

**Proximicine A, B und C - Totalsynthese und Struktur-Wirkungs-
beziehungen zu Kleine-Furche-Bindern
und Zellzyklusinhibitoren**

vorgelegt von
Diplom-Chemiker
Falko E. Wolter
aus Wernigerode

Von der Fakultät II – Mathematik und Naturwissenschaften
der Technischen Universität Berlin
zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Naturwissenschaften
- Dr. rer. nat. -

genehmigte Dissertation

Promotionsausschuss:

Vorsitzender:	Prof. Dr. rer. nat. Thomas Friedrich
Erster Bericht:	Prof. Dr. rer. nat. Roderich D. Süßmuth
Zweiter Bericht:	Prof. Dr. rer. nat. Michael Bienert

Tag der wissenschaftlichen Aussprache: 5. Dezember 2008

Berlin 2009

D 83

Zusammenfassung

Proximicine A, B und C - Totalsynthese und Struktur-Wirkungsbeziehungen zu Kleine-Furche-Bindern und Zellzyklusinhibitoren

Die Proximicine A, B und C sind neuartige Naturstoffe, die aus marinen Actinomyce-ten der Gattung *Verrucosispora* isoliert wurden. Es handelt sich um Dipeptide, die aus der neuartigen γ -Aminosäure 4-Aminofuran-2-carbonsäure als zentralem hetero-zyklischem Baustein aufgebaut sind. Am *N*-Terminus tragen alle drei Verbindungen eine ungewöhnliche Methylcarbamat-Funktionalität, während sie sich untereinander durch verschiedene C-terminale Substituenten unterscheiden. Die Proximicine zei-gen eine enge strukturelle Verwandtschaft zu den bekannten Naturstoffen Netropsin und Distamycin, die selektiv an AT-reiche Sequenzen in der kleinen Furche der DNA binden können. In beiden Naturstoffen taucht ein ähnliches Di- bzw. Tripeptid aus einer heterozyklischen γ -Aminosäure als Strukturmotiv auf. Dort ist der Furanring der Proximicine formal durch ein *N*-Methylpyrrol ersetzt. Trotz der engen strukturellen Verwandtschaft zeigen die Proximicine eine andere biologische Aktivität, wie in ers-ten Untersuchungen gezeigt werden konnte.

Im Rahmen der vorgelegten Arbeit wurde durch chemische Synthese und anschlie-ßende biologische Evaluierung verschiedener Derivate die Wirkweise der Proximici-ne näher untersucht. Dabei wurden drei unterschiedliche Ansätze verfolgt.

Zum einen wurden sogenannte Netropsin-Proximicin-Hybride entworfen und synthe-tisiert. Das heterozyklische Strukturmotiv des Netropsins wurde dabei mit den *N*- und C-terminalen Resten der Proximicine kombiniert. In anschließenden Arbeiten wurden weitere Substituenten am *N*- und C-Terminus eingeführt, so dass eine 19-gliedrige Substanzbibliothek erhalten wurde. Basierend auf Antitumortestungen der so erhal-tenen Derivate konnte eine erste SAR der Proximicine erarbeitet werden.

Zum anderen konnte im Rahmen der vorgelegten Arbeit die erste Totalsynthese der Proximicine A, B und C verwirklicht werden. Hierfür wurde eine synthetische Methode zum Aufbau der bisher nicht literaturbekannten 4-Aminofuran-2-carbonsäure in ge-schützter Form etabliert. Dieser Baustein wurde sowohl in der Totalsynthese als auch in der Synthese weiterer Verbindungen im Verlauf dieser Arbeit verwendet.

Abschließend konnte in einem dritten Ansatz die Grundstruktur der Proximicine so verändert werden, dass neuartige Kleine-Furche-Binder erhalten werden konnten. Dies wurde durch DNA-Schmelzanalysen nachgewiesen.

Teile der vorliegenden Arbeit wurden veröffentlicht:

Schneider, K., Keller, S., Wolter, F. E., Röglin, L., Beil, W., Seitz, O., Nicholson, G., Bruntner, C., Riedlinger, J., Fiedler, H.-P., Süssmuth, R. D.

"Proximicin A, B und C – antitumoraktive Furananaloga des Netropsins aus dem marinen Actinomyceten Verrucosispora induzieren die Hochregulation von p53 und des Cyclinkinase-Inhibitors p21"

Angew. Chem. **2008**, 120, 3302-3305; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, 47, 3258-3261.

Amicus certus in re incerta cernitur.

*Meinen lieben Eltern, Gernot, Leena, meiner Oma
und Kathrin
in Dankbarkeit gewidmet.*

Danksagung:

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Roderich D. Süßmuth für die Überlassung des spannenden Themas und die ausgezeichneten Arbeitsbedingungen. Darüber hinaus möchte ich mich für die stete Diskussionsbereitschaft, für zahlreiche konstruktive Hinweise und das freundschaftliche Verhältnis über die Arbeit hinaus bedanken.

Herrn Prof. Dr. M. Bienert danke ich für die bereitwillige Übernahme der zweiten Richterstattung.

Herrn Prof. Dr. O. Seitz und seinen Mitarbeitern Dr. L. Röglin und Dipl.-Chem. E. Socher danke ich für die Durchführung der DNA-Schmelzanalysen.

Bei Herrn Prof. Dr. W. Beil möchte ich mich für die Durchführung der Antitumortestungen bedanken.

Den Mitarbeitern des Instituts für Chemie danke ich für die gute Zusammenarbeit: Herrn Dr. R. Zeisberg für die Hilfestellung bei der Aufnahme von NMR-Spektren; Frau Klose für die Aufnahme von IR-Spektren; Herrn Dr. Höhne und Frau M. Schlangen für die Aufnahme der EI-, CI- und der FAB-Massenspektren. Mein Dank gilt auch Herrn D. Grimm für die stets prompte Anfertigung und Reparatur verschiedenster Glasapparaturen.

Vielen Dank Dipl.-Ing. Graeme Nicholson für die Durchführung der ESI-FT-ICR-MS-Messungen.

Sehr herzlich bedanke ich mich bei meinen Kollegen aus Tübingen und Berlin: Andreas Reicke, Anne Hänchen, Arun Mishra, Bojan Bister, Brian Davies, Caroline Schlosser, Christian Appelt, Daniel Bischoff, Diane Butz, Ellen Graf, Elvira Gottardi, Florian Oldach, Frank Dettner, Georg Sambeth, Hanna von Suchodoletz, Heiko Schadt, Jane Müller, Joanna Krawczyk, Jonny Nachtigall, Kathrin Schneider, Kati Winter, Mahsuni Atli, Maik Henkel, Marcelo Bertazzo, Pierre-Loic Saaidi, Sajeli Begum, Simone Keller, Soliman Helali, Stefan Pohle, Stefan Weist, Suada Turkanović, Sven Feifel, Timo Schmiederer, Todor Baramov und Wolfgang Müller. Ich möchte

mich bei allen für die große Hilfsbereitschaft und für die freundschaftliche, entspannte Atmosphäre bedanken. Simone Keller und Heiko Schadt danke ich insbesondere für die stets schnelle und unkomplizierte Messung von HPLC-MS-Proben.

Mein Dank gilt auch Lise Molinari für die Synthese von zahlreichen Vor- und Zwischenstufen und Endprodukten.

Suada möchte für die angenehme Zusammenarbeit im Labor in Tübingen und in Berlin danken.

Diane und Timo bin ich für eine tolle Zeit in Berlin innerhalb und außerhalb des Labors dankbar. Es waren einfach drei schöne Jahre in Berlin.

Kathrin danke ich für ihr Verständnis und ihre stete Aufmunterung während meiner Promotion. Das hat mir viel Kraft gegeben. Vielen Dank auch für zahlreiche fruchtbare wissenschaftliche Diskussionen.

Meinen lieben Eltern danke ich von Herzen für ihr Vertrauen und ihre Unterstützung während meiner Studienzeit und meiner Promotion. Herzlich danken möchte ich auch Gernot und Leena.

Inhaltsverzeichnis

I	ALLGEMEINER TEIL	1
1	EINLEITUNG	1
1.1	<i>DNA als target für small molecules und Proteine</i>	4
1.2	<i>Die Proximicine A, B und C</i>	26
2	SYNTHESE UND BIOLOGISCHE EVALUIERUNG VON NETROPSIN-PROXIMICIN-HYBRIDEN	30
2.1	<i>Synthese von Netropsin-Proximicin-Hybriden mit N-Methylpyrrol-Grundstruktur</i>	31
2.2	<i>Biologische Evaluierung der Netropsin-Proximicin-Hybride</i>	37
2.3	<i>Zusammenfassung und Diskussion der Ergebnisse</i>	42
3	TOTALSYNTHESE DER PROXIMICINE A, B UND C	45
3.1	<i>Retrosynthese der Proximicine</i>	46
3.2	<i>Synthesemethoden zur Darstellung von substituierten Furanen</i>	47
3.3	<i>Eigene Arbeiten zur Darstellung von 2,4-disubstituierten Furanen</i>	54
3.4	<i>Totalsynthese der Proximicine A, B und C</i>	60
3.5	<i>Zusammenfassung der Ergebnisse</i>	66
4	SYNTHESE UND BIOLOGISCHE EVALUIERUNG NEUARTIGER MINOR-GROOVE-BINDER BASIEREND AUF 4-AMINOFURAN-2-CARBONSÄURE	67
4.1	<i>Potentielle minor-groove-binder basierend auf 4-Aminofuran-2-carbonsäure</i>	67
4.2	<i>Synthese der potentiellen minor-groove-binder</i>	70
4.3	<i>Biologische Evaluierung</i>	81
4.4	<i>Zusammenfassung der Ergebnisse und Diskussion</i>	88
5	ZUSAMMENFASSUNG DER EINZELNEN THEMEN UND AUSBLICK	92
II	EXPERIMENTELLER TEIL	96
1	ALLGEMEINES	96
2	SYNTHESEVORSCHRIFTEN UND ANALYTISCHE DATEN DER EINZELNEN VERBINDUNGEN	100
2.1	<i>Synthese der Netropsin-Proximicin-Hybride A, B und C</i>	100
2.2	<i>Synthese der Substanzbibliothek von 19 Netropsin-Proximicin-Hybriden</i>	106
2.3	<i>Totalsynthese der Proximicine</i>	123
2.4	<i>Synthese der potentiellen minor-groove-binder</i>	131
3	NMR-SPEKTREN AUSGEWÄHLTER VERBINDUNGEN	150
4	KRISTALLOGRAPHISCHE DATEN	164
III	ANHANG	173
1	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	173
2	LITERATURVERZEICHNIS	175

I Allgemeiner Teil

1 Einleitung

Arzneistoffe, seien es Naturstoffe oder durch Synthesechemiker rational entworfene Verbindungen, stellen derzeit die wichtigste Möglichkeit dar, Erkrankungen des Menschen zu behandeln. Ihre Wirkung beruht auf der Wechselwirkung mit unterschiedlichen Zielstrukturen (*targets*) im menschlichen Organismus. Von besonderer Bedeutung ist dabei die Zelle, da sie die kleinste funktionelle Einheit des menschlichen Organismus bildet. Als Angriffsorte für Arzneistoffe innerhalb einer Zelle können die DNA, die RNA, Lipide und Proteine dienen. Allerdings ist die Anzahl der Arzneistoffe, die direkt mit Lipiden, der DNA oder RNA in Wechselwirkung treten gering. Die weitaus meisten Arzneistoffe interagieren mit Proteinen. Die Proteine lassen sich untergliedern in Enzyme, in Ionenkanäle, in Transporter und in Rezeptoren (Tabelle I-1).^[1]

Tabelle I-1. Molekulare Angriffspunkte für Arzneistoffe.^[1]

Angriffspunkt	Wirkprinzip	Beispiele
DNA	DNA-Crosslinker	N-Lostderivate (Zytostatika)
	DNA-Interkalator	Anthracycline (Zytostatika)
RNA	rRNA-Funktionshemmer	verschiedene Antibiotika: Aminoglykoside, Tetracycline, Oxazolidindione
Lipide	Oxidationsschutz	Vitamin E
Proteine: Enzyme	Enzymaktivatoren	Vitamine B ₁ , B ₂ , B ₆ und B ₁₂
	Enzymhemmer	ACE-Hemmer, HIV-Proteasehemmer, Cyclooxygenasehemmer
Proteine: Rezeptoren	Rezeptoragonisten	β-Sympathomimetika, Insulin, Vitamine A und D
	Rezeptorantagonisten	β-Blocker, AT ₂ -Rezeptorantagonisten
Proteine: Ionenkanäle	Kanalblocker	Calciumantagonisten vom Nifedipin-Typ
Proteine: Transporter	Transporthemmer	Hemmung der Wiederaufnahme von Monoaminen (Antidepressiva)

Ein Arzneistoff muss verschiedene Kriterien erfüllen, damit er eingesetzt werden kann. Insbesondere ist es notwendig, dass er eine spezifische Wechselwirkung mit dem entsprechenden *target*, dem molekularen Angriffspunkt, eingeht. So gibt es zum

Beispiel im menschlichen Organismus über 35000 Proteine. Ein möglicher Wirkstoff ist nur dann als solcher interessant, wenn er in pharmakologisch relevanten Konzentrationen an ein bestimmtes Protein selektiv binden kann. Ist seine Affinität zum *target* zu gering, dann bleibt er ohne Wirkung, erfolgt gar eine unspezifische Wechselwirkung mit mehreren Proteinen, so ist mit einer großen Zahl von Nebenwirkungen zu rechnen.^[1]

Die für einen pharmakologischen Effekt notwendige Wechselwirkung zwischen Wirkstoff und *target* erfolgt dabei meistens nach dem Schlüssel-Schloss-Prinzip, das von Emil Fischer erstmals postuliert wurde.^[2] Ein Wirkstoff (Ligand) muss demnach die passende Raumerfüllung (Größe) und die Gestalt (3D-Struktur) aufweisen, um eine gute Anbindung an den Rezeptor zu erzielen. Die Verfeinerung dieses Modells führte zu dem Modell des *induced fit*.^[3] Hierbei wird berücksichtigt, dass weder der Ligand noch der Rezeptor starre Konformationen besitzen. Durch die Annäherung beider kann es bei beiden zu Konformationsänderungen kommen, durch die dann erst der tatsächliche Komplex entsteht. Die molekulare Wechselwirkung zwischen Wirkstoff und Rezeptor beruht auf verschiedenen Mechanismen. Grundsätzlich kann zwischen kovalenter und nicht-kovalenter Wechselwirkung unterschieden werden. Die nicht-kovalenten Wechselwirkungen lassen sich weiter unterteilen in Wasserstoffbrückenbindungen, ionische Wechselwirkungen, hydrophobe Wechselwirkungen und Kation- π -Wechselwirkungen (Abbildung I-1).

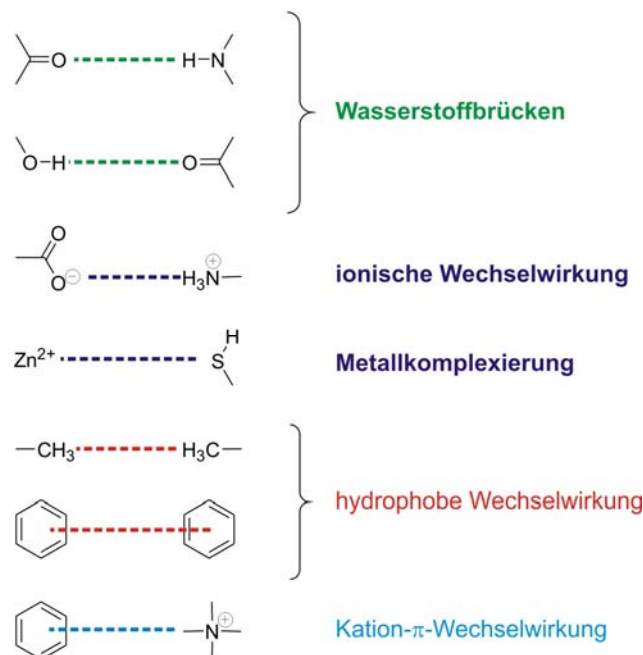


Abbildung I-1. Übersicht über grundlegende, nicht-kovalente molekulare Mechanismen der Wechselwirkung zwischen Ligand und Rezeptor.^[1]

Die Auswahl der Beispiele in Abbildung I-1 zeigt, dass die Wechselwirkung zwischen Ligand und Rezeptor durch eine Vielzahl von funktionellen Gruppen stabilisiert werden kann. Durch die Kombination mehrerer Wechselwirkungsmechanismen können sehr stabile Komplexe gebildet werden.

Die Suche nach neuen und verbesserten Arzneistoffen hat sich seit den Anfängen der Arzneimittelforschung stark verändert. Früher galt die Volksmedizin als einzige Quelle von Arzneimitteln. Erst durch die Einführung des Tierversuches als Modell für den kranken Menschen konnte eine systematische Suche nach neuen synthetischen Stoffen mit biologischer Wirkung beginnen. Dieser Ansatz wurde verfeinert und so weit möglich wurde der Tierversuch durch entsprechende *in vitro* Testsysteme ersetzt, die meist eine präzisere Untersuchung der Wirkweise eines möglichen Arzneimittels ermöglichen. Durch den Einsatz von Computern konnte unter Zuhilfenahme von Proteinkristallstrukturen und genauen Strukturinformationen der *targets* die Suche nach Arzneistoffen systematischer und effektiver durchgeführt werden. So wird heutzutage durch ein Screeningprogramm oftmals eine sogenannte Leitstruktur festgelegt, die bereits definierte Merkmale eines möglichen Arzneistoffes besitzt. Die Leitstruktur lässt sich untergliedern in das eigentliche Pharmakophor, das für die Wirkung verantwortlich ist, und in Haftgruppen, die die Bindung des Pharmakophors an den Rezeptor verstärken. Die Optimierung dieser Leitstruktur durch Neusynthese modifizierter Derivate, durch Semisynthese oder auch durch biotechnologische Ansätze ist ein iterativer Prozess an dessen Ende ein neuer Arzneistoff stehen kann.^[1] So können z.B. im Rahmen dieser Entwicklung funktionelle Gruppen eingeführt werden, die die Lipophilie des Moleküls verändern und somit die Aufnahme, den Transport und die Ausscheidung gezielt beeinflussen. Während des Entwicklungsprozesses eines Arzneimittels werden heutzutage meist die einzelnen historischen Entwicklungsschritte der Arzneimittelforschung in rückwärtiger Weise durchlaufen, so dass erst am Ende der Entwicklungsphase die Testung des Arzneistoffes am kranken Menschen durchgeführt wird.^[4]

Im folgenden Kapitel soll die DNA als ein mögliches *target* für Wirkstoffkandidaten und Arzneistoffe näher betrachtet werden.

1.1 DNA als *target* für *small molecules* und Proteine

1.1.1 Aufbau, Struktur und Organisation der DNA im Zellkern

Die Desoxyribonukleinsäure (DNA) ist der universelle Träger der genetischen Information in einfachen Prokaryoten, in Tieren, in Pflanzen und im Menschen. Die DNA ist eine Polymer aus mehreren Nucleotidbausteinen (Abbildung I-2). Ein Nucleotid besteht aus einem Zuckermolekül, der Desoxyribose, einer Phosphatgruppe, die sich am 5'-Ende des Zuckers befindet, und einer von vier unterschiedlichen Basen, die N-glykosidisch am C-2 des Zuckers gebunden ist. Die vier Basen werden unterteilt in Purin- und in Pyrimidin-Basen. Zu den Purin-Basen gehören Guanin (G) und Adenin (A), zu den Pyrimidin-Basen Cytosin (C) und Thymin (T). Die Nucleoside sind über die Phosphatgruppe zu einem linearen Polymer miteinander verbunden. Dadurch besitzt jeder dieser Stränge ein 3' und ein 5' Ende. Zwei dieser Stränge können zusammen in einer antiparallelen Ausrichtung eine Doppelhelix ausbilden. Dabei kommt es zu einer spezifischen Basenpaarbildung, den sogenannten Watson-Crick-Basenpaarungen (Abbildung I-2). Es bildet immer eine Purin- mit einer Pyrimidinbase ein Basenpaar aus: Guanin mit Cytosin und Adenin mit Thymin.

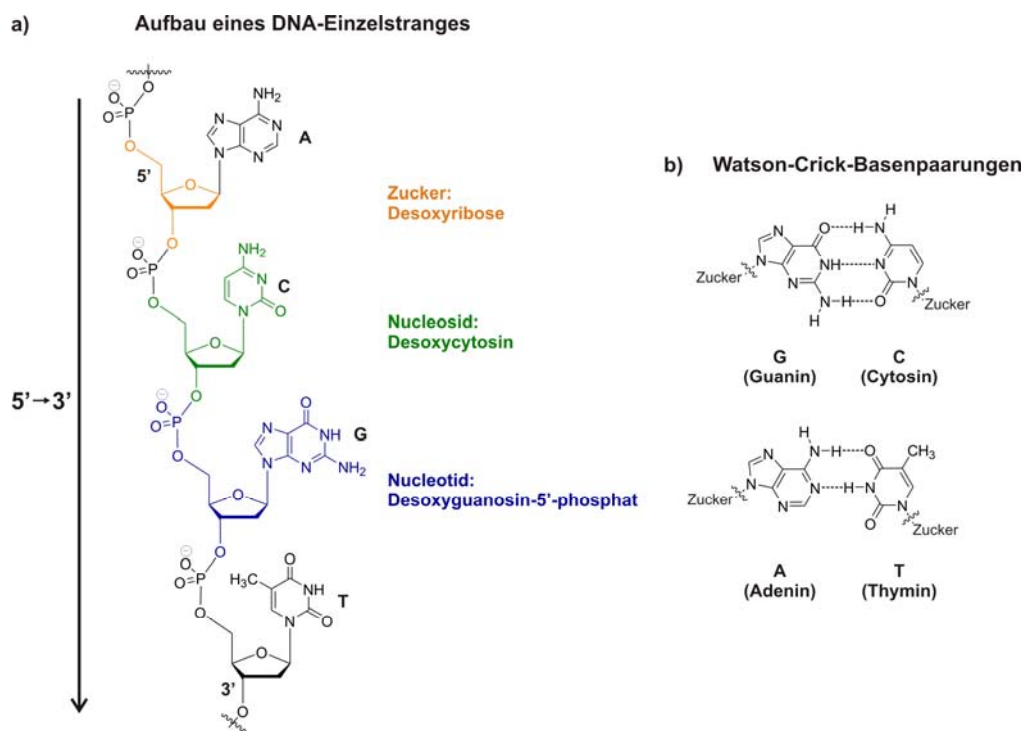


Abbildung I-2. Aufbau der DNA; a) Aufbau eines DNA-Einzelstranges mit Nomenklatur der einzelnen Elemente; b) Darstellung der Watson-Crick-Basenpaarungen mit eingezeichneten H-Brücken. Die Nucleobasen sind mit der üblichen Ein-Buchstaben-Bezeichnung abgekürzt.

Auf Grund der jeweiligen Struktur der Basenpaare kann sich eine unterschiedliche Anzahl von Wasserstoffbrückenbindungen ausbilden, die die Doppelhelix stabilisieren. In einer Watson-Crick-Basenpaarung können sich zwischen G und C drei H-Brücken ausbilden, während zwischen A und T nur zwei H-Brücken möglich sind. Die Häufigkeit einer Base in der DNA ist von Organismus zu Organismus unterschiedlich (Chargaff-Regel). Allerdings ist durch die spezifische Bindung von immer zwei Basenpaaren, der Gehalt von G und C oder A und T immer identisch (Chargaff-Regel). GC-reiche DNA ist durch die größere Anzahl von H-Brücken stabiler als AT-reiche DNA bei gleicher Anzahl an Basenpaaren. Im Strukturmodell der DNA liegen die Basenpaare im Inneren während die Phosphatgruppen und die Zuckerreste nach außen zeigen. Dadurch ergeben sich unterschiedliche Polaritäten. Das Äußere der DNA ist sehr polar, durch die Phosphatgruppen sogar negativ geladen, das Innere ist durch die aromatischen Basen vorwiegend unpolar.

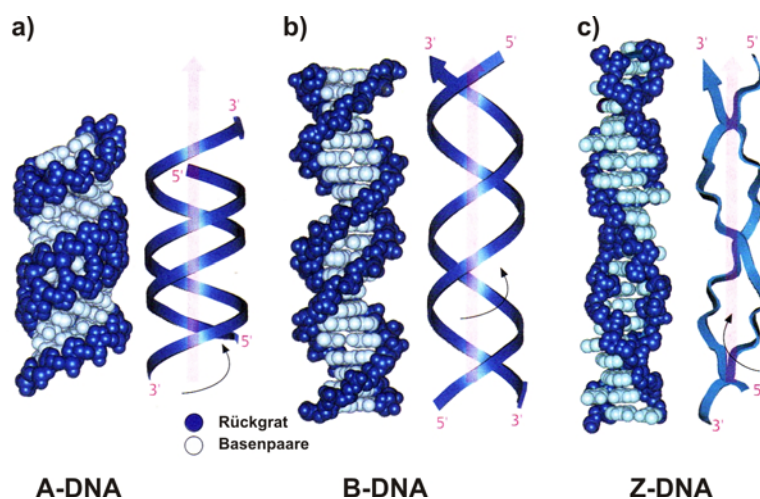


Abbildung I-3. Unterschiedliche Konformationen doppelsträngiger DNA. Gezeigt ist jeweils ein Kalottenmodell der Doppelhelix und eine schematische Vereinfachung mit angegebener Händigkeit der Helix; a) A-DNA, b) B-DNA und c) Z-DNA.^[5]

Die DNA kann als Doppelhelix in unterschiedlichen Konformationen auftreten (Abbildung I-3). Die in der Zelle häufigste Form ist die B-Form. Daneben gibt es aber auch noch die A und die Z-Form. Die A- und die B-Form sind rechtshändige Helices während die Z-Form linkshändig ist. A- und B-Form unterscheiden sich vornehmlich in der Anzahl der Basen, die für eine vollständige Umdrehung der Helix benötigt werden. In der B-Form sind es zehn Basen gegenüber elf in der A-Form. Dadurch ist die A-Form etwas kürzer und kompakter. Es bilden sich aber in beiden Formen durch die doppelhelikale Struktur immer zwei Einsenkungen im Strang aus, die man als

kleine und große Furche der DNA bezeichnet. Die große Furche tritt in der selteneren Z-Form nicht auf. Durch die noch kompaktere Form findet man zwölf Basenpaare für eine vollständige Umdrehung. Die Substituenten von Cytosin und Guanin ragen in die große Furche hinein und füllen sie dadurch aus.

Funktionell sind beide Stränge nicht äquivalent. Der Matrizenstrang, auch codogener Strang, ist derjenige, der während der RNA-Synthese abgelesen wird. Damit ist er komplementär zur gebildeten RNA. Der andere Strang wird Sinnstrang oder codierender Strang genannt. Da er komplementär zum Matrizenstrang ist, hat er die gleiche Sequenz wie der gebildete RNA-Strang, abgesehen von dem Austausch von T gegen Uracil (U) in der RNA. Deshalb werden Gensequenzen immer in 5'→3'-Richtung des Sinnstranges angegeben, da man so mit Hilfe des genetischen Codes sofort die Proteinsequenz vom N- zum C-Terminus erhält.

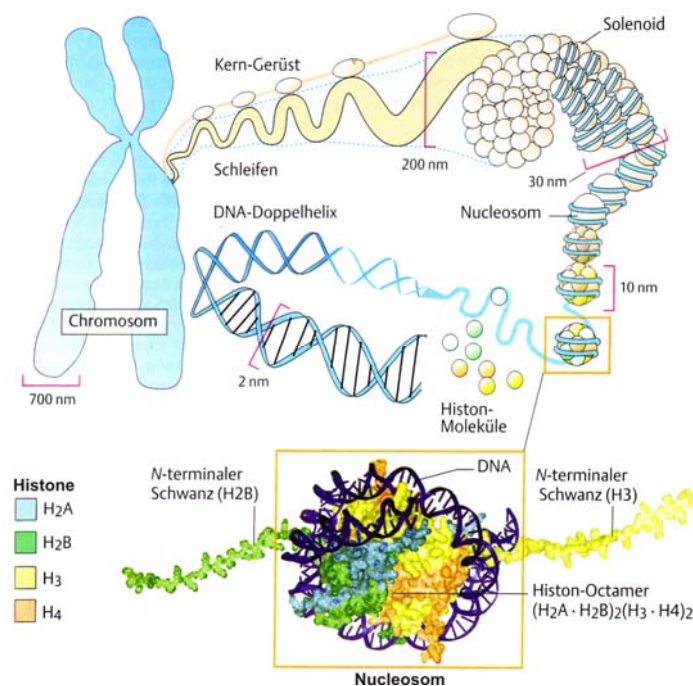


Abbildung I-4. Organisation des Chromatins mit einer Ausschnittsvergrößerung eines Nucleosoms im unteren Teil der Abbildung.^[5]

Der Zellkern einer menschlichen Zelle hat 46 Chromosomen. Jedes dieser Chromosomen besteht aus einer DNA-Doppelhelix, die, wenn man sie völlig strecken würde, eine Länge von ungefähr vier Zentimetern hätte. Dadurch ergäbe sich eine theoretische Länge von zwei Metern, wenn man alle Chromosomen aneinander reihen würde. Der Zellkern hat aber nur einen Durchmesser von 5 µm. Deshalb liegt die DNA in einer regelmäßigen Art wohlgeordnet in Proteinkomplexen assoziiert vor.

Diese Komplexe werden als Chromatin bezeichnet (Abbildung I-4). Die Doppelhelix ist mit Histonen assoziiert. Diese sind stark basische Proteine und neutralisieren so die negative Nettoladung der DNA. Die Histone bilden oktamere Komplexe, um die die DNA gewickelt ist. Diese Komplexe werden Nucleosome genannt. Sie bilden spiralförmige Solenoide als Überstrukturen aus, die einen ungefähren Durchmesser von 30 nm haben. Bei einer Zellteilung liegt die DNA kondensiert als Chromosom vor. Dabei bilden sich Schleifen aus den Solenoiden aus, die in gepackter Form die charakteristische Struktur der Chromosomen bilden.

1.1.2 Möglichkeiten der Interaktion von *small molecules* mit der DNA

Es gibt eine Reihe von Molekülen, die mit der DNA in Wechselwirkung treten können. Die Interaktion von *small molecules* aber auch die von biologisch relevanten Makromolekülen mit der DNA kann reversibel oder irreversibel erfolgen. Die reversible Interaktion kann in drei Klassen unterteilt werden (Abbildung I-5). Es kann zu einer rein elektrostatischen Wechselwirkung, zur Interkalation zwischen den Basenpaaren oder auch zur Bindung in die kleine oder in die große Furche der DNA kommen. Neben der reversiblen Interaktion eines Moleküls mit der DNA kann es auch zur Alkylierung und in einer weiteren Folge zum Strangbruch kommen. Dann handelt es sich um eine irreversible Wechselwirkung.

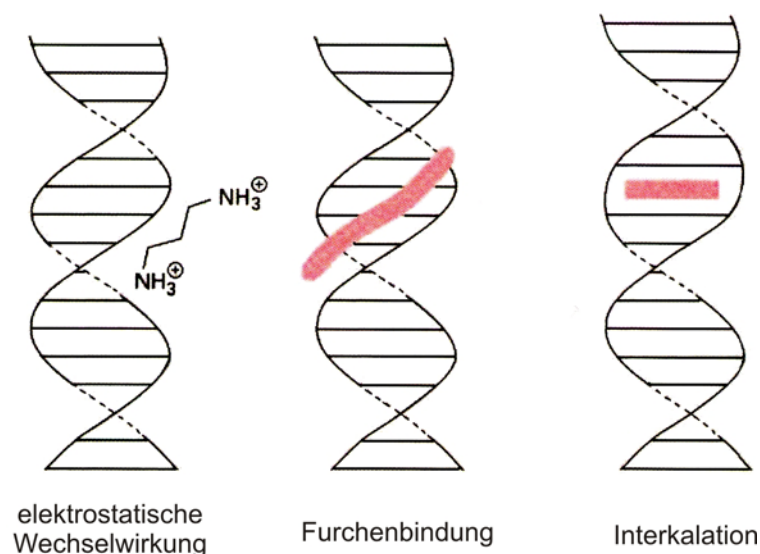


Abbildung I-5. Möglichkeiten der reversiblen Wechselwirkung von Molekülen mit doppelhelikaler DNA.^[6]

Die DNA besitzt an ihrem Rückgrat durch die Phosphatgruppen ein Überschuss an negativen Ladungen. Dadurch können eine Vielzahl von Kationen und auch

Wassermoleküle an die DNA binden und stabilisieren sie so in unterschiedlichen Sekundärstrukturen. Das Entfernen der Gegenionen vom Rückgrat kann zum einen einen positiven energetischen Beitrag liefern, denn dadurch erhöht sich die Entropie des Gesamtsystems. Auf der anderen Seite kann sich durch den Verlust der ionischen Wechselwirkung die Enthalpie des Systems verändern. Allgemein lässt sich aber sagen, dass diese elektrostatischen Wechselwirkungen unspezifischer Natur sind und nicht von einer bestimmten DNA-Sequenz abhängen.

Beide Furchen eines doppelhelikalen DNA-Strangs (Abbildung 1-3) unterscheiden sich sowohl in ihrer elektronischen als auch in ihrer sterischen Charakteristik. Proteine, wie z.B. das Zinkfingerprotein, binden bevorzugt spezifisch in die große Furche der DNA. Die kleine Furche ist wesentlich schmaler und enger. Deshalb binden dort bevorzugt kleinere Moleküle (*small molecules*) unter Verdrängung der dort gebundenen Wassermoleküle. Diese Binder sind meist flach, bestehen aus einem aromatischen System, sind aber dennoch flexibel genug, um sich optimal in die kleine Furche einzupassen. Außerdem besitzen sie eine sichelförmige Grundstruktur und sind dadurch annähernd isohelikal mit der DNA. Die bekanntesten Vertreter dieser Substanzklasse sind Netropsin und Distamycin. Sie binden spezifisch an AT-reiche Sequenzen in der DNA. Ihr Wirkmechanismus soll genauer im Kapitel 1.1.3 beleuchtet werden.

Interkalation ist der dritte Mechanismus, nach dem Moleküle mit der DNA in Wechselwirkung treten können. Interkalatoren sind im allgemeinen starre planare Moleküle mit einem teilweise über mehrere Ringe ausgeprägten π -Elektronensystem. Sie schieben sich zwischen die Basenpaare der DNA und es kommt zu einer π - π -Wechselwirkung des Elektronensystems des Interkalators mit den aromatischen Ringen der Basenpaare. Die Haupttriebkraft der Bindung ist die Desolvatation des unpolaren Moleküls durch Interkalation zwischen die Basenpaare. Dadurch kommt es praktisch rechtwinklig zur helikalen Achse der DNA zu liegen. Die Interkalation bewirkt, dass die Basenpaare etwas voneinander getrennt werden, was wiederum die regelmäßige Struktur des Rückgrats stört. Allerdings wird die Watson-Crick-Basenpaarung durch die Interkalation nicht gestört. Trotzdem ist es für DNA-bindende Enzyme nicht mehr möglich in der korrekten Weise mit der DNA in Wechselwirkung zu treten. So kann z.B. eine DNA-Polymerase unter diesen Bedingungen den DNA-Strang nicht mehr richtig ablesen. Die meisten Interkalatoren binden nicht sequenzspezifisch an die DNA.

Es gibt aber auch Interkalatoren, die eine gewisse Spezifität aufweisen. Dactinomycin (1), das in den 1940er Jahren aus einem Streptomyceten als Actinomycin D isoliert wurde, besitzt eine antitumorale Aktivität und wird seit den 1950er Jahren unter dem Namen Cosmegen® als Medikament eingesetzt.^[7, 8] Das aromatische Phenoxazin-Grundgerüst interkaliert zwischen die Basenpaare der DNA, und inhibiert so in Abhängigkeit von der Konzentration die DNA-Replikation oder die RNA-Synthese. Neben einem aromatischen Molekülteil besitzt Dactinomycin zwei Cyclodepsipeptid-Seitenketten. Diese bilden H-Brücken und van-der-Waals-Bindungen zur DNA aus und stabilisieren so zusätzlich den Komplex (Abbildung I-6). Dabei kommen diese Seitenketten in der kleinen Furche der DNA zu liegen. Die Bindung ist abhängig von der Gegenwart von Guanin. Nur dann kann sich eine stabile H-Brücke zwischen der Aminogruppe des Guanins und einem Threonin aus der Seitenkette des Dactinomycins ausbilden. Die Ausbildung dieser H-Brücke ist für die Sequenzspezifität verantwortlich. Synthetische Strukturvariationen im Peptidteil von Actinomycin führen zu einem dramatischen Verlust an Antitumoraktivität, so dass für diese Molekülklasse wenig Spielraum für strukturell vereinfachte Wirkstoffe besteht.

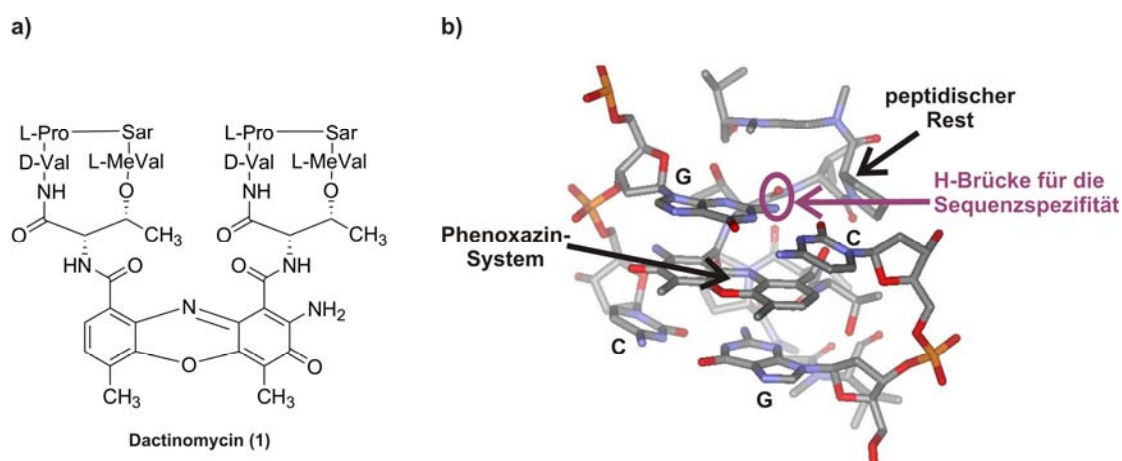


Abbildung I-6. a) Struktur von Dactinomycin (Actinomycin D); b) Ausschnitt aus einem Dactinomycin-DNA-Komplex (PDB 1FJA). Die Interkalation erfolgt spezifisch zwischen GC-Basenpaare auf Grund einer stabilisierenden H-Brücke. Die Basenpaare sind mit großen Buchstaben gekennzeichnet.

Neben der hier vorgestellten Auswahl an reversibel bindenden Molekülen gibt es auch Wechselwirkungen mit der DNA, die irreversibel sind. Zunächst sollen im folgenden DNA-Alkylanzien beschrieben werden.

Die bekannteste Verbindung dieser Gruppe ist Senfgas (**2**), das nach seinen Entwicklern Lommel und Steinkopf (Kaiser-Wilhelm-Institut, 1916) auch Lost (**2**) genannt wird. Dabei handelt es sich um Bis(2-chlorethyl)sulfid (Abbildung I-7). Lost wurde im Ersten Weltkrieg als Giftgas eingesetzt. Neben dieser Anwendung als chemische Waffe wurde aber bereits 1931 seine Potenz als antitumoraler Wirkstoff durch direkte Injektion in menschliche Tumore erkannt.^[6, 9] Allerdings war seine Wirkung zu toxisch, als dass es für eine medizinische Anwendung in Frage gekommen wäre. Deshalb wurde systematisch nach weniger toxischen Derivaten gesucht und man fand diese in den weniger reaktiven *N*-Lost-Derivaten.^[10] Allerdings haben nur wenige dieser Derivate therapeutische Bedeutung erlangt (Abbildung I-7).

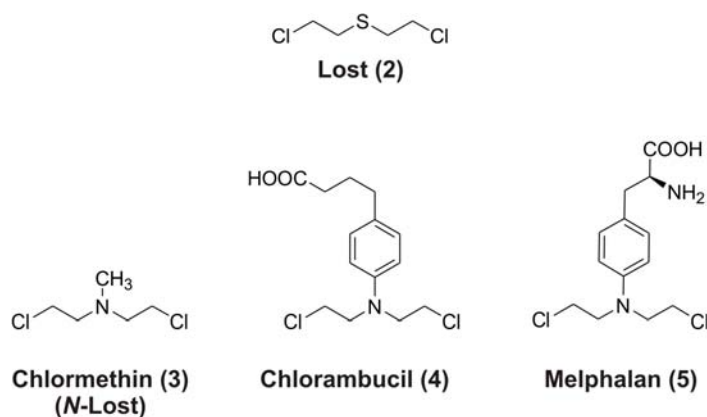
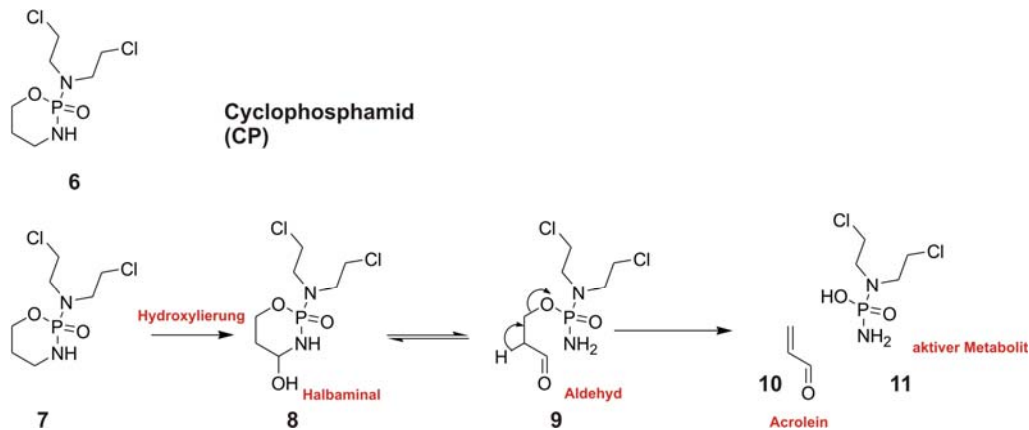


Abbildung I-7. Eine Auswahl von DNA-Alkylanzien. Gezeigt ist die Stammverbindung Lost und darunter drei weniger toxische *N*-Lost-Derivate, die Anwendung als Wirkstoffe finden.

Der Wirkmechanismus von *N*-Lost-Derivaten basiert auf einer intramolekularen nucleophilen Substitution des Chloratoms durch Stickstoff. Dadurch entsteht ein reaktives Aziridiniumion, das nucleophile funktionelle Gruppen der DNA alkylieren kann. Die Reaktionsgeschwindigkeit der S_Ni -Reaktion ist abhängig von der Nucleophilie des Stickstoffs. Durch unterschiedliche Reste an dieser Position lässt sich die Reaktivität der *N*-Lost-Derivate steuern. Durch Protonierung wird die Nucleophilie des Stickstoffs gänzlich aufgehoben, so dass auch über den pH eine Steuerung der Reaktivität möglich ist. Durch die Bifunktionalität der *N*-Lost-Derivate kann es zur Quervernetzung der DNA kommen.

Neben diesen sehr reaktiven Antitumorstoffen gibt es auch *N*-Lost-Derivate, die erst durch eine Bioaktivierung in eine reaktive Spezies überführt werden. Man spricht in einem solchen Fall von Prodrugs. Eines dieser Prodrugs ist Cyclophosphamid (**6**) (Schema I-1). Durch metabolische Hydroxylierung in 4-Position des Ringes entsteht

ein Halbaminal (**8**), das im Gleichgewicht mit der entsprechenden Aldehydform (**9**) steht. Durch eine Eliminierungsreaktion wird dann neben Acrolein (**10**) der aktive Metabolit (**11**) gebildet. Die Hydroxylierung findet in der Leber statt. Der Oxaphosphinanring ist stabil genug, damit das Prodrug oral verabreicht werden kann.



Schema I-1. Beispiel für ein Prodrug, das erst durch Bioaktivierung in den aktiven Metaboliten überführt wird. Im oberen Teil ist die Struktur des Cyclophosphamids gezeigt, im unteren Teil die metabolische Aktivierung in der Leber.

Neben der irreversiblen kovalenten Bindung von Wirkstoffen oder der Quervernetzung der DNA durch Alkylanzien, gibt es auch Wirkstoffe, die zunächst reversibel an die DNA binden und nachfolgend durch eine chemische Reaktion einen Strangbruch verursachen. Dies sind beispielsweise die Bleomycine (**12, 13**), eine Familie strukturell verwandter Glykopeptide, die aus *Streptomyces verticillus* isoliert wurden (Abbildung I-8). Sie binden sequenzspezifisch an die DNA und führen durch eine metallabhängige Aktivierung von molekularem Sauerstoff zu einem Strangbruch in der DNA oder RNA.

Die Bleomycine sind in der Lage, Fe^{2+} -Ionen zu komplexieren (Abbildung I-8). Dabei werden fünf Positionen des Koordinationsoktaeders durch Stickstoffatome des Bleomycins besetzt. Die letzte verbleibende Position wird durch molekularen Sauerstoff besetzt. Dieses derart aktivierte Bleomycin bindet nun an die DNA. Die Bisthiazoleinheit interkaliert zwischen die Basenpaare und ionische Wechselwirkungen der Seitenkette mit dem Phosphatrückgrat der DNA stabilisieren den Komplex zusätzlich. Durch die Aktivierung des an das Eisen gebundenen Sauerstoffs kommt es dann zu einer oxidativen Spaltung des DNA-Stranges.

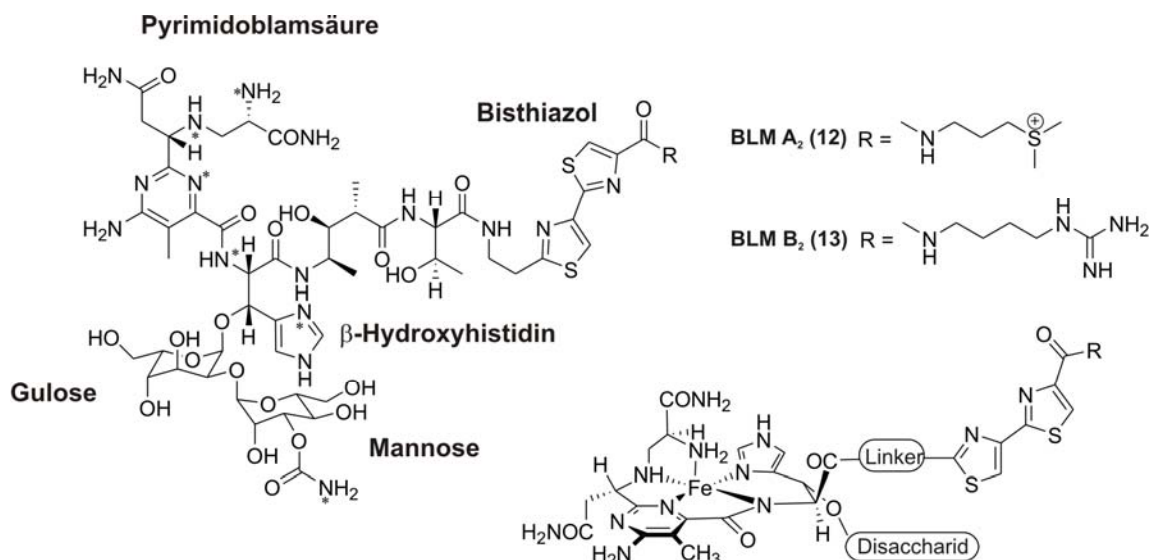


Abbildung I-8. Strukturen von Bleomycin A2 (12) und B2 (13) und ein Modell eines möglichen Bleomycin-Fe²⁺-Komplexes. Sterne (*) markieren mögliche Koordinationsstellen für das Eisen (Fe²⁺).

1.1.3 Die Naturstoffe Netropsin und Distamycin als Beispiele für reversibel an die DNA bindende Moleküle

Netropsin (14) und Distamycin (15) sind natürlich vorkommende heteroaromatische γ -Oligopeptide (Abbildung I-9). Netropsin, das in der Literatur auch Congocidin genannt wird, wurde 1951 aus *Streptomyces netropsis* isoliert und seine Struktur 1967 aufgeklärt^[11, 12]. Distamycin wurde 1964 aus demselben Bakterium isoliert.^[13] Die Grundstruktur von Netropsin besteht aus einem Dipeptid der γ -Aminosäure *N*-Methyl-4-aminopyrrol-2-carbonsäure. Die Grundstruktur von Distamycin besteht aus dem entsprechenden Tripeptid. Beide Substanzen tragen C-terminal eine Amidinseitenkette, während sie sich N-terminal unterscheiden. Im Fall von Distamycin ist der *N*-Terminus formyliert, Netropsin dagegen trägt dort eine Guanidinoessigsäure. Beide Substanzen sind sehr prominent, weil es die ersten bekannten natürlich vorkommenden Peptide waren, die selektiv an AT-reiche Sequenzen der kleinen Furche doppelsträngiger DNA binden.^[14-18] Darüber hinaus zeigen sie antivirale, antibakterielle und antitumorale Aktivität.^[19-22]

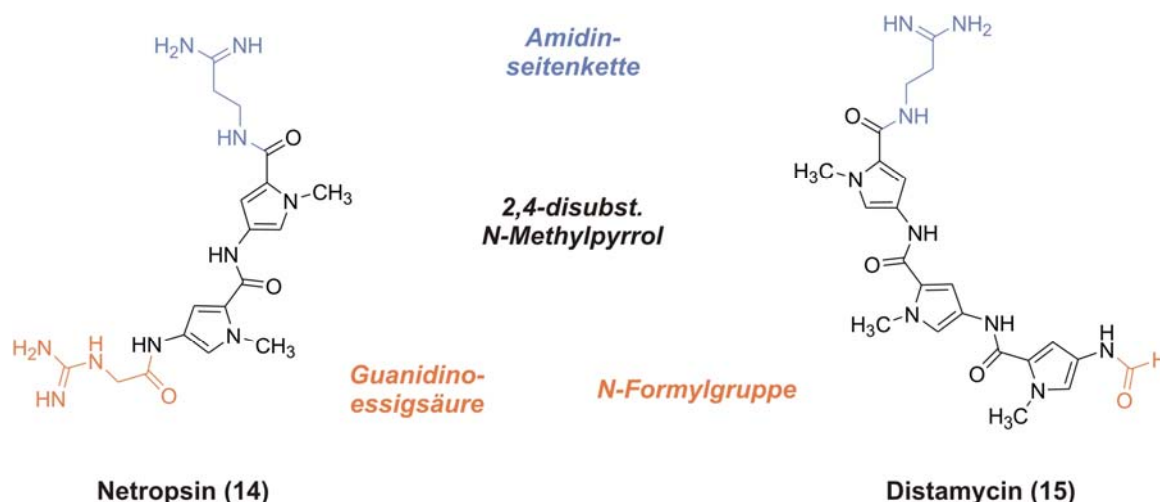


Abbildung I-9. Strukturen von Netropsin (14) und Distamycin (15). Die strukturellen Merkmale und Gemeinsamkeiten sind farblich hervorgehoben.

Die selektive Erkennung bestimmter DNA-Sequenzen nimmt einen wichtigen Punkt bei der gesteuerten Aktivierung und Inaktivierung von Genen ein, so dass im folgenden der Wirkmechanismus von Netropsin und Distamycin genauer erläutert werden soll. Eine DNA-Doppelhelix bildet zwei Furchen aus, die kleine (minor groove) und die große (major groove) Furche. An die letztere binden vornehmlich Proteine, wie z.B. Zinkfingerproteine, während die relativ flache und enge kleine Furche der DNA die Bindungsstelle für z.B. Netropsin und Distamycin darstellt.^[23, 24]

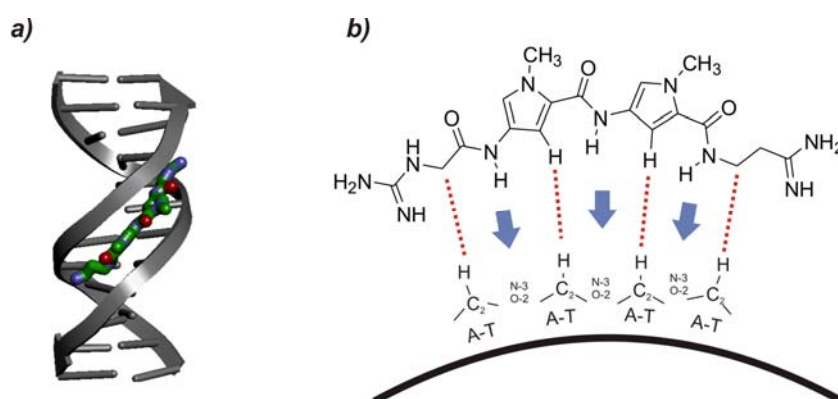


Abbildung I-10. Bindungsmodus von Netropsin in die kleine Furche der DNA. a) 1:1-Komplex von Netropsin mit doppelhelikaler DNA^[25]; b) an der Bindung an eine AT-Sequenz beteiligte Wechselwirkungen (blaue Blockpfeile: H-Brücken in Donor-Akzeptor-Richtung, rote gestrichelte Linie: hydrophobe Wechselwirkungen).^[15]

Netropsin bindet an AT-reiche Sequenzen in einer 1:1 Stöchiometrie (Abbildung I-10). Dies konnte zuerst durch NMR-Spektroskopie nachgewiesen werden.^[26] Dabei tragen insbesondere drei Faktoren zu einer Stabilisierung des Komplexes bei. Zum einen bilden sich Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den NH-Amiden und den

N-3-Atomen des Adenins bzw. den O-2-Atomen des Thymins aus. Zum anderen ermöglicht die sichelförmige Struktur des Netropsin eine hohe Passgenauigkeit für die Einlagerung in die kleine Furche. So kommt es zu einem sehr engen Kontakt zwischen Ligand und Rezeptor der durch van-der-Waals-Kontakte unterstützt wird. Den dritten Beitrag liefern ionische Wechselwirkungen zwischen dem negativ geladenen Rückgrat der DNA und dem unter physiologischen Bedingungen positiv geladenen Liganden.^[15] Lediglich einen geringen weiteren Beitrag liefert der Entropiegewinn, der durch die Verdrängung von gebundenen Wassermolekülen durch Netropsin, entsteht.^[27] Es wird vermutet, dass die van-der-Waals-Kontakte ausschlaggebend für die sequenzspezifische Erkennung sind.

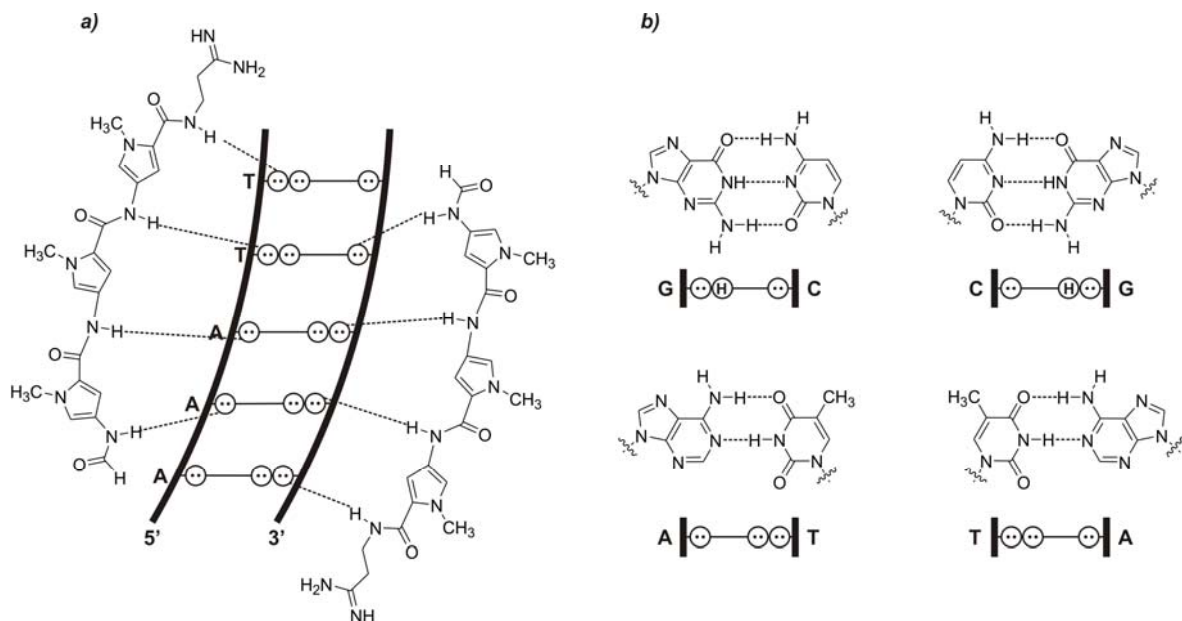


Abbildung I-11. a) Bindungsmodus von Distamycin in einer 2:1-Stöchiometrie in die kleine Furche der DNA; b) schematische Darstellung der Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Basenpaaren und jeweils darunter vereinfacht die elektronische Situation in der kleinen Furche bei dem entsprechenden Basenpaar: Kreis mit Punkten steht für ein freies Elektronenpaar, Kreis mit H steht für ein in die kleine Furche zeigendes H-Atom.^[28]

Im Gegensatz zu Netropsin kann Distamycin neben einer 1:1-Stöchiometrie auch in einer 2:1-Stöchiometrie an die DNA binden (Abbildung I-11). Die jeweilige Stöchiometrie ist dabei sowohl von der Konzentration der DNA bzw. des Wirkstoffs als auch von der Basenpaarabfolge in der Sequenz abhängig.^[29, 30] Mindestens fünf A-T-Basenpaare sind nötig, damit sich dieser Komplex ausbilden kann. In Titrationsexperimenten mit einer AAATT-Sequenz und Distamycin wurde gefunden, dass sich zunächst ein 1:1-Komplex ausbildet und erst nach weiterer Erhöhung der

Konzentration an Distamycin sich der 2:1-Komplex bildet.^[31] Aus den Experimenten konnte abgeschätzt werden, dass die Bindungskonstante für die Anbindung des ersten Distamycin-Moleküls ungefähr um den Faktor zehn größer ist als die für die Bindung des zweiten Distamycins. Im 2:1-Komplex liegen beide Distamycine antiparallel und leicht gegeneinander verschoben übereinander in der kleinen Furche der DNA. Dabei sind jeweils zwei gegenüberliegende Heterozyklen an der Bindung zu einem Basenpaar beteiligt. Netropsin kann auf Grund von elektrostatischer Abstoßung der Seitenketten nicht in dieser Stöchiometrie binden.^[32]

Durch NMR-Bindungsstudien und durch *DNase footprinting assays* konnte die spezifische Orientierung des Distamycins bei der Bindung in die kleine Furche nachgewiesen werden.^[33, 34] Dabei befindet sich der *N*-Terminus immer am 5'-Ende des entsprechenden DNA-Stranges. Für Netropsin konnte diese Vorzugsorientierung nicht nachgewiesen werden. Hier sind beide Orientierungen energetisch gleichwertig.^[34]

1.1.4 Von Distamycin und Netropsin abgeleitete heteroaromatische Polyamide mit dDNA-Affinität

Die selektive Erkennung bestimmter DNA-Sequenzen durch *small molecules* wäre gleichbedeutend mit dem gezielten Ein- und Ausschalten bestimmter Genfunktionen. Man erhoffte sich dadurch, beispielsweise die Expression von Onkogenen gezielt zu steuern. Für das Design dieser Liganden dienten die Regeln der molekularen Erkennung von Netropsin und Distamycin. Die Spezifität der selektiven Erkennung AT-reicher DNA-Sequenzen durch Netropsin und Distamycin war Ausgangspunkt für die Synthese zahlreicher Derivate dieser beiden Naturstoffe. Zunächst wollte man basierend auf den Erkenntnissen zu bevorzugten Sequenzbindungsmotiven rational entworfene Strukturen synthetisieren, die in der Lage sein sollten, spezifisch an GC-reiche Sequenzen der DNA zu binden. In weiteren Studien wurde die spezifische Erkennung von DNA-Sequenzen aus Permutationen aller vier unterschiedlicher Basenpaare erreicht.

Zunächst waren die Synthesen von Bindemolekülen darauf gerichtet, längere DNA-Sequenzen zu erkennen. Dementsprechend wurden Netropsin- und Distamycin-Derivate synthetisiert, die mehr als drei repetitive *N*-Methylpyrrole (Py) als zentrale Aminosäure besitzen. Bis zu sechs *N*-Methylpyrrolcarboxamide wurden aneinander geknüpft. Dabei wurde festgestellt, dass *n*-1 Heterozyklen oder *n* Amidbindungen an

eine Sequenz aus $n+1$ Basenpaare binden können.^[35, 36] Mit sechs Heterozyklen wurde die natürliche Grenze erreicht, weil Heterozyklen und Amidbindungen längerer Oligopeptide nicht mehr direkt über den entsprechenden Bindungspositionen der Basenpaare zu liegen kamen. Ligand (Netropsin/Distamycin-Derivat) und Rezeptor (DNA) sind sozusagen außer Phase geraten. Untersuchungen ergaben, dass ein *N*-Methylpyrrolcarboxamid ungefähr 20 % zu lang ist, um ideal ein Basenpaar abzudecken.^[37] Dem wurde versucht entgegenzuwirken, indem verschiedene Linker nach einer bestimmten Anzahl von Carboxamiden eingefügt wurden. Als Linker wurden neben Alkyl- und Alkenketten auch verschiedene Alicyclen, Heterocyclen und Peptide verwendet. So konnten bis zu zehn aufeinanderfolgende AT-Basenpaare erkannt werden.^[15] Idealerweise sollte aber eine Erkennung von 15 bis 16 Basenpaaren erreicht werden, um aus statistischen Gründen eine eindeutige DNA-Sequenz spezifisch abdecken zu können (bei $\sim 3 \times 10^9$ Basenpaaren für ein humanes Genom).^[22] Dies gelang zum ersten Mal der Arbeitsgruppe von Peter B. Dervan (Caltech, Pasadena, USA).^[38] Durch Verknüpfung von drei Polyamiden, die jeweils aus vier *N*-Methylpyrrolen bestehen, mit einem β -Alaninlinker konnte eine Sequenz aus 16 Basenpaaren erkannt werden (Abbildung I-12).

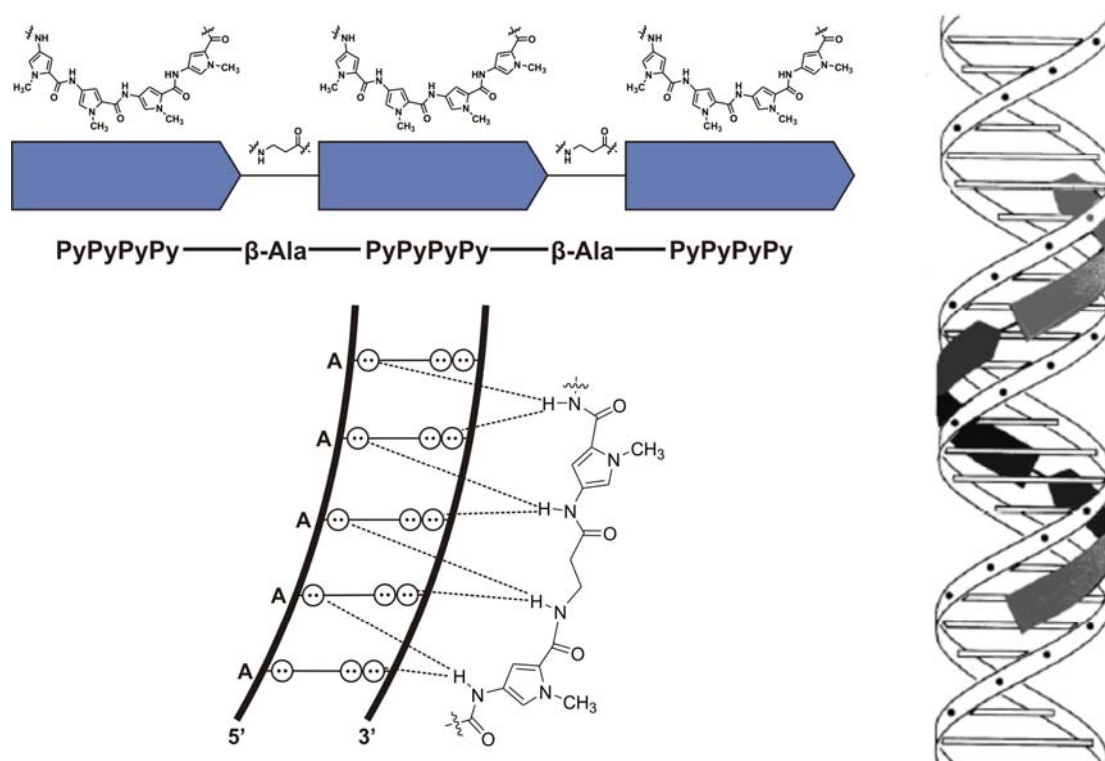


Abbildung I-12. Erkennung einer 16 bp langen AT-Sequenz durch ein Polyamid bestehend aus drei Untereinheiten die jeweils mit einem β -Alaninlinker miteinander verbunden sind.^[38]

Neben synthetischen Arbeiten basierte ein anderer Ansatz auf *molecular modelling* Rechnungen. Diese sagen für eine Reihe hypothetischer „verkürzter“ Netropsine oder Distamycine bessere Bindungswerte voraus als für die entsprechenden Stammverbindungen. Verkürzt in dem hier verwendeten Sinn bedeutet, dass entweder die Carbonylgruppe oder die Aminogruppe aus den die Heterozyklen verknüpfenden Peptidbindungen entfernt wurden. Weil diese Verbindungen isohelikal mit der DNA sind, wurden sie Isolexine (**16** und **17**) genannt (Abbildung I-13).^[37, 39] Die quantenchemischen Rechnungen ergaben, dass beide Verknüpfungen grundsätzlich möglich sind, dass aber die Verknüpfung der Heterozyklen über eine Carbonylfunktion zu einer günstigeren Wechselwirkung mit einer AT-reichen Sequenz führt. Der Beitrag der Carbonylfunktion kann sogar den Effekt anderer Heterozyklen (z.B. Imidazol statt Pyrrol, s. unten), die zu einer veränderten Spezifität führen würden, kompensieren. Die Verknüpfung über eine Aminofunktion hingegen besitzt keinen dirigierenden Einfluss. Hier wird die Spezifität ausschließlich durch die Heterozyklen bestimmt.^[39]

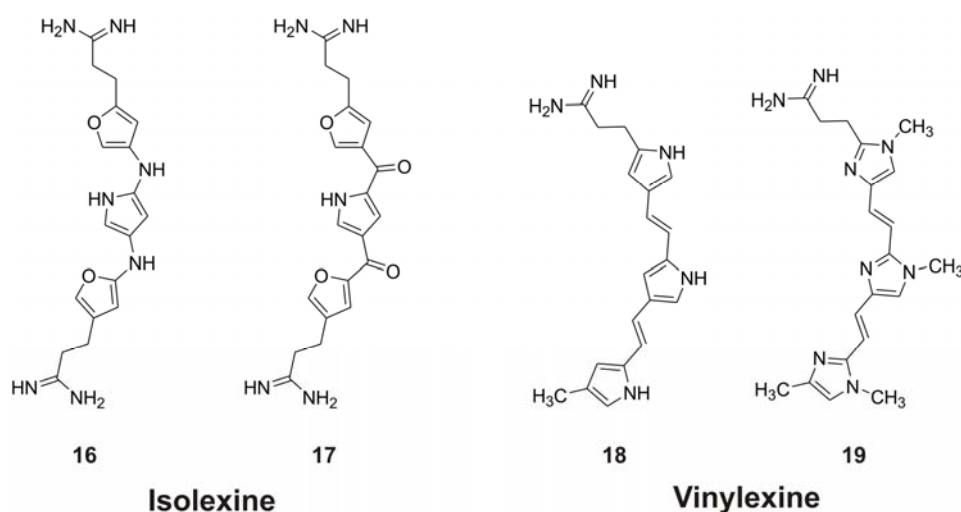


Abbildung I-13. Eine Auswahl an Isolexinen und Vinylexinen, die basierend auf quantenchemischen Rechnungen in die kleine Furche der DNA binden sollen.

In weiterführenden theoretischen Arbeiten wurden die Heterozyklen über Vinylgruppen miteinander verbunden (Abbildung I-13) und ihre Bindungseigenschaften ebenfalls quantenmechanisch berechnet. Auch für diese sogenannten Vinylexine wurde eine bessere Passgenauigkeit in die kleine Furche vorhergesagt.^[40] Die quantenchemischen Rechnungen zeigten, dass der Ersatz der verknüpfenden Aminogruppe der Isolexine durch Vinylgruppen für eine gegebene Spezifität zu einer höheren Bindungsenergie mit der DNA führen sollten.^[40] Die

Autoren folgerten daraus, dass nicht allein die Anzahl der möglichen Wasserstoffbrückendonoren und -akzeptoren für eine Wechselwirkung mit der DNA entscheidend ist, sondern die gesamte elektronische Struktur eines potentiellen Liganden betrachtet werden muss. Die aus den Rechnungen erhaltenen Daten konnten bisher noch nicht experimentell bestätigt werden, da noch keines dieser postulierten Derivate synthetisiert wurde.

Neben ersten synthetischen Arbeiten, die zunächst meist mit *N*-Methylpyrrol als zentralem heterozyklischem Grundkörper durchgeführt wurden, wurde in weiteren Ansätzen der Einbau anderer heterozyklischer Aminosäuren in das Grundgerüst von Distamycin verfolgt. Dabei sollte vor allem eine Veränderung der sequenzspezifischen Erkennung durch die Liganden erzielt werden.

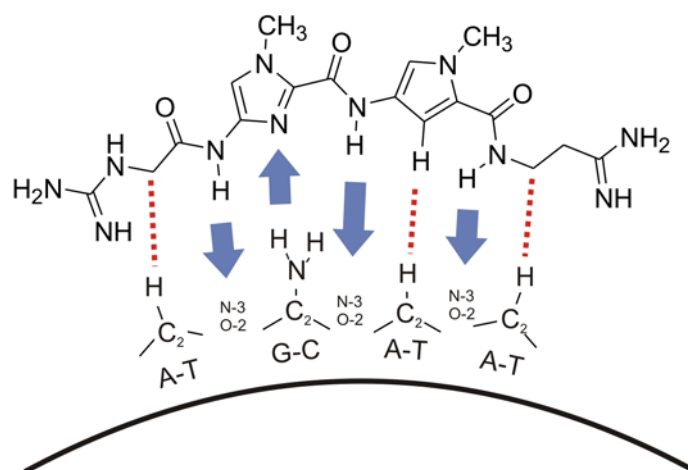


Abbildung I-14. Erkennung eines G•C-Basenpaares durch ein *N*-Methylimidazolcarboxamid. Schematische Darstellung des Bindungsmodus und der beteiligten Wechselwirkungen (blaue Blockpfeile: H-Brücken in Donor-Akzeptor-Richtung, rote gestrichelte Linie: hydrophobe Wechselwirkungen).^[22]

Aus den Strukturuntersuchungen von Netropsin- oder Distamycin-DNA-Komplexen war ersichtlich, dass eine Bindung an GC-reiche Sequenzen vor allem durch die Aminogruppe am C-2 von Guanin behindert wird. Diese Aminogruppe zeigt direkt in die kleine Furche der DNA und es kommt dadurch zu einer negativen sterischen Wechselwirkung mit der CH-Gruppe des *N*-Methylpyrrolrings. Untersuchungen mit synthetischen DNA-Sequenzen, bei denen Guanin-Derivate eingebaut wurden, die diese Aminogruppe nicht trugen, oder Adenin-Derivate mit an dieser Stelle künstlich eingebauter Aminogruppe, unterstützten diese Vermutungen.^[41, 42] In einem ersten Versuch wurde deshalb das *N*-Methylpyrrolcarboxamid durch das entsprechende *N*-Methylimidazolderivat ersetzt.^[43, 44] Dadurch wird die behindernde sterische

Wechselwirkung mit der Aminogruppe des Guanins aufgehoben und zusätzlich ein Wasserstoffbrückenbindungsakzeptor an dieser Position angeboten (Abbildung I-14).^[22, 45]

Tatsächlich zeigen Derivate mit einem Imidazolcarboxamid, sie wurden allgemein Lexitropsine genannt, eine Bindungsaktivität an GC-Sequenzen. Daraufhin wurde eine Vielzahl von synthetischen Derivaten hergestellt, bei denen neben Imidazol auch Thiazole, Oxazole, Triazole und andere Heterozyklen als Carboxamid-Bausteine verwendet wurden (Abbildung I-15).

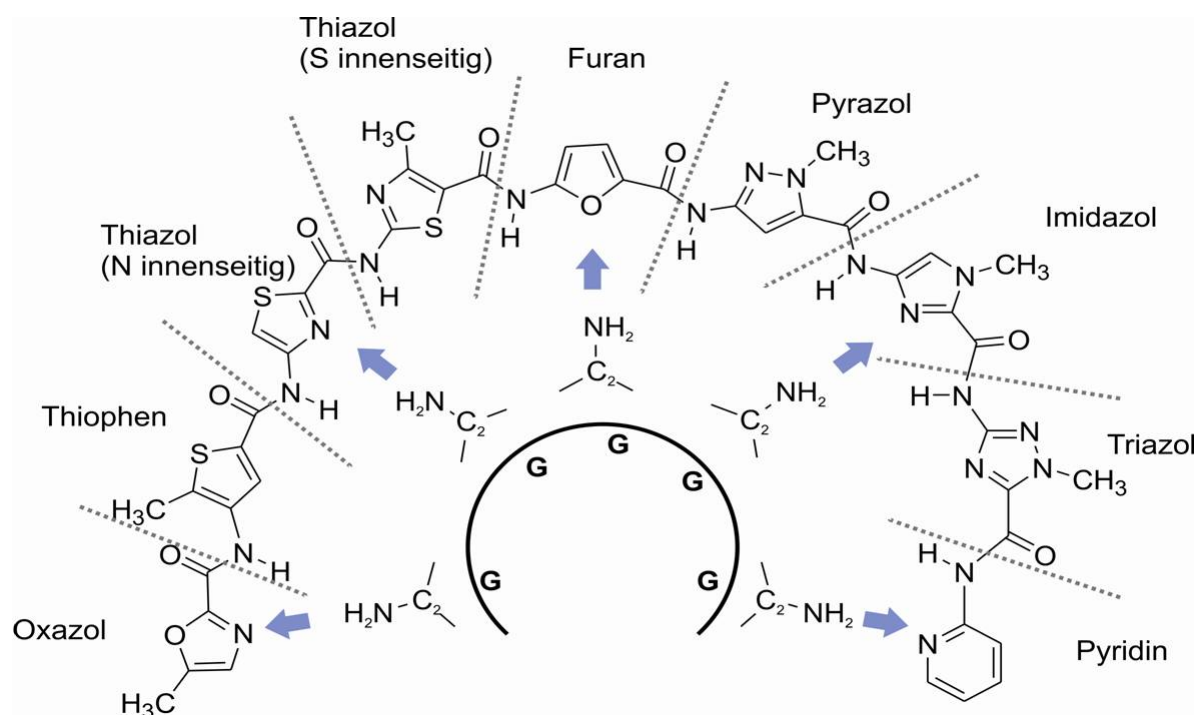


Abbildung I-15. Übersicht über eine Auswahl der Heterozyklen, die in Distamycin-Derivaten verwendet wurden, um eine GC-Spezifität zu erreichen.^[15] Blaue Blockpfeile zeigen Wasserstoffbrücken in Donor-Akzeptor-Richtung zwischen der Aminogruppe am C-2 von Guanin und den Heteroatomen.

So wurden Liganden entworfen, die an eine Sequenz mit ein oder auch zwei GC-Basenpaarungen innerhalb einer Sequenz von AT-Basenpaarungen binden konnten. Thiazol-Ringe zeigen dabei eine Besonderheit, da entweder der Schwefel oder aber der Stickstoff in die kleine Furche zeigen können. Im ersten Fall erfolgt keine Bindung in die kleine Furche, da der Schwefel einen zu großen sterischen Anspruch ausübt.^[46] Zusätzlich konnte durch die Verwendung von chiralen Linkern zwischen den heterozyklischen Aminosäuren eine bessere Bindung an die DNA erreicht werden, sofern die Stereochemie so günstig war, dass sich der Ligand isohelikal in DNA einpassen konnte. Unter all diese Liganden befand sich keiner, der selektiv an

eine Abfolge von GC-Basenpaarungen binden konnte. Es wurden lediglich GC-Basenpaare innerhalb einer AT-Sequenz toleriert.

Von Distamycin war bekannt, dass es sowohl in einer 1:1-Stöchiometrie als auch in einer 2:1-Stöchiometrie in die kleine Furche binden kann (Kapitel 1.1.3). Die Anwendung dieses Konzepts auf die Lexitropsine führte zur Entwicklung eines Homodimers basierend auf einem Distamycin-Derivat mit zwei Imidazol- und zwei *N*-Methylpyrrolcarboxamiden (Abbildung I-16).^[47] Dies war der erste Ligand der selektiv an eine Abfolge von GC-Sequenzen binden konnte.

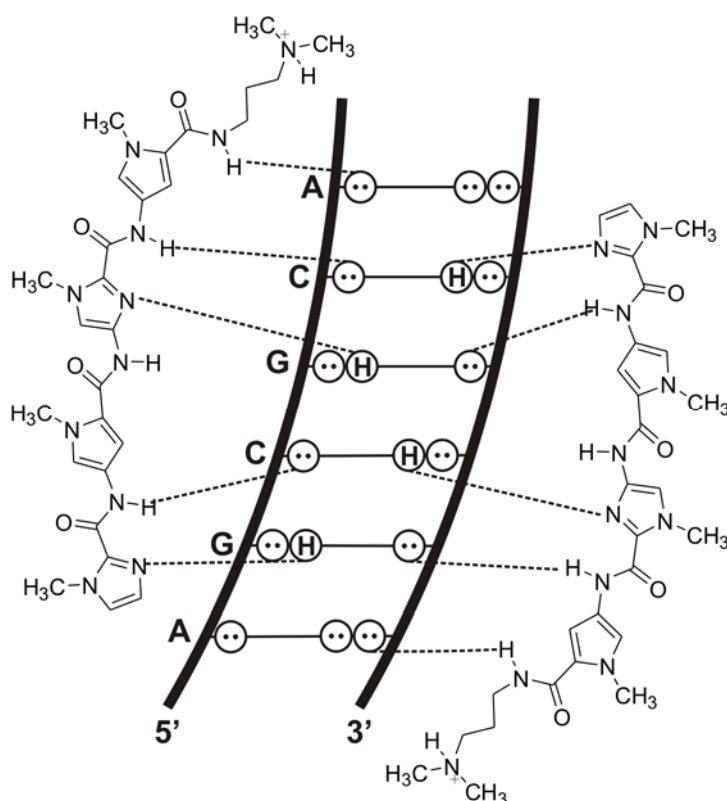


Abbildung I-16. Erstes spezifisch an eine GC-Sequenz bindendes Polyamid in 2:1-Stöchiometrie.^[47] Schematische Darstellung der Bindungsverhältnisse analog zu Abbildung I-11.

Die 2:1-Stöchiometrie der Liganden wurde in weiteren Ansätzen künstlich hergestellt, indem zwei Lexitropsine über einen flexiblen Linker derart miteinander verknüpft wurden, dass eine antiparallele Orientierung der Liganden erzwungen wurde. Dadurch entstanden die sogenannten Haarnadel-Polyamide.^[48] Sie besitzen eine höhere Spezifität gegenüber den Homodimeren. Durch die kovalente Verknüpfung und durch Variation der heterozyklischen Carboxamide konnten Liganden hergestellt werden, die Abfolgen aller vier Basenpaare erkennen können.^[49] Diese Liganden sind in ihrer Affinität und auch in ihrer Spezifität vergleichbar mit DNA-bindenden

Proteinen, also z.B. mit Transkriptionsfaktoren.^[50] Schließlich konnten sogenannte Paarungsregeln für die Erkennung bestimmter Sequenzen aufgestellt werden. Aus den Arbeiten zur Erkennung von GC-Sequenzen wusste man, dass die Verwendung von *N*-Methylimidazol (Im) eine stabilisierende Wechselwirkung mit der Aminogruppe des Guanins ermöglicht (Abbildung I-14). Als Paar mit *N*-Methylpyrrol (Py) in einem Haarnadelpolyamid konnte die Abfolge GC von der Abfolge CG unterschieden werden (Abbildung I-17).^[51] Befindet sich das Imidazol auf der Seite der Guanin-Base kann sich ausgehend von dem freien Elektronenpaar des N-Atoms des Imidazols eine H-Brücke zur Aminogruppe des Guanins ausbilden. Der daraus resultierende Winkel liegt ungefähr bei 160° und ist damit nah an dem günstigsten Winkel für eine H-Brücke von 180°. Würde sich das Imidazol über dem Cytosin befinden, würde eine H-Brücke in einem Winkel von ungefähr 106° entstehen, wenn man den Winkel ausgehend von der Position des gegenüberliegenden Pyrrols abschätzt. Dieser Wert ist sehr ungünstig und würde stark von dem spitzesten Winkel von 132°, der bisher für eine Zwei-Zentren-H-Brücke gefunden wurde, abweichen.^[52]

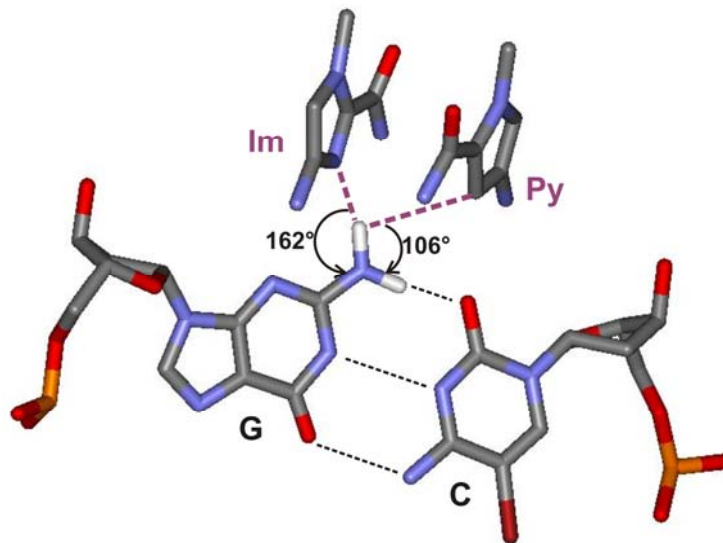


Abbildung I-17. Ausschnitt aus dem Polyamid ImImPyPy-β-Dp gebunden an eine GC-reiche DNA-Sequenz (PDB 365D). Dargestellt ist ein vergrößerter Ausschnitt der Bindung eines Im/Py-Paares an ein GC-Basenpaar. Nur wenn sich das Im auf der Seite von G befindet kann sich eine günstige H-Brücke ausbilden. H-Brücken sind gestrichelt eingezeichnet.

Die Unterscheidung einer AT- von einer TA-Abfolge gelang erst später. Sowohl Adenin als auch Thymin besitzen in der kleinen Furche einen H-Brückenakzeptor (Abbildung I-11b). Allerdings ist auch hier eine Unterscheidung möglich. Zwischen dem O-2 des Thymins und dem C-2 des Adenins befindet sich eine unsymmetrische

Lücke. Außerdem besitzt der Sauerstoff des Thymins zwei freie Elektronenpaare während das N-3 des Adenins nur ein freies Elektronenpaar besitzt. Dies wurde in einem computerbasierten Design ausgenutzt und *N*-Methyl-3-hydroxypyrrol (Hp) als idealer Heterozyklus gefunden (Abbildung I-18).^[53]

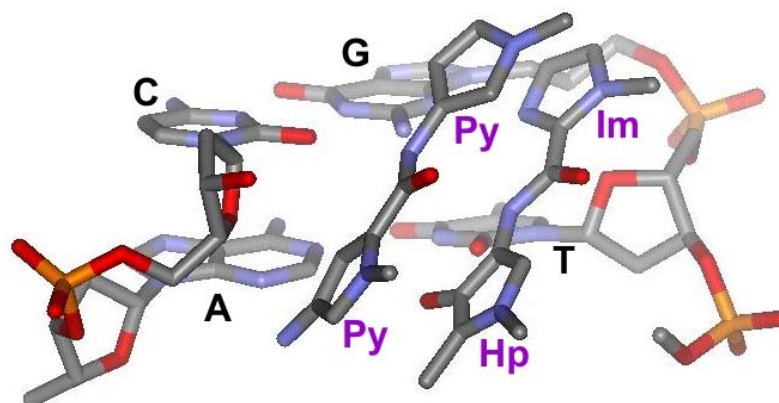


Abbildung I-18. Ausschnitt aus dem Polyamid ImHpPyPy- β -Dp gebunden an eine AGTACT-Sequenz (PDB 407D). Im oberen Teil ist die sequenzspezifische Erkennung eines C•G-Paares durch Py/Im, im unteren Teil die eines A•T-Paares durch Py/Hp gezeigt.^[54]

Tatsächlich war es somit durch ein Hp/Py-Paar möglich die Abfolge von AT von der von TA zu unterscheiden (Tabelle I-2).^[53]

Das generelle Strukturmotiv dieser Haarnadelpolyamide besteht aus acht heterozyklischen Ringen, in denen der C-Terminus des einen Polyamids über einen γ -Aminobuttersäure-Linker mit dem N-Terminus des anderen Polyamids verbunden ist. Dabei orientiert sich wie beim Distamycin (Abbildung I-11) das Polyamid N $\rightarrow$ C in Richtung von 5' $\rightarrow$ 3' am DNA-Strang. Diese Haarnadelpolyamide binden aber lediglich an sechs aufeinanderfolgende Basenpaare. Durch Substitution eines Py-Rings durch einen β -Alanin-Rest (β) ist es aber möglich bis zu 16 Basenpaare zu adressieren.^[55, 56] Einer anderen Strategie folgend wurden zwei Haarnadelpolyamide über einen Linker miteinander verbunden, um so bis zu elf und zwölf Basenpaare selektiv zu erkennen.^[28]

Tabelle I-2. Paarungsregeln in Haarnadelpolyamiden zu selektiven Erkennung bestimmter Basenpaarungen (Py: *N*-Methylpyrrol, Im: *N*-Methylimidazol, Hp: *N*-Methyl-3-Hydroxypyrrol).^[28]

	C•G	G•C	A•T	T•A
Py/Im	+	-	-	-
Im/Py	-	+	-	-
Py/Hp	-	-	+	-
Hp/Py	-	-	-	+

Es wurde außerdem versucht, die Gruppe der drei heteroaromatischen Aminosäuren der Paarungsregeln (Tabelle I-2) zu erweitern. Besonders vor dem Hintergrund der biologischen Evaluierung der Liganden in Tiermodellen, bei denen Fragestellungen nach der Bioverfügbarkeit, nach dem Metabolismus, nach der Pharmakokinetik u.a. hinzukommen, wollte man eine Bibliothek von fünfgliedrigen Heterozyklen aufbauen, um die unterschiedlichen Heterozyklen gegeneinander austauschen zu können.^[57, 58] Dabei wurden vor allem unterschiedliche Modifikationen auf der Seite der Heterozyklen eingeführt, die in die kleine Furche der DNA zeigt (Abbildung I-19).

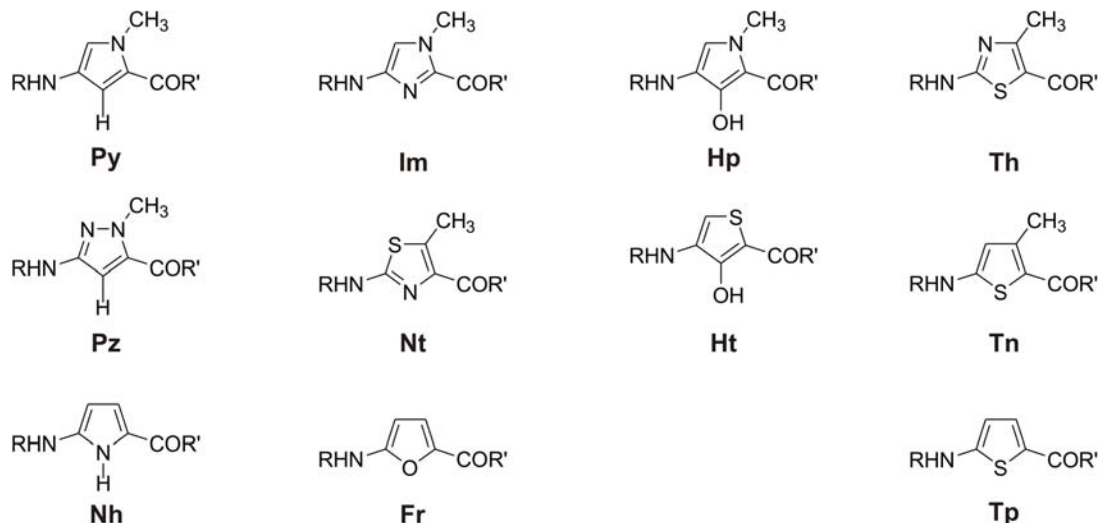


Abbildung I-19. Übersicht über fünfgliedrige Heterozyklen, die in der Arbeitsgruppe von P. B. Dervan synthetisiert wurden.^[58, 59] Die Funktionalitäten, die in die kleine Furche zeigen, sind nach untenweisend dargestellt. Unter jeder Aminosäure findet sich der übliche Zwei-Buchstaben-Code.

Durch die unterschiedlichen Heteroatome im Ring und die verschiedenen Substitutionsmuster ist trotz Isosterie und Isolobalanalogien die exakte Geometrie einer jeden dieser Aminosäuren unterschiedlich. Daraus ergeben sich auch unterschiedliche Sichelformen in den entsprechenden Polyamiden. Aus den

Untersuchungen von Distamycin, Netropsin und ihren Derivaten mit *N*-Methylpyrrol (Py) als heterozyklischem Grundkörper weiß man, dass die Abfolge von Py-Resten eine eigentlich zu starke Krümmung der Sichelform der Polyamide verursacht, wenn man dies mit der entsprechenden Krümmung in der DNA vergleicht. Eine Abschwächung der Krümmung würde demnach zu einer besseren Passgenauigkeit des Polyamids führen und somit wäre eine Bindung auch empfindlicher für kleine Veränderungen der Geometrie oder der elektronischen Situation in der kleinen Furche. Für den Einbau von 2,5-disubstituiertem Methylthiophen (Tn) (Abbildung I-20) konnte dies durch quantenchemische Rechnungen gezeigt werden, während der Einbau eines 2,5-disubstituierten Furans (Fr) in die Polyamide zu einer wesentlich stärkeren Krümmung der Polyamide führte und somit die Bindung stark beeinträchtigt werden sollte (Abbildung I-20).^[57]

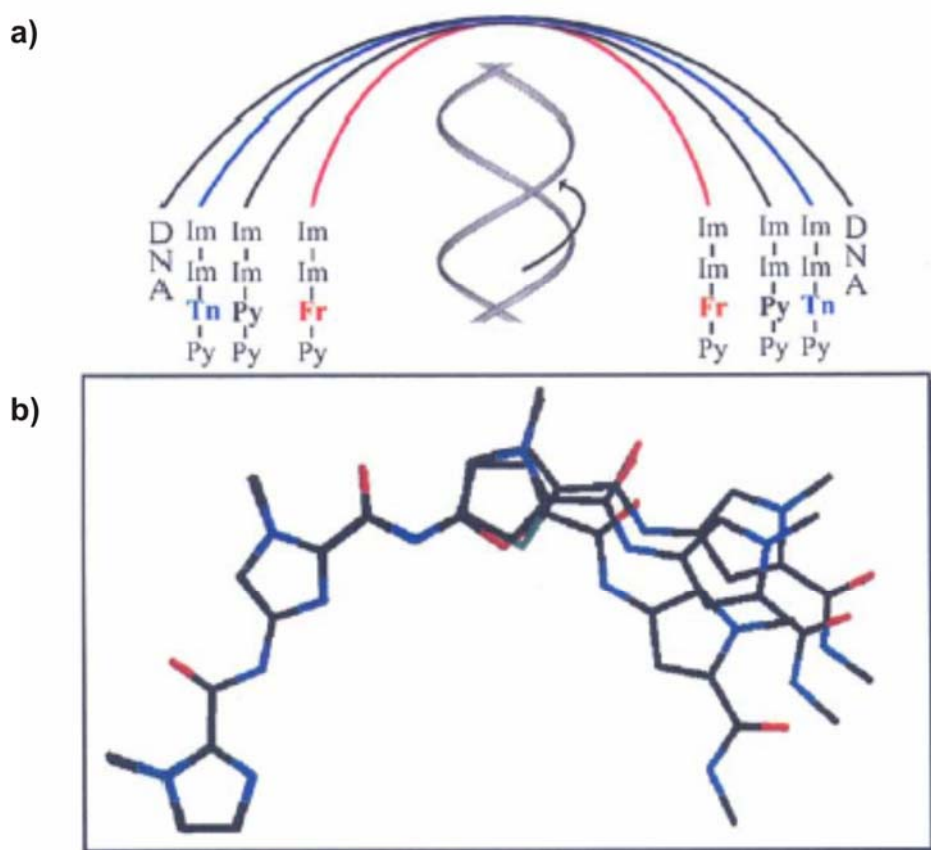


Abbildung I-20. a) Schematische Darstellung der Krümmung verschiedener Polyamide im Vergleich zur Krümmung der DNA; b) *ab initio* Rechnungen der in a) dargestellten Polyamide. Die drei Strukturen sind übereinandergelegt (Abbildung der Original-Literatur entnommen).^[16]

Vielversprechender erscheinen die Ansätze neben neuen Fünfringheterozyklen neue anellierte Fünfring-Sechsring-Systeme, wie z.B. Benzimidazole oder Imidazopyridine, zu verwenden (Abbildung I-21). Sie wurden als Isostere für Dipeptide der bekannten Fünfringheterozyklen in einem rationalen Ansatz entworfen (Abbildung I-21). So konnten neue Paare und entsprechende Paarungsregeln für die selektive Erkennung spezifischer DNA-Sequenzen aufgestellt werden.^[60, 61]

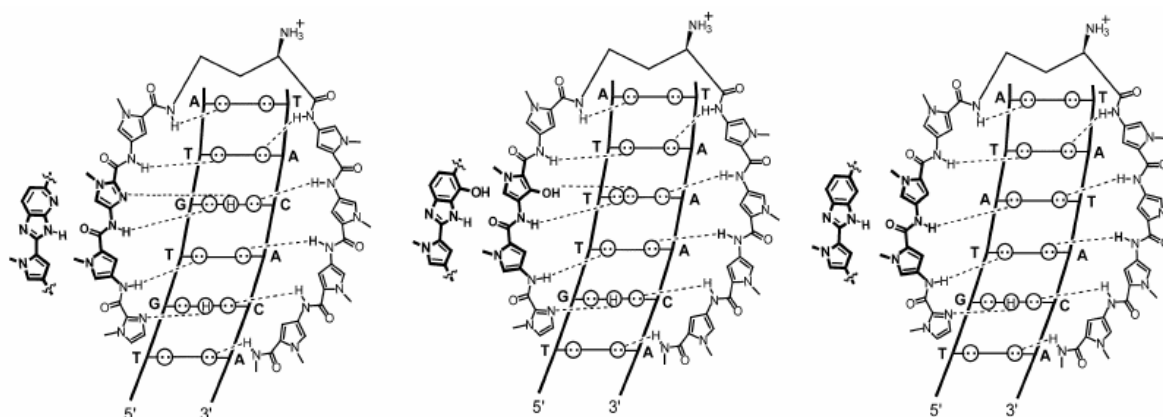


Abbildung I-21. Beispiele für den isosteren Ersatz von Dipeptid-Einheiten in bekannten Polyamiden durch Benzimidazole oder Imidazopyridine. Die analogen Struktur motive sind fett hervorgehoben (Abbildung aus der Originalliteratur übernommen).^[60]

Die Anwendung der hier vorgestellten spezifischen Liganden in Zelllinien oder lebenden Organismen, um definierte DNA-Sequenzen *in vivo* zu erkennen, ist bisher nur eingeschränkt möglich. Die Liganden zeigen zwar eine teilweise hohe Affinität an isolierte DNA-Abschnitte werden aber im Fall von Zelllinien teilweise kaum in den Zellkern aufgenommen.^[28] Dies konnte mit Hilfe von fluoreszenzmarkierten Polyamiden nachgewiesen werden. Bisher gibt es keine allgemein gültigen Kriterien, die die Aufnahme dieser Verbindungen in den Zellkern garantieren können. Weder die Größe eines Polyamids, noch sein Imidazol-Gehalt, die Anbindung eines zur Detektion verwendeten Fluoreszenzfarbstoffs, noch die Struktur der C-terminalen Seitenketten scheinen einen definierten Einfluss auf die Aufnahme auszuüben.^[62]

Ein Beispiel für die erfolgreiche Verwendung eines Polyamid-Liganden zur Steuerung der Genexpression in einem *in vivo* System ist die Inhibition der Anbindung des Transkriptionsfaktors TFIIA an ein 5S RNA Gen in Nierenzellen eines Krallenfroschs der Gattung *Xenopus*.^[63]

1.2 Die Proximicine A, B und C

Im Rahmen eines chemischen Screenings nach strukturell neuen Sekundärmetaboliten, das in der Arbeitsgruppe von Prof. H.-P. Fiedler (Eberhard-Karls-Universität Tübingen) durchgeführt wurde, wurden zwei verschiedene *Verrucosisspora*-Stämme untersucht. Beide stammten aus marinen Habitaten. Der eine, *Verrucosisspora* sp. MG37, wurde aus einer Sedimentprobe des Raune Fjords in Norwegen, die in einer Tiefe von 250 m genommen wurde, isoliert. Der andere, *Verrucosisspora* sp. AB-18-32, entstammte ebenfalls einer Sedimentprobe, die in der Sagami Bay in Japan in einer Tiefe von 289 m genommen wurde. Beide Stämme wurden an der Universität Tübingen fermentiert.^[64] Die HPLC-DAD-Chromatogramme des Screening sind in Abbildung I-22 dargestellt.

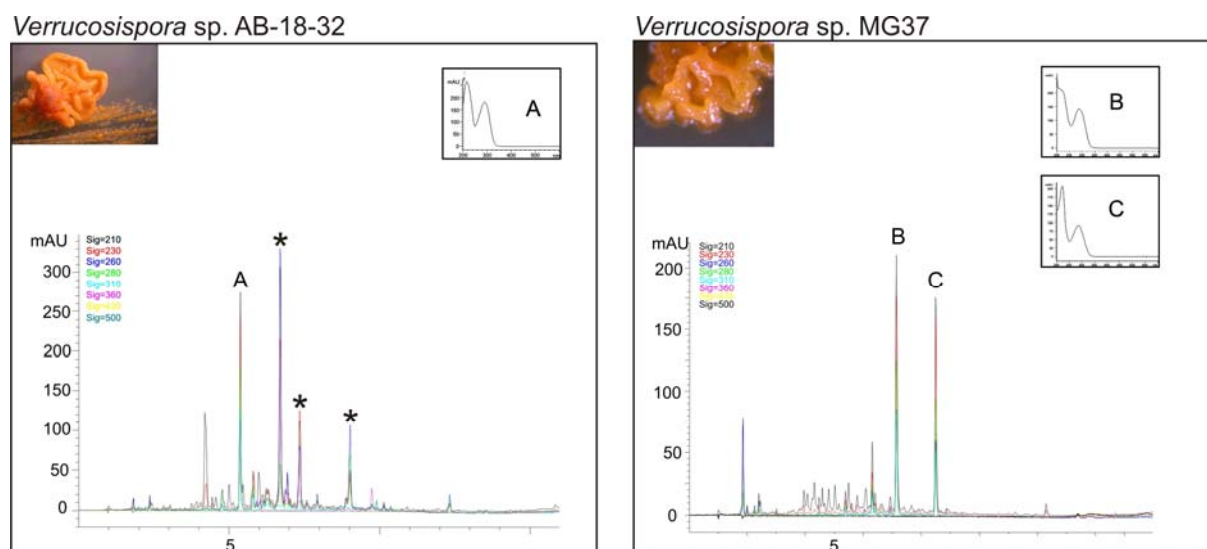


Abbildung I-22. HPLC-DAD-Chromatogramme der Kulturfiltratextrakte von zwei verschiedenen *Verrucosisspora*-Stämmen. Mit A, B und C sind die interessierenden Sekundärmetabolite bezeichnet. Zusätzlich sind ihre UV-Spektren jeweils rechts mit angegeben. Mit einem Stern im linken Chromatogramm sind die Signale der Abyssomicine B, C und D markiert.^[65, 66]

Der Stamm *Verrucosisspora* sp. AB-18-32 ist als Produzent der Abyssomicine B, C und D bekannt. Die Signale dieser Verbindungen sind in Abbildung I-22 ebenfalls dargestellt (mit einem Stern markierte Signale).^[65, 66] Die mit Buchstaben markierten Signale in den HPLC-DAD-Chromatogrammen der Kulturfiltratextrakte wurden isoliert und aufgereinigt. Die zugehörigen Verbindungen wurden Proximicin A (**20**), B (**21**) und C (**22**) genannt. Die Strukturaufklärung dieser drei Verbindungen gelang Dr. K. Schneider im Rahmen ihrer Dissertation (Abbildung I-23).^[67, 68]

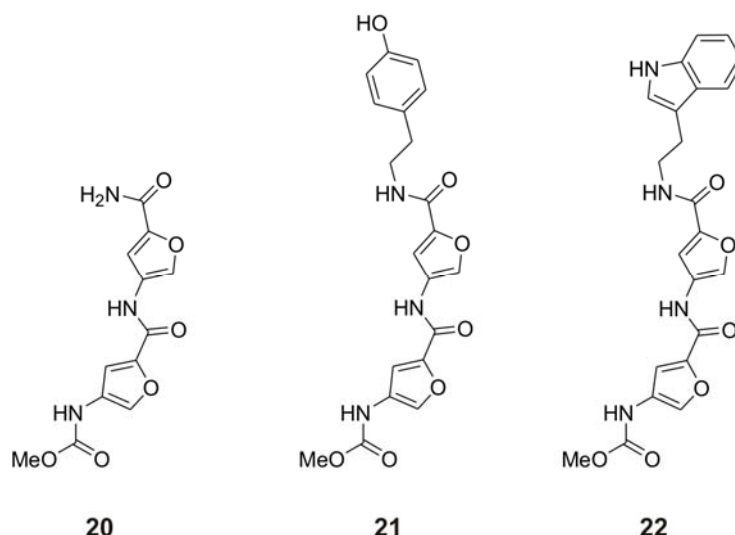


Abbildung I-23. Strukturformeln der Proximicine A (20), B (21) und C (22).

Die Proximicine A-C stellen eine neue Substanzklasse dar. Ihr wichtigstes strukturelles Merkmal ist ein Dipeptid bestehend aus einer bisher unbekannten 4-Amino-furan-2-carbonsäure als Monomer. Diese heterozyklische Aminosäure wurde vorher weder in biologischen noch in synthetischen Verbindungsdatenbanken beschrieben. Das 2,4-Disubstitutionsmuster ist auf chemischen Weg nur schwer zu erhalten. Ein weiteres gemeinsames Merkmal aller drei Proximicine stellt das *N*-terminale Methylcarbamat dar, das ebenfalls ungewöhnlich für Naturstoffe ist und nur selten zu finden ist. Die Proximicine unterscheiden sich untereinander in ihren C-terminalen Modifikationen. Während Proximicin B und C an dieser Stelle amidisch gebundene biogene Amine tragen, im Fall von Proximicin B ein Tyramin, im Fall von Proximicin C ein Tryptamin, findet sich an dieser Stelle im Proximicin A ein Säureamid.

Die Proximicine sind strukturell eng verwandt mit den Naturstoffen Netropsin und Distamycin (Kapitel 1.1.3). Netropsin besitzt als zentrales Strukturmotiv ein Dipeptid aus *N*-Methyl-4-aminopyrrol-2-carbonsäure, das der 2,4-disubstituierten Furanaminosäure der Proximicine formal gleichzusetzen ist. Im Distamycin kommt diese heterozyklische Aminosäure als Tripeptid vor (Abbildung I-9). *N*- und C-terminal unterscheiden sich die Proximicine wesentlich stärker von Netropsin und Distamycin, die beide C-terminal eine Amidinseitenkette tragen, die unter physiologische Bedingungen protoniert ist. Netropsin kann zusätzlich auch *N*-terminal durch eine Guanidinoessigsäure eine weitere positive Ladung tragen. Distamycin trägt *N*-terminal eine Formylgruppe. Netropsin und Distamycin waren die ersten Moleküle für die eine selektive Bindung an AT-reiche Sequenzen in der kleinen

Furche der DNA gezeigt werden konnte (Kapitel 1.1.3). Aufgrund der großen Bemühungen, synthetische Derivate des Distamycins und Netropsins herzustellen, die eine veränderte Spezifität aufzeigen (Kapitel 1.1.4), ist es bemerkenswert, dass bisher kein Derivat basierend auf der heterozyklische Furanaminosäure der Proximicine synthetisiert wurde. Lediglich eine 2,5-disubstituierte Furanaminosäure wurde in Lexitropsinen als monomerer Baustein verwendet, um eine GC-Spezifität der Bindung herbeizuführen (Abbildung I-15).^[69]

Trotz ihrer teilweise sehr ähnlichen Struktur scheinen die Proximicine einen von Netropsin und Distamycin unterschiedlichen Wirkmechanismus aufzuweisen.^[67, 68]

Wie durch DNA-Schmelzanalysen gezeigt werden konnte, binden die Proximicine weder an eine AT-reiche DNA-Sequenz (Abbildung I-24) noch an eine GC-reiche DNA-Sequenz (Daten nicht gezeigt).

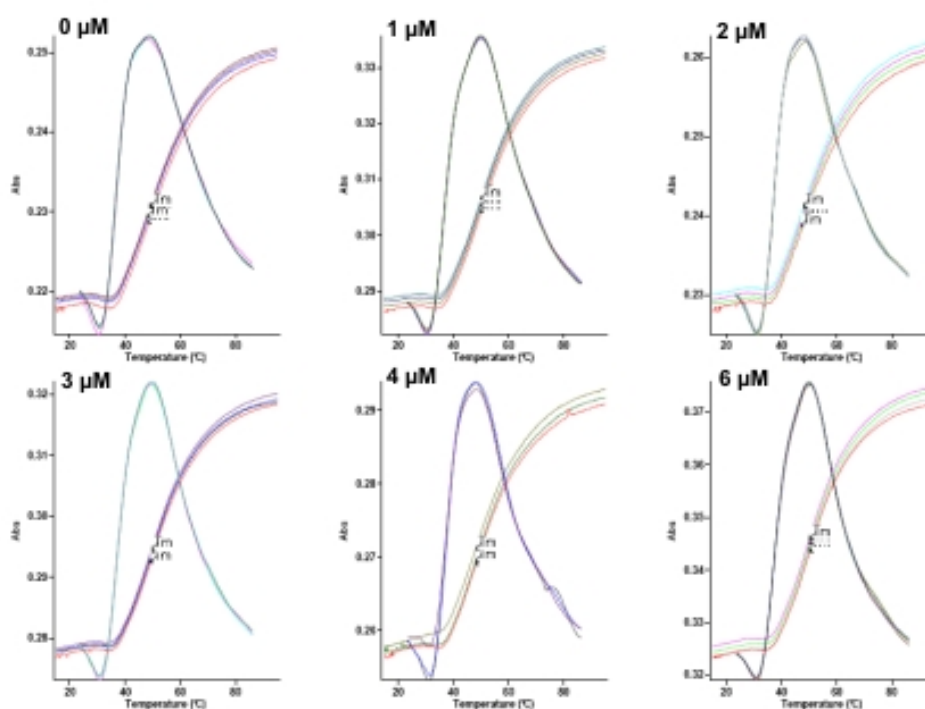


Abbildung I-24. DNA-Schmelzkurven einer AT-reichen DNA-Sequenz (cgcaaatttcgcg) inkubiert mit unterschiedlichen Konzentrationen an Proximicin B (21). Es erfolgt keine Veränderung des Schmelzpunktes der DNA.^[67]

Die Proximicine zeigen moderate Antitumoraktivitäten gegen verschiedene Krebszelllinien. In den Fällen der drei getesteten Zelllinien sind sie meist deutlich stärker aktiv als Distamycin und Netropsin (Tabelle I-3).

Tabelle I-3. Antitumoraktivitäten von Netropsin (14), Distamycin (15) und Proximicin A-C (20-22) gegen drei verschiedene Krebszelllinien.

Verbindung	AGS ^[a] GI ₅₀ [μM] ^[b]	HepG2 ^[a] GI ₅₀ [μM] ^[b]	MCF7 ^[a] GI ₅₀ [μM] ^[b]
Netropsin (14)	>116.2	60.4	74.3
Distamycin (15)	>103.8	54.0	14.3
Proximicin A (20)	2.0	2.8	24.6
Proximicin B (21)	3.6	23.0	12.1
Proximicin C (22)	0.6	1.8	20.6

[a] Zelllinien: AGS: Magenkarzinom; HepG2: Leberkarzinom, MCF7: Mammakarzinom; [b] GI₅₀: 50 % Wachstumshemmung.

In Zellzyklusanalysen wurde versucht, einen ersten Hinweis auf den möglichen Wirkort der Proximicine zu erhalten. Die Zellzyklusanalysen wurden in AGS-Zellen, einer Magenkarzinomzelllinie, mit Proximicin C (**22**) im Vergleich zu Netropsin (**14**) und Distamycin (**15**) durchgeführt. Während Netropsin und Distamycin zu einem Arrest der Zellen in der G2/M-Phase führen, arretiert die Zugabe von Proximicin C die Zellen in der G0/G1 Phase.

Diese ersten Ergebnisse zu der biologischen Wirkung der neuartigen Naturstoffe Proximicin A, B und C lassen vermuten, dass diese Substanzen trotz ihre starken strukturellen Ähnlichkeit zu Distamycin und Netropsin einen anderen Wirkmechanismus besitzen.

2 Synthese und biologische Evaluierung von Netropsin-Proximicin-Hybriden

Die Proximicine A-C (**20-22**) zeigen trotz ihrer engen strukturellen Verwandtschaft zu den Naturstoffen Netropsin (**14**) und Distamycin (**15**) eine andere biologische Aktivität (vgl. Kapitel 1.2). Um diesen Unterschied in ihrer Wirkung in einem ersten Ansatz näher zu untersuchen, sollten zunächst sogenannte Netropsin-Proximicin-Hybride hergestellt werden. Dabei sollten die strukturellen Merkmale beider Naturstoffgruppen vereint werden. Diese Hybride sollten die heterozyklische Grundeinheit des Netropsins, ein Dipeptid aus zwei *N*-Methylpyrrolaminosäuren, als gemeinsames Rückgrat tragen. Der *N*- und der *C*-Terminus dieses Peptids sollte die Seitenketten der Proximicine tragen, also *N*-terminal ein Methylcarbamat und *C*-terminal die biogenen Amine Tyramin und Tryptamin, bzw. eine Säureamidfunktion (Abbildung I-25). In Analogie zu der Nomenklatur der Proximicine sollen diese Hybride entsprechend ihren *C*-terminalen Resten mit A, B und C bezeichnet werden.

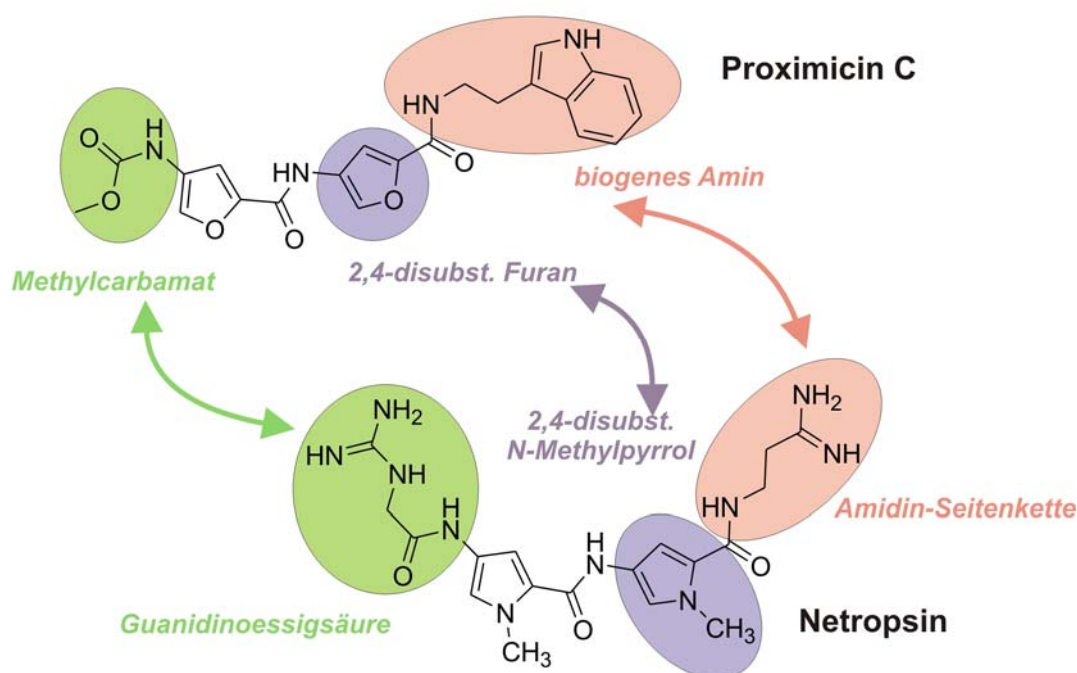


Abbildung I-25. Vergleich der Strukturen von Proximicin C und Netropsin. Die Unterschiede der beiden Strukturen sind farblich hervorgehoben.

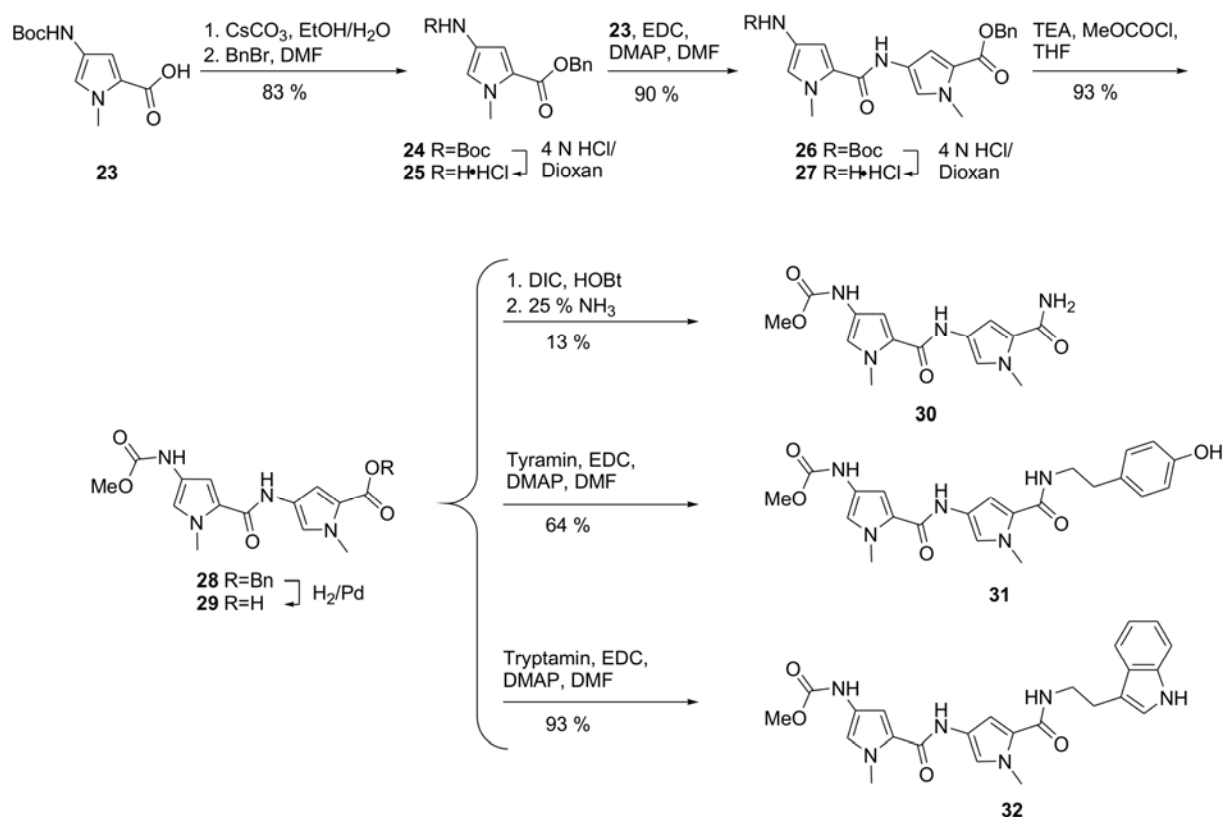
Die Synthese dieser Hybride und die Ergebnisse ihrer biologischen Testung sollen im folgenden beschrieben werden (Kapitel 2.1.1 und 2.2.1).

Im zweiten Teil der Arbeit sollte eine Substanzbibliothek aus 19 Vertretern, ebenfalls basierend auf dem Dipeptidmotiv des Netropsins als gemeinsames Rückgrat, synthetisiert werden. Ihre Synthese (Kapitel 2.1.2) und die Ergebnisse aus der biologischen Testung (Kapitel 2.2.2) sollen ebenfalls im folgenden dargelegt werden.

2.1 Synthese von Netropsin-Proximicin-Hybriden mit *N*-Methylpyrrol-Grundstruktur

2.1.1 Synthese von Netropsin-Proximicin-Hybrid A, B und C

Die Synthese der Pyrrolcarbonsäure **23** ist literaturbekannt^[70] und außerdem ist sie kommerziell erhältlich, weshalb sie als Ausgangsverbindung für die Synthese der Netropsin-Proximicin-Hybride A-C eingesetzt wurde. Die gewählte Syntheseroute (Schema I-2) orientiert sich an einem optimierten Protokoll für den Aufbau der Netropsin-Grundstruktur, das von Boger et al. im Rahmen der Synthese von Distamycin-Analoga beschrieben wurde.^[71]



Schema I-2. Synthese der Netropsin-Proximicin-Hybride A-C (30-32).

Um das Dipeptidmotiv des Netropsins aufzubauen, wurde zunächst die Boc-geschützte Pyrrolaminosäure **23** in den Benzylester überführt und nachfolgend die Boc-Schutzgruppe durch saure Hydrolyse entfernt (Schema I-2).^[72] Das so erhaltene Hydrochlorid (**25**) konnte dann mit Verbindung **23** unter Verwendung von EDCI/DMAP in sehr guten Ausbeuten zum entsprechenden Dipeptid (**26**) gekuppelt werden. Nach erneuter saurer Hydrolyse der Boc-Schutzgruppe wurde unter Verwendung von Chlorameisensäuremethylester das Methylcarbamat als *N*-terminale funktionelle Gruppe der Hybride A-C eingeführt. Nach Hydrogenolyse des Benzylesters konnten dann unter erneuter Verwendung von EDCI/DMAP als Kupplungsreagenzien und den biogenen Aminen Tyramin und Tryptamin die Hybride B (**31**) und C (**32**) erhalten werden. Das entsprechende Hybrid A (**30**) konnte durch Ammonolyse eines *in situ* erzeugten OBt-Esters dargestellt werden.

Die zur Knüpfung der Peptidbindung verwendeten Reagenzien EDCI und DMAP haben den Vorteil, dass sie sich durch flüssig/flüssig-Extraktion mit sauren und basischen Waschlösungen abtrennen lassen. Weiterhin können durch diese Waschprozeduren auch Reste der Edukte und mögliche Nebenprodukte entfernt werden. Dadurch konnten die Hybride B (**31**) und C (**32**) ohne weitere Aufreinigung, insbesondere ohne säulenchromatographische Reinigung, ausgehend von der Pyrrolaminosäure **23** erhalten werden. Lediglich das Hybrid A (**30**) musste nach dem letzten Reaktionsschritt durch präparative HPLC an Umkehrphase aufgereinigt werden.

Es ist anzumerken, dass von Grehn et al.^[72] eine saure Hydrolyse der Boc-Schutzgruppe der Verbindungen **24** und **26** mittels TFA/DCM beschrieben wurde. Bei eigenen Versuchen verfärbten sich die Reaktionslösungen nach kurzer Zeit dunkel und die erhaltenen Rohprodukte waren dabei tiefbraune bis schwarze Öle, die in dieser Form eingesetzt schlechte Kupplungsausbeuten in weiteren Syntheseschritten lieferten. Deshalb wurde als alternatives Abspaltreagens der Boc-Schutzgruppe 4 N HCl in Dioxan verwendet. Die Reaktionszeiten waren ebenfalls kurz (~ 30 min) und es trat keine auffällige Verfärbung der Reaktionslösungen ein. Nach Entfernen der flüchtigen Komponenten im Vakuum wurden beigefarbene Pulver erhalten, die als Rohprodukte ohne Beeinträchtigung in weiteren Reaktionen eingesetzt werden konnten.

2.1.2 Synthese einer Substanzbibliothek von Netropsin-Proximicin-Hybriden

Basierend auf der Synthese der Netropsin-Proximicin-Hybride A-C (**30-32**) (Kapitel 2.1.1) sollte eine Substanzbibliothek aus verschiedenen Hybridmolekülen hergestellt werden. Mit Hilfe dieser Bibliothek sollte der Effekt unterschiedlicher *N*- und *C*-terminaler Seitenketten untersucht werden. Deshalb wurde eine Substanzbibliothek geplant, die Modifikationen am *N*- und am *C*-Terminus eines zentralen Dipeptids aus zwei *N*-Methylpyrrolaminosäuren trägt (Abbildung I-26).

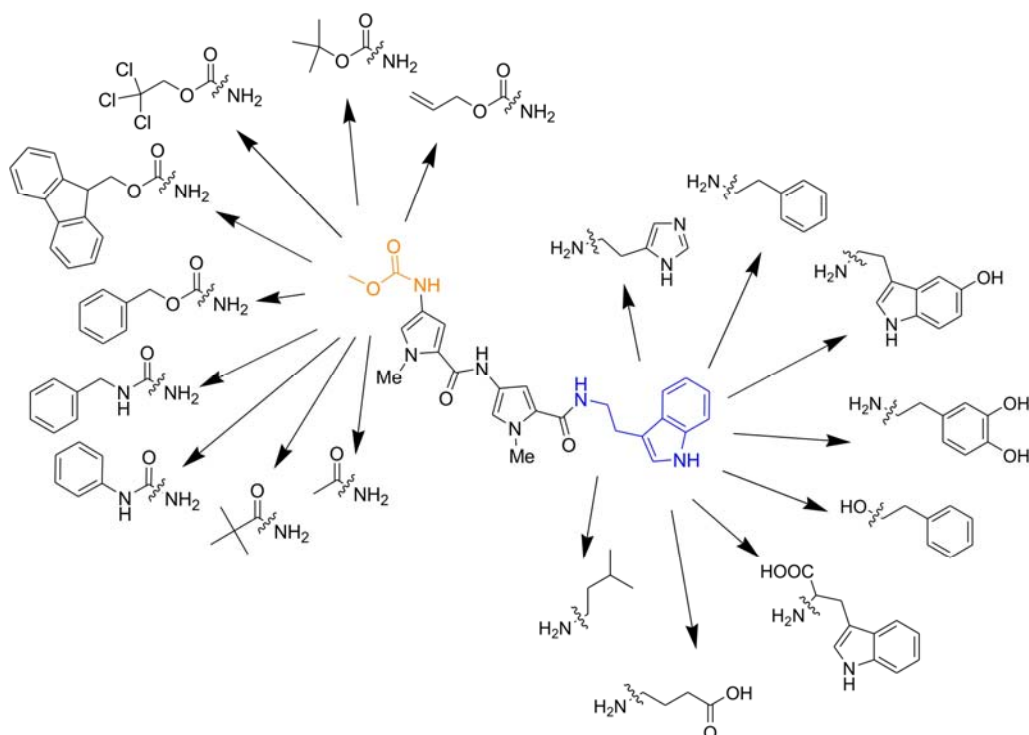
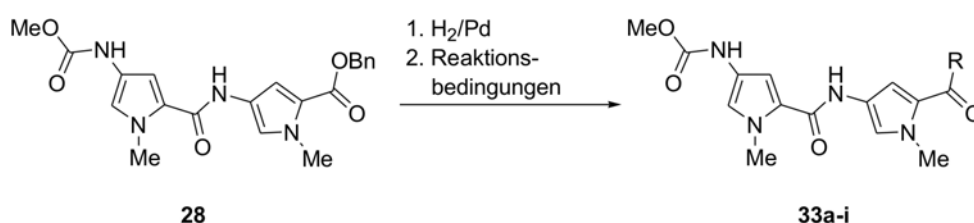


Abbildung I-26. Überblick über synthetische Modifikationen am *N*- und am *C*-Terminus eines zentralen Dipeptids der Form H-Py(Me)Py(Me)-OH.

Bei der Wahl der *N*-terminalen Modifikationen wurden drei verschiedene Funktionalitäten berücksichtigt. Zum einen wurden verschiedene Carbamate eingeführt, angelehnt an die in den Proximicinen natürlich vorkommene Methylcarbamatgruppe. Dabei wurden zunächst verschiedene Alkylsubstituenten eingeführt, wie z.B. ein Allyl- oder *tert*-Butyl-, aber auch ein Trichlorethylrest. Zum anderen sollte auch der Einfluss von aromatischen Substituenten geprüft werden. Dies sollte durch die Einführung von Benzyl- oder Fluorenylcarbamaten untersucht werden. Neben diesen Derivaten wurden auch unterschiedliche Harnstoffderivate synthetisiert. Harnstoffe unterscheiden sich von Carbamaten durch die Substitution eines Sauerstoffatoms durch ein Stickstoffatom. Dadurch findet an dieser Position ein

Wechsel von einem H-Brückenakzeptor zu einem H-Brückendonor statt. Dies sollte mit zwei Derivaten, einem Phenyl- und einem Benzylharnstoff, geprüft werden. Als dritte Gruppe von Modifikationen wurden *N*-terminal zwei verschiedene Acylgruppen eingeführt. Dadurch verschwindet eine mögliche Interaktion mit H-Brücken an dieser Position gänzlich.

Auch am C-Terminus wurden unterschiedliche Seitenketten eingeführt. Da zwei der drei natürlich vorkommenden Proximicine an ihrem C-Terminus biogene Amine tragen, lag es nahe, weitere biogene Amine an dieser Stelle einzuführen. So wurden die Amide abgeleitet von Histamin, Phenylethylamin, Serotonin, Dopamin und Isoamylamin synthetisiert. Weiterhin sollte der Einfluss einer Carbonsäurefunktionalität untersucht werden. Dazu wurden Tryptophan, in Anlehnung an den Tryptaminrest des Proximicins C, und γ -Aminobuttersäure (GABA) an den C-Terminus angefügt. Außerdem sollte auch in der Reihe der C-terminalen Modifikationen die Substitution des H-Brückendonors (NH-Gruppe des Amids) durch einen entsprechenden H-Brückenakzeptor untersucht werden. Dies geschah durch die Darstellung eines Phenylethylesters.



Schema I-3. Synthese von C-terminal modifizierten Netropsin-Proximicin-Hybriden (33a-i). Dargestellt ist die Synthese der Hybride ausgehend vom zentralen Baustein 28 (Schema I-2). Tabelle I-4 enthält Details zu den Reaktionsbedingungen der Reaktion.

Um den Einfluss der jeweiligen Seitenkette auf die Zytotoxizität zu prüfen, wurden nicht alle Permutationen der oben aufgeführten Derivatisierungen durchgeführt, sondern die Struktur von Hybrid C (Kapitel 2.1.1) als Ausgangspunkt gewählt. Bei allen *N*-terminalen Modifikationen wurde als C-terminale Modifikation der Tryptaminrest und bei allen C-terminalen Modifikationen die Methylcarbamatgruppe beibehalten. Mit den jeweils freien Amino- und Carboxyfunktionalitäten des zentralen Dipeptids wurden so insgesamt 19 Verbindungen erhalten. Die Synthese der Verbindungen soll im folgenden beschrieben werden.

Die Syntheseroute für die C-terminal modifizierten Derivate ist bis auf den letzten Reaktionsschritt identisch mit der Syntheseroute, die für die Synthese der Hybride A-

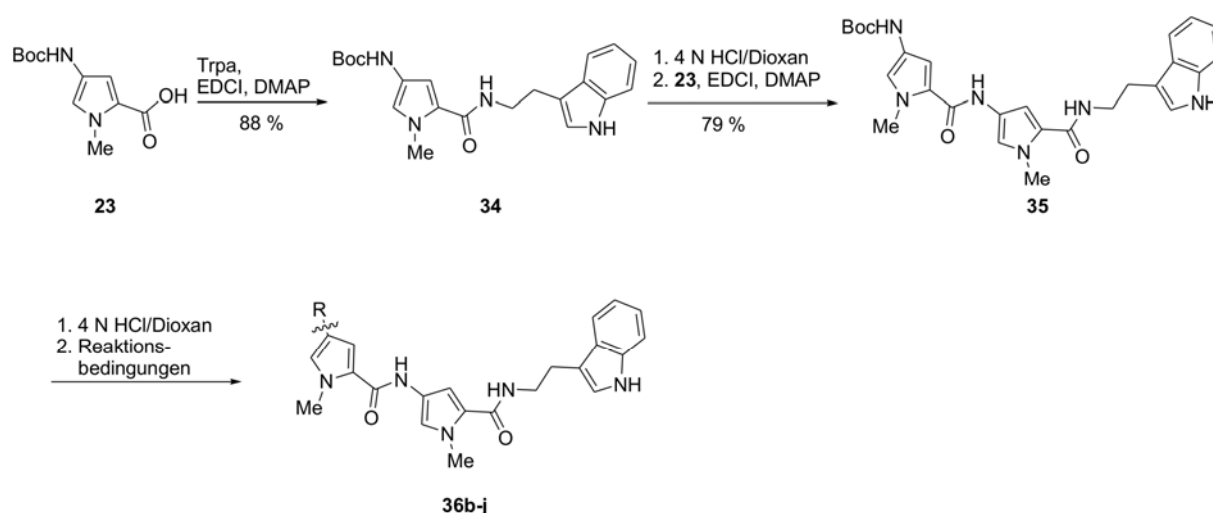
C gewählt wurde (Kap. 2.1.1). Die Einführung der Modifikationen im letzten Reaktionsschritt über den Umweg der Benzylestereinführung und Entschützung bietet den Vorteil, dass dadurch die Syntheseroute erst spät divergent wird. Somit ist es nicht nötig jeden Reaktionsschritt für jedes Derivat einzeln durchzuführen. Die unterschiedlichen Modifikationen wurden durch EDCI/DMAP-Aktivierung des C-Terminus eingeführt. Lediglich der Histaminrest der Verbindung **33g** konnte unter diesen Bedingungen nicht eingeführt werden. Hier wurde die Aktivierung mittels PyBOP durchgeführt. Die Methylester der Derivate MePy2-C5 (**33e**) (Tryptophan) und MePy2-C6 (**33f**) (γ -Aminobuttersäure) wurden anschließend durch Behandlung mit 0.1 N LiOH verseift. Alle Rohprodukte wurden durch präparative RP-HPLC aufgereinigt.

Tabelle I-4. Strukturen der C-terminal modifizierten Netropsin-Proximicin-Hybride und Reaktionsbedingungen für die Einführung der verschiedenen Modifikationen nach Schema I-3.

Substanz	Struktur (R=) ^[a]	Reagenz	Isolierte Menge (Ausbeute in %) ^[b]
MePy2-C1 (33a)	OH	H ₂ /Pd	26 mg (52 %)
MePy2-C2 (33b)		Phenylethylamin ^[c]	8 mg (12 %)
MePy2-C3 (33c)		Dopamin ^[c]	5 mg (8 %)
MePy2-C4 (33d)		Isoamylamin ^[c]	18 mg (29 %)
MePy2-C5 (33e)		H-L-Trp-OMe ^[d]	4 mg (5 %)
MePy2-C6 (33f)		H-GABA-OMe ^[d]	6 mg (10 %)
MePy2-C7 (33g)		Histamin ^[e]	6 mg (10 %)
MePy2-C8 (33h)		Serotonin ^[c]	24 mg (32 %)
MePy2-C9 (33i)		Phenylethanol ^[c]	17 mg (26 %)

[a] bezogen auf R in der Struktur **33** (Schema I-3); [b] nach Aufreinigung mittels präparativer HPLC; Reaktionsbedingungen (Schema I-3): [c] EDCI/DMAP, DMF, 16 h, RT; [d] 1. EDCI/DMAP, DMF, 16 h, RT; 2. 0.1 N LiOH, RT; [e] PyBOP, DIPEA, DCM/DMF, 0°C→RT.

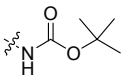
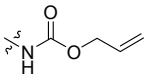
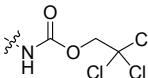
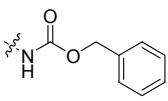
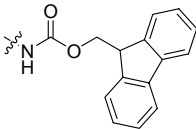
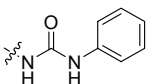
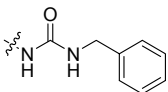
Für die Synthese der *N*-terminal modifizierten Dipeptide wurde eine andere Syntheseroute gewählt (Schema I-4). Ausgehend von der kommerziell erhältlichen *N*-Methylpyrrolaminosäure **23** wurde zunächst mittels EDCI/DMAP der Tryptaminrest, der allen Derivaten der *N*-terminal modifizierten Reihe gemein ist, eingeführt und anschließend das Peptid **35** durch die bereits beschriebenen Synthesen aufgebaut. Erst dann wurde die Boc-Gruppe in Verbindung **35** durch saure Hydrolyse abgespalten, um die unterschiedlichen Seitenketten einführen zu können. Es wurden dabei aktivierte Kohlensäureester (MePy2-N2 bis -N6, **36a-e**), Isocyanate (MePy2-N9 und -N10, **36h+i**) und Acylhalogenide (MePy2-N7 bis -N8, **36f+g**) verwendet. Die genauen Reaktionsbedingungen und auch die Angabe der hierfür verwendeten Reagenzien findet sich in Tabelle I-5. Es wurde auf eine möglichst späte Divergenz der Syntheseroute geachtet.



Schema I-4. Synthese von *N*-terminal modifizierten Netropsin-Proximicin-Hybriden. Dargestellt ist die Syntheseroute bis zu dem zentralen Baustein **35**, von dem ausgehend die verschiedenen Modifikationen eingeführt wurden. Tabelle I-5 enthält Details zu den Reagenzien und Reaktionsbedingungen für den letzten Reaktionsschritt.

Alle erhaltenen Derivate wurden nach dem letzten Reaktionsschritt mittels präparativer HPLC aufgereinigt. Dabei wurden sowohl bei den C- als auch bei den *N*-terminal modifizierten Hybriden starke Ausbeuteverluste beobachtet. Alle Derivate wurden mittels NMR, MS, HRMS und IR-Spektroskopie vollständig charakterisiert (Kapitel II.2.2).

Tabelle I-5. Strukturen der N-terminal modifizierten Netropsin-Proximicin-Hybride und Reaktionsbedingungen für die Einführung der verschiedenen Modifikationen nach Schema I-4.

Name	Struktur (R=) ^[a]	Reagenz	Isolierte Menge (Ausbeute) ^[b]
MePy2-N1 (36a)	-NH ₂	-	6 mg (12 %)
MePy2-N2 (36b)		Boc ₂ O ^[c]	7 mg (12 %)
MePy2-N3 (36c)		Alloc-Cl ^[d]	13 mg (23 %)
MePy2-N4 (36d)		Troc-Cl ^[d]	8 mg (13 %)
MePy2-N5 (36e)		Cbz-Cl ^[d]	7 mg (13 %)
MePy2-N6 (36f)		Fmoc-OSu ^[d]	9 mg (13 %)
MePy2-N7 (36g)		AcCl ^[d]	11 mg (22 %)
MePy2-N8 (36h)		Piv-Cl ^[d]	6 mg (12 %)
MePy2-N9 (36i)		PIC ^[d]	9 mg (15 %)
MePy2-N10 (36j)		BIC ^[d]	6 mg (10 %)

[a] bezogen auf R in der Verbindung **36** (Schema I-4); [b] nach Aufreinigung mittels präparativer HPLC; Reaktionsbedingungen (Schema I-4): [c] NaHCO₃, Dioxan/H₂O, RT; [d] TEA, THF, RT.

2.2 Biologische Evaluierung der Netropsin-Proximicin-Hybride

2.2.1 Biologische Evaluierung der Netropsin-Proximicin-Hybride A-C

Die biologische Aktivität der Netropsin-Proximicin-Hybride wurde teilweise bereits von Dr. K. Schneider (TU Berlin) in Zusammenarbeit mit Prof. W. Beil (MH Hannover) untersucht und in der Dissertation von K. Schneider diskutiert.^[68] Die Ergebnisse sollen hier im folgenden zunächst noch einmal zusammengefasst werden, um eine Einordnung der Resultate von den nun durchgeführten Folgeexperimenten zu ermöglichen.

Die Netropsin-Proximicin-Hybride A-C wurden auf ihre Fähigkeit untersucht, mit doppelsträngiger DNA in Wechselwirkung zu treten. Durch die Aufnahme von DNA-Schmelzkurven mit und ohne einer potentiell DNA-bindenden Verbindung kann durch eine Veränderung der Schmelztemperatur der DNA (T_m) auf eine Interaktion mit der DNA geschlossen werden. In den Ergebnissen, die in Zusammenarbeit mit Dr. L. Röglin (AK Seitz, HU Berlin) erhalten wurden, zeigte sich, dass die Netropsin-Proximicin-Hybride trotz ihrer engen strukturellen Verwandtschaft zu Netropsin zu keiner Veränderung der Schmelztemperatur der DNA führten und dies weder für AT- noch für GC-reiche DNA-Sequenzen beobachtet wurde. Gleiches wurde bereits für die Proximicine beschrieben.^[67, 68]

Zusätzlich wurde die Antitumoraktivität der Proximicine und die ihrer Hybride gegen verschiedene Krebszelllinien untersucht (Arbeiten von Prof. W. Beil, MH Hannover).

Tabelle I-6. Zusammenstellung der Antitumoraktivitäten von Netropsin und Distamycin, der Proximicine und der drei entsprechenden Hybride.

Verbindung	AGS ^[a] GI ₅₀ [μM] ^[b]	HepG2 ^[a] GI ₅₀ [μM] ^[b]	MCF7 ^[a] GI ₅₀ [μM] ^[b]	HM02 ^[a] GI ₅₀ [μM] ^[b]
Netropsin (14)	>116.2	60.4	74.3	60.4
Distamycin (15)	>103.8	54.0	14.3	32.2
Proximicin A (20)	2.0	2.8	24.6	-
Proximicin B (21)	3.6	23.0	12.1	-
Proximicin C (22)	0.6	1.8	20.6	-
Hybrid A (30)	93.9	119.0	131.5	96.5
Hybrid B (31)	28.4	34.1	41.0	30.7
Hybrid C (32)	17.7	21.6	24.9	20.5

[a] Zelllinien: AGS: Magenkarzinom; HepG2: Leberkarzinom, MCF7: Mammakarzinom, HM02: Magenkarzinom; [b] GI₅₀: 50 % Wachstumshemmung.

Dabei zeigten die Proximicine eine moderate Aktivität, die aber deutlich stärker als die von Netropsin und Distamycin war (Tabelle I-6). Die Netropsin-Proximicin-Hybride waren alle weniger aktiv als die entsprechenden Proximicin-Stammverbindungen. In Zellzyklusuntersuchungen mit einer AGS-Zelllinie konnte gezeigt werden, dass sowohl die Proximicine als auch die entsprechenden Hybride zu einem Arrest in der G0/G1-Phase führen, während Distamycin und Netropsin die Zellen in der G2/M-Phase arretieren. Aus diesen Ergebnissen wurde geschlossen, dass die Proximicine

und ihre Hybride einen anderen Wirkmechanismus haben als Netropsin und Distamycin.^[67, 68]

Basierend auf diesen Daten wurden nun im Rahmen dieser Arbeit weiterführende Experimente durchgeführt. Insbesondere aufgrund der Ergebnisse der Zellzyklusanalysen wurde untersucht, ob die Proximicine und ihre Hybride zellzyklusregulierende Proteine aktivieren, die an dem Übergang der Zellen von der G1 in die S-Phase beteiligt sind (Cyclin E, p21, p53). Es zeigte sich, dass der Level an Cyclin E in AGS-Zellen nach einer Inkubation von 13 h weder durch Proximicin C (Daten nicht gezeigt) noch durch das Hybrid C beeinflusst wird (Abbildung I-27). Allerdings führten beide Substanzen zu einer Hochregulation von p53 und des Cyclinkinsase-Inhibitors (CDKI) p21 in AGS-Zellen. Distamycin dagegen induzierte die Expression von p53 und p21 nicht (Abbildung I-27).

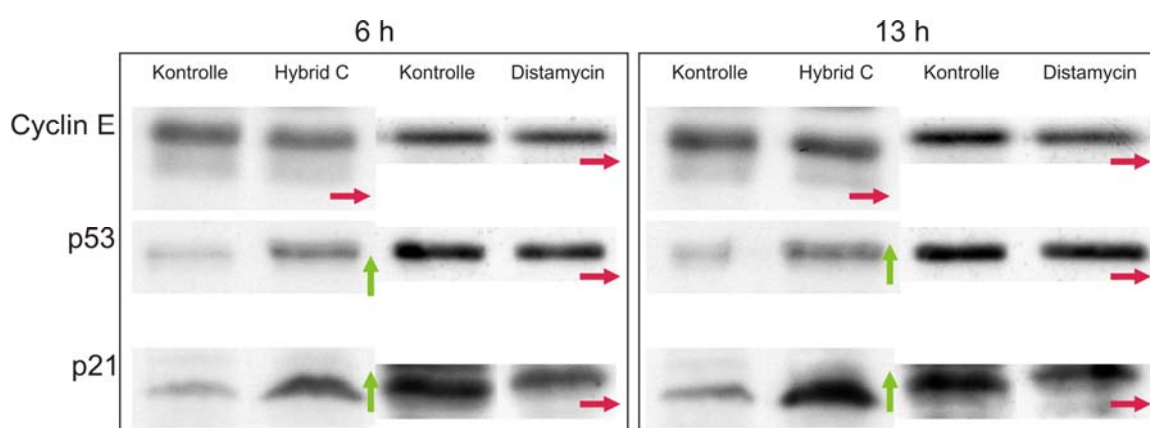


Abbildung I-27. Der Western-Blot zeigt den Einfluss des Netropsin-Proximicin-Hybrids C (32) und von Distamycin auf die Expression von p21, p53 und Cyclin E in AGS-Zellen nach 6 h und 13 h nach der Inkubation.

Um den Effekt von Netropsin, Distamycin, Proximicin C und dem entsprechenden Hybrid C zu vergleichen, wurden alle Verbindungen auf ihre Wachstumshemmung gegen eine Zelllinie mit mutierten p53 (Huh7-Zelllinie) getestet (Tabelle I-7).^[73] Netropsin und Distamycin sind gegen Huh7-Zelllinien ähnlich aktiv wie gegen HepG2-Zellen. Proximicin C und das entsprechende Hybrid C hemmen dagegen in Zellen mit mutiertem p53 das Wachstum nicht.

Tabelle I-7. Antitumoraktivität von Netropsin, Distamycin, Proximicin und dem Hybrid C gegen eine Huh7-Zelllinie^[a] mit mutierten p53.

Verbindung	GI ₅₀ [μM] ^[b]
Netropsin (14)	57.7
Distamycin (15)	62.3
Proximicin C (22)	keine Hemmung
Hybrid C (32)	keine Hemmung

[a] Huh7: Leberkarzinom; [b] GI₅₀: 50 % Wachstumshemmung.

Es wurden deshalb auch Zellzyklusanalysen mit Huh7-Zellen durchgeführt (Tabelle I-8). Während Netropsin und Distamycin hier wie auch bei der AGS-Zelllinie zu einem Arrest der Zellen in der G2/M-Phase bzw. Distamycin zusätzlich noch in der S-Phase führten, führten Proximicin C und das entsprechende Hybrid C zu keiner Veränderung der Verteilung der Zellen innerhalb des Zellzyklus.

Tabelle I-8. Zellzyklusanalyse von Netropsin, Distamycin, Proximicin C und dem Hybrid C mit Huh7-Zellen.

Verbindung	Sub G1 ^[a]	G0/G1 ^[a]	S ^[a]	G2/M ^[a]
Kontrolle	1.2 ± 0.1	62.0 ± 1.8	22.5 ± 1.3	16.0 ± 0.8
Netropsin (14)	1.0 ± 0.15	53.2 ± 1.8 ^[b]	25.0 ± 3.3	20.4 ± 1.7^[b]
Distamycin (15)	3.1 ± 0.2 ^[b]	39.3 ± 2.4 ^[b]	33.1 ± 1.4^[b]	24.7 ± 1.2^[b]
Proximicin C (22)	0.9 ± 0.1	66.2 ± 1.2	17.8 ± 4	15.1 ± 1.1
Hybrid C (32)	1.5 ± 0.6	58.7 ± 3.5	19.7 ± 2.4	19.6 ± 1.6

[a] Phasen des Zellzyklus, Angabe in Prozent der Zellen, die sich in dem jeweiligen Abschnitt des Zellzyklus befinden ± Standardabweichung; [b] p < 0.05 gegenüber der Kontrolle (t-Test).

Diese neuen und ergänzenden Untersuchungen unterstützen die These von Dr. K. Schneider, dass die Proximicine und auch die Netropsin-Proximicin-Hybride trotz ihrer engen strukturellen Verwandtschaft zu Netropsin und Distamycin einen anderen Wirkmechanismus aufweisen müssen.

2.2.2 Biologische Evaluierung der Substanzbibliothek von Netropsin-Proximicin-Hybriden

Die Substanzbibliothek mit 19 verschiedenen Netropsin-Proximicin-Hybriden wurde auf ihre Aktivität gegen drei verschiedene Krebszelllinien untersucht (Arbeiten durchgeführt von Prof. W. Beil, MH Hannover). Von diesen 19 Verbindungen zeigten zwölf bis zur maximalen Testkonzentration von 20 µg/mL keine Aktivität. Die Ergebnisse der verbleibenden sieben Verbindungen sind in der folgenden Tabelle zusammengestellt (Tabelle I-9).

Tabelle I-9. Zusammenstellung der Antitumoraktivitäten von sieben verschiedenen Netropsin-Proximicin-Hybriden, die im Rahmen einer Substanzbibliothek hergestellt wurden. Die Codierung der Substanznamen erfolgt analog zu Tabelle I-4 und Tabelle I-5.

Verbindung	AGS ^[a] GI ₅₀ [µM] ^[b]	HepG2 ^[a] GI ₅₀ [µM] ^[b]	MCF7 ^[a] GI ₅₀ [µM] ^[b]
MePy2-C9 (33i)	2.8	2.0	13.0
MePy2-N3 (36c)	1.7	14.3	15.4
MePy2-N4 (36d)	10.0	4.0	10.3
MePy2-N5 (36e)	9.3	5.6	10.8
MePy2-N6 (36f)	> 31.9	4.6	18.8
MePy2-N8 (36h)	23.5	> 40.9	17.4
MePy2-N9 (36i)	16.8	14.3	19.7

[a] Zelllinien: AGS: Magenkarzinom; HepG2: Leberkarzinom, MCF7: Mammakarzinom; [b] GI₅₀: 50 % Wachstumshemmung.

Es ist auffällig, dass die aktiven Verbindungen hauptsächlich aus der Verbindungsbibliothek mit *N*-terminalen Modifikationen stammen. Allein die Verbindung MePy2-C9 (**33i**), mit einem Phenylethylester, aus der Verbindungsbibliothek mit *C*-terminalen Modifikationen zeigt eine Antitumoraktivität. Die anderen Hybride, bei denen es sich um Amide handelt, zeigen keine zytotoxischen Eigenschaften bis zur maximalen Testkonzentration von 20 µg/mL.

Aus der Reihe der *N*-terminalen Modifikationen zeigen die Carbamat-Derivate mit einer Alloc-, einer Troc-, einer Cbz- und einer Fmoc-Gruppe (MePy2-N3 bis MePy2-N6, **36c-f**) Aktivität gegen die drei getesteten Krebszelllinien. Außerdem sind das Acylderivat mit einer Pivaloylgruppe (MePy2-N8, **36h**) und das Phenylharnstoffderivat (MePy2-N9, **36i**) gegen die drei Krebszelllinien wirksam. Hier

scheint beim Vorhandensein einer Carbamatgruppe im Molekül die Gegenwart einer Methylengruppe in der α -Position essentiell für eine Aktivität zu sein, denn das Derivat MePy2-N2 (*tert*-Butylcarbamat, **36b**) ist nicht aktiv. Bei den beiden Harnstoffderivaten scheint es umgekehrt zu sein. Hier ist das Derivat ohne Methylengruppe (**36i**) aktiv. Eine Acylierung führt scheinbar nur zu Aktivität, wenn der entsprechende Acylrest raumerfüllend ist, denn das Acetylderivat MePy2-N7 (**36g**) ist im Gegensatz zum Pivaloylderivat MePy2-N8 (**36h**) nicht aktiv. Weiterhin scheint eine Modifikation der Aminogruppe essentiell für eine antitumorale Aktivität zu sein, da das Derivat MePy2-N1 (**36a**) keinerlei Aktivität zeigt.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die aktiven Verbindungen (Tabelle I-9) der Substanzbibliothek alle eine stärkere antitumorale Aktivität aufweisen als die Netropsin-Proximicin-Hybride A-C (**30-32**) (Tabelle I-6). Ihre Aktivitäten sind vergleichbar mit denen der drei Naturstoffe Proximicin A-C (**20-22**) (Tabelle I-6).

2.3 Zusammenfassung und Diskussion der Ergebnisse

Im Rahmen dieser Arbeit wurden drei Heterozyklen-substituierte Derivate der Naturstoffe Proximicin A, B und C hergestellt, die strukturelle Elemente der Proximicine und des verwandten Naturstoffs Netropsin aufweisen. Sie bestehen aus dem Grundgerüst der Netropsine, einem Dipeptid der γ -Aminosäure 4-Amino-*N*-methylpyrrol-2-carbonsäure, und den *N*- und C-terminalen Resten der Proximicine. Deshalb wurden diese Derivate Netropsin-Proximicin-Hybride A-C genannt. Darauf aufbauend wurde eine Substanzbibliothek von 19 verschiedenen Netropsin-Proximicin-Hybriden hergestellt, bei der die *N*- und die C-terminalen Reste der Hybride A-C verändert, das Grundgerüst aber beibehalten wurde. Die Substanzbibliothek kann in zwei Gruppen unterteilt werden. Die eine Gruppe trägt am *N*-Terminus das Methylcarbamat der Proximicine und unterschiedliche Reste am C-Terminus. Bei der anderen Gruppe wurde das C-terminale Tryptamin des Proximicin C beibehalten und unterschiedliche Reste am *N*-Terminus eingeführt. Alle Hybride wurden einer biologischen Evaluierung in Form von Antitumortestungen unterzogen. Die drei Hybride A-C weisen eine geringere antitumorale Aktivität als die entsprechenden Proximicine auf. Allerdings lassen vergleichbare Ergebnisse von Proximicin C und von Hybrid C in den Zellzyklusanalysen und bei den Analysen der

Expression der zellzyklusregulierenden Proteine p53, p21 und Cyclin E vermuten, dass die Hybride A-C und die Proximicine A-C den gleichen Wirkmechanismus haben. Proximicin C und das Hybrid C bewirken einen Arrest im Zellzyklus in der G0/G1-Phase und eine Überexpression von p53 und p21. Weiterhin haben beide keine antitumorale Aktivität gegen Zelllinien mit deletiertem p53. Der Wirkmechanismus scheint von Netropsin und Distamycin verschieden zu sein. Dies zeigen vergleichende Experimente mit allen Substanzen.

Die Ergebnisse lassen vermuten, dass das Pharmakophor der Proximicine nicht allein die ungewöhnlich substituierte Furanamino-säure oder das entsprechende Dipeptid aus zwei Furanamino-säuren ist. Vermutlich haben die *N*- und *C*-terminalen Reste und die durch die Heterozyklen eingestellte relative Positionierung den größeren Einfluss auf den Wirkmechanismus. Dies ist beachtlich, weil die strukturelle Verwandtschaft von Netropsin und den Hybriden noch enger ist als die mit den Proximicinen. Es scheinen bereits kleine Veränderungen in den *N*- und *C*-terminalen Funktionalitäten zu genügen, um einen anderen Wirkmechanismus zu erwirken.

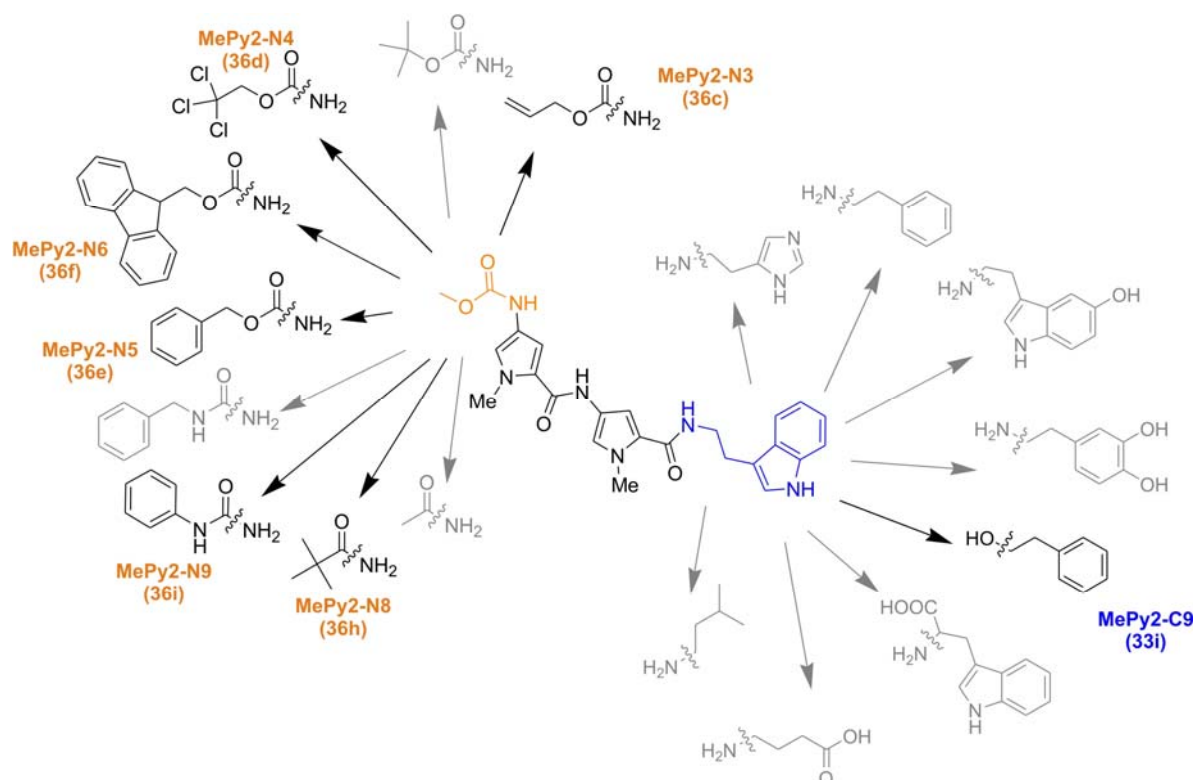


Abbildung I-28. Die Substanzbibliothek der Netropsin-Proximicin-Hybride. Gezeigt sind die Strukturen der 19 Mitglieder: aktive Derivate (schwarz), inaktive Derivate (grau) (Tabelle I-9).

Die Antitumoraktivität der Hybride A-C konnte durch die Bibliothek der Netropsin-Proximicin-Hybride noch gesteigert werden. Es konnten Hybride hergestellt werden, die eine vergleichbare Aktivität wie die drei Proximicine aufweisen. Dabei scheint der Austausch des C-terminalen Amids gegen eine Ester-Bindung wichtig für eine hohe Aktivität zu sein. Ein H-Brücken-Akzeptor wie das O-Atom des Esters an dieser Position verstärkt demnach die Wirkung der Hybride im Gegensatz zu einem H-Brücken-Donor wie die NH-Gruppe eines Amids. N-terminal ist vor allem das Allylcarbamat in der Lage, die zytotoxische Wirkung zu verstärken. Durch die Einführung eines Allylrestes gegenüber des Methylrestes in den Hybriden A-C wird das Molekül länger und es könnte durch die Doppelbindung des Allylrestes eine hydrophobe Wechselwirkung zwischen Hybrid und dem vermuteten *target* entstehen. Eine unpolare Struktur scheint grundsätzlich für die Antitumoraktivität notwendig zu sein. Dies zeigt sich besonders an den C-terminal eingeführten Modifikationen. Polare funktionelle Gruppen wie phenolische Hydroxyfunktionen, basische sekundäre Amine und saure Carboxygruppen im Molekül führen zum Wirkungsverlust. Auch die beiden Derivate mit freiem N- und C-Terminus führen zum Verlust der Hemmung des Zellwachstums. Für den Wirkmechanismus scheinen demnach hydrophobe Wechselwirkungen besonders von Bedeutung zu sein.

In weitergehenden Untersuchungen müssten mit den aktiven Mitgliedern der Substanzbibliothek Zellzyklusanalysen durchgeführt werden, um wirklich feststellen zu können, dass diese Effekte der Mitglieder der Bibliothek mit denen der Hybride A-C vergleichbar sind. Außerdem müssten die Hybride auch gegen Huh7-Zellen getestet werden, um die Abhängigkeit ihrer Aktivität von p53 untersuchen zu können. Nur wenn bei beiden Experimenten ähnliche Ergebnisse erhalten werden, ist von demselben Wirkmechanismus auszugehen.

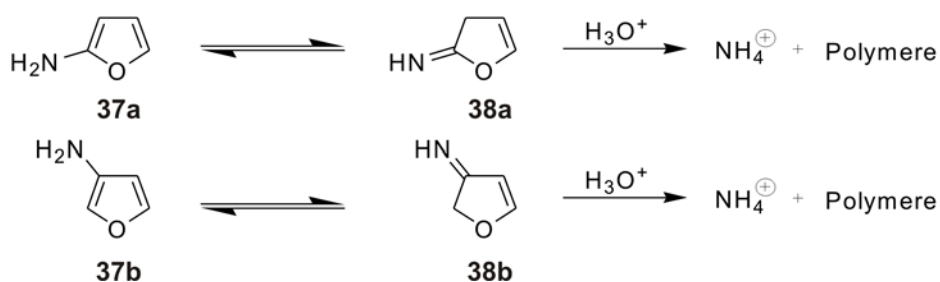
Die hier erhaltenen Ergebnisse zeigen auch Möglichkeiten auf, das molekulare *target* der Proximicine zu bestimmen. Die grundsätzlich vergleichbaren Ergebnisse der Proximicine und ihrer Hybride ermöglichen es, für die Bestimmung des Wirkmechanismus Derivate herzustellen, die auf der 4-Amino-N-methylpyrrol-2-carbonsäure des Netropsins basieren. Dadurch könnte das mögliche *target* sowohl durch Derivate vom Netropsin-Typ (N-Methylpyrrol) als auch durch solche vom Proximicin-Typ (Furan) näher untersucht werden.

3 Totalsynthese der Proximicine A, B und C

Mit der Totalsynthese der Proximicine sollten zwei Ziele erreicht werden. Zum einen sollte durch eine Totalsynthese die Struktur der Proximicine, die durch Dr. K. Schneider im Rahmen ihrer Dissertation aufgeklärt wurde, bewiesen werden.^[68] Zum anderen sollte eine Totalsynthese den Weg für die Synthese weiterer Derivate ebnen, um den Wirkmechanismus der Proximicine genauer untersuchen zu können, z.B. in Form von SAR-Studien.

Die Totalsynthese der Proximicine ist deshalb besonders reizvoll, weil die Proximicine als zentralen Baustein eine 2,4-disubstituierte Furanaminosäure besitzen. Eine solche Aminosäure ist bisher nicht in der Literatur beschrieben worden. Weiterhin ist das Substitutionsmuster des Furanrings selten und damit eine synthetische Herausforderung. Die verwandte 2,5-disubstituierte Furanaminosäure ist als Syntheseäquivalent bekannt.^[69] Allerdings kann die dort beschriebene Synthese nicht auf das vorliegende Problem angewandt werden. Es ist deshalb nötig, einen neuen Syntheseweg für 2,4-disubstituierte Furanaminosäuren zu etablieren.

Aminofurane sind bekanntermaßen instabile Verbindungen, die zur Hydrolyse neigen. Sowohl 2-Aminofurane (**37a**) als auch 3-Aminofurane (**37b**) können in zwei tautomeren Formen vorliegen, in der aromatischen Enaminform (**37**) aber auch in der nicht mehr aromatischen Ketiminform (**38**), die wiederum bereits gegen verdünnte wässrige Mineralsäuren hydrolyseempfindlich ist (Schema I-5).^[69, 74, 75] Weiterhin wurde beschrieben, dass 2- und auch 3-Aminofurane, die im allgemeinen etwas stabiler sein sollen, bereits durch längeres Stehenlassen an Luft verharzen und sich dabei zersetzen.^[74] Elektronegative Substituenten am Furanring, wie z.B. Nitro-, Cyano- oder Ester-Gruppen, wirken sich stabilisierend auf Aminofurane aus.^[74]



Schema I-5. Tautomere Formen der 2- und 3-Aminofurane und ihre Hydrolyse unter sauren Bedingungen zu Zersetzungsprodukten.^[69, 74]

Es ist zu beachten, dass weitere Substituenten am Furanring das Gleichgewicht der Tautomerie in Abhängigkeit von ihrem elektronischen Einfluss auf den Heterozyklus verschieben könnten. Im Fall der Proximicine ist dies eine Carboxy- bzw. eine Carboxamid-Gruppe, die beide einen elektronenziehenden Effekt ausüben, und dadurch dem Effekt der Aminogruppe entgegenwirken und so die aromatische Enaminform stabilisieren könnten. Diese Einflüsse sind bei der Planung einer Totalsynthese, insbesondere in einer Schutzgruppenstrategie, zu berücksichtigen.

3.1 Retrosynthese der Proximicine

Die drei Proximicine A-C weisen untereinander die gleiche Grundstruktur auf und unterscheiden sich voneinander nur durch unterschiedliche Reste an ihren C-Termini. Deshalb sei hier vereinfachend die Retrosynthese beispielhaft am Proximicin C gezeigt (Abbildung I-29). Die Retrosynthese der anderen beiden Verbindungen verläuft entsprechend analog.

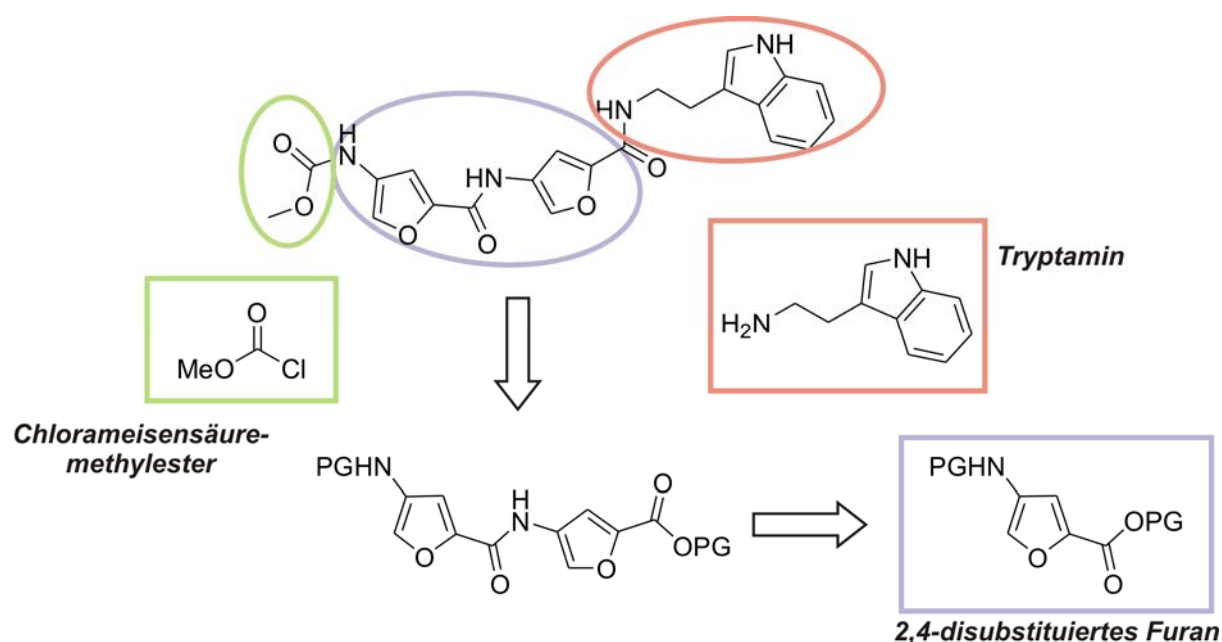


Abbildung I-29. Schematische Retrosynthese des Proximicin C. Die strukturellen Merkmale im Molekül sind durch farbige Ellipsen dargestellt, die entsprechenden Synthone in gleichfarbigen Rechtecken. PG steht für eine hier nicht näher spezifizierte Schutzgruppe.

Proximicin C lässt sich in ein zentrales Dipeptidmotiv, das N- und C-terminale Reste trägt, strukturell unterteilen. Das N-terminale Methylcarbamat sollte sich leicht durch

Umsetzung des freien Amins mit Chlorameisensäuremethylester darstellen lassen. Der C-terminale Rest im Proximicin C ist ein Tryptamin und sollte durch eine klassische Peptidkupplung einzuführen sein. Tryptamin und Chlorameisensäuremethylester sind beide kommerziell erhältlich, so dass hierfür keine weiteren Synthesewege etabliert werden müssen.

Das zentrale Dipeptid muss für die beschriebene Einführung der *N*- und C-terminalen Reste in einer orthogonalen Schützung vorliegen, damit unabhängig voneinander die Carboxygruppe bzw. die Aminogruppe entschützt werden können. Als Schutzgruppen für die Carboxygruppe bieten sich Alkylester (z.B. Methyl-) oder auch substituierte Alkylester wie Benzylester an. Die Aminogruppe sollte idealerweise in Form eines Carbamats geschützt werden. Die literaturbekannten etablierten Schutzgruppen bieten eine ausreichend große strukturelle Vielfalt, um die notwendige Orthogonalität zu erzielen.^[76] Das zentrale Dipeptid lässt sich auf seine monomere Aminosäure, eine 2,4-disubstituierte Furanaminosäure zurückführen. Für die Schutzgruppenstrategie dieses Bausteins gilt gleiches wie für das entsprechende Dipeptid. Bei der Wahl der Schutzgruppe für die Aminogruppe ist insbesondere auf die Abspaltbedingungen zu achten. Das entstehende Aminofuran sollte sauren wässrigen Bedingungen nicht ausgesetzt und möglichst schnell weiter umgesetzt werden, um seine Zersetzung zu vermeiden (Schema I-5).

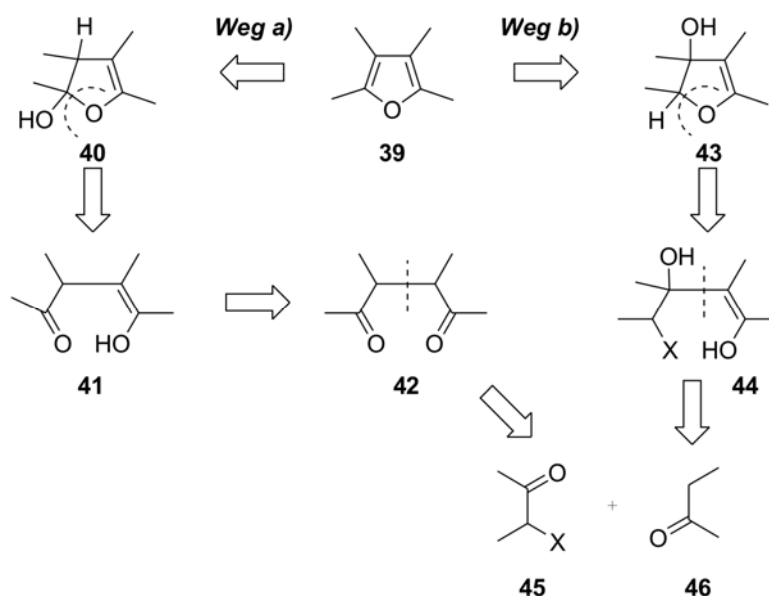
Substituierte Furane lassen sich grundsätzlich auf zwei verschiedenen Wegen erhalten. Entweder baut man sie aus linearen Vorläufern durch Zyklisierung auf oder man führt Substitutionen an einem bereits bestehenden Furanring durch. Die Synthese eines 2,4-disubstituierten Furanrings, wie er in den Proximicinen vorkommt, ist allerdings weder aus linearen Vorläufern noch durch Substitution eines Furanrings beschrieben. Deshalb musste im Rahmen dieser Arbeit eine grundlegend neue Synthesemethode etabliert werden. Beide Wege wurden dafür evaluiert.

3.2 Synthesemethoden zur Darstellung von substituierten Furanen

Furane stellen eine interessante Gruppe von fünfgliedrigen aromatischen Heterozyklen dar. Sie tauchen meist in mehrfach substituierter Form in Naturstoffen oder auch Pharmazeutika auf.^[77, 78] Außerdem finden Furane Verwendung als Zwischenstufen oder als Ausgangsmaterialien für verschiedenste Synthesen.^[77, 79-81]

In zahlreichen Übersichtsartikeln^[79, 82-87] ist die Synthese von substituierten Furanderivaten beschrieben. Während bestimmte Substitutionsmuster des Furanringes (z.B. 2,5- oder 2,3-Disubstitution) relativ leicht zugänglich sind, gibt es nur wenige Methoden, die eine regioselektive Synthese von 2,4-disubstituierten Furanen beschreiben.^[85, 88-90]

Substituierte Furane (**39**) lassen sich durch retrosynthetische Analyse auf zwei verschiedene Weisen in lineare Vorläufer zerlegen (Schema I-6). Basierend auf Weg a) wird der Furanring nach formaler Addition eines Moleküls Wasser in eine 1,4-Dicarbonylverbindung (**42**) zerlegt. Reaktionen die durch Cyklokondensationen unter sauren Bedingungen (Brønstedt- oder Lewissäure), z.B. unter Verwendung von konz. H_2SO_4 , H_3PO_4 oder SnCl_2 , zu Furanen verlaufen werden Paal-Knorr-Reaktionen genannt. Unter Brønstedtsäurekatalyse wird zunächst eine Carbonylfunktion protoniert, dann erfolgt ein intramolekularer nucleophiler Angriff durch die andere Carbonylfunktion und schließlich wird ebenfalls säurekatalysiert durch β -Eliminierung von Wasser der aromatische Ring hergestellt.^[91]

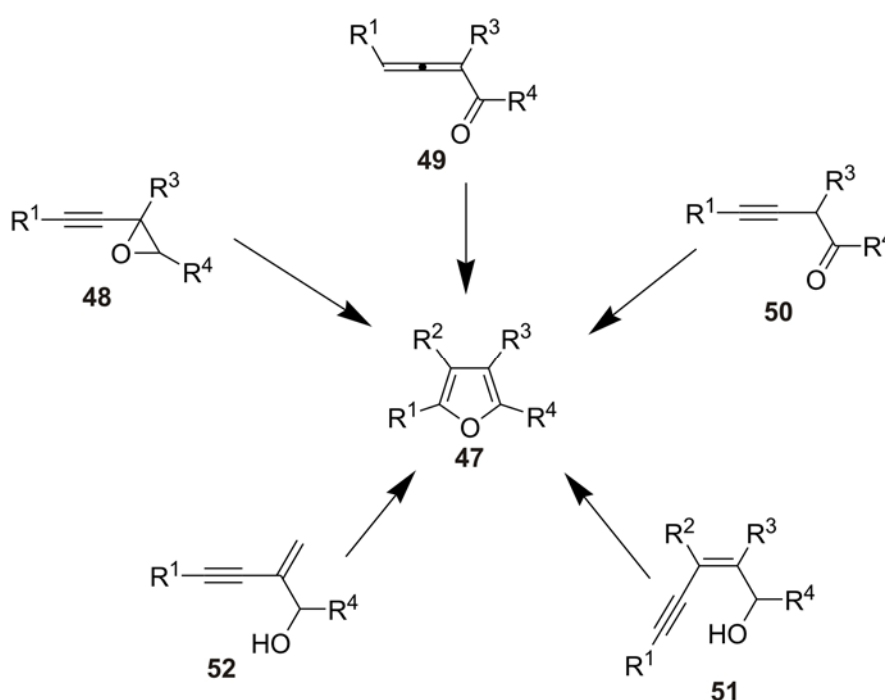


Schema I-6. Zwei mögliche Wege der Retrosynthese von substituierten Furanen. Weg a) entspricht einer Paal-Knorr-Reaktion; Weg b) entspricht einer Feist-Benary-Synthese.

Der anderen Route folgend wird der Furanring in ein α -Halogenocarbonyl (**45**) und in eine CH-acide β -Ketosäure (**46**) zerlegt. Auch die 1,4-Dicarbonylverbindungen, die als Ausgangssubstanz für die Paal-Knorr-Synthese dienen, können aus diesen Edukten erhalten werden. Zykllokondensationen, die auf diesen Ausgangsmaterialien

basieren, werden Feist-Benary-Synthesen genannt. Die Feist-Benary-Synthese erfordert die Gegenwart von Base (z.B. Na_2CO_3).

Neben diesen beiden klassischen Methoden zur Darstellung von Furanen gibt es auch einige neuere Methoden, die auf metallkatalysierter Zyklisomerisierung von Alkinen oder Allenen basieren (Schema I-7). Die Schwierigkeiten dieser Synthesen liegen in der Zugänglichkeit der verschiedenen Alkine und Allene und außerdem tolerieren die Reaktionsbedingungen nicht jede Funktionalität in den Resten. Weiterhin ist es nicht möglich 3,4-disubstituierte Furane durch direkte Zyklisomerisierung von Allenen zu erhalten.^[87]

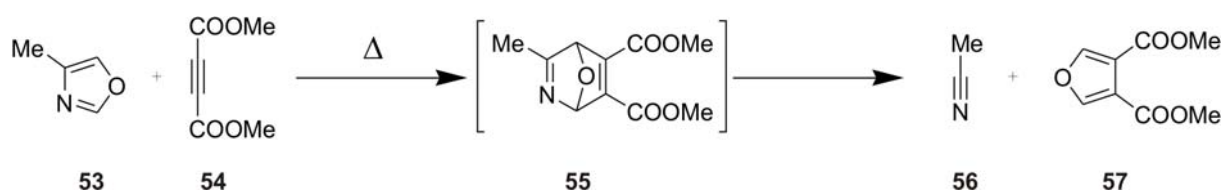


Schema I-7. Synthese substituierter Furane durch metallkatalysierte Zyklisomerisierung von linearen Vorläufern.^[87]

Eine weitere Syntheseroute zur Darstellung von Furanen geht von substituierten Oxazolen (**53**) aus (Schema I-8).^[92, 93] Oxazole können in einer Diels-Alder-Reaktion mit einem elektronenarmen Alkin (**54**) über einen nicht isolierbaren Bicyklus (**55**) und einer Retro-Diels-Alder-Reaktion unter Eliminierung von Acetonitril (**56**) zu 3,4-disubstituierten Furanen (**57**) reagieren. Die Triebkraft der Zykloreversion zur Produktbildung liegt in der Bildung des thermodynamisch sehr stabilen Acetonitrils und der Rearomatisierung, die mit der Furanbildung einhergeht.

Neben den beschriebenen Methoden zur Darstellung von substituierten Furanen aus azyklischen Vorläufern oder aus anderen Heterozyklen ist es auch möglich,

substituierte Furane aus bereits bestehenden Furanringsystemen zu erhalten. Dies geschieht durch elektrophile Substitution oder durch Metallierung des Furanringes.



Schema I-8. Synthese substituierter Furane durch eine Sequenz von einer [4+2]-Zykloaddition (Diels-Alder-Reaktion) und einer [4+2]-Cykloreversion.

Furan reagiert 10^{11} -mal schneller in elektrophilen Substitutionen (S_E) als Benzol. Dies liegt zum einen an der geringeren Resonanzenergie des Furans und zum anderen handelt es sich bei Furan um einen π -Elektronen-Überschuss-Aromaten (Abbildung I-30). Die sechs π -Elektronen des Furans sind auf nur fünf Ringatome verteilt, dadurch ist die Elektronendichte im Ring höher als bei Sechsring-Aromaten wie z.B. bei Benzol.

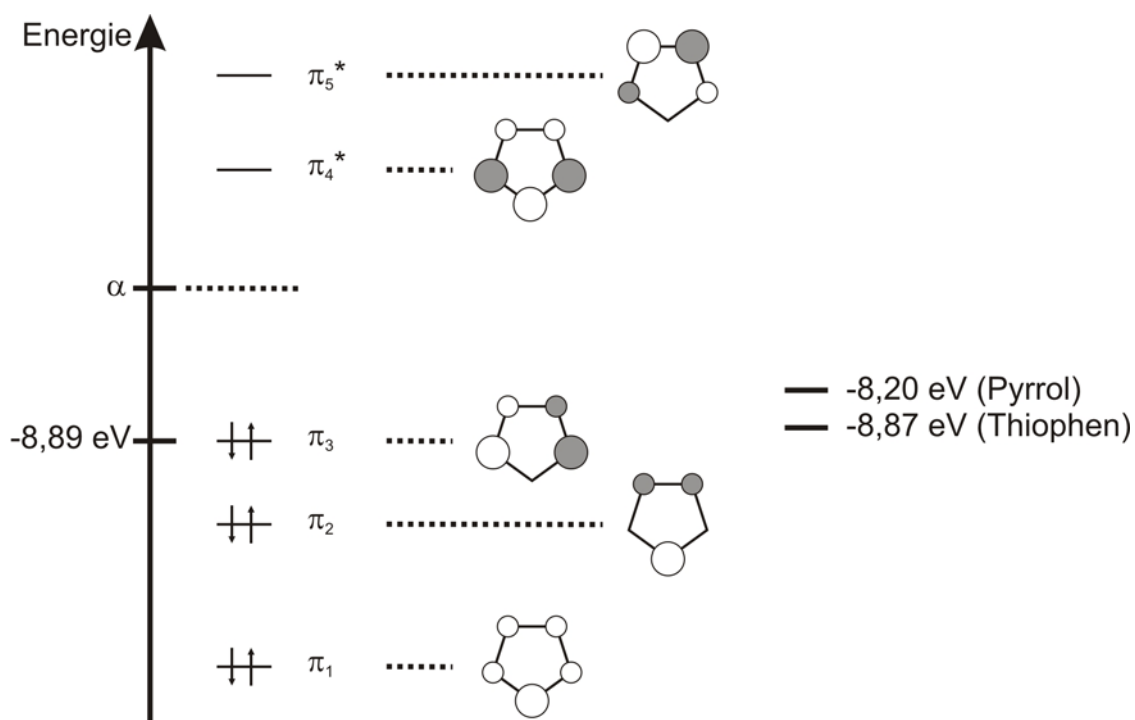
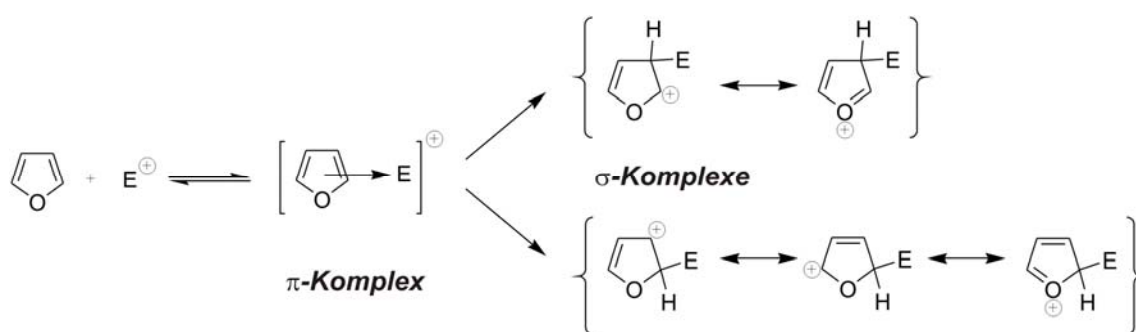


Abbildung I-30. Energieniveaus der π -MO (qualitativ) von Furan und ihre Besetzung mit Elektronen.^[94]

Die S_E -Reaktion an Furan findet wie beim Benzol durch einen Additions-Eliminierungs-Mechanismus statt. Bei einem unsubstituierten Furan erfolgt die

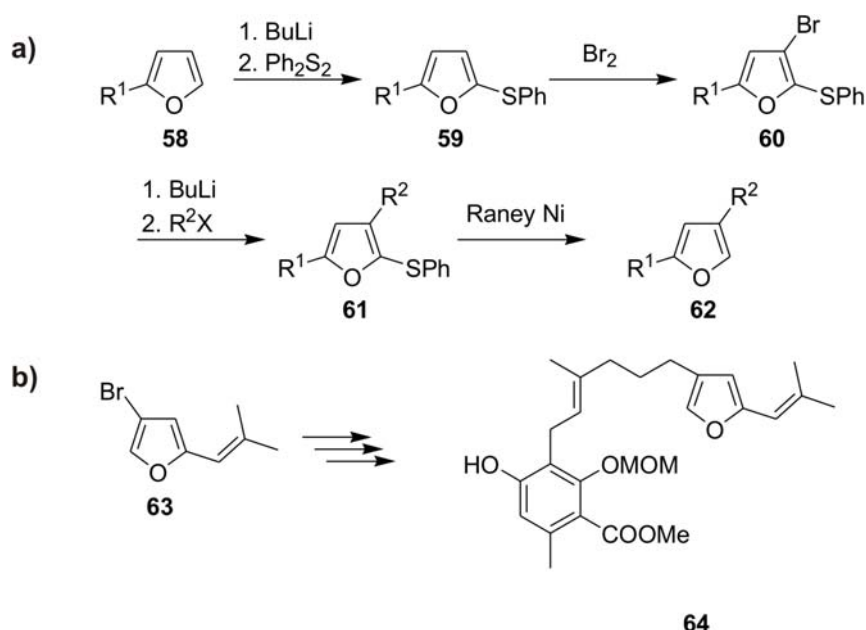
Substitution regioselektiv an der α -Position des Rings (Schema I-9). Dies liegt an zwei Gründen. Zum einen kann die positive Ladung, die durch den Angriff eines Elektrophils im Ring entsteht, bei einem Angriff auf die β -Position weniger gut delokalisiert werden als bei einem Angriff auf die α -Position. Außerdem ist der Homo-Koeffizient an den α -Positionen des Furanrings größer als an den β -Positionen (Abbildung I-30), so dass Elektrophile besonders an diesen beiden Positionen des Furanrings addieren.

Aus diesen Gründen ist es besonders schwierig, ein 2,4-Substitutionsmuster ausgehend von einfach substituierten Furanen darzustellen. Mit einem Elektrophil oder durch Lithiierung würde eine Reaktion immer an der C-2 bzw. an der C-5 Position stattfinden. Deshalb müssen bei der Synthese entweder entsprechend dirigierende Substituenten vorhanden sein oder die reaktiven Positionen des Furanrings müssen kurzzeitig blockiert und nach erfolgter Substitution wieder freigesetzt werden.



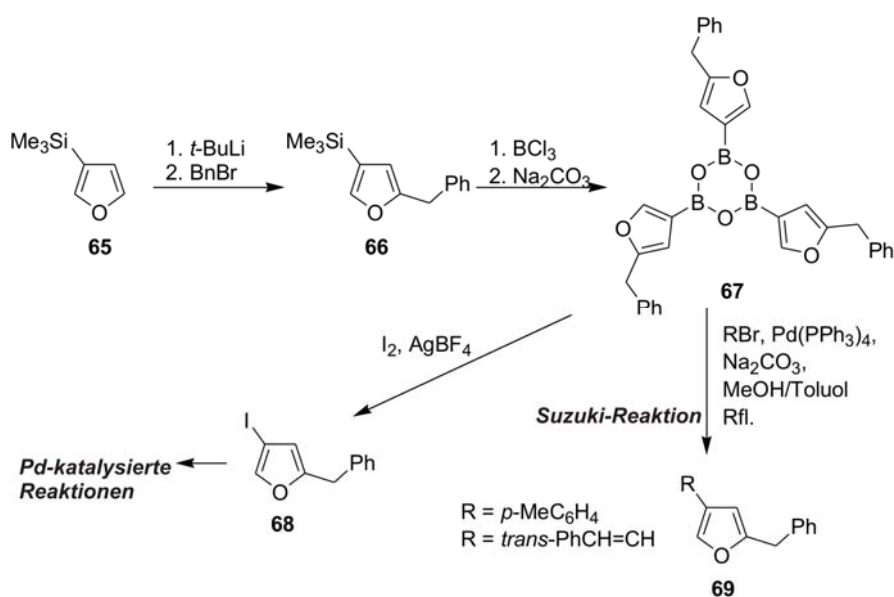
Schema I-9. Elektrophile Substitution (S_E) an Furan. Beide Angriffsmöglichkeiten sind dargestellt. Bei einem Angriff auf die α -Position kann die entstehende positive Ladung über mehr Ringatome verteilt werden.

So besteht die Möglichkeit, eine elektrophile Substitution an 2,3-disubstituierten Furanen durchzuführen. Diese wird nach den oben beschriebenen Gesetzmäßigkeiten regioselektiv an der C-5-Position des Ringes stattfinden. Anschließend muss der ursprüngliche Substituent an der C-2-Position entfernt werden. In der Literatur ist bisher die erfolgreiche Entfernung von Bromatomen,^[95, 96] Phenylthiogruppen^[97-99] oder auch Silylgruppen^[100] beschrieben, wobei diese Gruppen teilweise formal durch ein H-Atom ersetzt wurden (Schema I-10).



Schema I-10. a) Synthese von 2,4-disubstituierten Furanen mittels temporärer Blockierung der reaktiven C-5-Position des Furanrings mit einer Thiophenylgruppe.^[97]
b) Anwendung dieser Synthesemethode in der Synthese eines Cristatsäurederivats.^[95]

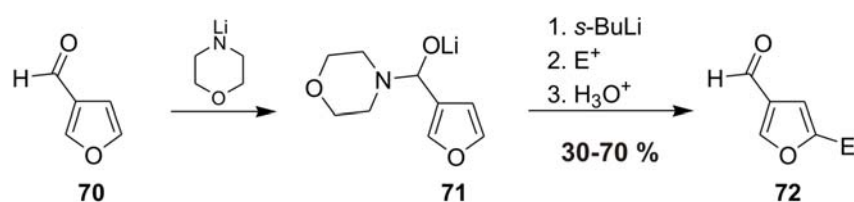
Ein anderer Zugang zu 2,4-disubstituierten Furanen besteht in der direkten Metallierung von 3-substituierten Furanen (**65**) (Schema I-11). Allerdings ist auch hier wieder die reaktivste Position die C-2-Position. Allerdings kann durch einen großen sterischen Anspruch des Substituenten am C-3 und durch die Verwendung einer sterisch anspruchsvollen Lithiumbase die Metallierung an die C-5-Position verlagert werden (**66**).^[101]



Schema I-11. Synthese von 2,4-disubstituierten Furanen durch direkte Metallierung von 3-Furanen. Die Suzuki-Reaktion und andere Pd-katalysierte Reaktionen erlauben dabei die Einführung verschiedenster Substituenten.^[101]

Durch Transmetallierung kann dann die Silylgruppe in eine Boronsäure (oder in ihr Anhydrid, ein Boroxin, **67**) überführt werden, die dann entweder direkt in Suzuki-Kupplungen eingesetzt werden kann oder zunächst durch Iod substituiert und zu Verbindung **68** umgesetzt werden muss, um dann in anderen Pd-katalysierten Reaktionen (z.B. der Sonogashira-Reaktion) eingesetzt zu werden. Beide Reaktionstypen tolerieren eine Vielzahl von Substituenten und funktionellen Gruppen, so dass durch diese Methode unterschiedlichste Substituenten am Furanring eingeführt werden können. Die Ausgangsverbindung, 3-Trimethylsilylfuran (**65**), ist in einer einstufigen Synthese aus einem Oxazol und einem Silylalkin durch Diels-Alder-Reaktion zugänglich.^[101]

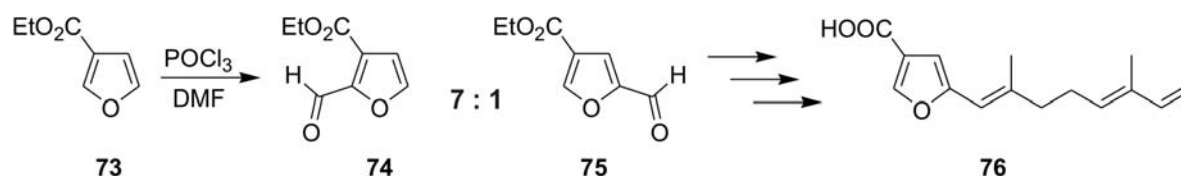
Eine andere Methode der regioselektiven Darstellung von 2,4-substituierten Furanen ist von Lee et al. beschrieben worden (Schema I-12).^[102] Ausgehend von 3-Furaldehyd (**70**) ist es nach dieser Methode in einem einzigen Reaktionsschritt möglich, regioselektiv an der C-5-Position zu substituieren und so 2,4-disubstituierte Furane (**72**) zu erhalten. In einem ersten Reaktionsschritt wird der Aldehyd mit *in situ*-generierten Lithiummorpholid umgesetzt und als α -Aminoalkoxid (**71**) geschützt. Aufgrund der elektronischen und sterischen Effekte des Substituenten an der 3-Position findet eine nun folgende Lithiierung regioselektiv an C-5 statt, so dass nach Abfangen des metallierten Furans mit Elektrophilen 2,4-disubstituierte Furane in moderaten Ausbeuten erhalten werden können. Als Elektrophile wurden u.a. Silylchloride, Alkyljode oder auch aliphatische Aldehyde eingesetzt.



Schema I-12. Darstellung 2,4-disubstituierter Furane durch eine regioselektive direkte Metallierung von 3-Furaldehyd in einer „one pot“ Reaktion.^[102]

Nimmt man die Bildung von Regioisomeren bei der elektrophilen Substitution an 3-Furanen in Kauf, so kann z.B. auch eine Vilsmeier-Formylierung durchgeführt werden (Schema I-13). Allerdings entsteht bei der Formylierung von 3-Furansäureethylester (**73**) ein Regioisomerenverhältnis von 7:1 zu Ungunsten der 2,4-Substitution.^[85] Zudem lassen sich die Isomere nicht trennen, so dass zunächst mit dem

Isomerengemisch weitergearbeitet werden muss und erst in einem späteren Reaktionsschritt die Aufreinigung erfolgen kann.^[103, 104]



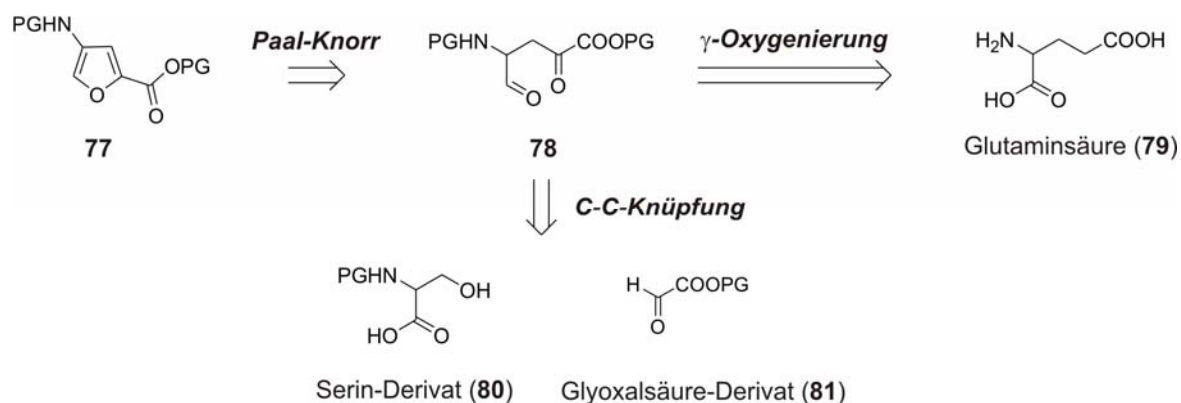
Schema I-13. Darstellung eines 2,4-disubstituierten Furans durch eine Vilsmeier-Formylierung und Anwendung des Reaktionsprodukts in der Synthese eines Phospholipase A₂ (PLA₂) Inhibitors, der aus *Sinularia* sp. isoliert wurde.^[103]

3.3 Eigene Arbeiten zur Darstellung von 2,4-disubstituierten Furanen

Aus den unterschiedlichen Synthesemethoden zur Darstellung von 2,4-disubstituierten Furanen (Kapitel 3.2) wurden im Rahmen dieser Arbeit drei Wege ausgewählt und auf ihre Anwendbarkeit auf die Synthese der Proximicine A-C untersucht. Zunächst sollte die zentrale Furanaminosäure der Proximicine aus linearen Vorläufern, die in einer Paal-Knorr-Reaktion zyklisiert werden sollten, hergestellt werden. In einem weiteren Ansatz wurde die selektive Metallierung von 3-Furaldehyd zur Darstellung der gewünschten Aminosäure untersucht.

3.3.1 Versuche zur Darstellung aus linearen Vorläufern

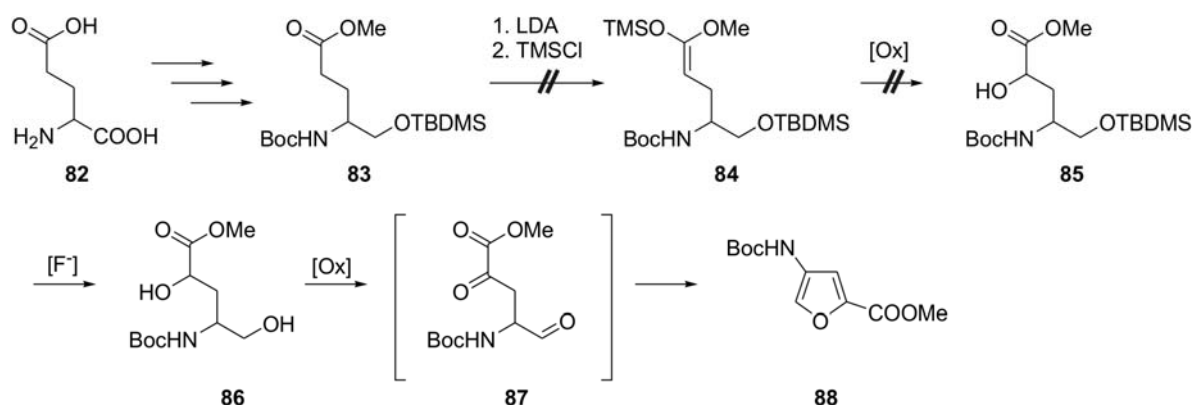
Zerlegt man retrosynthetisch einer Paal-Knorr-Reaktion folgend die zentrale ungewöhnliche Furanaminosäure der Proximicine, so muss zunächst das 1,4-Dicarbonylderivat **78** hergestellt werden (Schema I-14). Diese Verbindung lässt sich retrosynthetisch entweder auf Glutaminsäure (**79**), die einer γ -Oxygenierungsreaktion unterzogen werden müsste, oder auf Serin (**80**) und Glyoxalsäure (**81**) als Bausteine, die in einer C-C-Knüpfungsreaktion miteinander reagieren müssten, zurückführen.



Schema I-14. Retrosynthese der zentralen Furanamino-säure der Proximicine basierend auf einer Paal-Knorr-Reaktion. Zwei Möglichkeiten der Retrosynthese der 1,4-Dicarbonylverbindung und mögliche Edukte sind gezeigt.

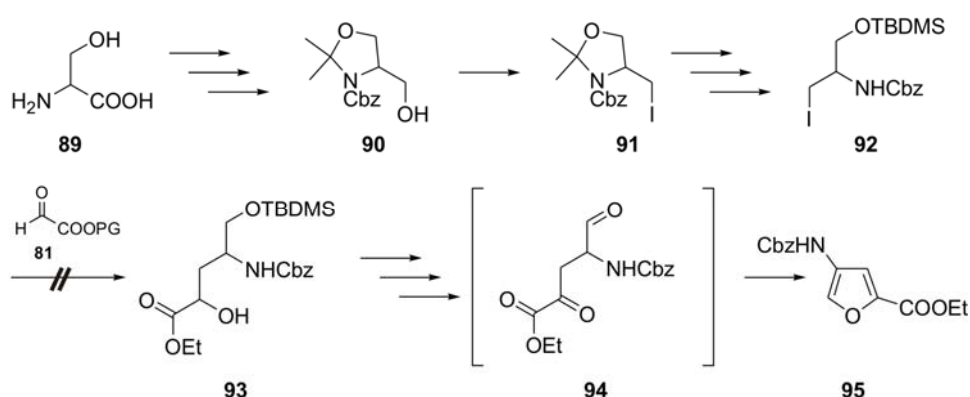
Der geplante Syntheseweg über eine γ -Oxygenierung von Glutaminsäure ist in Schema I-15 gezeigt. Er orientiert sich eng an einer publizierten Synthese zur Darstellung von (S)-4-Amino-4,5-dihydro-2-furancarbonsäure, also dem entsprechenden einfach ungesättigten Derivat.^[105, 106] Ausgehend von Glutaminsäure wurde zunächst das geschützte Derivat **83** mit einem zu einer Hydroxygruppe reduzierten C-Terminus hergestellt. Leider war es in ersten Versuchen nur in sehr schlechten Ausbeuten möglich, den dargestellten Ester **83** in sein entsprechendes Silylketenacetal **84** zu überführen, obwohl laut Literatur solche Reaktionen in guten bis sehr guten Ausbeuten verlaufen sollten.^[105-108] Anschließend wurden zwei verschiedene Methoden im kleinen Maßstab getestet, um durch γ -Oxygenierung die gewünschte Zwischenstufe **85** zu erhalten. Zum einen wurde eine Oxidation basierend auf *m*-Chlorperbenzoesäure (MCPBA) durchgeführt.^[107] Die Reaktion verläuft vermutlich über mehrere Zwischenstufen. Zunächst wird die Doppelbindung durch MCPBA epoxidiert; unter anschließender Säurekatalyse öffnet sich das Epoxid und die Silylgruppe wandert zur entstandenen Hydroxygruppe. Nach Zugabe eines Fluoridions (z.B. Tetrabutylammoniumfluorid, TBAF) wird schließlich die Silylschutzgruppe abgespalten.^[107] In einem anderen Experiment wurde versucht, die Hydroxygruppe durch Umsetzung des Ketenacetals mit Bleitetraacetat ($\text{Pb}(\text{OAc})_4$) einzuführen.^[109]

In keiner dieser beiden Testreaktionen konnte das gewünschte Produkt nachgewiesen werden, so dass auf die Syntheseroute ausgehend von Serin und Glyoxalsäureester ausgewichen wurde.



Schema I-15. Geplante Syntheseroute zur Darstellung der zentralen Furanaminosäure (88) der Proximicine über eine γ -Oxygenierung eines Glutaminsäurederivats (84).

Dabei wurde zunächst ausgehend von Serin nach einer Literaturvorschrift das geschützte Iodalaninderivat **92** hergestellt (Schema I-16).^[110] Dieses sollte dann in einer Homo-Reformatsky-Reaktion mit Glyoxalsäureethylester zu Verbindung **93** umgesetzt werden.^[111] Das gewünschte Reaktionsprodukt (**93**) konnte dabei nicht erhalten werden, so dass auch diese Syntheseroute nicht weiter verfolgt wurde.

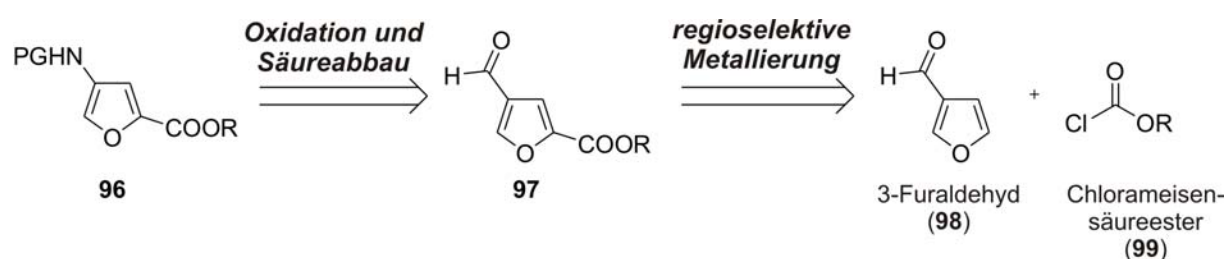


Schema I-16. Geplante Syntheseroute zur Darstellung der zentralen Furanaminosäure der Proximicine über eine Art Homo-Reformatsky-Reaktion zwischen einem Iodalaninderivat (92) und Glyoxalsäure.

3.3.2 Darstellung der zentralen Furanaminosäure der Proximixine ausgehend von 3-Furaldehyd

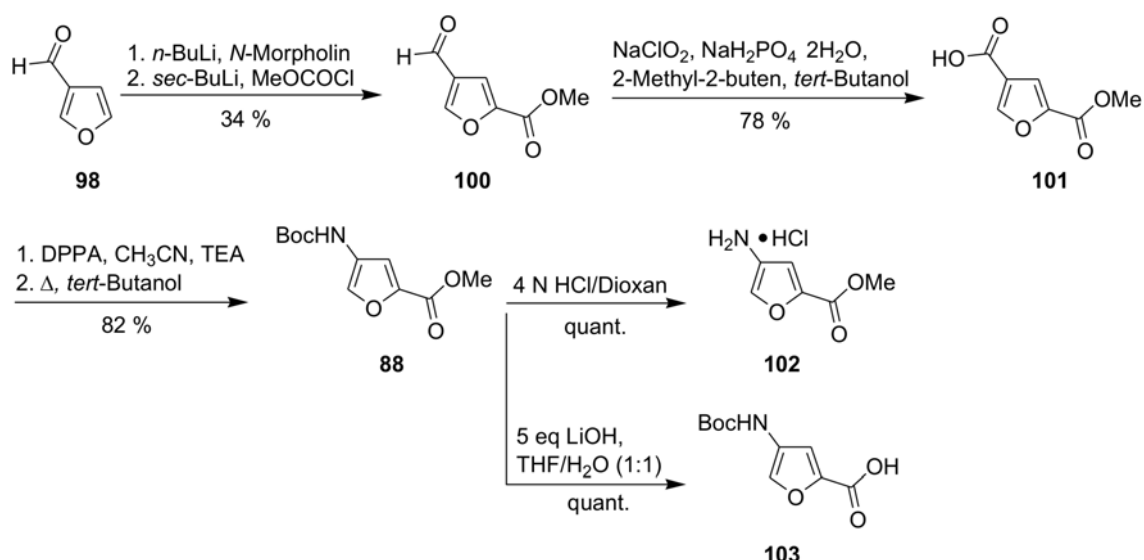
Die Methode von Lee et al. zur Generierung eines 2,4-Substitutionsmusters (Kapitel 3.2, Schema I-12) erschien geeignet, um die zentrale Furanaminosäure der Proximicine ausgehend von 3-Furaldehyd herzustellen.^[102] Die auf dieser Strategie basierende Retrosynthese ist in Schema I-17 dargestellt. Die Synthesemethode von Lee et al. basiert auf einer *in situ*-Schützung des Aldehyds mit Lithiummorpholid,

anschließender regioselektiver Lithiierung des Furans an der C-5-Position und Abfangen der metallierten Spezies mit einem Elektrophil. Abschließend wird durch saure Aufarbeitung die Aldehydgruppe wieder freigesetzt. Als Elektrophil bieten sich in dem vorliegenden Fall im allgemeinen Chlorameisensäureester an. Diese sind kommerziell erhältlich und leicht zu handhaben. Zusätzlich kann mit ihnen in einem Reaktionsschritt eine geschützte Carboxygruppe erhalten werden. Die Transformation des Aldehyds in die gewünschte Aminofunktion kann über die entsprechende Säure geschehen, die dann einer der Säureabbaureaktionen von Hofmann, Lossen, Schmidt oder Curtius unterzogen wird.^[112]



Schema I-17. Retrosynthese der zentralen Furanaminosäure der Proximicine mit einer regioselektiven Metallierung als Schlüsselschritt gemäß den Arbeiten von Lee et al.^[102]

Zunächst wurde die grundsätzliche Anwendung der regioselektiven Metallierung der 5-Position des 3-Furaldehyds **98** für den vorliegenden Fall getestet, da die Verwendung von Chlorameisensäureestern als Elektrophil bei diesem Reaktionstyp bisher nicht beschrieben wurde (Schema I-18). Es stellte sich heraus das Chlorameisensäuremethylester in der Tat geeignet ist, 4-Formylfuran-2-carbonsäuremethylester herzustellen. Die Ausbeuten lagen aber durchweg am unteren Ende des Bereichs der von Lee et al. für andere Elektrophile gefunden wurde.^[102] Vielmehr war es sogar so, dass die Ausbeuten zunächst in nicht reproduzierbarer Weise zwischen 14-30 % variierten. Durch mehrere Optimierungsexperimente (Reaktionszeit, Ansatzgröße, Konzentration der Reaktanden und Zutropfgeschwindigkeiten) konnte die ideale Ansatzgröße auf 1 g ($\approx$ 11 mmol) 3-Furaldehyd festgesetzt werden. Dabei konnte eine reproduzierbare Ausbeute von 30-35 % erhalten werden. Es war allerdings nicht möglich, nicht umgesetztes Edukt zurückzugewinnen, vermutlich aufgrund der Instabilität der Zwischenstufen.



Schema I-18. Synthese der zentralen Furanamino-säure der Proximicine in geschützter Form ausgehend von 3-Furaldehyd.

Der so erhaltene Aldehyd **100** wurde einer Oxidation mit Natriumchlorit in gepufferter Lösung (Phosphatpuffer) in Gegenwart von 2-Methyl-2-buten unterzogen.^[113] Natriumchlorit ist ein mildes und günstiges Reagens zur selektiven Oxidation von Aldehyden zu den entsprechenden Carbonsäuren. 2-Methyl-2-buten fängt als Radikalfänger die möglicherweise entstehenden freien Chlorradikale aus der Reaktionsmischung ab. Diese milde Oxidationsmethode wurde gewählt, um starke Mineralsäuren (Jones-Oxidation) oder basische Bedingungen (Silberoxid-Oxidation) zu vermeiden, und so den empfindlichen Furanring zu schützen. Die Oxidation verlief in guten Ausbeuten (ca. 80 %) und die analysenreine Carbonsäure **101** konnte ohne säulenchromatographische Aufreinigung erhalten werden. Carbonsäure **101** sollte nachfolgend in möglichst einem Reaktionsschritt in eine Aminogruppe überführt werden. Dafür bietet sich die Curtius-Umlagerung an.^[114] Eine Curtius-Umlagerung hat zusätzlich den Vorteil, dass es nicht nur möglich ist, freie Amine zu erhalten, sondern auch die direkte Überführung in entsprechende Carbamate durchzuführen. Dies ist besonders vor dem Hintergrund der Empfindlichkeit der Aminofurane (Kapitel 3, Schema I-5) gegenüber sauren Hydrolysebedingungen von Bedeutung. Die für die Curtius-Umlagerung notwendigen Säureazide können *in situ* hergestellt werden und müssen nicht isoliert werden. Als Reagens der Wahl bietet sich hierfür Diphenylphosphorylazid (DPPA) an.^[115, 116] Das intermediär gebildete Säureazid wird anschließend in Gegenwart eines Alkohols erhitzt. Dabei wird Stickstoff abgespalten und durch Umlagerung ein Isocyanat gebildet, das mit dem Alkohol zum entsprechenden Carbamat abreagiert.

Es konnte gezeigt werden, dass die Reaktion in sehr guten Ausbeuten unter Zusatz von *tert*-Butanol verläuft und man so das Boc-geschütztes Aminofuran **88** erhalten kann. Die Ausbeuten der hier etablierten Curtius-Umlagerung konnten durch Variationen der Reaktionszeiten und Ansatzgrößen von anfänglich ca. 30 % auf über 80 % in optimierten Experimenten gesteigert werden.

In den Proximicinen findet sich natürlicherweise am *N*-Terminus ein Methylcarbamat. Deshalb lag es nahe, einen entsprechenden Baustein durch Erhitzen des Säureazids in Gegenwart von Methanol zu erhalten. Diese Reaktion führte in einem ersten Versuch nicht zu dem gewünschten Produkt und wurde deshalb nicht weiter untersucht.

Die etablierte und hier vorgestellte Syntheseroute bietet einen sehr kurzen (3 Stufen, 2 x säulenchromatographische Aufreinigung) Zugang zur zentralen Boc-geschützten Aminosäure (**88**) für die Synthese der Proximicine. Die Ausbeuten der einzelnen Reaktionsschritte sind moderat bis gut. Ein Vorteil ist, dass eine orthogonal vollgeschützte Aminofuranaminosäure erhalten werden kann. Die angewandten Reaktionen sollten es durch Variation von verschiedenen Chlorameisensäureestern im Metallierungsschritt oder durch den Einsatz verschiedener Alkohole in der Curtius-Umlagerung zusätzlich ermöglichen, andere Schutzgruppen an beiden Funktionalitäten einzuführen.

Das hier dargestellte Derivat **88** sollte außerdem nach Verseifen des Methylesters in einer festphasengestützten Synthese (SPPS, SPOS) nach der Boc-Strategie einsetzbar sein. Dieser Ansatz wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht evaluiert.

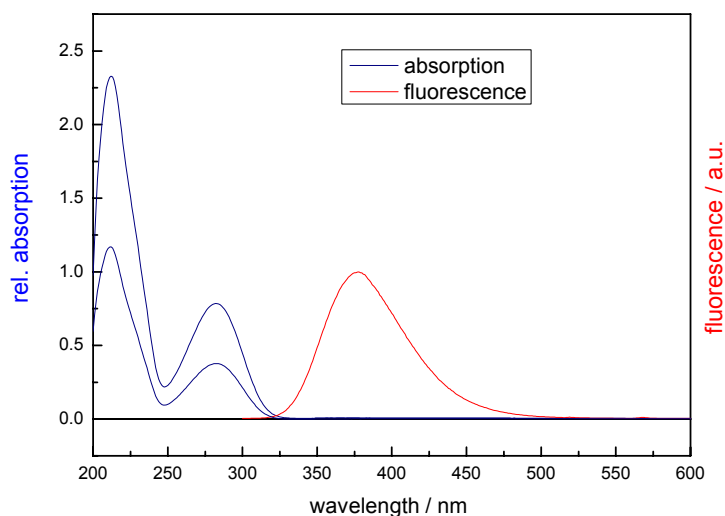


Abbildung I-31. UV-Absorptions- (blau, zwei unterschiedliche Konzentrationen) und das entsprechende Fluoreszenzspektrum (rot) der in Chloroform gelösten Verbindung **88**.

Die dargestellte geschützte Aminosäure **88** ist ein farbloser Feststoff, der aber unter UV-Licht mit einer Anregung von $\lambda=254$ nm eine schwach blaue Lumineszenz zeigt. In Chloroform gelöst ist die Lumineszenz sehr viel stärker. In Abbildung I-31 sind das UV- und das Fluoreszenzspektrum gezeigt. Das Anregungsmaximum der Aminosäure liegt bei $\lambda\approx 260$ nm und das Emissionsmaximum bei $\lambda=360$ nm.

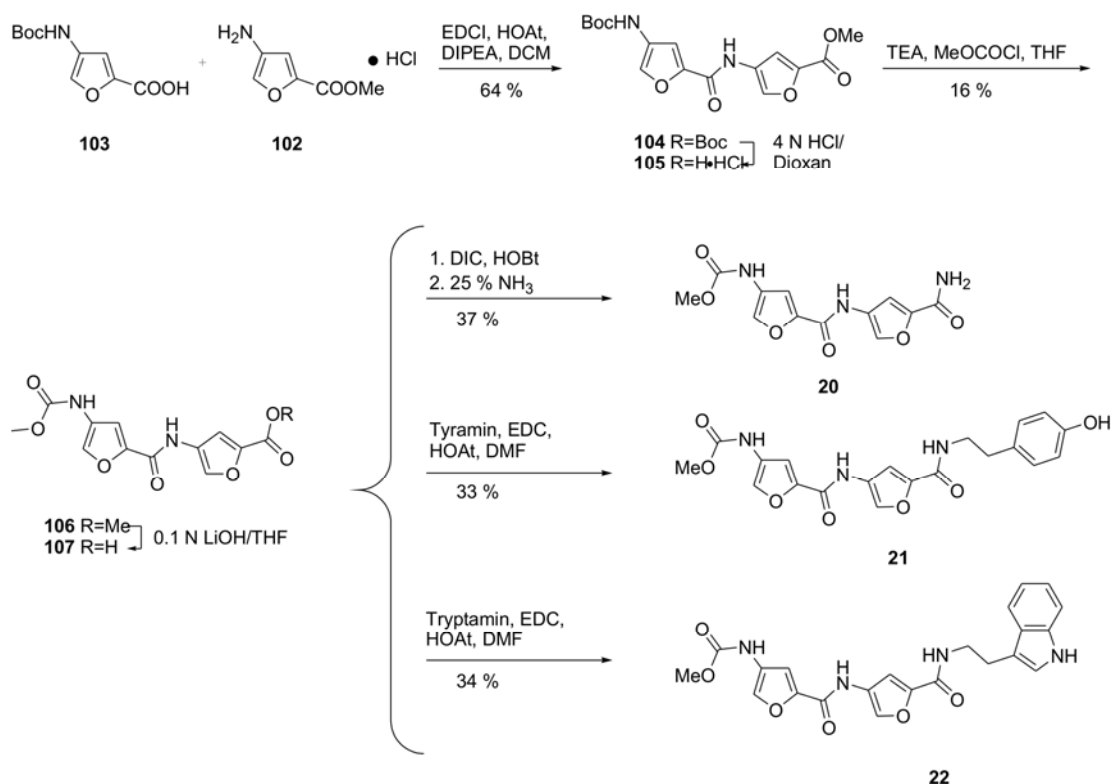
3.4 Totalsynthese der Proximicine A, B und C

Mit Baustein **88**, der analog der Aminosäurenomenklatur und der Nomenklatur der Heterozyklen in Lexitropsinen (Kapitel 1.1.4) im folgenden Boc-Fu-OMe genannt werden soll, konnte die Totalsynthese der Proximicine fortgeführt werden. Die Synthesestrategie sah zunächst den Aufbau des zentralen Dipeptids vor, das dann nach Abspaltung der Boc-Gruppe und anschließender Einführung des Methylcarbamats in die Proximicine A, B und C überführt wurde (Schema I-19).

Für den Aufbau des Dipeptids **104** wurden verschiedene Methoden zur Peptidkupplung evaluiert. Es stellte sich heraus, dass die Knüpfung der Peptidbindung am besten in DCM (im Vergleich zu DMF), mit EDCI und HOAt als Aktivierungsreagenzien für den C-Terminus (im Vergleich zu TBTU bzw. DIC/HOBt) und mit DIPEA als Base durchzuführen ist. Weiterhin wurde zunächst der C-Terminus voraktiviert bevor die Aminokomponente zugesetzt wurde. Dadurch wird sichergestellt, dass die Aminokomponente so schnell wie möglich abreagiert und so das Aminofuran nur in geringem Ausmaß Zersetzungsreaktionen unterliegt (Schema I-5). Die verwendeten Reagenzien bieten den Vorteil, dass sie größtenteils durch Extraktion mit Base und Säure aus dem Rohprodukt entfernt werden können. Dies sollte zusätzlich durch den Einsatz von äquimolaren Mengen der Reagenzien erleichtert werden. Dadurch ist nicht immer eine säulenchromatographische Aufreinigung des Kupplungsproduktes notwendig. Diese für den hier vorliegenden Fall optimierten Kupplungsbedingungen wurden in allen weiteren Peptidkupplungen dieser Arbeit verwendet.

Für die Abspaltung der Boc-Schutzgruppe des Dipeptids **104** wurde zunächst TFA/DCM (1:1, V/V) verwendet. Allerdings führte diese Methode zu braun- bis schwarzgefärbten Ölen als Produkte, deren Farbe offenkundig auf Zersetzungsprodukte zurückzuführen ist. Auch deshalb lieferten wahrscheinlich die

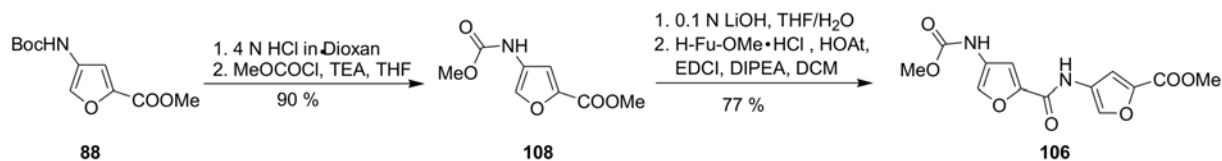
Kupplungsversuche mit diesen Furanaminen sehr schlechte Ausbeuten. Es ist zu vermuten, dass die verwendete TFA nicht völlig wasserfrei war und es deshalb in Folge zur Hydrolyse der Aminofurane kam. Deshalb wurde auch in diesem Fall wie schon bei den *N*-Methylpyrrolderivaten (Kapitel 2.1.1) die Boc-Schutzgruppe durch 4 N HCl in Dioxan abgespalten. Diese Lösung ist wasserfrei und lieferte deshalb wahrscheinlich deutlich bessere Ergebnisse.



Schema I-19. Totalsynthese der Proximicine A, B und C.

Der Nachteil der hier vorgestellten Syntheseroute liegt in der sehr geringen Ausbeute bei der Einführung des Methylcarbamats. Es ist zu vermuten, dass das dabei als Zwischenprodukt durchlaufene Aminofuran **105** unter den gegebenen Reaktionsbedingungen nicht stabil ist. So konnten von dieser Verbindung auch keine zufriedenstellenden analytischen Daten erhalten werden. Während Verbindungen vom Typ **102** keinen Zersetzungsreaktion zu unterliegen scheinen, ist dies bei dem Aminofuran **105** nicht der Fall. Die Ursache hierfür könnte an dem Substituenten am C-2 des Furan-Rings liegen. Ein Ester an dieser Position vermag das Aminohydrochlorid zu stabilisieren, ist aber ein weiterer Furanring in Form eines Carboxamids an dieser Position vorhanden, scheinen die entsprechenden Aminoverbindungen zur Zersetzung zu neigen. Eine zu den Tautomeren (Schema

I-5) analoge Grenzform könnte in einem Dipeptid aus zwei Furanaminosäuren über ein größeres π -System stabilisiert werden. Dadurch würden diese Dipeptide auch anfälliger gegenüber Hydrolyse, die aus dieser tautomeren Form heraus stattfindet.



Schema I-20. Synthese von Meoc-Fu-Fu-OMe (106) über die Zwischenstufe 108 zur Verwendung in der Totalsynthese der Proximicine unter Umgehung des Dipeptids Boc-Fu-Fu-OMe (104).

Aufgrund der schlechten Ausbeuten bei der Boc-Abspaltung und der nachfolgenden Einführung des Methylcarbamats (**104**→**106**) wurde eine andere Abfolge der Reaktionen gewählt (Schema I-20). Das Methylcarbamat sollte so früh wie möglich eingeführt werden, so dass keine Dipeptide aus Furanaminosäuren mit freier Aminogruppe während der Synthese auftreten. Diese modifizierte Syntheseroute beginnt mit einem Baustein Meoc-Fu-OMe (**108**), der aus Boc-Fu-OMe (**88**) durch Umschützen erhalten werden konnte. Unter den Bedingungen einer basischen Verseifung in wässrigem Milieu ist das Methylcarbamat stabil,^[117] sodass der C-Terminus geschützt werden und anschließend ein weiterer Baustein der Furanaminosäure gekuppelt werden konnte. Nach erneutem Verseifen des Methylesters konnten ausgehend von diesem Dipeptid (**106**) die Proximicine A, B und C dargestellt werden. Proximicin A (**20**) wurde durch eine Ammonolyse des OBt-Esters der Carbonsäure **107** dargestellt. Proximicin B (**21**) und C (**22**) dagegen wurden nach den bereits etablierten Kupplungsbedingungen mit EDCI/HOAt als Aktivierungsreagenzien und Tyramin bzw. Tryptamin als Nucleophile erhalten. Die so dargestellten Proximicine A, B und C waren in jeder Hinsicht identisch mit den isolierten Naturstoffen. Als Beweis sind die ¹H-NMR-Spektren im folgenden gezeigt (Abbildung I-34 bis Abbildung I-36).

Es war möglich von Derivat **104** (Schema I-19) Einkristalle zu erhalten und die erhaltene Röntgenstruktur zu lösen (Kapitel II.4.1). Die Struktur dieses Peptids im Festkörper ist flach, d.h. nahezu alle Atome des Gerüsts liegen in einer Ebene (Abbildung I-32). Lediglich ein Blick von der Seite zeigt, dass es leicht S-förmig ist und die beiden Furanringe gegeneinander um wenige Grad verdreht sind. Die zentrale Peptidbindung, die die beiden Furanringe miteinander verbindet, ist wie bei Peptiden

zumeist beobachtet *trans* konfiguriert. Bemerkenswert ist, dass dieses Peptid nahezu linear gestreckt ist, während das strukturell verwandte Netropsin in seiner Kristallstruktur halbmondförmig gebogen ist (Abbildung I-33).^[14] Die Ursache hierfür ist in der Orientierung der Heteroatome des Fünfrings zueinander zu finden. Während die Stickstoffatome der Kristallstruktur des Netropsins auf ein und dieselbe Seite zeigen, zeigen die Sauerstoffatome der Verbindung **104**, die eine unmittelbare Vorstufe in der Synthese der Proximicine darstellt, zumindest im Festkörper in gegenüberliegende Richtungen.

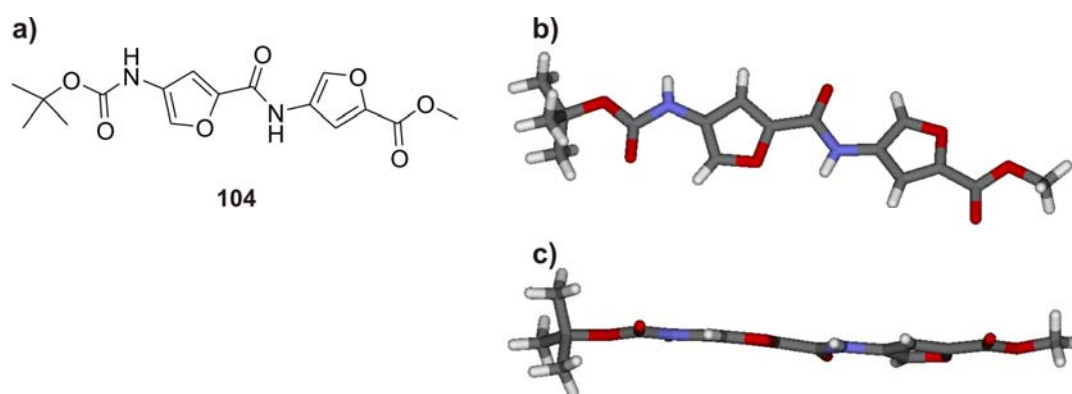


Abbildung I-32. Kristallstruktur von Boc-Fu-Fu-OMe in zwei verschiedenen Ansichten; b) Blick von oben; c) Seitenansicht.

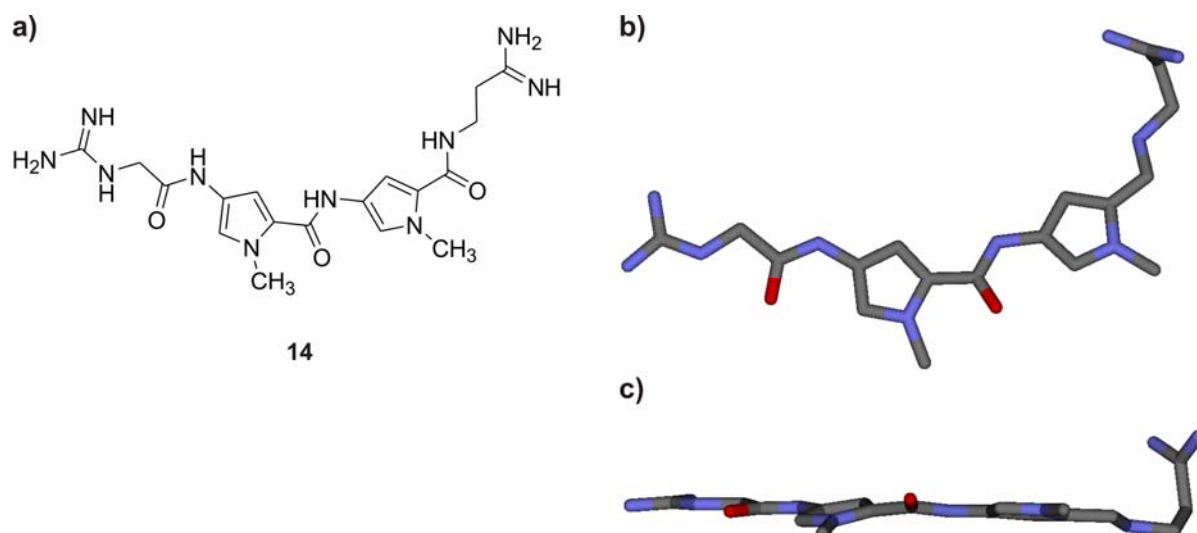


Abbildung I-33. Kristallstruktur von Netropsin in zwei verschiedenen Ansichten;^[14] b) Blick von oben; c) Seitenansicht. Die dargestellte Kristallstruktur ist nicht korrekt, da der Datensatz der Quelldateien fehlerhaft ist. Es fehlt die Carbonylfunktion am C-Terminus des Netropsins in b) und c).

Verbindung **104** ist der Grundstruktur der Proximicine strukturell sehr ähnlich. Vernachlässigt man die unterschiedlichen Alkylcarbamate (*tert*-Butyl- versus

Methylcarbamat) sind lediglich die Carboxamide der Naturstoffe noch nicht eingeführt und erst durch einen Methylester vorgebildet. Trotzdem kann man basierend auf der Röntgenstruktur von Verbindung **104** nicht zwingend die unterschiedlichen Wirkungsweisen (Kapitel 1.2) der Proximicine und des Netropsins erklären, insbesondere die unterschiedlichen Bindungsaktivitäten an doppelsträngige DNA.

Durch die vorliegende Röntgenstruktur sind lediglich Rückschlüsse auf eine mögliche Struktur oder Konformation der Proximicine im Festkörper möglich. Lägen die Proximicine in Lösung in der gleichen Konformation wie Verbindung **104** im Festkörper vor, so wäre eine Passgenauigkeit durch die lineare Struktur in die kleine Furche der DNA nicht gegeben. Hierfür wäre die halbmondförmige Konformation des Netropsins notwendig. Allerdings kann von einer Struktur im Festkörper nicht auf eine Lösungskonformation geschlossen werden. Ist die Rotationsbarriere zwischen den beiden grundsätzlichen Konformationen, linear gestreckt oder halbmondförmig gebogen, hinreichend klein, so könnte auch in Lösung eine netropsinartige Struktur vorliegen. Welche Konformationen der Proximicine in Lösung tatsächlich vorliegen, könnte durch weitere Untersuchungen, sowohl quantenchemische Rechnungen als auch NMR-spektroskopische Untersuchungen, näher bestimmt werden.

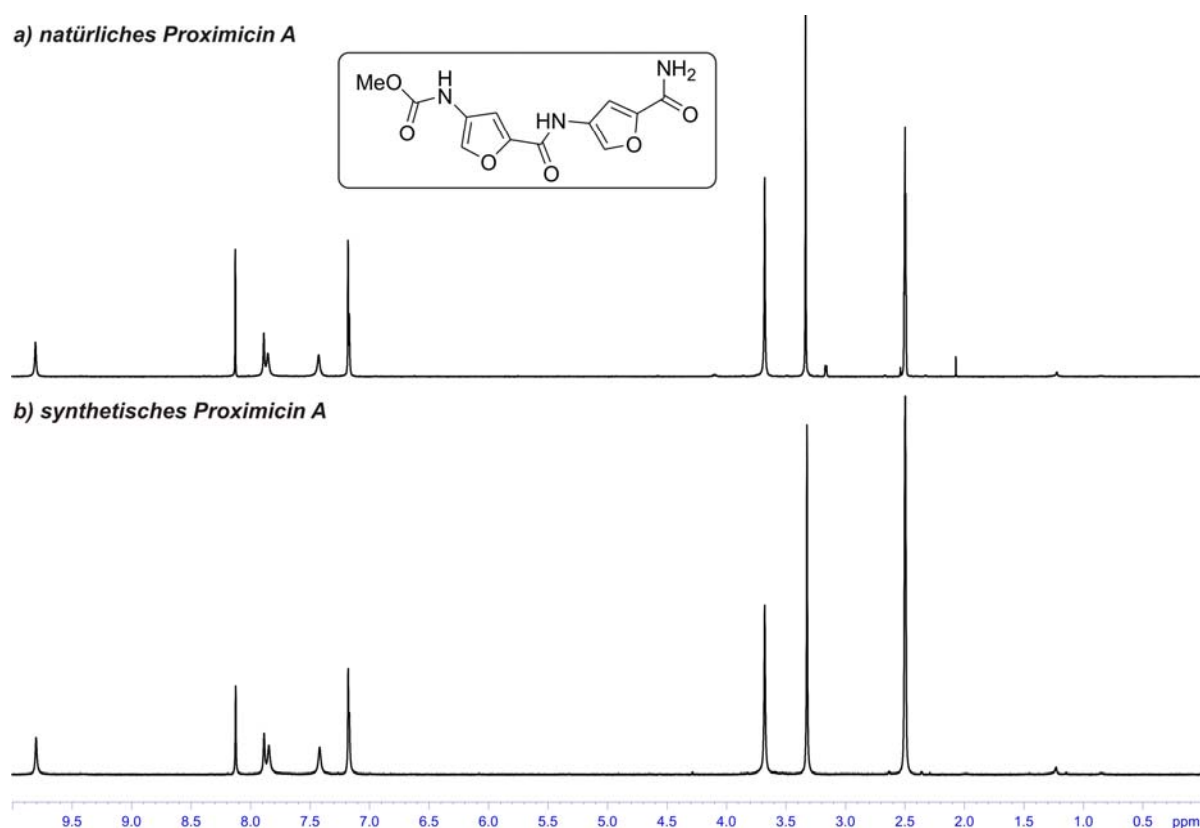
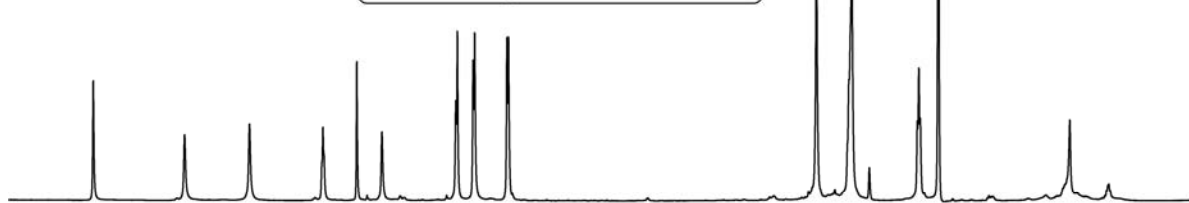
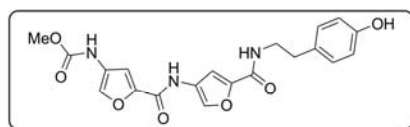
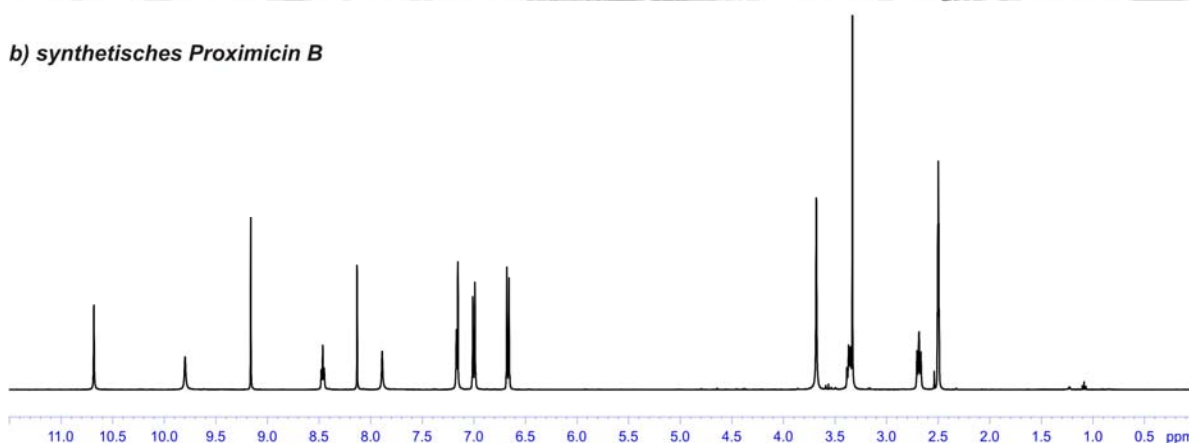


Abbildung I-34. Vergleich der ^1H -Spektren von natürlichem (a) und synthetischem (b) Proximicin A in DMSO-d_6 .

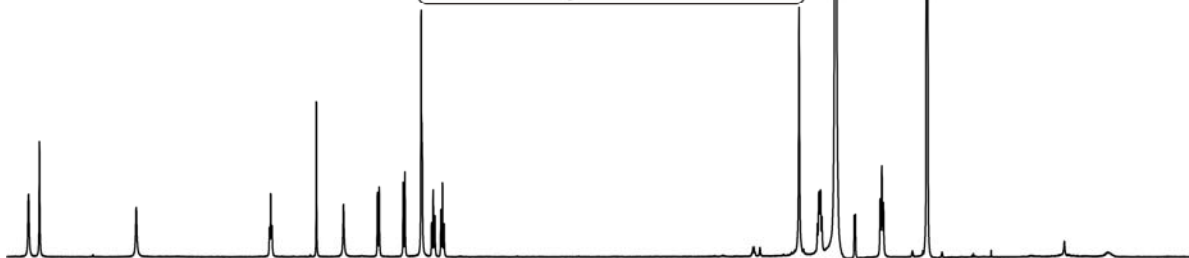
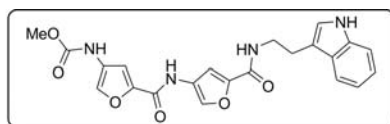
a) natürliches Proximicin B



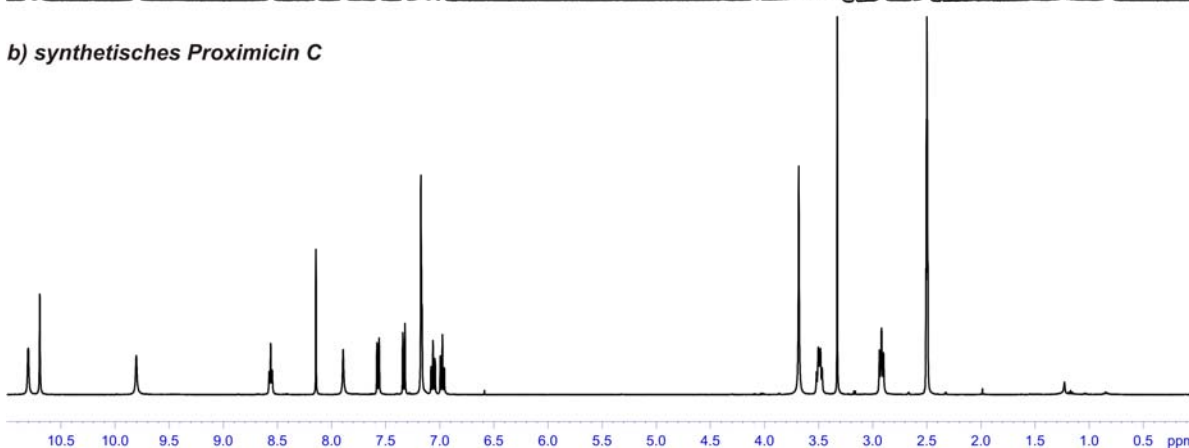
b) synthetisches Proximicin B

Abbildung I-35. Vergleich der ¹H-Spektren von natürlichem (a) und synthetischem (b) Proximicin B in DMSO-d₆.

a) natürliches Proximicin C



b) synthetisches Proximicin C

Abbildung I-36. Vergleich der ¹H-Spektren von natürlichem (a) und synthetischem (b) Proximicin C in DMSO-d₆.

3.5 Zusammenfassung der Ergebnisse

Im Rahmen der hier beschriebenen Totalsynthese der Proximicine A, B und C wurde erstmals eine 2,4-disubstituierte Furanaminosäure hergestellt. Ausgehend von 3-Furaldehyd war es in einer sehr kurzen und effizienten dreistufigen Synthese möglich, ein entsprechendes orthogonal geschütztes Derivat dieser Aminosäure zu erzeugen. Die vorgestellte Syntheseroute, die zu dieser Aminosäure führt, sollte variabel genug sein, um andere Schutzgruppen am *N*- und am *C*-Terminus einführen zu können. Die Möglichkeit der elektrophilen Substitution des Furanrings sollte es durch den Einsatz anderer Chlorameisensäureester erlauben, unterschiedlichste Esterfunktionen in der 2-Position einführen zu können. Weiterhin könnten grundsätzlich durch die Curtius-Umlagerung verschiedene Carbamatschutzgruppen an die Aminogruppe in 4-Position angefügt werden. So sollte es in weiteren Experimenten möglich sein, auch entsprechend geschützte Derivate herzustellen, die u.a. für eine Festphasensynthese geeignet sein sollten.

Durch die in dem vorliegenden Fall gewählte orthogonale Schützung der Aminofunktion der Furanaminosäure durch die säurelabile Boc-Gruppe und dem Methylester am *C*-Terminus war es möglich, die Totalsynthese der Proximicine durchzuführen. Es wurden hierfür optimierte Bedingungen zur Knüpfung der Peptidbindungen etabliert. Die vorgestellte Syntheseroute sollte variabel genug sein, um neben den Proximicinen auch weitere Derivate dieser neuen Naturstoffklasse im Rahmen von SAR-Studien herzustellen. Außerdem kann die im Rahmen dieser Arbeit erstmals hergestellte 2,4-disubstituierte Furanaminosäure auch zur Synthese neuer Lexitropsine und verwandter Polyamide eingesetzt werden. Im Verlauf der Synthese konnte ein geschütztes Dipeptid aus zwei Einheiten der genannten Furanaminosäure kristallisiert werden. Die daraus resultierenden Strukturdaten könnten zum einen für die Synthese von Lexitropsinen zum anderen aber auch für das Verständnis des Wirkmechanismus der Proximicine hilfreich sein. Die erfolgreiche Totalsynthese der Proximicine A, B und C hat weiterhin die Strukturaufklärung dieser Naturstoffe, die von Dr. K. Schneider durchgeführt wurde, bestätigt.^[64, 67]

4 **Synthese und biologische Evaluierung neuartiger *minor-groove-binder* basierend auf 4-Aminofuran-2-carbonsäure**

Die Proximicine A, B und C zeigen eine enge strukturelle Verwandtschaft mit den Naturstoffen Netropsin und Distamycin. Insbesondere das zentrale Di- bzw. Tripeptidmotiv, ist bis auf den Heterozyklus, Furan gegenüber *N*-Methylpyrrol, identisch. Während die Proximicine und auch die Netropsin-Proximicin-Hybride, die in Kapitel 2 vorgestellt wurden, keinerlei Interaktion mit doppelsträngiger DNA zeigen, sind Netropsin und Distamycin die ersten niedermolekularen Verbindungen gewesen, die selektiv an AT-reiche Sequenzen in die kleine Furche doppelsträngiger DNA binden (Kapitel 1.1.3). Seit dieser Entdeckung bestand ein großes Interesse daran, synthetische Derivate herzustellen, die eine spezifische DNA-Sequenz erkennen sollten, um so eine selektive Inhibierung der Genexpression herbeizuführen (Kapitel 1.1.4).^[15] Insbesondere wollte man Moleküle herstellen, die selektiv an GC-reiche DNA-Sequenzen binden können. Im Rahmen dieser Arbeiten wurde eine Vielzahl von Fünfringheterozyklen in netropsin- oder distamycinartige Moleküle eingebaut, so z.B. Imidazole, Thiazole, Thiophene und andere.^[15] Allerdings wurde dabei bemerkenswerterweise nie eine 4-Aminofuran-2-carbonsäure verwendet. Im Rahmen dieses Teils der vorliegenden Arbeit sollte die Verwendung von 4-Aminofuran-2-carbonsäure als monomerer Baustein in der Synthese von neuartigen Polyamiden auf Basis der Proximicine evaluiert werden. Diese Polyamide sollten in der Lage sein, in die kleine Furche der DNA zu binden. Die zunächst aufgestellte Arbeitshypothese, die Synthese und abschließend die biologische Evaluierung der Substanzen soll im folgenden Kapitel geschildert werden.

4.1 **Potentielle *minor-groove-binder* basierend auf 4-Aminofuran-2-carbonsäure**

In DNA-Schmelzanalysen wurde festgestellt, dass die Proximicine A, B und C weder mit GC-reichen noch mit AT-reichen DNA-Sequenzen in Wechselwirkung treten.^[67, 68] Durch die vorliegende Arbeit sollte im Rahmen von SAR-Studien eine solche biologische Aktivität basierend auf dem Grundgerüst der Proximicine herbeigeführt werden. Dazu wurden drei verschiedene Ansätze getestet.

In einem ersten Ansatz sollte die Struktur der Proximicine insofern geändert werden, dass eine weitere Furanamino-säure in das Rückgrat der Proximicine eingebaut

wurde (Abbildung I-37). Man erhält so die Proximicin-Homologen (**109-111**). Durch den Einbau eines weiteren Furanrings sollten sich zusätzliche Wechselwirkungen mit der DNA ausbilden können. Zum einen könnte die neu hinzugekommene amidische NH-Gruppe als H-Brücken-Donor dienen, zum anderen könnte eine CH-Gruppe des Furanrings eine hydrophobe Wechselwirkung mit der Methinylgruppe des C-2 an Adenin oder Thymin eingehen (Kapitel 1.1.3 und 1.1.4).

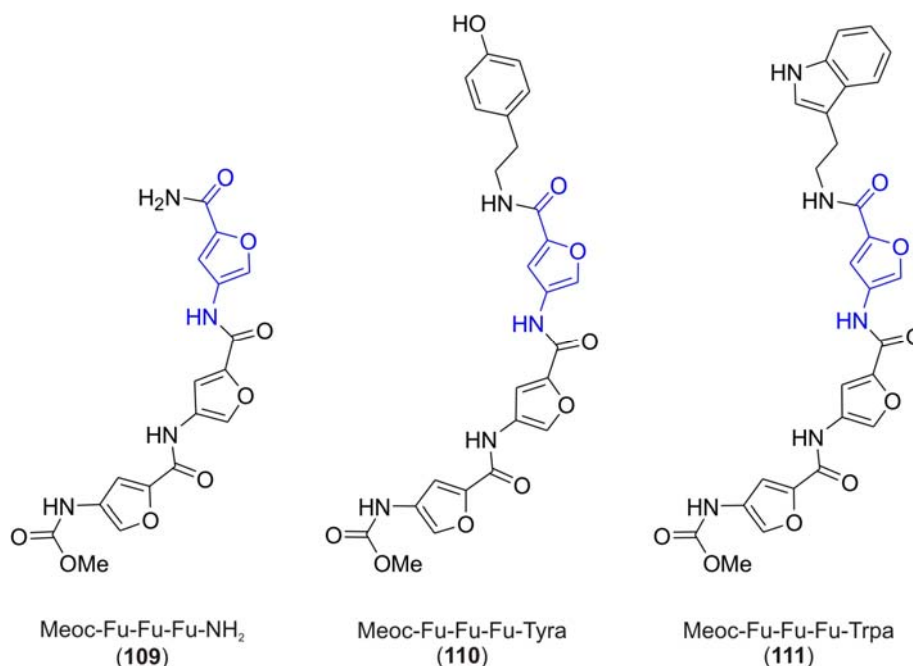


Abbildung I-37. Strukturen der Proximicin-Homologe A, B und C (109-111). In schwarz sind die Strukturelemente der Proximicine und in blau ist die im Vergleich zur Struktur der Proximicine zusätzlich eingefügte Furanaminosäure gezeigt.

In einem weiteren Ansatz sollte durch Synthese der Verbindungen **112** und **113** getestet werden, ob eine basische Seitenkette am C-Terminus eine Bindung in die kleine Furche der DNA ermöglicht (Abbildung I-38). Diese C-terminale Modifikation sollte sowohl anhand eines Dipeptids als auch eines Tripeptids der Furanaminosäuren eingeführt werden. Dabei sollte das Methylcarbamat am N-Terminus beibehalten werden. Von Arbeiten von Boger et al. ist bekannt, dass eine Carbamatfunktionalität (*tert*-Butylcarbamat) gegenüber einer Formylfunktion, wie sie natürlicherweise im Distamycin vorhanden ist, die Bindungsaffinität an die DNA verringert, aber nicht aufhebt.^[71]

Eine basische Seitenkette wie 3-Dimethylaminopropylamin könnte durch zwei Effekte eine Wechselwirkung mit der DNA begünstigen. Zum einen sollte das tertiäre Amin unter physiologischen Bedingungen protoniert sein und so z.B. eine Salzbrücke zum

negativ geladenen DNA-Rückgrat ermöglichen. Es wurde allerdings gezeigt, dass eine solche positive Ladung nicht zwingend für eine günstige Wechselwirkung mit der DNA vorhanden sein muss.^[118] Zum anderen bieten die Methylengruppen in der Alkylkette des Dimethylpropylamins die Möglichkeit, dass sich ähnlich wie in Netropsin oder Distamycin hydrophobe Wechselwirkungen mit der DNA ausbilden können (Kapitel 1.1.3 und 1.1.4).

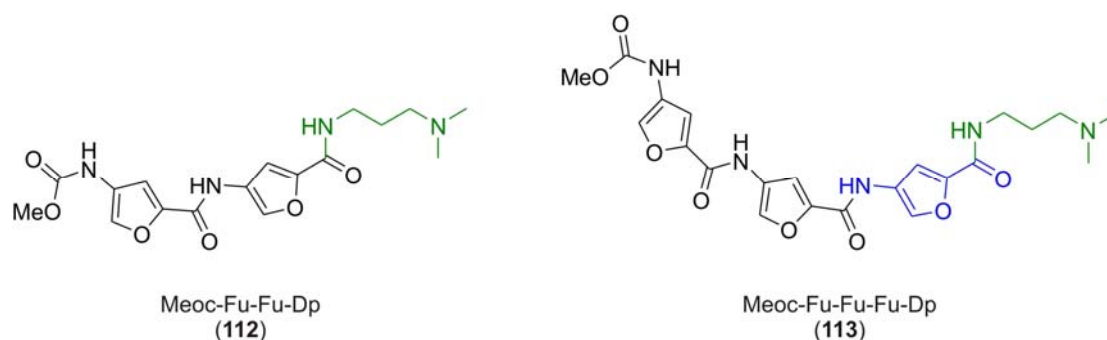


Abbildung I-38. Strukturen der Proximicin-Derivate 112 und 113 mit basischer Seitenkette. In schwarz sind die Strukturelemente der Proximicine, in blau ist die im Vergleich zur Struktur der Proximicine zusätzlich eingefügte Furanaminosäure und in grün ist die basische Seitenkette gezeigt.

In einem dritten Ansatz sollten die Furanderivate des Netropsins (**114**) und des Distamycins (**115**) erzeugt werden (Abbildung I-39). Durch Darstellung ihrer Furanderivate kann ein möglicherweise negativer Einfluss der *N*- und *C*-terminalen Reste der Proximicine A, B und C auf eine Bindungsaktivität an die DNA ausgeschlossen werden.

Durch den Ersatz der *C*-terminalen Amidinseitenkette durch einen Dimethylaminopropylaminrest in beiden Derivaten vermeidet man die oft nur variable Ausbeuten liefernde Pinner-Reaktion zur Darstellung von Amidinen.^[119-122] Der Ersatz ist zulässig, weil in nach derselben Art modifizierten Distamycinderivaten kaum ein Unterschied in der Bindungsaffinität gegenüber Distamycin festgestellt wurde.^[71] Weiterhin verändert der Ersatz die Bindungsselektivität nicht.^[123, 124]

Die sieben hier vorgestellten Verbindungen sollten aufgrund des 2,4-Substitutionsmusters des Furans und der Art der Seitenketten bevorzugt an AT-reiche Sequenzen binden. Diese Hypothese sollte durch die im folgenden vorgestellten Synthesen und die anschließende biologische Evaluierung der erhaltenen Derivate bestätigt werden.

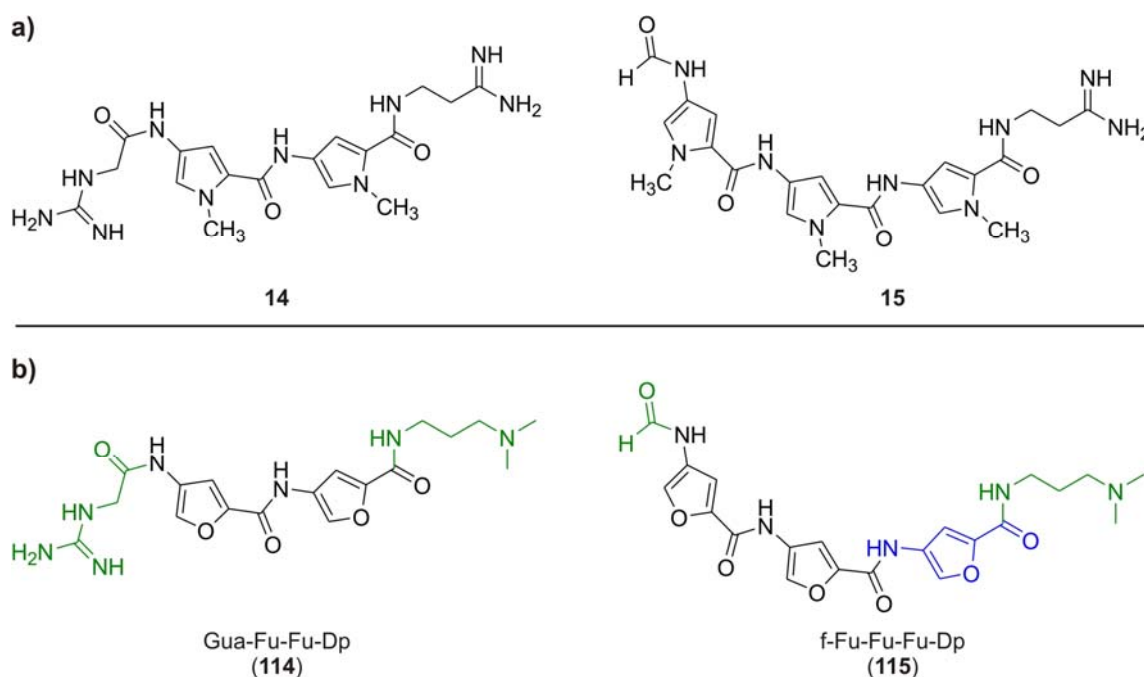


Abbildung I-39. a) Strukturen von Netropsin (14) und Distamycin (15); b) Strukturen des Furan-Netropsins (114) und des Furan-Distamycins (115). In schwarz sind die Strukturelemente der Proximicine, in blau ist die im Vergleich zur Struktur der Proximicine zusätzlich eingefügte Furanaminosäure und in grün sind die jeweiligen Strukturelemente des Netropsins bzw. Distamycins gezeigt.

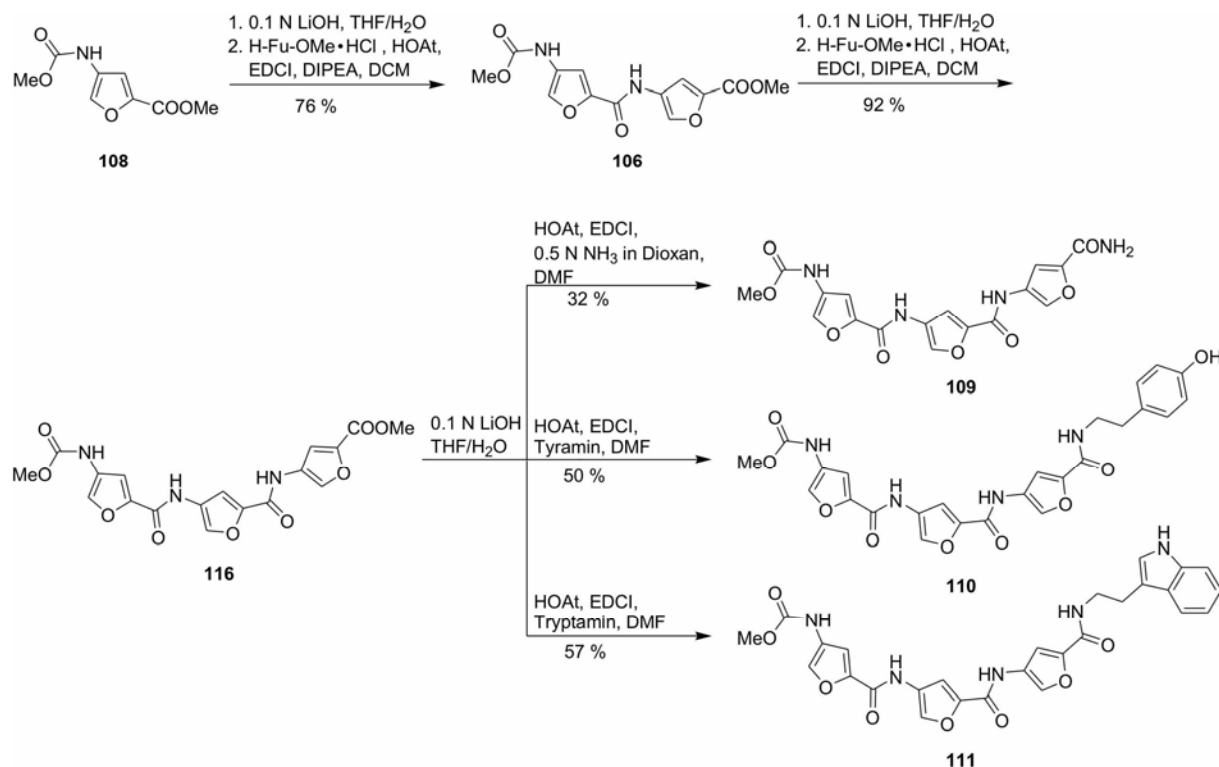
4.2 Synthese der potentiellen *minor-groove-binder*

4.2.1 Synthese der Proximicin-Homologe A-C

Die Synthese der Proximicin-Homologe A, B und C (**109-111**) sollte aufbauend auf den Ergebnissen, die aus der Totalsynthese der Proximicine (Kapitel 3.4) erhalten wurden, durchgeführt werden. Es sollte auch hier aufgrund ihrer Tendenz zur Zersetzung das Auftreten von Aminofuranen als Zwischenstufen vermieden werden. Deshalb wurde die Synthese ausgehend von Meoc-Fu-OMe (**108**) durchgeführt (Schema I-21), dessen Synthese bereits im Rahmen der Totalsynthese der Proximicine beschrieben wurde (Kapitel 3.4 und Schema I-20).

Ausgehend von diesem Baustein wurde das Tripeptid **116** durch repetitives Verseifen des Methylesters am C-Terminus und Knüpfen der darauffolgenden Peptidbindung unter optimierten Bedingungen mit EDCI/HOAt (Kapitel 3.4) aufgebaut. Das Dipeptid **106** musste anfänglich nach der Peptidkupplung noch säulenchromatographisch aufgereinigt werden. Allerdings konnte das Tripeptid **116** bereits nicht mehr durch Säulenchromatographie aufgereinigt werden, da seine Löslichkeit in organischen Lösungsmitteln (Methanol, Ethylacetat oder Dichlormethan) wesentlich schlechter

war. Die schlechten Löslichkeiten der Verbindungen **106** und **116** wurden ausgenutzt, indem die Menge an DCM, das als Lösungsmittel für die Peptidkupplung diente, möglichst klein gewählt wurde. Dadurch fielen die Kupplungsprodukte aus der Reaktionsmischung aus und konnten nach Filtration und einer kurzen Waschprozedur in den folgenden Reaktionsschritten eingesetzt werden.



Schema I-21. Synthese der Proximicin-Homologe A (109), B (110) und C (111).

Das Proximicin-Homologe A (**109**) wurde analog der Darstellung des Proximicins A durch Ammonolyse eines OBt-Esters erhalten. Bei den Peptidkupplungen, die bei der Darstellung der Proximicin-Homologe B (**110**) und C (**111**) durchgeführt wurden, musste DCM gegen DMF als Lösungsmittel getauscht werden, da die Edukte und auch der intermediär gebildete OBt-Esters nicht in DCM löslich waren. Dadurch fielen die Kupplungsprodukte nicht aus der Reaktionsmischung aus und mussten folglich durch Extraktion aus den Reaktionsmischungen erhalten werden. Während die Kupplungsreagenzien und ihre Nebenprodukte durch die Aufarbeitung nahezu vollständig abgetrennt werden konnten, waren die Rohprodukte aller drei Homologe vornehmlich mit der entsprechenden freien Säure verunreinigt. Allerdings ließen sie sich weder durch Säulenchromatographie an Kieselgel noch durch präparative RP-HPLC weiter aufreinigen.

Zur weiteren Aufreinigung der drei Proximicin-Homologe wurden deshalb festphasengebundene Reagenzien eingesetzt.^[125-128] In der Festphasensynthese von Peptiden wird der 2-Chlorotrityl-Linker gebunden an quervernetztes Polystyrolharz häufig eingesetzt, da Aminosäuren unter milden Bedingungen zügig immobilisiert werden können.^[129, 130] Diese Eigenschaften sollten in dem vorliegenden Fall ausgenutzt werden, um die in den Rohprodukten als Verunreinigung enthaltene Carbonsäure abzutrennen (Abbildung I-40). Außerdem sollten auch andere Nucleophile wie möglicherweise noch enthaltene Reste von HOAt oder freie Amine entfernt werden können.

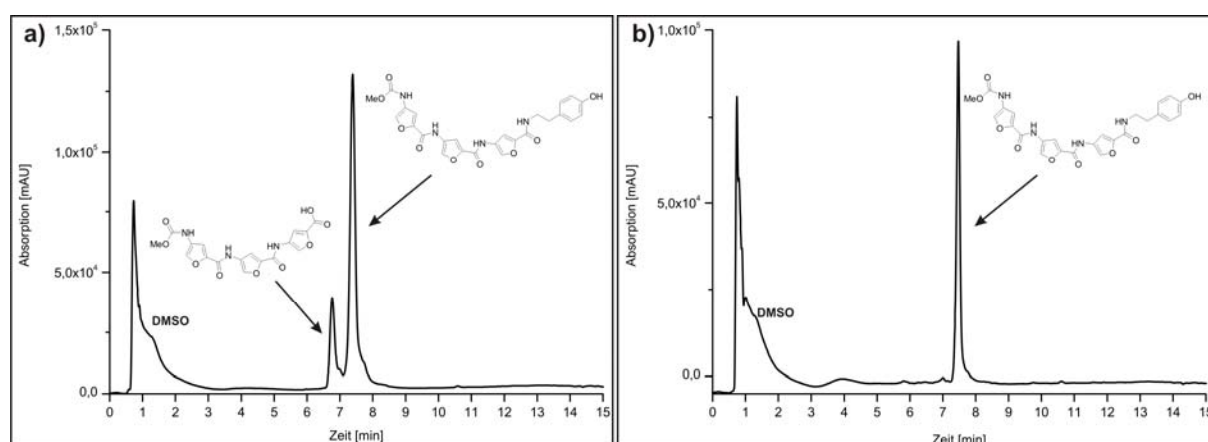


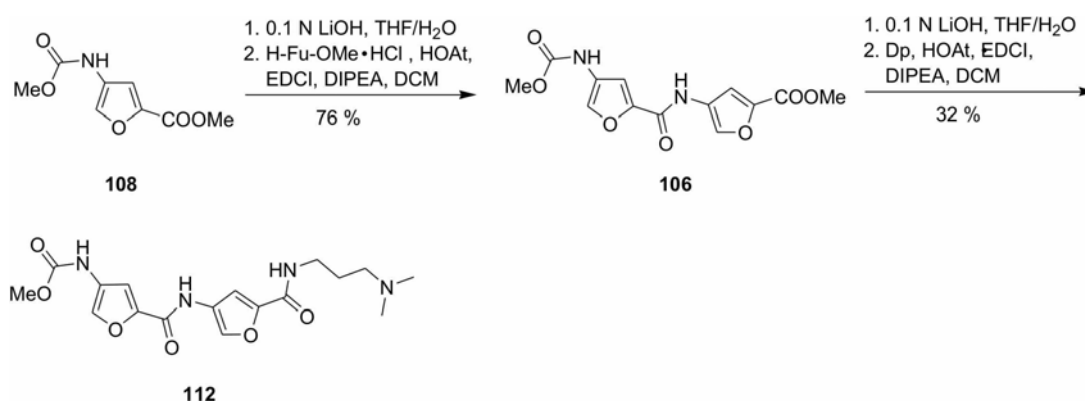
Abbildung I-40. HPLC-UV-Chromatogramme von a) verunreinigten und b) mit 2-Chlorotritylharz gereinigten Proximicin-Homolog B (Meoc-Fu-Fu-Tyra, 110). Das starke Injektionssignal ($R_t \approx 1$ min) ist auf DMSO zurückzuführen.

Es wurden 2-3 Äquivalente Harz bezogen auf die zu entfernende Komponente eingesetzt. Zum Neutralisieren des während der Reaktion freiwerdenden Chlorwasserstoffs wurde Hünigs Base im Überschuss eingesetzt. Das dabei gebildete DIPEA-Hydrochlorid ist nach Abfiltrieren des Harzes als Verunreinigung enthalten und lässt sich im Gegensatz zu der freien Base nicht am Vakuum entfernen. Es gibt zwei Möglichkeiten, um es vom Produkt abzutrennen. In der Literatur wird als einfache Methode ein ebenfalls am polymeren Träger gebundenes Hydrogencarbonat beschrieben.^[128] Durch Behandlung der Reaktionslösung nach Abfiltrieren des 2-Chlorotritylharzes mit dieser polymergebundenen Base wird das Hydrochlorid in seine freie Base umgewandelt und kann am Vakuum entfernt werden. Allerdings verliefen die eigenen Versuche unter diesen Bedingungen nicht erfolgreich, so dass auf eine andere Methode ausgewichen wurde. Das Filtrat aus der Behandlung des Rohproduktes mit 2-Chlorotritylharz wurde lyophilisiert. Das

dabei zurückgebliebene Hydrochlorid wurde anschließend durch Behandlung des Lyophilisats mit Wasser ausgewaschen. Nach diesem Protokoll wurden reine Proximicin-Homologe erhalten (Abbildung I-40).

4.2.2 Synthese der Proximicin-Derivate mit basischer Seitenkette

Die Synthese des Proximicin-Derivats **112** mit basischer Seitenkette wurde wie in Schema I-22 dargestellt durchgeführt. Ausgehend von Meoc-Fu-OMe (**108**) wurden die Peptidkupplungen nach der oben beschriebenen Prozedur durchgeführt (Kapitel 4.2.1).

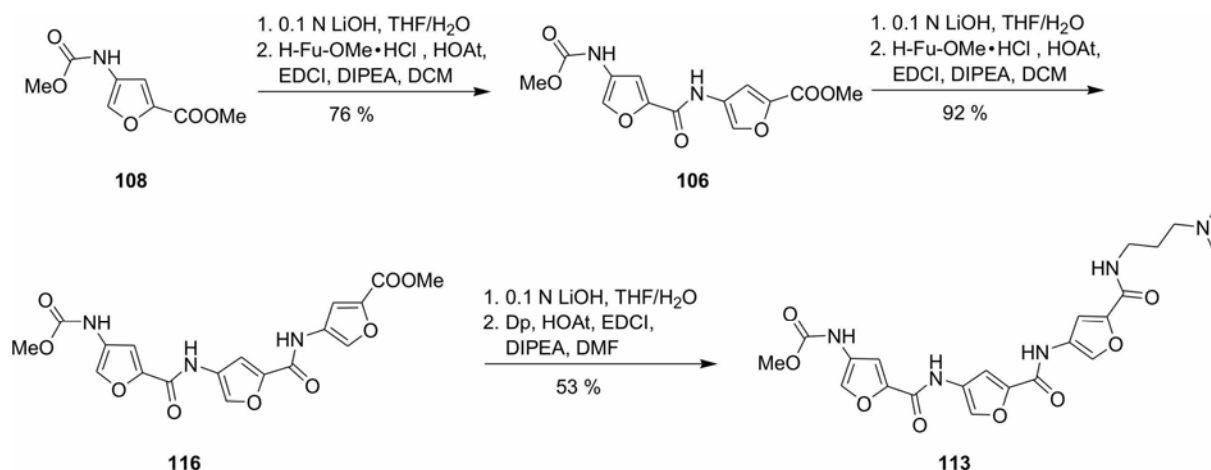


Schema I-22. Synthese des Proximicin-Derivats **112 (Meoc-Fu-Fu-Dp) mit C-terminaler basischer Seitenkette.**

Die Zielstruktur **112** konnte durch präparative RP-HPLC aufgereinigt werden. Die Synthese des Proximicin-Homologen **113** mit basischer Seitenkette (Meoc-Fu-Fu-Fu-Dp) orientierte sich an der Synthese der anderen Homologe, die in Kapitel 4.2.1 beschrieben wurde (Schema I-23).

Auch bei dieser Synthese wurden die optimierten Bedingungen zur Knüpfung der Peptidbindungen verwendet. Das gewünschte Proximicin-Homologe **113** ließ sich im Gegensatz zu seinem verwandten Derivat **112** nicht über präparative HPLC aufreinigen ähnlich den anderen Homologen **109-111** (Schema I-21). Deshalb musste eine alternative Aufreinigungsstrategie etabliert werden. Das erhaltene Rohprodukt enthielt als Verunreinigung Reste des Additives HOAt. In Vorversuchen konnte festgestellt werden, dass sich HOAt trotz seiner nucleophilen Hydroxygruppe nur unvollständig durch Behandlung mit 2-Chlorotritylharz abtrennen lässt. Die Acidität dieser Hydroxygruppe erlaubt es aber, HOAt mittels einer polymergebundenen Base abzutrennen. Als genügend basisch erwies sich 1,5,7-

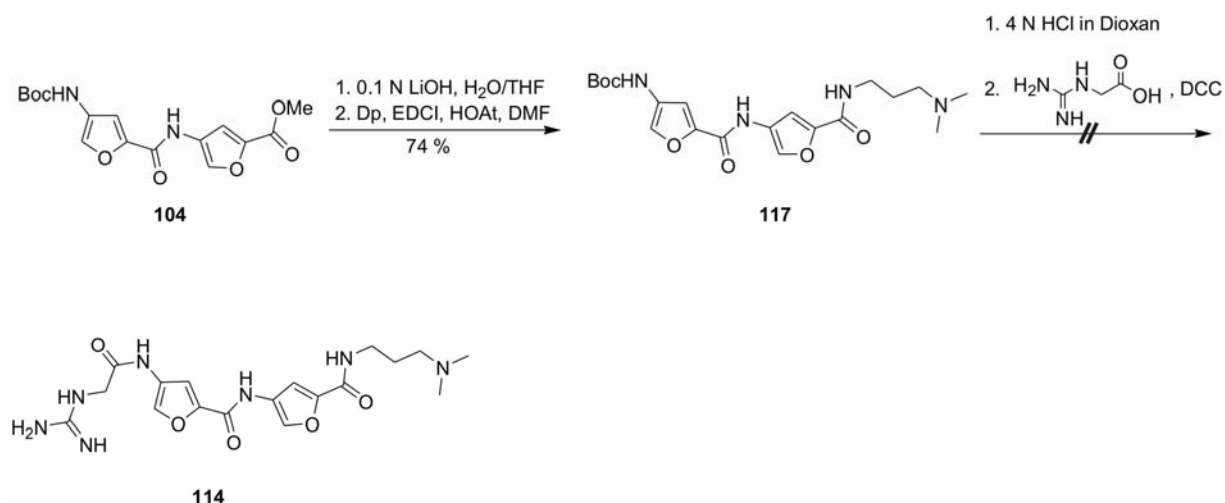
Triazabicyclo[4.4.0]dec-5-en.^[131] Ein polymergebundenes Derivat (PL-TBD) wird von Polymer Laboratories in Form einer SPE-Kartusche kommerziell angeboten. Dadurch konnte das Proximicin-Homologe **113** in reiner Form erhalten werden.



Schema I-23. Synthese des Proximicin-Homologs **113** (Meoc-Fu-Fu-Fu-Dp) mit C-terminaler basischer Seitenkette.

4.2.3 Synthese des Furan-Netropsin-Derivats

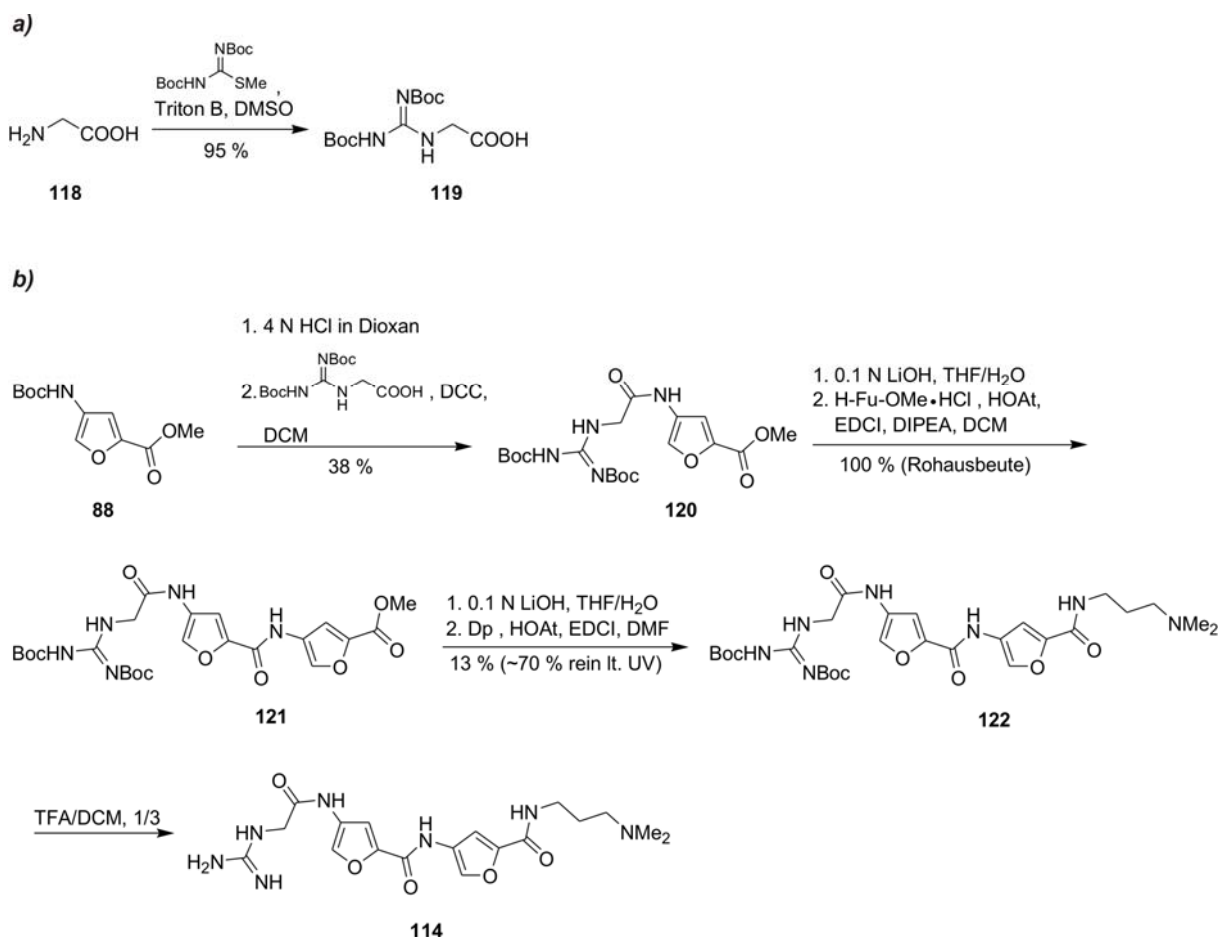
Die Totalsynthese von Netropsin (**14**) wurde 1985 von Lown et al. beschrieben.^[132] In Analogie zu dieser Synthese sollte versucht werden, ein Furanderivat des Netropsins aufzubauen. Aus Gründen der Praktikabilität wurde auf die Einführung der C-terminalen Amidgruppe verzichtet (Kapitel 4.1). Sie wurde durch eine Dimethylaminogruppe ersetzt.



Schema I-24. Geplante Synthese eines Furan-Netropsins (**114**) ausgehend von einem Synthesebaustein (Boc-Fu-Fu-OME, **104**) aus der Totalsynthese der Proximicine A-C.

Zunächst wurde ausgehend von der Verbindung Boc-Fu-Fu-OMe (**104**), die eine Zwischenstufe in der Totalsynthese der Proximicine ist (Kapitel 3.4, Schema I-19), nach Verseifung des Methylesters die basische Seitenkette eingeführt (Schema I-24). In einem folgenden Schritt sollte die Boc-Schutzgruppe der Verbindung **117** mittels 4 N HCl in Dioxan abgespalten und durch Peptidkupplung Guanidinoessigsäure *N*-terminal angeknüpft werden. Der letzte Syntheseschritt verlief nicht erfolgreich. Vermutlich ist dies erneut auf die Instabilität der Aminofurane der allgemeinen Form $H-(Fu)_n-R$ ($n=2, 3$) zurückzuführen (Kapitel 3.4).

In einem alternativen Ansatz wurde versucht, freie Aminofurane diesen Typs zu vermeiden. Deshalb sollte die Guanidinoessigsäure in geschützter Form so früh wie möglich *N*-terminal eingeführt werden (Schema I-25). Die Schützung der Guanidinofunktion ist notwendig, da freie Guanidine sehr gut wasserlöslich sind und somit eine schwierige Aufreinigung der Reaktionsmischungen zu erwarten ist. Beide terminalen Stickstoffatome des Guanidins sollten als *tert*-Butylcarbamate geschützt werden. Ein derart geschütztes Derivat ist kommerziell bei den gängigen Chemikalienlieferanten nicht erhältlich, kann aber sehr leicht durch Guanidinylierung von Glycin (**118**) mit entsprechend geschützten Methylisothioharnstoff erhalten werden (Schema I-25 a).^[133] Die Ausbeute der Peptidkupplung eines so erhaltenen Guanidinoessigsäure-Derivats (**119**) mit einem Aminofuran (**102**) konnte trotz unterschiedlicher Reaktionsparameter nicht über 38 % gesteigert werden. Trotzdem wurde versucht, das Furan-Netropsin (**114**) durch weitere Peptidkupplungen aufzubauen. Allerdings lieferten auch die folgenden Peptidkupplungen nur schlechte Ausbeuten und die Aufarbeitung der Reaktionsprodukte war nur unvollständig möglich, so dass die Synthesesequenz in Testreaktionen und teilweise mit Rohprodukten oder verunreinigten Derivaten fortgeführt wurde. Das Furan-Netropsin-Derivat **114** konnte zumindest mittels LC-MS-Charakterisierung als Reaktionsprodukt nachgewiesen werden. Es konnten aber nur wenige Milligramm in unreiner Form erhalten werden.



Schema I-25. Synthese des Furan-Netropsin-Derivats. a) Darstellung von zweifach Boc-geschützter Guanidinoessigsäure; b) Synthese des Furan-Netropsin-Derivats ausgehend vom *N*- zum *C*-Terminus. Die Synthesesequenz wurde nur in Testreaktionen zu Ende geführt.

Im Rahmen dieser Synthese konnten von Verbindung **120** Einkristalle erhalten werden. Die Lösung der Struktur gelang unter bestimmten Strukturvorgaben, die aus der Lösung der Kristallstruktur von Verbindung **104** bekannt waren (Abbildung I-32). Die Kristallstruktur ist in Abbildung I-41 dargestellt.

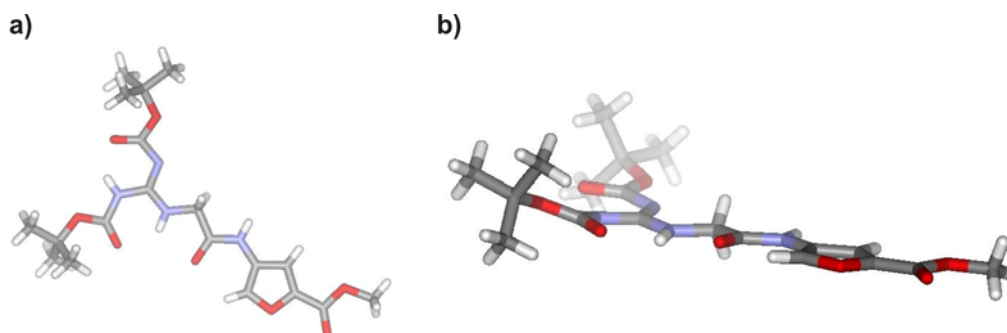


Abbildung I-41. Kristallstruktur des Derivates **120**. a) In der Aufsicht, b) in einer Seitenansicht.

Ausgehend von Boc-Fu-OMe (**88**) konnte so das Tetrapeptid Boc-Gly-Fu-Fu-Dp (**125**) in guten Ausbeuten erhalten werden. Die jeweiligen Reaktionsprodukte ließen sich im Gegensatz zur vorherigen Synthesestrategie (Schema I-25) durch Säulenchromatographie an Kieselgel aufreinigen.

Zur Einführung einer Guanidinogruppe sind verschiedene Reagenzien beschrieben worden.^[134, 135] Die Funktionalisierung von Aminogruppen bzw. Alkylgruppen zu Guanidinen kann zwei unterschiedlichen Prinzipien folgen. Eine Guanidinofunktion kann entweder durch Reaktion eines Amins mit einer Amidinquelle oder durch Reaktion eines Guanidins, Harnstoffs oder Thioharnstoffs mit einem Alkylhalogenid eingeführt werden. Der erste Ansatz ist der verbreitetere und sollte auch in dem vorliegenden Fall angewandt werden. Übliche Reagenzien sind in der folgenden Abbildung (Abbildung I-36) zusammengestellt.

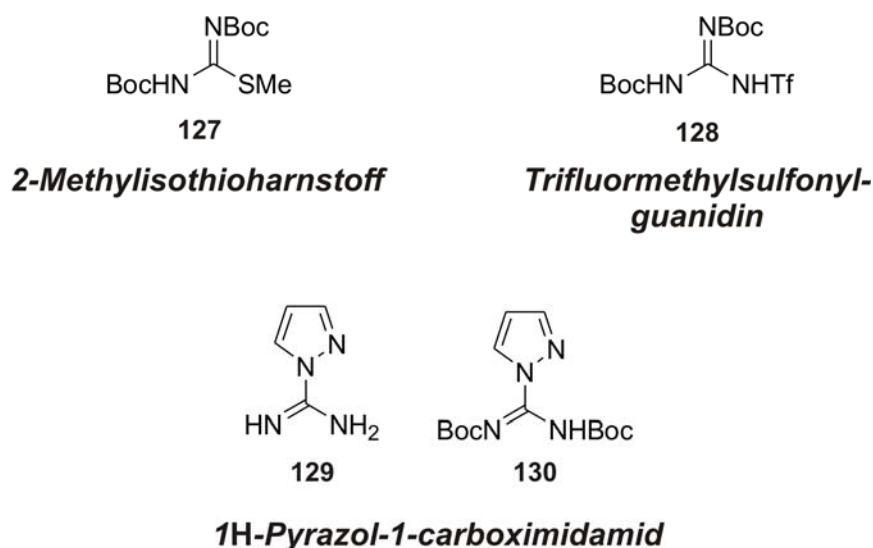


Abbildung I-42. Reagenzien zur Einführung einer Guanidinofunktion durch Reaktion eines freien Amins mit einem der Reagenzien: 2-Methylisothioharnstoffe, Trifluormethylsulfonylguanidine, 1H-Pyrazol-1-carboximidamide.^[134]

Die Reagenzien bieten die Möglichkeit, entweder geschützte oder ungeschützte Guanidinogruppen einzuführen. Da in dem vorliegenden Fall die Guanidinogruppe in dem letzten Reaktionsschritt eingeführt wird, sollte es nicht nötig sein, sie in einer geschützten Form einzuführen. So wird ein Reaktionsschritt, die Entschützung, gespart. Dazu sollte 1H-Pyrazol-1-carboximidamid (**129**) verwendet werden. Die verschiedenen Testreaktionen ergaben hinsichtlich Ausbeute nicht zufriedenstellende Ergebnisse. Außerdem ist eine Abtrennung des bei der Reaktion entstehenden Pyrazols schwierig, da beide Reaktionsprodukte gut wasserlöslich

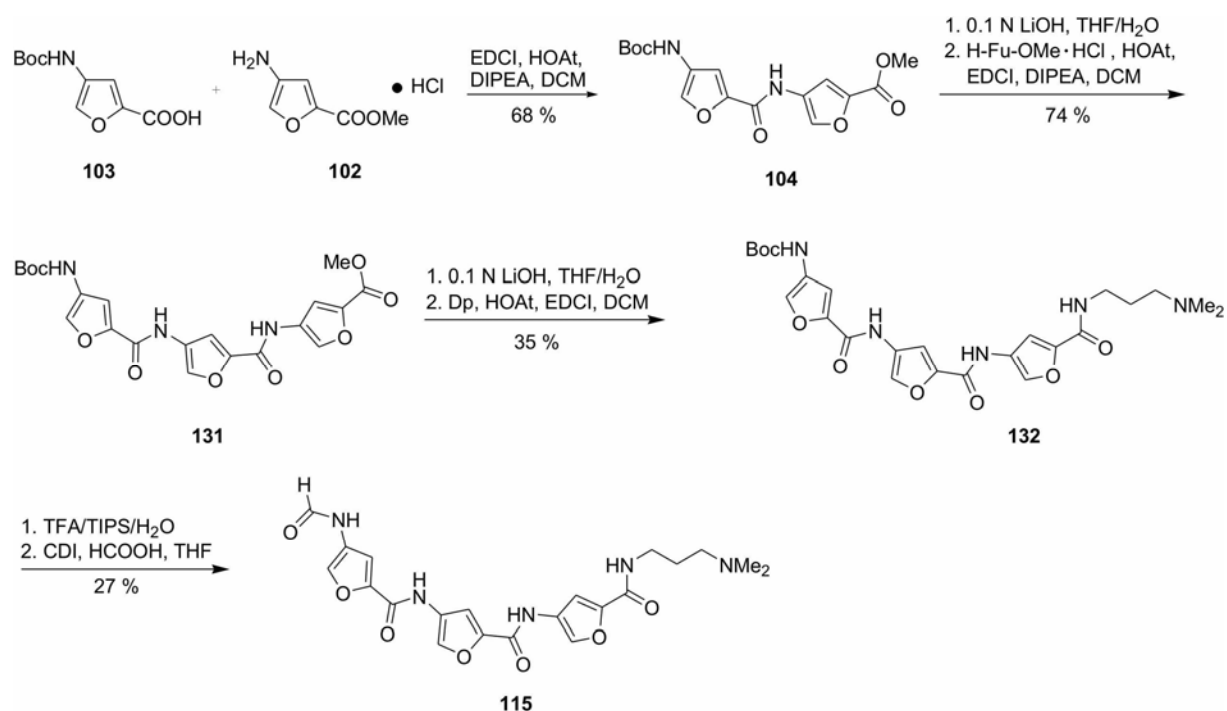
sind. Deshalb wurde der Umweg über die Einführung einer geschützten Guanidinogruppe gegangen.

Dafür sind Trifluormethylsulfonylguanidine sehr gut geeignet. Hier sollte das entsprechende Boc-geschützte Derivat, das sogenannte Goodmans Reagens (**128**), eingesetzt werden.^[136] Die Einführung der geschützten Guanidinogruppe verlief glatt und in guter Ausbeute (**125**→**126**) (Schema I-26). Die Boc-Schutzgruppen des Guanidins (**126**) ließen sich nachfolgend mit TFA/DCM abspalten, während Abspaltungsversuche mit 4 N HCl in Dioxan zu teilweiser Zersetzung des Reaktionsproduktes führten. Das so erhaltene TFA-Salz konnte durch Behandlung mit Anionenaustauscher in das entsprechende Hydrochlorid (**114**) überführt werden. So konnte erstmals ein Furan-Derivat des Netropsins in guten Ausbeuten synthetisiert werden.

4.2.4 Synthese des Furan-Distamycin-Derivats

Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit sollte sich die Synthese des Furan-Distamycins grundsätzlich an der Synthese des Proximicin-Homologs mit basischer Seitenkette (**113**) (Kapitel 4.2.2, Schema I-23) orientieren. Die Amidinseitenkette des Distamycins sollte wie schon beim Furan-Netropsin durch eine Dimethylaminopropylseitenkette ersetzt werden. Allerdings muss bei einem Distamycinderivat *N*-terminal eine Formyl-Gruppe eingeführt werden. Dies unterscheidet dieses Derivat von Verbindung **113** (Schema I-23), die an dieser Position ein Methylcarbammat trägt.

Methylcarbamate als Schutzgruppen in der Peptidsynthese sind nur bedingt geeignet, da sie über einen weiten pH-Bereich und gegenüber einer Vielzahl von Reagenzien äußerst stabil sind.^[117] Deshalb sollte das Derivat **113** nicht durch eine Sequenz aus Entschützung und anschließender Formylierung in das hier gewünschte Furan-Distamycin (**115**) umgewandelt werden. Eine Formylierung in einem frühen Reaktionsschritt, um die Gegenwart freier Aminofurane während der Synthesesequenz zu vermeiden, erschien ebenfalls nicht ratsam, da Formamide nur in einem begrenzten pH-Bereich (ca. pH 3-9) stabil sind und z.B. unter den basischen Bedingungen einer Esterverseifung hydrolysiert werden.^[117] Aus diesen Gründen wurde bei der Synthese des Furan-Distamycin-Derivats die Formylgruppe im letzten Reaktionsschritt eingeführt.



Schema I-27. Synthese des Furan-Distamycin-Derivats 115.

Zunächst wurde analog der Totalsynthese der Proximicine (Schema I-19) das Dipeptid **104** (Boc-Fu-Fu-OMe) aufgebaut. Ausgehend von diesem wurde durch wiederholte Verseifungen und Peptidkupplungen das Tetrapeptid **132** (Boc-Fu-Fu-Fu-Dp) dargestellt. Die Aufreinigung dieses Derivats musste wie schon bei den Derivaten **109-111** (Schema I-21) mittels 2-Chlortriethylharz erfolgen, um die als Edukt eingesetzte Säure aus dem Rohprodukt abtrennen zu können (Kapitel 4.2.1). Allerdings konnte in dem nachfolgenden Schritt das dabei gebildete DIPEA-Hydrochlorid nicht durch Waschen mit Wasser entfernt werden, da auch das Produkt durch das tertiäre Amin in der Seitenkette sehr gut wasserlöslich ist. Deshalb wurde das erhaltene Produkt in Wasser gelöst und über eine SPE-Kartusche beladen mit polymergebundenen Ammoniumhydrogencarbonat eluiert. Dabei wurde das Hydrochlorid in das freie Amin umgewandelt, das dann durch Lyophilisieren entfernt werden konnte. Die Abspaltung der Boc-Schutzgruppe wurde mit TFA/TIPS/H₂O durchgeführt. Dabei wurde darauf geachtet, die Reaktionszeit so kurz wie möglich zu halten. Versuche zur Abspaltung mit 4 N HCl in Dioxan verliefen nicht erfolgreich und führten zu Zersetzung des Produktes. Nach Lyophilisieren wurde das erhaltene TFA-Salz mittels Staab-Reagenz (*N,N*-Carbonyldiimidazol, CDI) und Ameisensäure ohne vorherige Aufreinigung formyliert.^[71, 137-139] Dabei wird zunächst in einer Voraktivierung ein Formylimidiazol gebildet, das dann zugegebenes Amin unter

Bildung von Imidazol formyliert. Es muss keine weitere Base zugegeben werden, auch dann nicht, wenn mit Hydrochloriden oder wie in dem vorliegenden Fall mit TFA-Salzen gearbeitet wird. Das Rohprodukt konnte mittels präparativer Umkehrphasen-HPLC aufgereinigt werden. Die schlechte Ausbeute von lediglich 27 % ist vermutlich auf die Instabilität des als Zwischenprodukt gebildeten Aminofurans zurückzuführen (Kapitel 3). Mit der Ausarbeitung dieser Synthesesequenz wurde erstmals ein Furan-Derivat des Distamycins in moderaten bis guten Ausbeuten synthetisch zugänglich.

4.3 Biologische Evaluierung

4.3.1 Biologische Evaluierung der potentiellen *minor-groove-binder*

Die im vorherigen Kapitel (Kapitel 4.2) beschriebenen Derivate wurden einer biologischen Evaluierung unterzogen. Zum einen wurde ihre Aktivität gegen verschiedene Tumorzelllinien getestet und zum anderen sollte durch DNA-Schmelzanalysen geprüft werden, ob sie wie in der Arbeitshypothese (Kapitel 4.1) dargelegt, tatsächlich in der Lage sind, mit doppelsträngiger DNA in Wechselwirkung zu treten und in die kleine Furche der DNA zu binden.

Tabelle I-10. Schmelztemperaturen in °C von DNA1 (catggccatg) in einer Konzentration von 2 µM nach Inkubation mit den aufgeführten Verbindungen in verschiedenen Konzentrationen.

Verbindung	0 µM	1 µM	2 µM	3 µM	4 µM	6 µM	ΔT_m
Netropsin (14)	47	47	47	47	47	47	0
Distamycin (15)	47	47	47	47	46	46	~ 0
Meoc-Fu-Fu-Fu-NH ₂ (109)	47	48	47	48	47	47	0
Meoc-Fu-Fu-Fu-Tyra (110)	47	48	49	48	47	46	~ 0
Meoc-Fu-Fu-Fu-Trpa (111)	47	47	48	48	47	47	0
Meoc-Fu-Fu-Dp (112)	47	47	47	47	47	47	0
Meoc-Fu-Fu-Fu-Dp (113)	47	47	47	47	47	46	0
Gua-Fu-Fu-Dp (114)	46	46	46	46	48	48	2
f-Fu-Fu-Fu-Dp (115)	46	47	48	46	46	46	0

Die DNA-Schmelzanalysen wurden von Dipl.-Chem E. Socher (Arbeitskreis Prof. O. Seitz, Humboldt-Universität zu Berlin) durchgeführt. Für diese Untersuchungen wurden zwei verschiedene Oligonucleotid-Sequenzen verwendet (DNA1: cat**ggcc**atg; DNA2: cgcaa**attt**gcg), DNA1 ist eine GC-reiche und DNA2 eine AT-reiche Sequenz.

In Tabelle I-10 sind die Ergebnisse der Schmelzanalysen mit der Oligonucleotidsequenz DNA1 gezeigt. Durch keine der getesteten Verbindungen tritt eine Änderung des Schmelzpunktes der DNA-Sequenz auf. Durch keine der Substanzen kann eine messbare Wechselwirkung mit einer GC-reichen DNA-Sequenz erzielt werden.

Die Schmelztemperaturen von DNA2 nach Inkubation mit den synthetisierten potentiellen *minor-groove-bindern*, Netropsin und Distamycin sind in verschiedenen Konzentrationen in Tabelle I-11 aufgeführt.

Tabelle I-11. Schmelztemperaturen in °C von DNA2 (cgcaaattt**gcg) in einer Konzentration von 2 µM nach Inkubation mit den aufgeführten Verbindungen in verschiedenen Konzentrationen. Die grau unterlegten Einträge markieren eine stabilisierende Wechselwirkung der entsprechenden Verbindung mit der DNA-Sequenz.**

Verbindung	0 µM	1 µM	2 µM	3 µM	4 µM	6 µM	ΔT_m
Netropsin (14)	53	69	70	71	67	72	19
Distamycin (15)	53	65	66	67	67	68	15
Meoc-Fu-Fu-Fu-NH ₂ (109)	54	55	56	56	56	56	2
Meoc-Fu-Fu-Fu-Tyra (110)	51	55	57	54	57	55	~ 5
Meoc-Fu-Fu-Fu-Trpa (111)	54	54	54	54	54	54	0
Meoc-Fu-Fu-Dp (112)	53	53	53	54	54	54	1
Meoc-Fu-Fu-Fu-Dp (113)	51	58	59	60	61	61	10
Gua-Fu-Fu-Dp (114)	51	57	57	57	59	60	9
f-Fu-Fu-Fu-Dp (115)	51	56	57	56	58	59	8

Netropsin und Distamycin führen zu einer Stabilisierung der Doppelhelix einer AT-reichen DNA-Sequenz. Dies zeigt sich durch eine Verschiebung der Schmelzpunkte von niedrigen zu höheren Temperaturen durch Zugabe der entsprechenden Verbindung. Im Fall der Zugabe von Netropsin zu DNA2 verschiebt sich der Schmelzpunkt von 53 °C auf 72 °C ($\Delta T_m=19$ °C) und im Fall von Distamycin von 53 °C auf 68 °C ($\Delta T_m=15$ °C). Dies steht in Einklang mit literaturbekannten Daten, die

besagen, dass Netropsin und Distamycin an AT-reiche Sequenzen der DNA binden.^[14, 19]

Von den synthetisierten Verbindungen **109-113** führen das Proximicin-Homologe B **110** und das Proximicin-Derivat **113** mit basischer Seitenkette zu einer Erhöhung der Schmelztemperatur. Die Verschiebung der Schmelztemperaturen liegt im ersten Fall bei $\Delta T_m \approx 5^\circ\text{C}$ und im zweiten Fall bei $\Delta T_m = 10^\circ\text{C}$. Beispielhaft sind in Abbildung I-43 die Schmelzkurven einer GC-reichen DNA-Sequenz nach Inkubation mit Verbindung **110**, Meoc-Fu-Fu-Fu-Tyra, gezeigt. Die durch beide Verbindungen resultierende Stabilisierung der DNA ist nicht so stark ausgeprägt wie bei Netropsin oder Distamycin aber trotzdem signifikant.

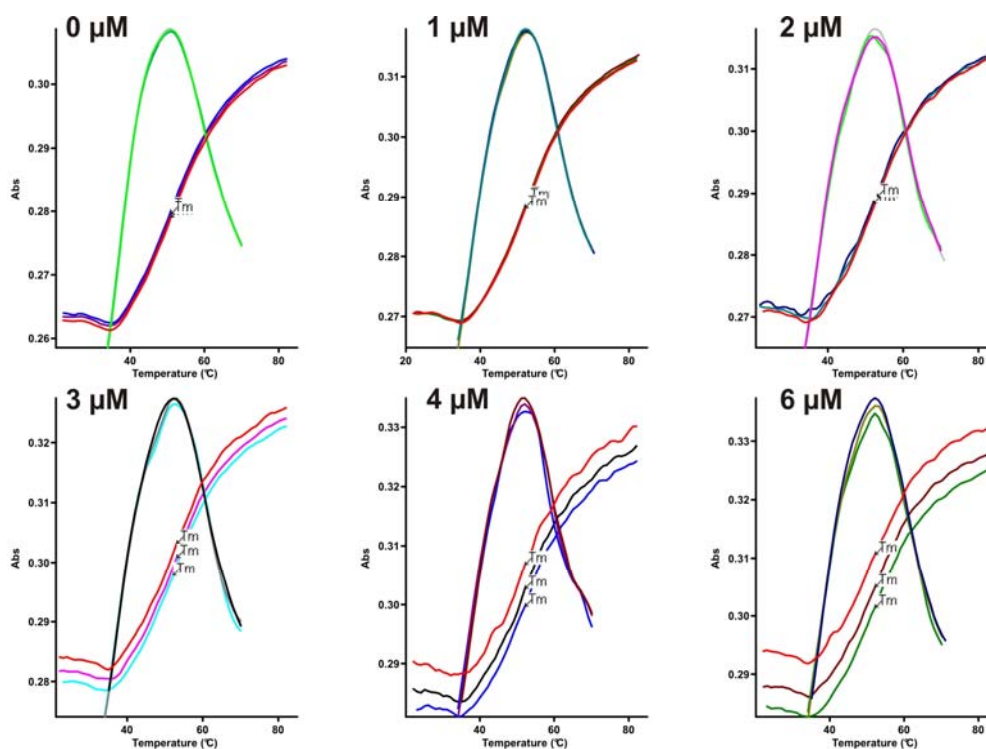


Abbildung I-43. Schmelzkurven einer 2 µM AT-reichen DNA-Sequenz (DNA2, cgcaaatttgcg) nach Inkubation mit der angegebenen Konzentration der Verbindung Meoc-Fu-Fu-Fu-Tyra (110). Der Schmelzpunkt ist jeweils mit T_m gekennzeichnet.

Auch die Furan-Analoga (**114** und **115**) von Netropsin und Distamycin binden in die kleine Furche der DNA. Die Schmelzpunkte der AT-reichen Sequenz werden deutlich durch die Zugabe dieser beiden Substanzen verschoben (Abbildung I-44). Allerdings ist der Effekt nicht so stark ausgeprägt wie bei den Naturstoffen selbst. Es erfolgt lediglich eine Verschiebung um $\Delta T_m = 9^\circ\text{C}$ für das Furan-Netropsin-Derivat (**114**) und von $\Delta T_m = 8^\circ\text{C}$ für das entsprechende Distamycin-Derivat (**115**). Damit ist die

Stabilisierung der DNA-Sequenz durch diese beiden Derivate schwächer als im Fall der Naturstoffe selbst. Allerdings ist das Furan-Netropsin-Derivat die einzige der getesteten Verbindungen, die zwei Furan-Ringe aufweist und trotzdem mit der DNA interagieren kann.

Die anderen Derivate führten zu keiner Verschiebung des Schmelzpunktes der DNA und treten demnach nicht mit ihr in Wechselwirkung.

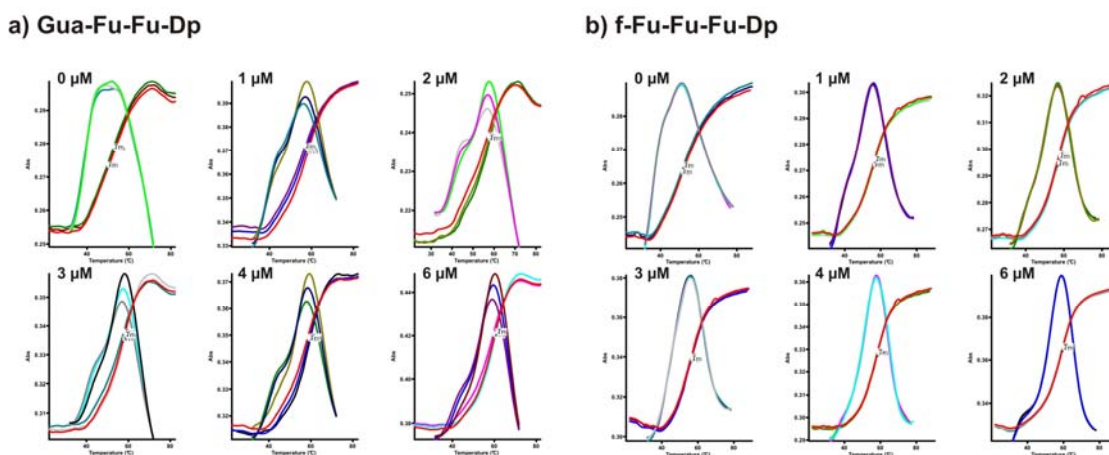


Abbildung I-44. Schmelzkurven einer 2 µM AT-reichen DNA-Sequenz (DNA2, cgcaaatgtgcg) nach Inkubation mit der angegebenen Konzentration der Verbindungen a) Gua-Fu-Fu-Dp (114) und b) f-Fu-Fu-Fu-Dp (115). Der jeweilige Schmelzpunkt ist mit T_m gekennzeichnet.

4.3.2 Ergebnisse der Antitumortestungen von Syntheseintermediaten und SAR

Im Rahmen der Antitumortestung gegen drei verschiedene Krebszelllinien wurden nicht nur die sieben in diesem Kapitel vorgestellten potentiellen *minor-groove-binder* (**109-115**) getestet, sondern auch einige Zwischenstufen der jeweiligen Syntheserouten. Sämtliche getesteten Verbindungen wurden bis zu einer maximalen Testkonzentration von 20 µg/ml auf ihre Aktivität gegen AGS- (Magenkarzinom), HepG2- (Leberkarzinom) und MCF7-Zellen (Mammakarzinom) geprüft. Die Ergebnisse sind in Tabelle I-12 bis Tabelle I-15 zusammengestellt.

Zunächst sollen die Antitumoraktivitäten der Zwischenstufen, die zur Synthese der Proximicin-Homologe (**109-111**) geführt haben, betrachtet werden (Tabelle I-12). Die Ergebnisse zeigen, dass Derivate mit freien Säuregruppen (**103**, **117b**, **131b**, **116b**) an der 2-Position eines Furanringes keine (**103**, **108** und **116b**) oder nur eine sehr

schwache Aktivität (**131b**) zeigen. Als weitere Tendenz lässt sich ablesen, dass je mehr Furanamino-säuren im Peptid aufeinander folgen, desto höher ist die Aktivität des entsprechenden Derivats. Dies gilt sowohl für die Reihe der Boc-geschützten Derivate (**88**, **104** und **131**), als auch für die Reihe der als Methylcarbamat geschützten Derivate (**108**, **106** und **116**), auch wenn hier die Aktivitätssteigerung nicht so stark ausgeprägt ist, denn die Derivate **106** und **116** haben lediglich vergleichbare Aktivitäten. Aber auch Derivate mit nur einem Furanring und unterschiedlichen Substituenten in 4-Position (**88**, **100-102**) besitzen eine moderate Antitumorwirkung. Eine Aminofunktion an dieser Position, entweder als Boc-geschütztes oder als freies Amin (**88** und **102**), scheint für eine Aktivität günstig zu sein. Für Meoc-Fu-OMe (**108**) konnte keine Hemmung des Zellwachstums nachgewiesen werden.

Tabelle I-12. Antitumoraktivitäten von einigen Zwischenstufen der Synthese der Verbindungen 109-111.

Verbindung		AGS ^[a] GI ₅₀ [μM] ^[b]	HepG2 ^[a] GI ₅₀ [μM] ^[b]	MCF7 ^[a] GI ₅₀ [μM] ^[b]
einkernige Furanderivate	f-Fu-OMe (100)	109.0	70.1	83.1
	Carb-Fu-OMe (101)	105.8	114.6	> 117.6
	Boc-Fu-OMe (88)	66.3	60.1	62.2
	Boc-Fu-OH (103)	k.H.	k.H.	k.H.
	Meoc-Fu-OMe (108)	k.H.	k.H.	k.H.
	H-Fu-OMe•HCl (102)	73.2	43.4	> 112.6
zwei-	Boc-Fu-Fu-OMe (104)	12.8	9.4	4.6
	Boc-Fu-Fu-OH (117b)	k.H.	k.H.	k.H.
	Meoc-Fu-Fu-OMe (106)	43.8	60.0	> 64.9
drei-	Boc-Fu-Fu-Fu-OMe (131)	4.6	1.4	5.4
	Boc-Fu-Fu-Fu-OH (131b)	> 44.9	18.9	19.1
	Meoc-Fu-Fu-Fu-OMe (116)	46.7	k.H.	> 47.9
	Meoc-Fu-Fu-Fu-OH (116b)	k.H.	k.H.	k.H.

[a] Zelllinien: AGS: Magenkarzinom; HepG2: Leberkarzinom, MCF7: Mammakarzinom; [b] GI₅₀: 50 % Wachstumshemmung (maximale Testkonzentration 20 μg/mL); k.H.=keine Hemmung.

Auch die Zwischenstufen der beiden Syntheserouten des Furan-Netropsins wurden auf Antitumoraktivität getestet (Kapitel 4.2.3). Die Zwischenstufen **120-122** der

ursprünglichen Syntheseroute zeigen eine zytotoxische Wirkung (Tabelle I-13). Bei diesen Derivaten scheint die Gegenwart einer freien Carboxygruppe (**120b**) zu keiner Aktivitätsminderung zu führen. Außerdem hat auch hier die Einführung eines weiteren Furanringes in das Peptidrückgrat einen positiven Einfluss auf die Aktivität. So zeigt Derivat **121** eine stärkere Aktivität als Verbindung **120**. Dieses Ergebnis kann allerdings verfälscht sein, da Verbindung **121** nicht vollständig aufgereinigt werden konnte und deshalb als verunreinigtes Rohprodukt getestet wurde. Die Zwischenstufen der zweiten, erfolgreichen Synthese des Furan-Netropsins (**123-125**) zeigen keine Hemmung bis zur maximalen Testkonzentration von 20 µg/mL. Lediglich die unmittelbare Vorstufe des Furan-Netropsins, das Boc-geschützte Guanidinderivat **126**, weist eine moderate zytotoxische Wirkung auf. Das Furan-Netropsin (**114**) selbst besitzt keine Antitumoraktivität.

Tabelle I-13. Antitumoraktivitäten von einigen Zwischenstufen der Synthese des Furan-Netropsin-Derivats.

Verbindung	AGS ^[a] GI ₅₀ [µM] ^[b]	HepG2 ^[a] GI ₅₀ [µM] ^[b]	MCF7 ^[a] GI ₅₀ [µM] ^[b]
Boc ₂ -Gua-Fu-OMe (120)	24.5	20.0	39.7
Boc ₂ -Gua-Fu-OH (120b)	24.4	38.7	> 46.9
Boc ₂ -Gua-Fu-Fu-OMe (121)*	9.5	10.0	12.7
Boc-Gly-Fu-OMe (123)	k.H.	k.H.	k.H.
Boc-Gly-Fu-Fu-OMe (124)	k.H.	k.H.	k.H.
Boc-Gly-Fu-Fu-Dp (125)	k.H.	k.H.	k.H.
Boc ₂ -Gua-Fu-Fu-Dp (126)	16.9	12.1	16.9
Gua-Fu-Fu-Dp (114)	k.H.	k.H.	k.H.

[a] Zelllinien: AGS: Magenkarzinom; HepG2: Leberkarzinom, MCF7: Mammarkarzinom; [b] GI₅₀: 50 % Wachstumshemmung (maximale Testkonzentration 20 µg/mL); k.H.=keine Hemmung; [*] spektroskopisch nicht einheitlich.

Neben den beiden Proximicin-Derivaten mit Dimethylpropylamin als C-terminalen Substituenten (**112**, **113**) wurden auch die entsprechenden Boc-geschützten Verbindungen (**117**, **132**) auf ihre Aktivität gegen Krebszelllinien getestet (Tabelle I-14). Bei beiden Gruppen lassen sich die Trends, die bereits in Tabelle I-13 festgestellt wurden, wiederfinden. Auch hier gilt für die Boc-geschützten Derivate, dass je länger die Kette aus Furanamino-säuren ist, desto stärker ist die zytotoxische

Wirkung. Weiterhin zeigen die beiden Methylcarbamate nicht nur eine deutlich schwächere Antitumoraktivität, sondern in diesem Fall sogar keinerlei Hemmung bis zur maximalen Testkonzentration von 20 µg/mL.

Tabelle I-14. Antitumoraktivitäten von Proximicin-Derivaten mit basischer Seitenkette. Gegenübergestellt sind Methylcarbamate und *tert*-Butylcarbamate als *N*-terminale Reste an Furan-Peptiden.

Verbindung	AGS ^[a] GI ₅₀ [µM] ^[b]	HepG2 ^[a] GI ₅₀ [µM] ^[b]	MCF7 ^[a] GI ₅₀ [µM] ^[b]
Boc-Fu-Fu-Dp (117)	23.8	29.0	k.H.
Meoc-Fu-Fu-Dp (112)	k.H.	k.H.	k.H.
Boc-Fu-Fu-Fu-Dp (132)	13.8	13.0	20.9
Meoc-Fu-Fu-Fu-Dp (113)	k.H.	k.H.	k.H.

[a] Zelllinien: AGS: Magenkarzinom; HepG2: Leberkarzinom, MCF7: Mammakarzinom; [b] GI₅₀: 50 % Wachstumshemmung (maximale Testkonzentration 20 µg/mL); k.H.=keine Hemmung.

Schließlich wurden auch die sieben potentiellen *minor-groove-binder* **109-115** auf ihre Antitumoraktivität getestet (Tabelle I-15). Für keines der synthetisierten Derivate konnte eine Hemmung des Zellwachstums gezeigt werden, so dass sie im Rahmen der hier durchgeführten Versuche als nicht aktiv bezeichnet werden müssen.

Tabelle I-15. Antitumoraktivitäten der potentiellen *minor-groove-binder* (109-115).

Verbindung	AGS ^[a] GI ₅₀ [µM] ^[b]	HepG2 ^[a] GI ₅₀ [µM] ^[b]	MCF7 ^[a] GI ₅₀ [µM] ^[b]
Meoc-Fu-Fu-Dp (112)	k.H.	k.H.	k.H.
Meoc-Fu-Fu-Fu-Dp (113)	k.H.	k.H.	k.H.
Meoc-Fu-Fu-Fu-NH ₂ (109)	k.H.	k.H.	k.H.
Meoc-Fu-Fu-Fu-Tyra (110)	k.H.	k.H.	k.H.
Meoc-Fu-Fu-Fu-Trpa (111)	k.H.	k.H.	k.H.
Gua-Fu-Fu-Dp (114)	k.H.	k.H.	k.H.
f-Fu-Fu-Fu-Dp (115)	k.H.	k.H.	k.H.

[a] Zelllinien: AGS: Magenkarzinom; HepG2: Leberkarzinom, MCF7: Mammakarzinom; [b] GI₅₀: 50 % Wachstumshemmung (maximale Testkonzentration 20 µg/mL); k.H.=keine Hemmung.

4.4 Zusammenfassung der Ergebnisse und Diskussion

In diesem Kapitel wurden ausgehend von der Hypothese, dass sich auf der Basis der 2,4-disubstituierten Furanaminosäure der Proximicine *minor-groove-binder* darstellen lassen, sieben unterschiedliche Verbindungen synthetisiert. Diese Verbindungen können in drei unterschiedliche Gruppen eingeteilt werden. Zum einen wurden Proximicin-Homologe synthetisiert, in denen die Struktur der Proximicine um eine weitere Furanaminosäureeinheit verlängert wurde. Zum anderen wurden zwei Proximicin-Derivate synthetisiert, die eine unter physiologischen Bedingungen protonierte Seitenkette am C-Terminus tragen, ähnlich der Amidinseitenkette von Netropsin und Distamycin. Anstelle der teilweise nur schwer einzuführenden Amidin-Funktionalität wurde ein Dimethylaminopropylrest verwendet. Als dritte Gruppe von Verbindungen gelang das erste Mal die Synthese von Furan-Derivaten der Naturstoffe Netropsin und Distamycin. Auch hier wurde die Amidinseitenkette durch einen Dimethylaminopropylrest ersetzt.

Die einzelnen Reaktionsschritte der entsprechenden Syntheserouten konnten optimiert werden. Insbesondere konnten die Bedingungen der Peptidkupplungen, die Kupplungsreagenzien und das Lösungsmittel, soweit verbessert werden, dass teilweise keine chromatographische Aufreinigung der Reaktionsprodukte erfolgen musste. Die gewünschten Derivate fielen in diesen Fällen aus den Reaktionslösungen aus und konnten nach Waschen als reine Verbindungen erhalten werden. Zur Aufreinigung der Derivate **109-111** und **113** konnten erfolgreich festphasengebundene Reagenzien eingesetzt werden.

Die so dargestellten Derivate wurden einer biologischen Evaluierung unterzogen. Zum einen wurden sie auf ihre Fähigkeit geprüft, in die kleine Furche der DNA zu binden, zum anderen wurde ihre zytotoxische Wirkung untersucht. Durch DNA-Schmelzanalysen konnte festgestellt werden, dass die Verbindungen **110** und **113** und die Furanderivate der Naturstoffe Netropsin und Distamycin **114** und **115** in die kleine Furche einer AT-reichen DNA binden. Die Ergebnisse deuten daraufhin, dass der Tryptamin-Rest an Verbindung **111** zu raumerfüllend ist, um eine Wechselwirkung des Derivats mit der DNA zu ermöglichen. Tryptamin ist ein kondensierter Aromat und damit sterisch anspruchsvoller als das phenolische Tyramin von Derivat **110**, das in die kleine Furche der DNA bindet. Interessanterweise führt das sterisch am wenigsten anspruchsvolle Amid-Derivat **109** zu keiner Stabilisierung der DNA. Vermutlich fehlen hierzu Methylengruppen in der

Seitenkette, die bei Netropsin (**14**) und Distamycin (**15**) vorhanden sind und dort zur Ausbildung von günstigen hydrophoben Wechselwirkungen beitragen. Diese Methylengruppen finden sich auch im Derivat **110**. Dies kann zusätzlich dessen Bindungsaktivität erklären.

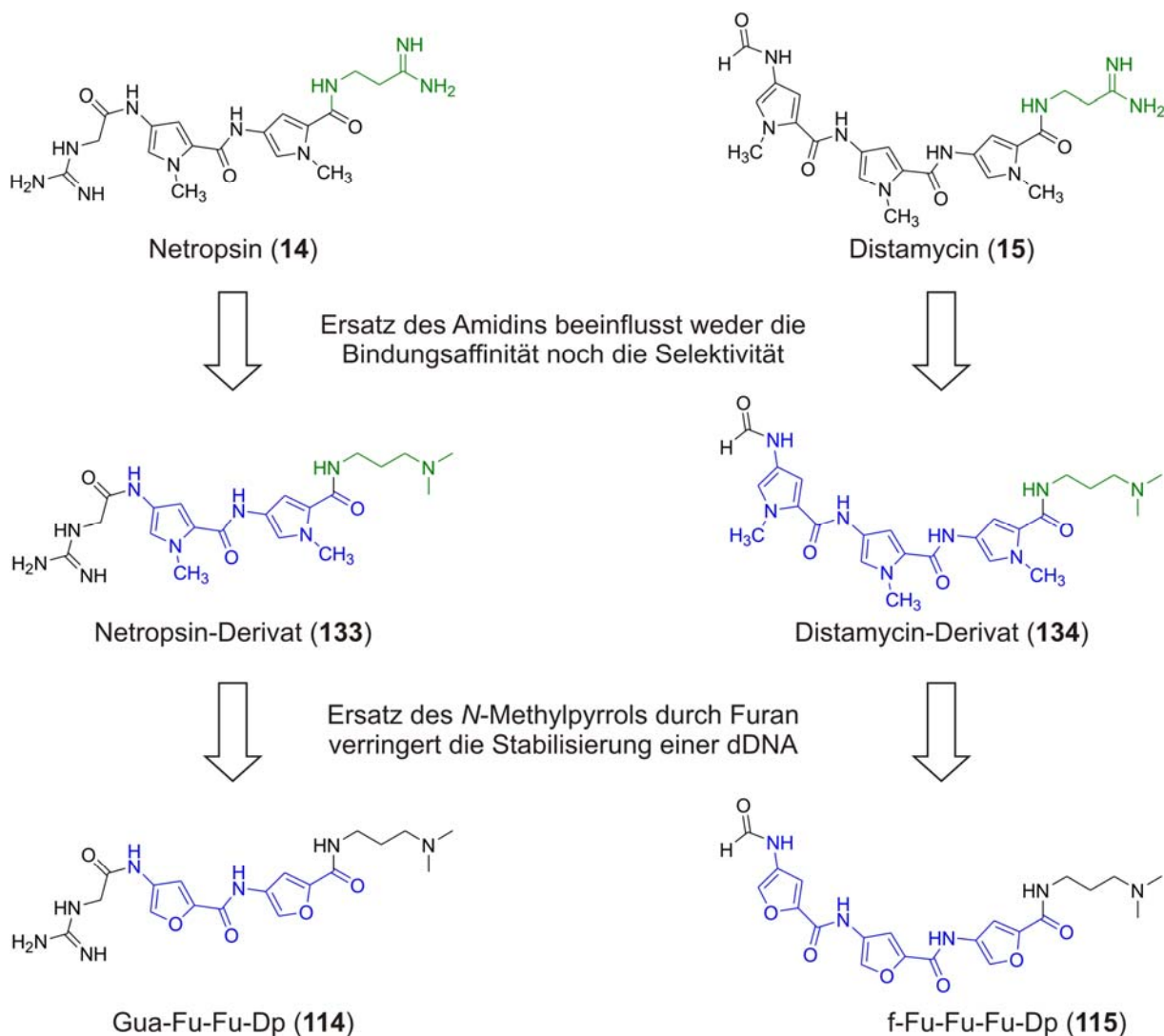


Abbildung I-45. Der Ersatz des *N*-Methylpyrrolsystems in Netropsin- und Distamycin-Derivaten (**133**, **134**) durch die entsprechenden Furanaminosäuren führt zu Derivaten (**114**, **115**), die eine geringere Stabilisierung AT-reicher dDNA bewirken.

Von den beiden Derivaten **112** und **113** mit einer Dimethylaminopropylseitenkette führt nur Verbindung **113** zu einer Stabilisierung der DNA. Es scheinen also drei aufeinander folgende Furanaminosäuren in dieser Reihe von Verbindungen notwendig zu sein, um eine Wechselwirkung mit der DNA zu ermöglichen. Dies steht in Einklang mit den Ergebnissen der Proximicin-Homologen **109-111**. Erst durch die Verlängerung des Peptidrückgrates der Proximicine um eine weitere Furaneinheit

wird eine Bindung in die kleine Furche möglich, wie es im Fall von Verbindung **110** gezeigt werden konnte. Die Stabilisierung der DNA durch Derivat **113** ist allerdings stärker. Dies spricht dafür, dass die positiv geladene Seitenkette zur Ausbildung einer ionischen Wechselwirkung mit dem negativ geladenen Rückgrat der DNA fähig sein könnte. Diese zusätzliche Stabilisierung kann so zu einem stärkeren Komplex führen.

Auch die Furanderivate des Netropsins (**114**) und des Distamycins (**115**) zeigen eine Wechselwirkung mit der AT-reichen DNA-Sequenz. Allerdings ist die dadurch hervorgerufene Stabilisierung geringer als in den Naturstoffen selbst. Diese kann zum einen auf die unterschiedlichen C-terminalen Seitenketten zum anderen auf die unterschiedlichen Heterozyklen zurückgeführt werden. Der Ersatz der Amidinseitenkette durch einen Dimethylaminopropylrest ist in Bezug auf die Selektivität zulässig.^[123, 124] Weiterhin haben Distamycin und ein entsprechendes Derivat, bei dem die Seitenketten derart verändert wurden, vergleichbare Bindungsaffinitäten an identische DNA-Sequenzen.^[71] Somit ist es unwahrscheinlich, dass die geringere Stabilisierung der DNA durch die Derivate **114** und **115** auf den Dimethylpropylaminrest zurückzuführen ist. Es muss vielmehr angenommen werden, dass für die geringere Stabilisierung die unterschiedlichen Heterozyklen, Furan gegenüber *N*-Methylpyrrol, verantwortlich sind (Abbildung I-45).

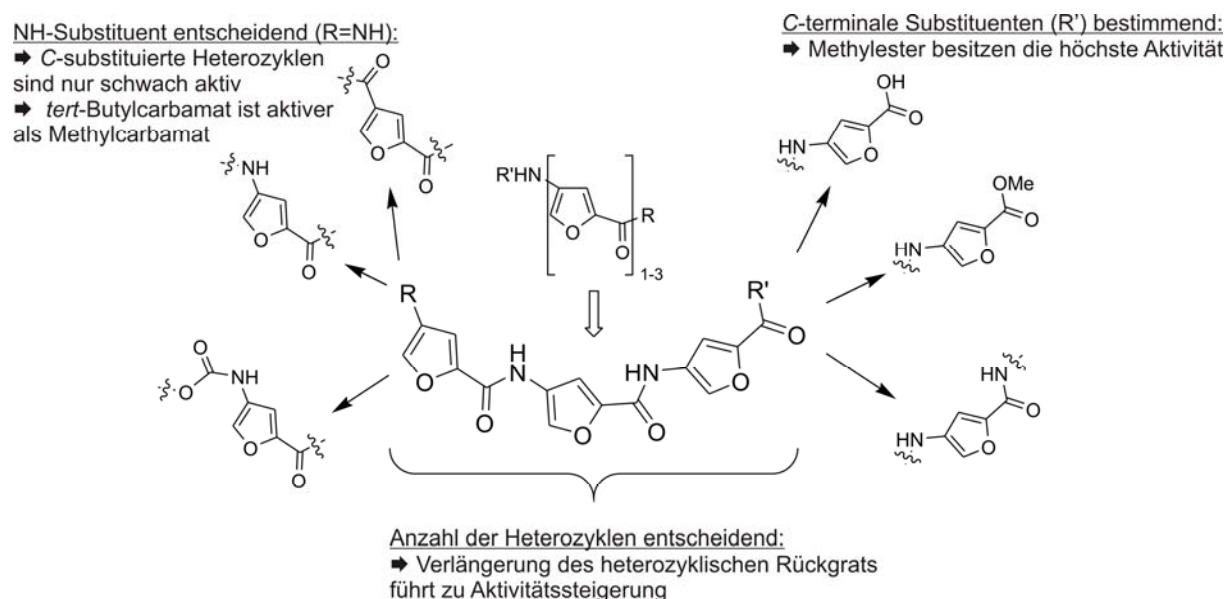


Abbildung I-46. Darstellung der Struktur-Wirkungs-Beziehungen für die Verbindungen der Tabelle I-12, Tabelle I-14 und Tabelle I-15.

Die Ergebnisse aus den Antitumortestungen der sieben hergestellten Derivate (**109-115**) zeigen, dass durch die vorgenommenen Änderungen an der Struktur der Proximicine A-C (**20-22**), die zytotoxische Wirkung der Proximicine verloren geht. Allerdings zeigen die Vorstufen dieser Verbindungen teilweise moderate Antitumoraktivitäten. Da der molekulare Wirkort der Proximicine noch nicht bekannt ist, ist es schwierig diese Ergebnisse einzuordnen.

Die Ergebnisse zeigen allerdings, dass eine unpolare Struktur günstiger für eine zytotoxische Wirkung ist als eine verwandte polare Struktur (Abbildung I-46). Dies zeigt sich nicht nur in der meist geringeren Aktivität der freien Säuren gegenüber den entsprechenden Methylestern, sondern auch an der stärkeren Aktivität der Boc-geschützten Derivate gegenüber den entsprechenden Methylcarbamaten. Als Tendenz lässt sich weiterhin ablesen, dass mit einer Verlängerung der Furangrundstruktur von einer zu drei aufeinander folgenden Furanaminosäuren eine Aktivitätssteigerung einhergeht.

Die Hypothese, dass sich ausgehend von der Struktur der Proximicine basierend auf der 2,4-disubstituierten Furanaminosäure als zentralem Baustein Lexitropsine herstellen lassen, konnte durch die in diesem Kapitel beschriebenen Ergebnisse bestätigt werden. Es konnten zwei Derivate (**110** und **113**) der Proximicine erhalten werden, die an AT-reiche Sequenzen der DNA binden. Weiterhin wurden erstmals Furan-Derivate (**114** und **115**) der Naturstoffe Netropsin und Distamycin synthetisch dargestellt. Durch die starke Analogie der dargestellten Verbindungen zu bereits beschriebenen Derivaten ist anzunehmen, dass die in DNA-Schmelzanalysen beobachtete Stabilisierung der DNA tatsächlich auf eine Bindung in die kleine Furche der DNA zurückzuführen ist.

Aus zwei Kristallstrukturen von Zwischenstufen könnten Strukturdaten gewonnen werden, die für die weitere Untersuchung des Wirkmechanismus der Proximicine und auch für die Synthese weiterer Lexitropsine hilfreich sein können.

5 Zusammenfassung der einzelnen Themen und Ausblick

Die Proximicine A-C sind neuartige Naturstoffe, die aus marinen Actinomyceten der Gattung *Verrucosispora* isoliert wurden und deren Struktur durch Dr. K. Schneider (Arbeitskreis Prof. R. D. Süßmuth, TU Berlin) aufgeklärt wurde.^[67, 68] Bei den Proximicinen A-C handelt es sich um Dipeptide, die aus der neuartigen γ -Aminosäure 4-Aminofuran-2-carbonsäure als zentralem heterozyklischem Baustein aufgebaut sind. Am *N*-Terminus tragen alle drei Verbindungen eine ungewöhnliche Methylcarbamat-Funktionalität, während sie sich untereinander durch verschiedene C-terminale Substituenten unterscheiden. So handelt es sich bei Proximicin A um ein Carboxamid, bei Proximicin B und C findet man an dieser Stelle biogene Amine wie Tyramin bzw. Tryptamin. Die Proximicine zeigen eine enge strukturelle Verwandtschaft zu den bekannten Naturstoffen Netropsin und Distamycin. In diesen taucht ein ähnliches Di- bzw. Tripeptid aus einer heterozyklischen γ -Aminosäure als Strukturmotiv auf. Dort ist der Furanring der Proximicine formal durch ein *N*-Methylpyrrol ersetzt. Trotz der engen strukturellen Verwandtschaft zeigen die Proximicine eine andere biologische Aktivität, wie in ersten Untersuchungen gezeigt werden konnte.^[68]

Im Rahmen der vorgelegten Arbeit wurde durch chemische Synthese und anschließende biologische Evaluierung verschiedener Derivate die Wirkweise der Proximicine näher untersucht. Dabei wurden drei unterschiedliche Ansätze verfolgt. Zum einen wurden sogenannte Netropsin-Proximicin-Hybride entworfen und synthetisiert. Das heterozyklische Strukturmotiv des Netropsins wurde dabei mit den *N*- und *C*-terminalen Resten der Proximicine kombiniert. Somit vereinen die Hybride die strukturellen Merkmale beider Naturstoffe. Die biologische Evaluierung dieser Hybride hat gezeigt, dass ihre Wirkung der der Proximicine ähnlich ist und somit auch sie eine von Netropsin verschiedene Wirkweise besitzen. Wie die Proximicine führen auch die Hybride zu einem Arrest von Krebszelllinien in der G0/G1-Phase während des Zellzyklus während Netropsin und Distamycin die Zellen in der G2/M-Phase arretieren. Außerdem konnte gezeigt werden, dass es durch die Inkubation von Krebszelllinien mit Proximicin C und dem Hybrid C zu einer Hochregulation von p53 und des Cyclinkinase-Inhibitors (CDKI) p21 in Magenkrebszelllinien kommt. Vergleichende Experimente in Krebszelllinien mit mutiertem p53 führten zu keiner Hochregulation beider Proteine. Distamycin dagegen induziert die Expression von

p53 und p21 in keiner der untersuchten Zelllinien. Dies spricht dafür, dass die Hybride und auch die Proximicine auf ein anderes zelluläres *target* wirken als Netropsin und Distamycin.

Die drei Naturstoffhybride zeigen zwar eine geringere Antitumoraktivität als die Proximicine selbst, sind allerdings meist aktiver als Netropsin oder Distamycin. Um den Einfluss verschiedener *N*- und *C*-terminaler Reste auf die Antitumoraktivität näher zu untersuchen, wurde im Rahmen einer kleinen SAR-Studie eine 19-gliedrige Substanzbibliothek synthetisiert, die Derivate mit neun unterschiedlichen *C*-terminalen und mit zehn unterschiedlichen *N*-terminalen Resten beinhaltet. So wurden Hybride erhalten, die eine stärkere Antitumoraktivität aufweisen und die vergleichbar mit der der Proximicine ist.

Zum anderen konnte im Rahmen der vorgelegten Arbeit die erste Totalsynthese der Proximicine A-C verwirklicht werden. Hierfür wurde eine synthetische Methode zum Aufbau der bisher nicht literaturbekannten 4-Aminofuran-2-carbonsäure in geschützter Form etabliert. Diese Aminosäure stellt den zentralen monomeren Baustein der Proximicine dar. Mit diesem Baustein konnte durch Knüpfung der unterschiedlichen Amidbindungen die Totalsynthese aller drei Derivate abgeschlossen werden. Der Zugang zur zentralen γ -Aminosäure ist mit drei Stufen, die in moderaten bis sehr guten Ausbeuten verlaufen, kurz und effizient. Außerdem ist die Synthese flexibel genug, um andere *N*- und *C*-terminale Schutzgruppen an diesem zentralen Baustein anfügen zu können. So sollte es auch möglich sein, entsprechend geschützte Analoga für Festphasensynthesen darzustellen. Im Verlauf der Synthesesequenz gelang es, ein geschütztes Dipeptid aus zwei γ -Furanaminosäuren zu kristallisieren. Die geometrischen Daten der Kristallstruktur dieses Intermediats könnten für den rationalen Entwurf weiterer Derivate und für die nähere Untersuchung des Wirkmechanismus hilfreiche Informationen liefern.

Abschließend wurde in einem dritten Ansatz versucht, die Grundstruktur der Proximicine so zu modifizieren, dass eine andere biologische Wirkung erzielt werden kann. Netropsin und auch Distamycin binden bekanntermaßen in die kleine Furche doppelsträngiger DNA. Hierbei weisen sie eine Selektivität für AT-reiche Sequenzen auf. Trotz der engen strukturellen Verwandtschaft der Proximicine zu diesen beiden Naturstoffen, zeigen sie keinerlei Interaktion mit doppelsträngiger DNA. Im Rahmen der vorgelegten Arbeit wurden sieben Moleküle basierend auf der zentralen γ -

Furanaminosäure der Proximicine entworfen, die potentiell in die kleine Furche der DNA binden sollten. Dabei wurden drei unterschiedliche Ansätze verfolgt:

1. formale „Verlängerung“ des Dipeptids der Proximicine um eine weitere γ -Furanaminosäure;
2. Einführung einer basischen Seitenkette;
3. Synthese der Furan-Analoga der Naturstoffe Netropsin und Distamycin.

Die Synthese dieser sieben Derivate konnte verwirklicht werden und vier Derivate zeigten die selektive Bindung in die kleine Furche AT-reicher DNA-Sequenzen. Dies konnte durch DNA-Schmelzanalysen gezeigt werden. Die erfolgreiche Etablierung von DNA-Bindungskapazität zeigt, dass die Grundstruktur der Proximicine vielseitige Möglichkeiten bietet, um eine Wechselwirkung mit zellulären *targets* herbeizuführen.

Im Rahmen der vorgelegten Arbeit wurden weitergehende Untersuchungen zur Wirkweise der Proximicine durchgeführt. Durch die Synthese von Hybrid-Molekülen konnte gezeigt werden, dass für die biologische Wirkung nicht allein das zentrale Dipeptid aus zwei γ -Furanaminosäuren verantwortlich ist, sondern insbesondere die chemische Natur der N- und C-terminalen Reste in den Hybriden für einen von Netropsin und Distamycin verschiedenen Wirkmechanismus verantwortlich ist. Außerdem ermöglicht die erfolgreiche Totalsynthese der Proximicine zum einen genügend naturidentisches Material für weitere Untersuchungen zur Verfügung zu stellen, und zum anderen können so weitere Derivate basierend auf der γ -Furanaminosäure der Proximicine synthetisiert werden. Dies kann insbesondere für die Identifizierung des zellulären *targets* der Proximicine von Bedeutung sein.

In zukünftigen Experimenten ist die Synthese neuartiger Proximicin-Hybride denkbar (Abbildung I-47). Auch in diesen Hybriden sollten die N- und C-terminalen Reste der Proximicine beibehalten und die Furanaminosäure weiter variiert werden. So könnten Sechsringaromaten als Isostere für den Furanring dienen. Um die Gesamtgeometrie der Proximicine beizubehalten, sollte als Substitutionsmuster dabei eine *meta*-Position der Carboxamid- und der Aminogruppe gewählt werden. Auch substituierte Pyridine könnten verwendet werden, um den Einfluss eines Heteroatoms zu testen. Weiterhin könnte durch die Synthese von reversen Proximicinen, bei denen die Positionen der Substituenten der Furanaminosäure formal vertauscht wären, die SAR erweitert werden. Neben der Substitution der heterozyklischen Aminosäure sollte auch der Ersatz der Peptidbindung, die die beiden Furanaminosäuren miteinander verknüpft, durch eine *trans*-konfigurierte Doppelbindung möglich sein. Dadurch

würde man zu Vinyl-Proximicinen - in Analogie zu den Vinylexinen (Abbildung I-13)^[40] - gelangen. Für entsprechende Pyrrolderivate wurde eine Bindung in die kleine Furche der DNA in quantenchemischen Rechnungen vorhergesagt.^[40]

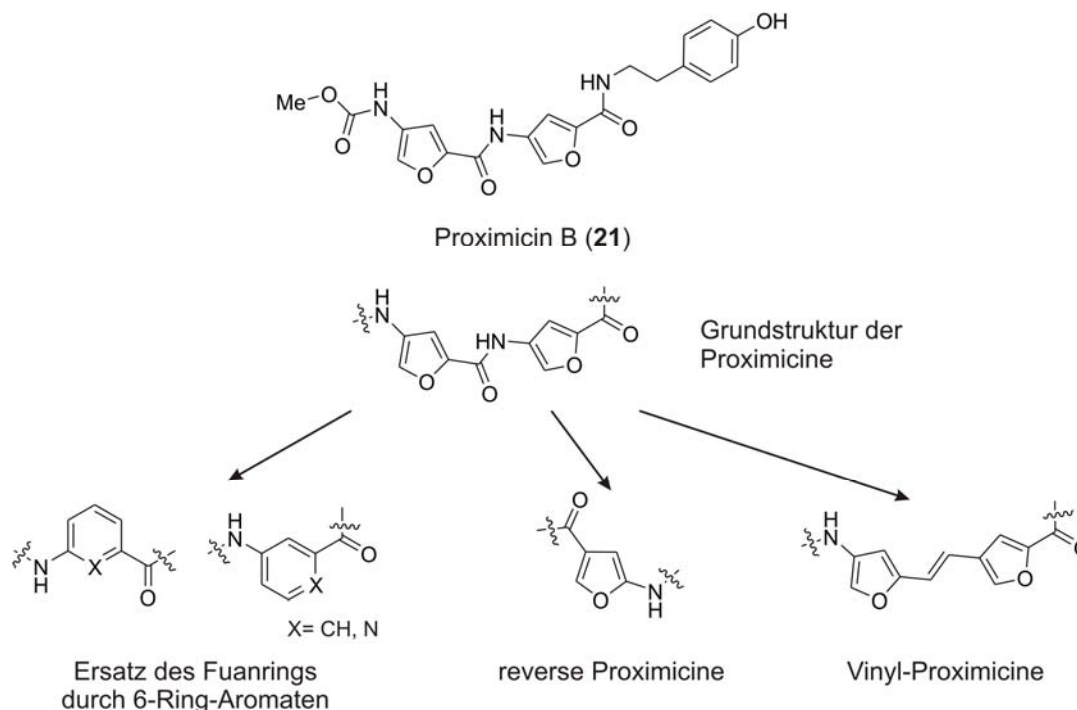


Abbildung I-47. Mögliche Substitutionen der Grundstruktur der Proximicine zur Erweiterung der bisherigen SAR.

Weiterhin kann die γ -Furanaminosäure der Proximicine auch für die Synthese weiterer Derivate hilfreich sein, die in der Lage sein sollten, mit doppelsträngiger DNA zu interagieren. Durch die Synthese längerer Oligopeptide aus diesem Baustein oder durch Kombination mit anderen heterozyklischen Aminosäuren könnten so vielleicht die Selektivität und Spezifität für bestimmte DNA Sequenzen positiv beeinflusst werden.

II Experimenteller Teil

1 Allgemeines

Chemikalien wurden von den Firmen Sigma-Aldrich (Taufkirchen), ABCR (Karlsruhe), Alfa Aesar (Karlsruhe), Fluorochem Ltd. (Old Glossop, Derbyshire, Vereinigtes Königreich) und Acros (Geel, Belgien) bezogen.

Lösungsmittel (Acros) wurden, wenn nicht anders vermerkt, wasserfrei wie gekauft verwendet.

Dünnschichtchromatogramme (DC) wurden mit kieselgelbeschichteten Aluminiumfolien der Firma Merck (Kieselgel 60, F254) aufgenommen. Zur Sichtbarmachung der Substanzen wurden übliche Färbereagenzien verwendet.^[140-142]

Säulenchromatographie wurde mit Kieselgel der Firma Acros (0.035-0.07 mm, 60A) durchgeführt. Als Eluenten wurden n-Hexan, Essigsäureethylester, Diethylether, Dichlormethan, Chloroform und Methanol eingesetzt.

¹H-NMR-Spektren wurden mit den Geräten DRX 500 (500 MHz) und AM 400 (400 MHz) der Firma Bruker (Rheinstetten) aufgenommen. Als Lösungsmittel dienten Deuteriochloroform (CDCl₃), Deuteromethanol (CD₃OD) und DMSO-d₆. Die chemischen Verschiebungen sind in δ -Werten (ppm) relativ zum internen Lösungsmittelsignal angegeben.^[143] In Klammern sind die Multiplizität, die Kopplungskonstante (Hz) und die Signalintensität angegeben. Die Signalmultiplizität ist wie folgt gekennzeichnet: (s) Singulett, (d) Dublett, (t) Triplett, (q) Quartett, (pent) Pentett, (sept) Septett und (m) Multipllett. Die Spektren wurden, sofern nicht anders angegeben, bei 298 K aufgenommen.

¹³C-NMR-Spektren wurden mit den Geräten DRX 500 (125 MHz) und AM 400 (100 MHz) der Firma Bruker (Rheinstetten) ¹H-Breitband entkoppelt oder als Projektion eines 2D ¹³C-HMQC/HMBC-Spektrums aufgenommen. Als Lösungsmittel dienten Deuteriochloroform (CDCl₃), Deuteromethanol (CD₃OD) und DMSO-d₆. Die chemischen Verschiebungen sind in δ -Werten (ppm) relativ zum internen

Lösungsmittelsignal angegeben.^[143] Die Zuordnungen wurden durch DEPT-135 oder APT ermittelt.

2D-NMR-Spektren wurden mit den Geräten DRX 500 (500 MHz) und AM 400 (400 MHz) der Firma Bruker (Rheinstetten) aufgenommen.

IR-Spektren wurden mit dem FTIR-Spektrometer Nicolet Magna 750 (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) aufgenommen. Die Spektren wurden als ATR (Attenuated Total Reflectance) aufgenommen. Die Lage der Banden ist in Wellenzahlen [cm^{-1}] angegeben.

MS-Spektren wurden auf einem Finnigan MAT 95 SQ oder Varian MAT 771 aufgenommen. Die Ionisierung erfolgte durch Elektronenstoß (EI mit einem Ionisierungspotential von 70 eV), durch *fast atom bombardement* (FAB) oder durch Chemische Ionisation (CI).

HPLC-MS-Kopplungen wurden mit einem ESI-Massenspektrometer (QTrap 2000, Applied Biosystems, Darmstadt) in Kopplung mit einer Agilent 1100 HPLC-Anlage (Agilent Technologies, Waldbronn) unter Verwendung einer RP-C₁₈-Säule (Phenomenex, Aschaffenburg) vorgenommen.

ESI-FT-ICR-MS-Spektren wurden mit einem APEX II FT-ICR-Massenspektrometer (Bruker-Franzen, Bremen) mit Elektrosprayionisierung im Positivionenmodus aufgenommen.

UV-Spektren wurden mit dem UV/VIS-Spektralphotometer Cary 1E der Firma Varian (Darmstadt) aufgenommen.

Fluoreszenzspektren wurden mit einem FluorMax2 der Firma Jobin Yvon Spex (HORIBA Jobin Yvon GmbH, Unterhaching) aufgenommen.

Präparative RP-HPLC Trennungen wurden auf einer Agilent HP 1100 HPLC-Anlage mit UV-Detektor (Agilent Technologies, Waldbronn) unter Verwendung einer RP-C₁₈-Säule (Grom-Sil 300, ODS-5, 10 μm , 2 x 25 cm, Grom, Rottenburg) durchgeführt. Als Lösungsmittelsysteme wurden entweder Wasser (Lösungsmittel A) und Acetonitril (Lösungsmittel B) oder Wasser / 0.1% TFA (Lösungsmittel C) und Acetonitril / 0.1 %

TFA (Lösungsmittel D) bei einer Flussrate von 15 mL/min verwendet. Die jeweiligen Gradienten sind an entsprechender Stelle aufgeführt.

SPE-Aufreinigungen wurden mit SPE-Kartuschen der Firma Polymer Laboratories (Varian Deutschland GmbH, Darmstadt) nach mitgeliefertem Protokoll durchgeführt.

Chemische Namen wurden mit dem Programm Beilstein AutoNom Ver. 4.0 nach Beilsteinnomenklatur erstellt. Zum besseren Verständnis wurde bei bestimmten Verbindungen von dieser Nomenklatur abgewichen und eine logische Kurznomenklatur eingeführt.

DNA-Schmelzanalysen wurden von Dr. L. Röglin und Dipl.-Chem. E. Socher (AK Prof. Seitz, Humboldt-Universität zu Berlin) mit einem Cary 100 Bio UV/Vis Spektralphotometer (Varian Deutschland GmbH, Darmstadt) ausgestattet mit einem thermostatisierten Küvettenwechsler durchgeführt. Es wurden DNA-Duplexe (DNA-1: cgcaaatttgcg und DNA-2: catggccatg) einer Konzentration von 2 μM (erhalten durch Verdünnung einer 0.5 mM Stammlösung in 20 mM NaH_2PO_4 und 100 mM NaCl, pH 7.4) in einer frisch entgasteten gepufferten Lösung von 20 mM NaH_2PO_4 und 100 mM NaCl (pH 7.4) verwendet. Die Konzentration der Liganden wurde im Bereich von 0 und 6 μM (erhalten durch Verdünnung einer 1.0 mM Stammlösung in DMSO) variiert. Die Denaturierung der entsprechenden DNA-Sequenzen wurde durch Detektion der Absorption bei einer Wellenlänge von $\lambda=260\text{ nm}$ mit einer Heizrate von $0.5\text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$. Der angegebene Wert für T_m ist ein Mittelwert aus mindestens drei Messreihen.

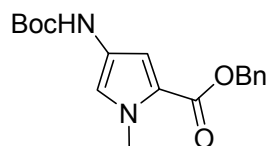
Antitumortestungen wurden von Prof. Beil (Medizinische Hochschule Hannover, Hannover) gemäß den NCI-Richtlinien^[144] mit den Tumorzelllinien AGS (Magenadenokarzinom), HepG2 (Leberkarzinom), MCF 7 (Mammakarzinom) und Huh7 (Leberkarzinom mit mutiertem p53)^[145] durchgeführt. Die Zellen wurden auf 96-well Mikrotiterplatten kultiviert. Medium: RPMI 1640 mit 10% fetalem Kälberserum. 24 Std. nach Aussaat wurden die Prüfsubstanzen (Konz. im Ansatz: 0,1 bis 20 $\mu\text{g/ml}$) zugegeben und die Zellen für weitere 48 h kultiviert. Nach dieser Zeit wurde die Zellzahl (Proteinbestimmung mit Sulforhodamin) bestimmt. Die Stammlösungen wurden alle in DMSO hergestellt. Die DMSO-Konzentration im Testansatz betrug 1

%. Aus den Konzentrationswirkungskurven wurden die GI_{50} -Werte (= Konz., die eine halbmaximale Hemmung des Zellwachstums bewirkt) bestimmt.

2 Synthesevorschriften und analytische Daten der einzelnen Verbindungen

2.1 Synthese der Netropsin-Proximicin-Hybride A, B und C

4-*tert*-Butoxycarbonylamino-1-methyl-1*H*-pyrrol-2-carbonsäurebenzyl-ester

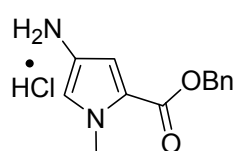


(Boc-PyMe-OBn) (24). 4-*tert*-Butoxycarbonylamino-1-methyl-1*H*-

pyrrol-2-carbonsäure (1 g, 4.16 mmol, 1.0 eq) wurde in Ethanol/Wasser (3:1, 20 mL) gelöst und unter Rühren wurde tropfenweise eine Lösung von Cs_2CO_3 (678 mg, 2.08 mmol, 0.5 eq) in Wasser (5 mL) zugegeben. Die Reaktionsmischung wurde für weitere 30 min gerührt und dann im Vakuum zur Trockene eingedampft. Der Rückstand wurde in Ethanol aufgenommen (20 mL) und erneut im Vakuum eingedampft. Diese Prozedur wurde zweimal wiederholt. Der erhaltene Feststoff wurde in DMF gelöst (15 mL) und Benzylbromid (717 mg, 4.16 mmol, 1.0 eq) tropfenweise zugegeben. Die erhaltene Suspension wurde bei 40 °C für 16 h gerührt und anschließend durch Zugabe von Wasser (50 mL) gestoppt. Die Lösung wurde mit EtOAc (3 x 30 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Extrakte wurden mit ges. Kochsalzlösung (5 x 30 mL) gewaschen, über Na_2SO_4 getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das so erhaltene Rohprodukt wurde mit Hexan (3 x 10 mL) gewaschen und anschließend getrocknet. Das Produkt konnte in einer Ausbeute von 88 % (1.21 g) in Form eines beigefarbenen Feststoffes erhalten werden.

Die analytischen Daten stimmen mit den in der Literatur beschriebenen überein.^[72]

H-PyMe-OBn•HCl (25). Verbindung **24** (1.18 g, 3.59 mmol) wurde fein zerrieben und

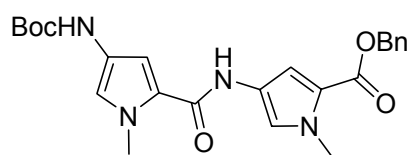


in 4 N HCl in Dioxan (10 mL) gelöst. Nach 5 min wurde die

Reaktionslösung trüb. Die Suspension wurde für 30 min bei RT gerührt und anschließend alle flüchtigen Bestandteile unter vermindertem Druck entfernt. Das Produkt wurde als feines beigefarbenes Pulver erhalten (957 mg, quant. Ausbeute).

Das Produkt wurde ohne weitere Aufreinigung in der Folgereaktion eingesetzt.

Boc-PyMe-PyMe-OBn (26). Zu einer Lösung von Verbindung **25** (957 mg, 3.59

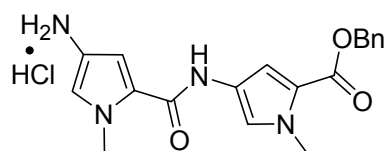


mmol, 1.0 eq) und **23** (964 mg, 3.95 mmol, 1.1eq) in DMF (28 mL) wurden EDCI (1.047 g, 5.385 mmol, 1.5eq) und DMAP (535 mg, 4.308 mmol, 1.2eq)

gegeben. Die Reaktion wurde für 16 h bei RT gerührt anschließend wurde die Reaktionsmischung in EtOAc gegossen und mit wässriger 10 %iger HCl (3 x 30 mL) und gesättigter NaHCO₃-Lösung (3 x 30 mL) gewaschen. Die organische Phase wurde über MgSO₄ getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel am Vakuum entfernt. Das Produkt wurde als bräunlicher Feststoff erhalten (1.457 g, 90%).

Die analytischen Daten stimmen mit den in der Literatur beschriebenen überein.^[72]

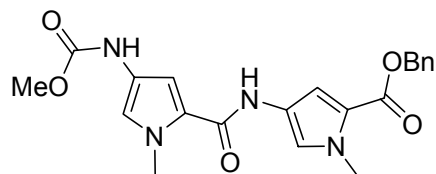
H-PyMe-PyMe-OBn•HCl (27). Verbindung **26** (1.475 g, 3.22 mmol) wurde fein



zerrieben und in 4 N HCl in Dioxan (15 mL) gelöst. Nach 5 min wurde die Reaktionslösung trüb. Die Suspension wurde für 30 min bei RT gerührt und anschließend

wurden alle flüchtigen Bestandteile unter vermindertem Druck entfernt. Das Produkt wurde als feines beigefarbenes Pulver erhalten (1.22 g, quant. Ausbeute).

Meoc-PyMe-PyMe-OBn (28). Verbindung **27** (193 mg, 0.4963 mmol, 1.0 eq) wurde

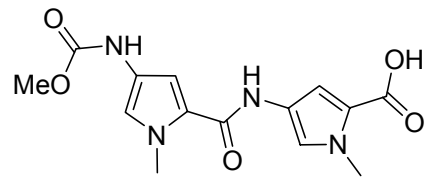


in THF (12 mL) suspendiert. TEA (153 µL, 1.0919 mmol, 2.2 eq) wurde in einer Portion zugegeben und die klare Lösung für 10 min bei RT gerührt.

Anschließend wurde Chlorameisensäuremethylester (47 µL, 0.5956 mmol, 1.2 eq) langsam tropfenweise hinzugegeben und die Mischung für weitere 45 min bei RT gerührt. Anschließend wurde die Reaktionslösung mit EtOAc (25 mL) verdünnt und mit Wasser (3 x 10 mL) und gesättigter Kochsalzlösung (5 x 10 mL) gewaschen. Die organische Phase wurde über NaSO₄ getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel am Vakuum entfernt. Das Produkt wurde als Feststoff erhalten (190 mg, 93 %).

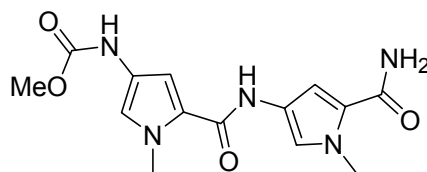
$^1\text{H NMR}$	δ_{H} (400 MHz; DMSO- d_6) 3.62 (s, 3H), 3.81 (s, 3H), 3.84 (s, 3H), 5.24 (s, 2H), 6.80 (bs, 1H), 6.92 (bs, 1H), 6.94 (d, 1H, $J=1.9$ Hz), 7.34-7.44 (m, 5H), 7.46 (d, 1H, $J=1.9$ Hz), 9.37 (s, 1H), 9.86 (s, 1H).
$^{13}\text{C NMR}$	δ_{C} (100 MHz; DMSO- d_6) 36.1, 36.2, 51.5, 64.9, 103.8, 108.6, 117.3, 118.4, 121.0, 122.1, 122.7, 123.0, 127.8, 128.0, 128.5, 136.6, 154.0, 158.3, 160.1.
EI-MS	m/z 410 (M^{+}), 181, 149, 91.
EI-HRMS	m/z 410.1598 (M^{+} , ber. 410.1590 für $\text{C}_{21}\text{H}_{22}\text{O}_5\text{N}_4^{+}$).
IR	ν_{max} (cm^{-1}) 3312, 3133, 3032, 2951, 1702, 1647, 1586, 1555, 1433, 1405, 1243.

Meoc-PyMe-PyMe-OH (29). Verbindung **28** (179 mg, 0.4361 mmol, 1.0 eq) wurde in Methanol (20 mL) gelöst und Pd/C (10 %, 40 mg) wurde in einer Portion zugegeben. Der Kolben wurde sofort mit einem Septum verschlossen und 5 min mit Wasserstoff gespült. Ein H_2 -Ballon wurde angebracht und die Suspension für 16 h bei RT gerührt. Anschließend wurde die Reaktionsmischung filtriert und das Lösungsmittel am Vakuum entfernt. Das Produkt wurde als bräunlicher Feststoff erhalten (126 mg, 90 %).



$^1\text{H NMR}$	δ_{H} (400 MHz; DMSO- d_6) 3.62 (s, 3H), 3.81 (s, 3H), 3.81 (s, 3H), 6.78 (d, 1H, $J=1.9$ Hz), 6.80 (s, 1H), 7.37 (d, 1H, $J=1.9$ Hz), 9.36 (s, 1H), 9.83 (s, 1H).
$^{13}\text{C NMR}$	δ_{C} (100 MHz; CDCl_3) 36.1, 36.1 51.5, 103.8, 108.0, 117.1, 119.7, 121.2, 122.1, 122.5, 122.9, 154.1, 158.3, 162.3.
EI-MS	m/z 320 (M^{+}), 276, 181, 149.
EI-HRMS	m/z 320.1122 (M^{+} , ber. 320.1121 für $\text{C}_{14}\text{H}_{16}\text{O}_5\text{N}_4^{+}$).
IR	ν_{max} (cm^{-1}) 3432, 3374, 3260, 3114, 2952, 2922, 2851, 1737, 1693, 1582, 1568, 1434, 1235, 1201.

Netropsin-Proximicin-Hybrid A (30). Die freie Säure **29** (30 mg, 0.0936 mmol, 1.0 eq) wurde in DCM/DMF (4:1, 5 mL) gelöst und HOBt



(14 mg, 0.1030 mmol, 1.1 eq) und DIC (15 μ L, 0.0983 mmol, 1.05 eq) wurden hinzugegeben. Anschließend wurde die Mischung für 75 min bei RT gerührt. Dann

wurde 25 % wässrige NH_3 -Lösung (10 μ L, 0.1546 mmol, 1.3 eq) in einer Portion zugegeben und für weitere 5 h bei RT gerührt. Der gebildete Niederschlag wurde abfiltriert, das Filtrat mit DCM verdünnt und mit 5 % NaHCO_3 , 5 % Zitronensäure und mit Wasser gewaschen. Die organische Phase wurde mit Na_2SO_4 getrocknet, filtriert und am Vakuum eingeeengt. Das erhaltene Rohprodukt wurde mittels präparativer HPLC aufgereinigt (4 mg, 13 %).

^1H NMR (DMSO- d_6 , 500 MHz) δ_{H} 9.83 (s, 1H), 9.35 (s, 1H), 7.19 (d, J = 1.4 Hz, 1H), 6.91 (bs, 1H), 6.81 (d, J = 1.5 Hz, 1H), 6.79 (bs, 1H), 3.80 (s, 3H), 3.78 (s, 3H), 3.61 (s, 3H).

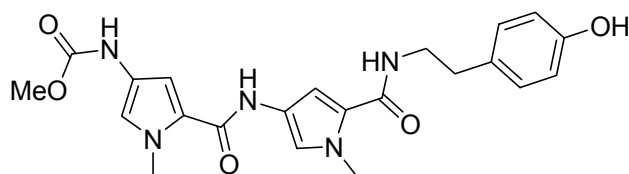
^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 125 MHz) δ_{C} 163.0, 158.3, 154.0, 123.0, 122.6, 122.1, 121.6, 118.1, 116.8, 104.8, 103.6, 51.3, 35.9.

EI-MS m/z 319 (M^+), 287, 181, 149.

EI-HRMS m/z 319.1277 [M^+ , ber. 319.1281 für $\text{C}_{14}\text{H}_{17}\text{O}_5\text{N}_4^+$].

IR ν_{max} (cm^{-1}) 3328, 2924, 2853, 1704, 1646, 1600, 1436, 1404, 1248.

Netropsin-Proximicin-Hybrid B (31). Die freie Säure **29** (32 mg, 0.1 mmol, 1.0 eq)

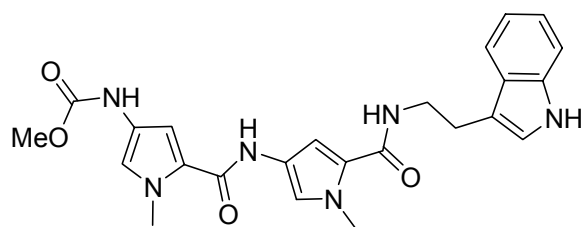


wurde in DMF (2 mL) gelöst und EDCI (39 mg, 0.2 mmol, 2.0 eq), DMAP (25 mg, 0.2 mmol, 2.0 eq), und Tyramin (14 mg, 0.1 mmol, 1.0 eq) nacheinander

hinzugegeben. Der Kolben wurde mit Stickstoff gespült und die Reaktion für 16 h bei RT gerührt. Nach vollständiger Umsetzung wurde die Mischung durch Zugabe von EtOAc (20 mL) verdünnt und mit 10 % HCl (3 x 20 mL) und ges. NaHCO_3 -Lösung (3 x 20 mL) gewaschen. Die organische Phase wurde über Na_2SO_4 getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Das Rohprodukt war ein bräunliches Öl, das nach Lyophilisation einen hellbeigen Feststoff ergab (28 mg, 64 %).

¹H NMR	(DMSO-d ₆ ; 500 MHz) δ_{H} 9.84 (s, 1H), 9.34 (s, 1H), 9.19 (s, 1H), 8.03 (t, $J = 5.34$ Hz, 1H), 7.16 (bs, 1H), 7.00 (d, $J = 8.2$ Hz, 2H), 6.91 (bs, 1H), 6.79 (bs, 2H), 6.66 (d, $J = 8.2$ Hz, 2H), 3.79 (s, 3H), 3.77 (s, 3H), 3.62 (s, 3H), 3.31 (im ¹ H nicht sichtbar), 2.66 (t, $J = 7.4$ Hz, 2H).
¹³C NMR	(DMSO-d ₆ , 125 MHz) δ_{C} 161.2, 158.3, 155.6, 154.1, 129.7, 129.2, 122.9, 121.9, 117.6, 116.9, 114.9, 103.8, 51.3, 40.4, 35.9, 35.8, 34.4.
EI-MS	m/z 439 (M^{+}), 407, 319, 303, 271, 181, 149.
EI-HRMS	m/z 439.1850 (M^{+} , ber. 439.1856 für C ₂₂ H ₂₅ O ₅ N ₅ ⁺).
IR	ν_{max} (cm ⁻¹) 3303, 2950, 1704, 1637, 1558, 1515, 1435, 1251.

Netropsin-Proximicin-Hybrid C (32). Die freie Säure **29** (32 mg, 0.1 mmol, 1.0 eq) wurde in DMF (2 mL) gelöst und EDCI (39 mg, 0.2 mmol, 2.0 eq), DMAP (25 mg, 0.2 mmol, 2.0 eq), und Tryptamin (17 mg, 0.1 mmol, 1.0 eq) nacheinander hinzugegeben. Der Kolben wurde mit Stickstoff gespült und die Reaktion für 16 h bei RT gerührt. Nach vollständiger Umsetzung wurde die Mischung durch Zugabe von EtOAc (20 mL) verdünnt und mit 10 % HCl (3 x 20 mL) und ges. NaHCO₃-Lösung (3 x 20 mL) gewaschen. Die organische Phase wurde über Na₂SO₄ getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Das Rohprodukt war ein bräunliches Öl, das nach Lyophilisation einen hellbeigen Feststoff ergab. Die Ausbeute betrug; 43 mg, 93 %.



¹H NMR	(DMSO-d ₆ , 500 MHz) δ_{H} 10.79 (s, 1H), 9.84 (s, 1H), 9.35 (s, 1H), 8.13 (t, $J = 5.7$ Hz, 1H), 7.57 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H), 7.32 (d, $J = 8.02$ Hz, 1H), 7.17 (d, $J = 1.43$ Hz, 1H), 7.15 (d, $J = 1.6$ Hz, 1H), 7.06 (t, $J = 7.4$ Hz, 1H), 6.98 (t, $J = 7.4$ Hz, 1H), 6.91 (bs, 1H), 6.83 (d, $J = 1.5$ Hz, 1H), 6.79 (bs, 1H), 3.80 (s, 6H), 3.61 (s, 3H), 3.44 (m, 2H), 2.89 (t, $J = 7.4$ Hz, 2H).
¹³C NMR	(DMSO-d ₆ , 125 MHz) δ_{C} 161.3, 158.4, 154.0, 136.3, 127.3, 123.0, 122.4, 122.1, 120.7, 118.1, 117.6, 116.9, 112.0, 111.1, 103.9, 103.6, 51.3, 39.3, 35.8, 25.2.
EI-MS	m/z 462 (M^{+}), 430, 319, 303, 287, 271, 181, 149, 143, 130.
EI-HRMS	m/z 462.2015 (M^{+} , ber. 462.2016 für C ₂₄ H ₂₆ O ₄ N ₆ ⁺).

IR ν_{max} (cm^{-1}) 3299, 2969, 2929, 1703, 1637, 1587, 1524, 1459, 1434, 1249.

2.2 Synthese der Substanzbibliothek von 19 Netropsin-Proximicin-Hybriden

2.2.1 Synthesen der C-terminalen Modifikationen

Die Synthese der C-terminalen Modifikationen basiert auf der Synthesesequenz für die Darstellung der Netropsin-Proximicin-Hybride A, B und C (Kapitel 2.1). Ausgehend von der MePy2-C1 (Meoc-PyMe-PyMe-OH, **29**) wurden die verschiedenen C-terminalen Modifikationen eingeführt.

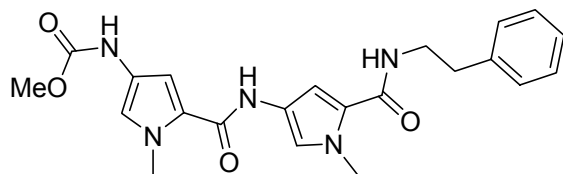
Für die Antitumortestungen wurde ein Teil von Verbindung **29** (50 mg) mittels RP-HPLC aufgereinigt (26 mg, 52 %).

HPLC: System C/D, linearer Gradient von 20 % auf 40 % D in 40 min

a) Allgemeine Vorschrift für die Synthese der Derivate MePy2-C2 (**33b**), MePy2-C3 (**33c**), MePy2-C4 (**33d**), MePy2-C8 (**33h**) und MePy2-C9 (**33i**).

Zu einer Lösung der freien Carbonsäure **29** (MePy2-C1) (50 mg, 0.156 mmol) und des entsprechenden Amins (0.156 mmol, 1.0 eq) in DMF (2 mL) wurden EDCI (60 mg, 0.312 mmol, 2.0eq) und DMAP (48 mg, 0.39 mmol, 2.5 eq) zugegeben. Die Reaktionsmischung wurde 16 h bei RT gerührt. Anschließend wurde die Reaktionsmischung in EtOAc (10 mL) gegossen, mit 10 % HCl (3 x 5 mL) und mit ges. NaHCO₃ (3 x 5 mL) gewaschen. Die organische Phase wurde mit Na₂SO₄ getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das so erhaltene Rohprodukt wurde mittels präparativer RP-HPLC aufgereinigt.

MePy2-C2 (**33b**)



HPLC: System A/B, linearer Gradient von 30 % auf 35 % B in 40 min

Ausbeute: 7.85 mg (12 %)

¹H NMR (DMSO-d₆, 500 MHz) δ_{H} 9.85 (s, 1H), 9.35 (s, 1H), 8.09 (t, $J = 5.5$ Hz, 1H), 7.29 (m, 2H), 7.22 (m, 2H), 7.20 (m, 1H), 7.17 (m, 1H), 6.92 (bs, 1H), 6.81 (m, 2H), 3.81 (s, 3H), 3.79 (s, 3H), 3.62 (s, 3H), 3.39 (m, 2H), 2.80 (t, $J = 7.4$ Hz, 2H).

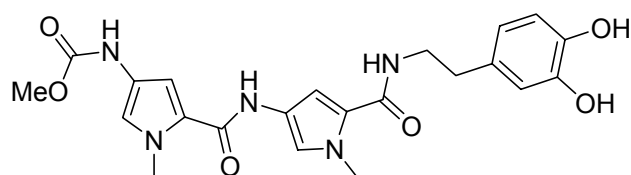
^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 125 MHz) δ_{C} 161.2, 158.3, 154.0, 139.7, 128.7, 128.3, 126.0, 123.0, 122.9, 122.1, 122.0, 117.8, 117.1, 104.1, 103.8, 51.5, 40.2, 36.1, 35.9, 35.3.

ESI-MS m/z 424.3 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 303.2.

FT-ICR-MS m/z 424.19806 ($[\text{M}+\text{H}]^+$, ber. 424.19793 für $\text{C}_{22}\text{H}_{26}\text{O}_4\text{N}_5^+$).

IR ν_{max} (cm^{-1}) 3305, 3132, 3062, 3027, 2969, 2949, 2858, 1705, 1639, 1588, 1528, 1465, 1435, 1403, 1249, 1208, 1079, 1003.

MePy2-C3 (33c)



HPLC: System C/D, linearer Gradient von 20 % auf 40 % D in 40 min

Ausbeute: 5.38 mg (8 %)

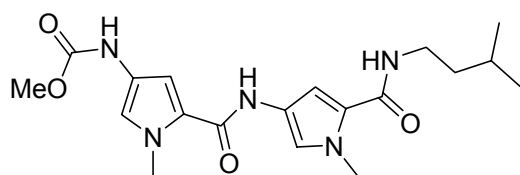
^1H NMR (DMSO- d_6 , 500 MHz) δ_{H} 9.85 (s, 1H), 9.35 (s, 1H), 8.76 (s, 1H), 8.64 (s, 1H), 8.03 (t, $J = 5.6$ Hz, 1H), 7.17 (s, 1H), 6.92 (s, 1H), 6.80 (m, 2H), 6.63 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H), 6.60 (d, $J = 1.5$ Hz, 1H), 6.45 (dd, $J = 8.1$ Hz, $J = 1.7$ Hz, 1H), 3.81 (s, 3H), 3.79 (s, 3H), 3.62 (s, 3H), 3.29 (m, 2H), 2.60 (t, $J = 7.6$ Hz, 2H).

^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 125 MHz) δ_{C} 161.1, 158.3, 154.1, 145.1, 143.5, 130.4, 123.0, 123.0, 122.0, 122.0, 119.2, 117.8, 117.2, 116.0, 115.5, 104.0, 103.8, 51.5, 40.6, 36.1, 35.9, 34.9.

ESI-MS m/z 456.1 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 303.3.

FT-ICR-MS m/z 478.16946 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$, ber. 478.16970 für $\text{C}_{22}\text{H}_{25}\text{O}_6\text{N}_5\text{Na}^+$).

IR ν_{max} (cm^{-1}) 3304, 3139, 2970, 2932, 2855, 1701, 1636, 1587, 1520, 1465, 1435, 1402, 1250.

MePy2-C4 (33d)

HPLC: System A/B, linearer Gradient von 30 % auf 35 % B in 40 min

Ausbeute: 17.92 mg (29 %)

¹H NMR (DMSO-d₆, 400 MHz) δ_{H} 9.83 (s, 1H), 9.36 (s, 1H), 7.95 (t, $J = 5.5$ Hz, 1H), 7.16 (d, $J = 1.3$ Hz, 1H), 6.92 (s, 1H), 6.83 (d, $J = 1.6$ Hz, 1H), 6.81 (s, 1H), 3.81 (s, 3H), 3.78 (s, 3H), 3.62 (s, 3H), 3.18 (m, 2H), 1.59 (m, 1H), 1.37 (q, $J = 7.1$ Hz, 2H), 0.89 (d, $J = 6.7$ Hz, 6H).

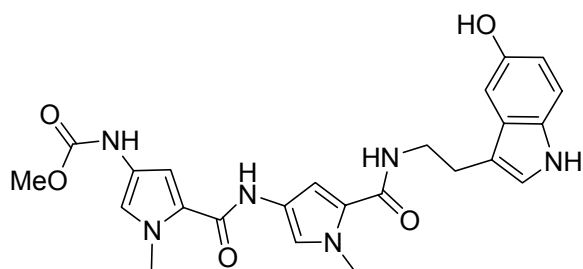
¹³C NMR (DMSO-d₆, 100 MHz) δ_{C} 161.2, 158.3, 154.1, 123.1, 123.0, 122.1, 122.0, 117.7, 117.1, 104.1, 103.8, 51.5, 38.4, 36.7, 36.1, 35.9, 25.3, 22.5.

ESI-MS m/z 390.3 [M+H]⁺, 303.3, 277.3

FT-ICR-MS m/z 390.21380 ([M+H]⁺, ber. 390.21358 für C₁₉H₂₈O₄N₅⁺).

m/z 412.19561 ([M+Na]⁺, ber. 412.19553 für C₁₉H₂₇O₄N₅Na⁺).

IR ν_{max} (cm⁻¹) 3306, 3135, 3110, 2955, 2935, 2870, 1707, 1638, 1589, 1529, 1465, 1435, 1403, 1249, 1208, 1079, 1003.

MePy2-C8 (33h)

HPLC: System C/D, linearer Gradient von 20 % auf 40 % B in 40 min

Ausbeute: 23.94 mg (32 %)

¹H NMR (DMSO-d₆, 500 MHz) δ_{H} 10.47 (s, 1H), 9.85 (s, 1H), 9.35 (s, 1H), 8.60 (s, 1H), 8.12 (t, $J = 5.5$ Hz, 1H), 7.18 (s, 1H), 7.12 (d, $J = 8.6$ Hz, 1H), 7.06 (s, 1H), 6.92 (s, 1H), 6.89 (s, 1H), 6.85 (s, 1H), 6.81 (s, 1H), 6.60

(dd, $J = 8.7$ Hz, $J = 1.2$ Hz, 1H), 3.82 (s, 3H), 3.82 (s, 3H), 3.63 (s, 3H), 3.42 (m, 2H), 2.81 (t, $J = 7.6$ Hz, 2H).

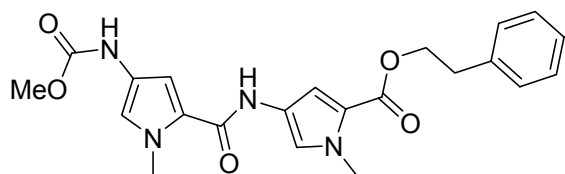
^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 125 MHz) δ_{C} 161.2, 158.3, 154.1, 150.2, 130.8, 128.0, 123.1, 123.1, 123.0, 122.1, 122.0, 117.8, 117.1, 111.6, 111.3, 111.0, 104.1, 103.8, 102.3, 51.5, 39.4, 36.1, 36.0, 25.6.

ESI-MS m/z 479.2 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 303.3, 277.3

FT-ICR-MS m/z 501.18566 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, ber. 501.18569 für $\text{C}_{24}\text{H}_{26}\text{O}_5\text{N}_6\text{Na}^+$.

IR ν_{max} (cm^{-1}) 3291, 3132, 2951, 2854, 1703, 1635, 1584, 1525, 1464, 1433, 1401, 1363, 1249, 1206, 1077, 1022, 1002.

MePy2-C9 (33i)



HPLC: System A/B, linearer Gradient von 30 % auf 35 % B in 40 min

Ausbeute: 16.95 mg (26 %)

^1H NMR (DMSO- d_6 , 400 MHz) δ_{H} 9.88 (s, 1H), 9.38 (s, 1H), 7.45 (d, $J = 1.9$ Hz, 1H), 7.31 (m, 4H), 7.23 (m, 1H), 6.93 (s, 1H), 6.85 (d, $J = 2.2$ Hz, 1H), 6.82 (s, 1H), 4.37 (t, $J = 6.7$ Hz, 2H), 3.81 (s, 3H), 3.78 (s, 3H), 3.63 (s, 3H), 2.98 (t, $J = 6.7$ Hz, 2H).

^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 100 MHz) δ_{C} 160.3, 158.3, 154.1, 138.3, 128.9, 128.4, 126.4, 122.9, 122.7, 122.1, 120.8, 118.6, 117.3, 108.4, 103.9, 64.0, 51.5, 36.2, 36.1, 34.5.

ESI-MS m/z 425.3 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 303.3, 271.3, 259.3

FT-ICR-MS m/z 425.18204 $[\text{M}+\text{H}]^+$, ber. 425.18195 für $\text{C}_{22}\text{H}_{25}\text{O}_5\text{N}_4^+$.

IR ν_{max} (cm^{-1}) 3490, 3320, 3135, 3028, 2953, 2853, 1702, 1645, 1588, 1555, 1467, 1434, 1407, 1245, 1193, 1107, 1060, 1003.

b) Vorschrift für die Synthese des Derivats MePy2-C7 (**33g**)

Histamindihydrochlorid (27 mg, 0.1438 mmol, 1.0 eq) wurde in MeOH (1 mL) suspendiert und DIPEA (50 μL , 0.2920 mmol, 2.0 eq) zugegeben, wobei eine klare

Lösung entstand. Anschließend wird das Lösungsmittel unter vermindertem Druck vollständig entfernt.

Die freie Carbonsäure **29** (MePy2-C1) (46 mg, 0.1438 mmol, 1.0 eq) wurde in DCM/DMF (10/1, 1 mL) gelöst und auf 0 °C gekühlt. Zu dieser Lösung wurden nacheinander PyBOP (75 mg, 0.1438 mmol, 1.0 eq) und DIPEA (74 µL, 0.4323 mmol, 3.0 eq) gegeben und die Lösung wurde für 30 min bei dieser Temperatur gerührt. Anschließend wird das Histamin-DIPEA-Hydrochlorid-Gemisch in DMF (1 mL) aufgenommen und zu der Reaktionsmischung gegeben. Die resultierende Suspension wurde für 16 h bei RT gerührt. Anschließend wurde die Reaktionsmischung mit EtOAc (10 mL) verdünnt und mit ges. NaCl (3 x 10 mL) gewaschen. Die organische Phase wurde mit Na₂SO₄ getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das so erhaltene Rohprodukt wurde mittels präparativer RP-HPLC aufgereinigt.

HPLC: System C/D, linearer Gradient von 20 % auf 40 % D in 40 min

Ausbeute: 5.85 mg (10 %)

¹H NMR (DMSO-d₆, 500 MHz) δ_H 9.84 (s, 1H), 9.35 (s, 1H), 8.08 (t, *J* = 5.4 Hz, 1H), 7.76 (s, 1H), 7.17 (s, 1H), 6.91 (s, 2H), 6.82 (m, 1H), 6.81 (m, 1H), 3.81 (s, 3H), 3.79 (s, 3H), 3.62 (s, 3H), 3.40 (m, 2H), 2.74 (t, *J* = 7.3 Hz, 2H).

¹³C NMR (DMSO-d₆, 125 MHz) δ_C 161.2, 158.3, 154.0, 134.6, 134.3, 123.0, 122.9, 122.1, 122.0, 117.8, 117.1, 116.6, 104.1, 103.8, 51.5, 38.5, 36.1, 35.9, 26.7.

ESI-MS *m/z* 414.2 [M+H]⁺.

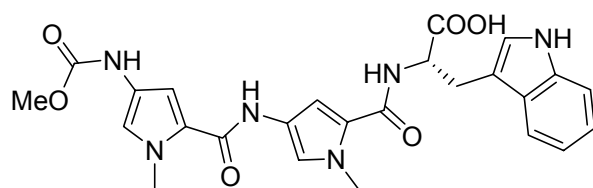
FT-ICR-MS *m/z* 414.18867 ([M+H]⁺, ber. 414.18843 für C₁₉H₂₄O₄N₇⁺).

IR ν_{max} (cm⁻¹) 3295, 3138, 2951, 2930, 2854, 1706, 1644, 1589, 1529, 1437, 1403, 1393, 1252, 1210, 1080, 1004.

c) Allgemeine Vorschrift für die Synthese der Derivate MePy2-C5 (**33e**) und MePy2-C6 (**33f**).

Zu einer Lösung der freien Carbonsäure **29** (MePy2-C1) (50 mg, 0.156 mmol) und der entsprechenden Aminosäure H-Xaa-OMe•HCl (0.156 mmol, 1.0eq) in DMF (2 mL) wurden EDCI (60 mg, 0.312 mmol, 2.0eq) und DMAP (48 mg, 0.39 mmol, 2.5eq)

zugegeben. Die Reaktionsmischung wurde 16 h bei RT gerührt. Anschließend wurde die Reaktionsmischung in EtOAc (10 mL) gegossen, mit 10 % HCl (3 x 5 mL) und mit ges. NaHCO₃ (3 x 5 mL) gewaschen. Die organische Phase wurde mit Na₂SO₄ getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das so erhaltene Rohprodukt wurde ohne weitere Aufreinigung umgesetzt. Es wurde in THF gelöst (5 mL) und eine 0.1 N wässrige LiOH (5.0 eq) wurde zugetropft. Nach vollständigem Umsatz wurden die flüchtigen Bestandteile unter vermindertem Druck entfernt. Der wässrige Rückstand wurde mit etwas Wasser (5 mL) verdünnt und mit 10 % HCl auf pH 3 eingestellt. Anschließend wurde die wässrige Phase mit EtOAc (3 x 10 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Extrakte wurde mit Na₂SO₄ getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das so erhaltene Rohprodukt wurde mittels präparativer RP-HPLC aufgereinigt.

MePy2-C5 (33e)

HPLC: System C/D, linearer Gradient von 20 % auf 25 % D in 40 min

Ausbeute: 4.07 mg (5 %, über 2 Stufen)

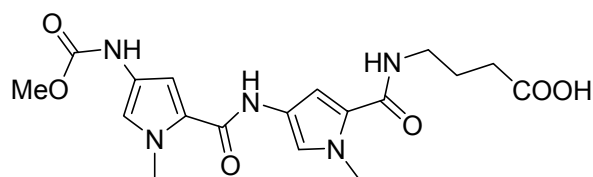
¹H NMR (DMSO-d₆, 500 MHz) δ_{H} 10.80 (s, 1H), 9.85 (s, 1H), 9.36 (s, 1H), 8.04 (bs, 1H), 7.56 (d, J = 8.1 Hz, 1H), 7.32 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 7.17 (s, 1H), 7.15 (s, 1H), 7.05 (t, J = 7.6 Hz, 1H), 6.97 (t, J = 7.5 Hz, 1H), 6.91 (m, 2H), 6.81 (s, 1H), 4.53 (bs, 1H), 3.81 (s, 3H), 3.73 (s, 3H), 3.62 (s, 3H), 3.26 (m, 1H), 3.18 (m, 1H).

¹³C NMR (DMSO-d₆, 125 MHz) δ_{C} 161.1, 158.3, 136.0, 123.4, 123.0, 122.1, 120.8, 118.3, 118.2, 117.1, 116.2, 111.3, 103.7, 102.8, 51.5, 50.5, 36.1, 35.9, 26.6.

ESI-MS m/z 507.2 [M+H]⁺, 303.2, 277.3.

FT-ICR-MS m/z 507.19860 ([M+H]⁺, ber. 507.19866 für C₂₅H₂₇O₆N₆⁺).

IR ν_{max} (cm⁻¹) 3318, 2954, 2930, 2854, 1706, 1644, 1589, 1522, 1459, 1437, 1403, 1251, 1209.

MePy2-C6 (33f)

HPLC: System C/D, linearer Gradient von 20 % auf 40 % D in 40 min

Ausbeute: 6.14 mg (10 %, über 2 Stufen)

¹H NMR (DMSO-d₆, 500 MHz) δ_{H} 12.05 (bs, 1H), 9.83 (s, 1H), 9.35 (s, 1H), 8.02 (t, $J = 5.2$ Hz, 1H), 7.16 (s, 1H), 6.92 (s, 1H), 6.85 (s, 1H), 6.80 (s, 1H), 3.81 (s, 3H), 3.78 (s, 3H), 3.62 (s, 3H), 3.17 (m, 2H), 2.24 (t, $J = 7.3$ Hz, 2H), 1.70 (m, 2H).

¹³C NMR (DMSO-d₆, 125 MHz) δ_{C} 174.3, 161.3, 158.3, 154.1, 123.0, 122.9, 122.1, 122.0, 117.7, 117.3, 104.2, 103.8, 51.5, 37.8, 36.1, 35.9, 31.2, 24.8.

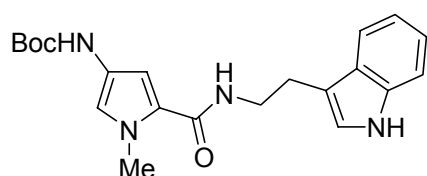
ESI-MS m/z 406.2 [M+H]⁺.

FT-ICR-MS m/z 428.15406 ([M+Na]⁺, ber. 428.15405 für C₁₈H₂₃O₆N₅Na⁺).

IR ν_{max} (cm⁻¹) 3304, 3138, 2954, 1707, 1654, 1532, 1439, 1390, 1298, 1248, 1217.

2.2.2 Synthesen der N-terminalen Modifikationen

{5-[2-(1H-Indol-3-yl)-ethylcarbamoyl]-1-methyl-1H-pyrrol-3-yl}-carbaminsäure-



tert-butylester (Boc-PyMe-Trpa) (34). 4-*tert*-

Butoxycarbonylamino-1-methyl-1*H*-pyrrole-2-

carbonsäure (1.0 g, 4.16 mmol, 1.0 eq) wurde in DMF (20 mL) gelöst und nacheinander Tryptamin (667 mg,

4.16 mmol, 1.0 eq), EDCI (1.595 g, 8.320 mmol, 2.0 eq) und DMAP (1.271 g, 10.40 mmol, 2.5eq) zugegeben. Nach jeder Zugabe wurde das vollständige Auflösen des zugegebenen Reagenzes abgewartet. Die Reaktionslösung wurde für 16 h bei RT gerührt. Anschließend wurde sie in EtOAc (50 mL) gegossen und mit 10 % HCl (3 x 30 mL), mit ges. NaHCO₃-Lösung (3 x 30 mL) und mit ges. NaCl-Lösung (5 x 30 mL) gewaschen. Die organische Phase wurde über MgSO₄ getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Produkt wurde als genügend reiner beiger Feststoff erhalten, der ohne weitere Aufreinigung weiter umgesetzt wurde (1.403 g, 88%).

¹H NMR (DMSO-d₆, 400 MHz) δ_{H} 1.44 (s, 9H), 2.88 (t, 2H, $J=7.2$ Hz), 3.42 (q, 2H, $J=8.4$ Hz, $J=6.1$ Hz), 3.78 (s, 3H), 6.63 (s, 1H), 6.83 (s, 1H), 6.98 (t, 1H, $J=7.1$ Hz), 7.06 (t, 1H, $J=7.6$ Hz), 7.15 (d, 1H, $J=2.1$ Hz), 7.33 (d, 1H, $J=8.1$ Hz), 7.57 (d, 1H, $J=7.8$ Hz), 8.11 (t, 1H, $J=5.6$ Hz), 9.05 (s, 1H), 10.80 (s, 1H).

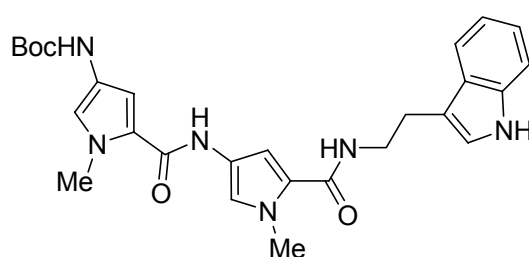
¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz) δ_{C} 25.5, 27.9, 36.0, 78.3, 103.2, 111.4, 112.1, 116.3, 118.2, 118.4, 120.9, 122.2, 122.5, 123.2, 127.3, 136.3, 152.8, 161.2.

EI-MS m/z 382 (M^{+}), 282, 143.

EI-HRMS m/z 382.1994 (M^{+} , ber. 382.2005 für C₂₁H₂₆O₃N₄⁺).

IR ν_{max} (cm⁻¹) 3318, 2976, 2929, 2854, 1696, 1638, 1589, 1521, 1249, 1162.

Boc-PyMe-PyMe-Trpa (35). Verbindung **34** (1.383 g, 3.62 mmol) wurde in einem



Mörser fein zerrieben und in einem Rundkolben in 4 N HCl in Dioxan (20 mL) gelöst. Die klare Lösung wurde für 30 min bei RT gerührt. Dabei wurde die Reaktionsmischung trüb. Nach vollständiger Reaktion wurden die

flüchtigen Bestandteile unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde als beiges Pulver erhalten und auf Grund seiner Empfindlichkeit direkt weiter umgesetzt. (1.157 g, 100%).

Das Hydrochlorid (1.157 g, 3.62 mmol) wurde in DMF (20 mL) gelöst und nacheinander 4-*tert*-Butoxycarbonylamino-1-methyl-1*H*-pyrrole-2-carbonsäure (872 mg, 3.62 mmol, 1.0eq), EDCI (1.392 g, 7.24 mmol, 2.0eq) and DMAP (1.109 g, 9.05 mmol, 2.5eq) zugegeben. Nach jeder Zugabe wurde das vollständige Auflösen des zugegebenen Reagenzes abgewartet. Die Reaktionslösung wurde für 16 h bei RT gerührt. Anschließend wurde sie in EtOAc (50 mL) gegossen und mit 10 % HCl (3 x 30 mL), mit ges. NaHCO₃-Lösung (3 x 30 mL) und mit ges. NaCl-Lösung (5 x 30 mL) gewaschen. Die organische Phase wurde über MgSO₄ getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Produkt wurde als beiger Feststoff erhalten, der ohne weitere Aufreinigung weiter umgesetzt wurde (1.455 g, 79%).

¹H NMR (DMSO-*d*₆, 500 MHz) δ_{H} 10.80 (s, 1H), 9.82 (s, 1H), 9.09 (s, 1H), 8.12 (t, *J* = 5.8 Hz, 1H), 7.58 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 7.33 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 7.17 (m, 2H), 7.06 (t, *J* = 7.3 Hz, 1H), 6.99 (t, *J* = 7.4 Hz, 1H), 6.88 (s, 1H), 6.85 (d, *J* = 1.1 Hz, 1H), 6.82 (s, 1H), 3.81 (s, 3H), 3.80 (s, 3H), 3.45 (m, 2H), 2.90 (t, *J* = 7.7 Hz, 2H), 1.45 (s, 9H).

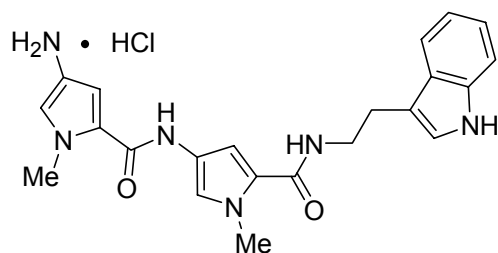
¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 125 MHz) δ_{C} 161.2, 158.4, 152.9, 136.2, 127.3, 123.0, 122.8, 122.5, 122.3, 122.1, 120.9, 118.3, 118.2, 117.6, 116.9, 112.0, 111.4, 104.1, 103.8, 78.3, 39.4, 36.0, 36.0, 28.2, 25.5.

ESI-MS *m/z* 505.3 [M+H]⁺, 449.3, 181, 405.4.

FT-ICR-MS *m/z* 505.25614 ([M+H]⁺, ber. 505.25578 für C₂₇H₃₃O₄N₆⁺).

IR ν_{max} (cm⁻¹) 3308, 2974, 2931, 2855, 1698, 1639, 1587, 1526, 1458, 1436, 1404, 1392, 1366, 1250, 1208, 1162, 1099, 1066.

H-PyMe-PyMe-Trpa•HCl (MePy2-N1) (36a). Verbindung **35** (1.455 g, 2.88 mmol)



wurde in einem Mörser fein zerrieben und in einem Rundkolben in 4 N HCl in Dioxan (20 mL) gelöst. Die klare Lösung wurde für 30 min bei RT gerührt. Dabei wurde die Reaktionsmischung trüb. Nach vollständiger Reaktion wurden die

flüchtigen Bestandteile unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde als beiges Pulver erhalten (1.231 g, 100%).

Ein Teil des Rohproduktes (52 mg) wurde mittels RP-HPLC aufgereinigt (6 mg, 12%).

HPLC: System C/D, linearer Gradient von 10 % auf 35 % D in 40 min

¹H NMR (DMSO-d₆, 500 MHz) δ_{H} 10.80 (bs, 1H), 9.57 (s, 1H), 8.12 (m, 1H), 7.58 (d, J = 7.5 Hz, 1H), 7.33 (d, J = 7.9 Hz, 1H), 7.16 (m, 2H), 7.06 (t, J = 7.4 Hz, 1H), 6.99 (t, J = 7.2 Hz, 1H), 6.82 (d, J = 1.3 Hz, 1H), 6.36 (d, J = 1.9 Hz, 1H), 6.26 (d, J = 1.9 Hz, 1H), 3.81 (s, 3H), 3.72 (s, 3H), 3.45 (m, 2H), 2.90 (t, J = 7.6 Hz, 2H).

¹³C NMR (DMSO-d₆, 125 MHz) δ_{C} 161.2, 158.6, 136.2, 131.6, 127.3, 123.0, 122.7, 122.5, 122.3, 120.9, 118.3, 118.2, 117.6, 114.2, 112.0, 111.3, 104.0, 103.2, 39.4, 35.9, 35.6, 25.5.

ESI-MS m/z 405.2 [M+H]⁺.

FT-ICR-MS m/z 405.20346 ([M+H]⁺, ber. 405.20335 für C₂₂H₂₅O₂N₆⁺).

IR ν_{max} (cm⁻¹) 3301, 2968, 2929, 2854, 1697, 1637, 1580, 1528, 1458, 1436, 1403, 1261.

a) Allgemeine Vorschrift für die Synthese des Derivate MePy2-N2 (36b).

Das Derivat MePy-N2 ist identisch mit der Verbindung Boc-PyMe-PyMe-Trpa (**35**) kann aber auch durch erneute Schützung aus Verbindung H-PyMe-PyMe-Trpa•HCl (MePy2-N1) (**36a**) erhalten werden.

Das Hydrochlorid **36a** (50 mg, 0.113 mmol) wurde in Dioxan (4 mL) gelöst und eine Lösung von NaHCO₃ (21 mg, 0.25 mmol, 2.1 eq) in Wasser (4 mL) zugetropft. Anschließend wurde Boc₂O (32 mg, 34 μ L, 0.147 mmol, 1.3 eq) zugegeben und die Reaktionsmischung 16 h bei RT gerührt. Nach vollständiger Reaktion wurde die

Reaktionsmischung mit EtOAc (10 mL) verdünnt, mit 10 % HCl (3 x 5 mL), mit ges. NaHCO₃-Lösung (1 x 5 mL) und mit ges. NaCl-Lösung (1 x 5 mL) gewaschen. Die organische Phase wurde über Na₂SO₄ getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das so erhaltene Rohprodukt wurde mittels präparativer RP-HPLC aufgereinigt.

HPLC: System C/D, linearer Gradient von 20 % auf 30 % D in 40 min

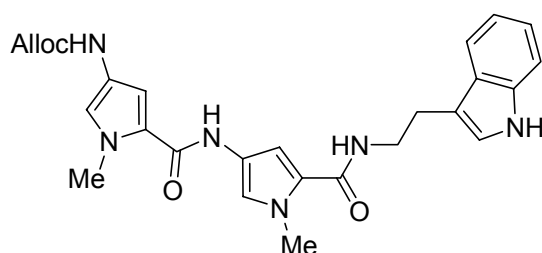
Ausbeute: 6.73 mg (12 %)

Analytische Daten: s.o. (Verbindung Boc-PyMe-PyMe-Trpa, **35**)

b) Allgemeine Vorschrift für die Synthese der Derivate MePy2-N3 (**36c**) bis MePy2-N10 (**36j**).

Das Hydrochlorid **36a** (50 mg, 0.113 mmol) wurde in THF (1 mL) suspendiert und nach Zugabe von Triethylamin (25 mg, 35 µL, 0.249 mmol, 2.2eq) wurde die nun klare Lösung für 10 min bei RT gerührt. Anschließend wurde das entsprechende Elektrophil (0.141 mmol, 1.25 eq) zugegeben und die Reaktionsmischung bei RT gerührt. Nach vollständiger Reaktion wurde die Reaktionsmischung mit EtOAc (10 mL) verdünnt und mit Wasser (1 x 5 mL) und ges. NaCl-Lösung (5 x 5 mL) gewaschen. Die organische Phase wurde über Na₂SO₄ getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das so erhaltene Rohprodukt wurde mittels präparativer RP-HPLC aufgereinigt.

MePy2-N3 (36c**)**



HPLC: System A/B, linearer Gradient von 30 % auf 45 % B in 40 min

Ausbeute: 12.81 mg (23 %)

¹H NMR (DMSO-d₆, 500 MHz) δ_H 10.80 (s, 1H), 9.86 (s, 1H), 9.45 (s, 1H), 8.14 (t, *J* = 5.6 Hz, 1H), 7.58 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H), 7.34 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 7.18 (m, 1H), 7.16 (m, 1H), 7.07 (t, *J* = 7.5 Hz, 1H), 6.99 (t, *J* = 7.4 Hz, 1H), 6.92 (s, 1H), 6.85 (d, *J* = 1.5 Hz, 1H), 6.83 (s, 1H), 5.97 (m, 1H),

5.33 (d, $J = 17.1$ Hz, 1H), 5.22 (d, $J = 10.5$ Hz, 1H), 4.57 (d, $J = 4.9$ Hz, 2H), 3.82 (s, 6H), 3.45 (m, 2H), 2.91 (t, $J = 7.5$ Hz, 2H).

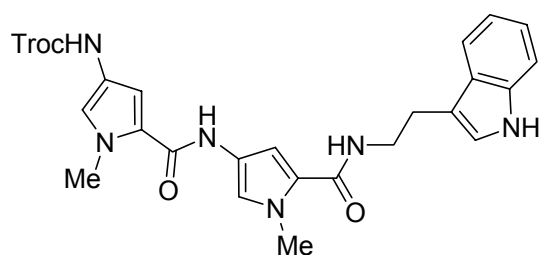
^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 125 MHz) δ_{C} 161.2, 158.3, 153.3, 136.2, 133.6, 127.3, 123.0, 122.5, 122.1, 121.9, 120.9, 118.3, 118.2, 117.8, 117.3, 117.1, 112.0, 111.4, 104.1, 103.8, 64.5, 39.4, 36.1, 36.0, 25.5.

ESI-MS m/z 489.2 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 329.3, 303.4.

FT-ICR-MS m/z 489.22488 ($[\text{M}+\text{H}]^+$, ber. 489.22448 für $\text{C}_{26}\text{H}_{29}\text{O}_4\text{N}_6^+$).
 m/z 511.20613 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$, ber. 511.20642 für $\text{C}_{26}\text{H}_{28}\text{O}_4\text{N}_6\text{Na}^+$).

IR ν_{max} (cm^{-1}) 3291, 3129, 2935, 2854, 1705, 1638, 1600, 1589, 1528, 1460, 1436, 1404, 1245, 1207, 1168, 1003.

MePy2-N4 (36d)



HPLC: System A/B, linearer Gradient von 35 % auf 55 % B in 40 min

Ausbeute: 8.24 mg (13 %)

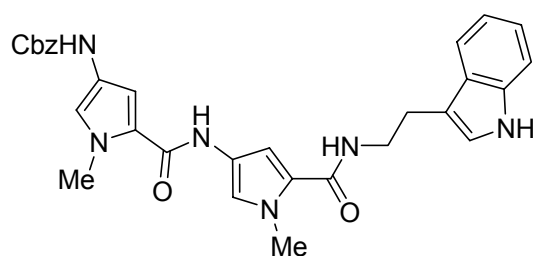
^1H NMR (DMSO- d_6 , 500 MHz) δ_{H} 10.80 (s, 1H), 9.93 (s, 1H), 9.89 (s, 1H), 8.14 (t, $J = 5.9$ Hz, 1H), 7.58 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H), 7.34 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H), 7.18 (d, $J = 1.7$ Hz, 1H), 7.16 (d, $J = 2.1$ Hz, 1H), 7.07 (t, $J = 7.6$ Hz, 1H), 6.99 (t, $J = 7.0$ Hz, 1H), 6.96 (d, $J = 1.7$ Hz, 1H), 6.88 (d, $J = 1.9$ Hz, 1H), 6.85 (d, $J = 1.7$ Hz, 1H), 4.91 (s, 2H), 3.83 (s, 3H), 3.82 (s, 3H), 3.45 (m, 2H), 2.90 (t, $J = 7.6$ Hz, 2H).

^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 125 MHz) δ_{C} 161.2, 158.2, 151.7, 136.2, 127.3, 123.3, 123.1, 122.5, 122.0, 121.2, 120.9, 118.3, 118.2, 117.8, 117.3, 112.0, 111.4, 104.1, 104.0, 96.2, 73.4, 39.4, 36.1, 36.0, 25.5.

ESI-MS m/z 579.1 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

FT-ICR-MS m/z 579.10753 ($[\text{M}+\text{H}]^+$, ber. 579.10756 für $\text{C}_{25}\text{H}_{26}\text{Cl}_3\text{O}_4\text{N}_6^+$).

IR ν_{max} (cm^{-1}) 3303, 3129, 3056, 2969, 2928, 2853, 1753, 1713, 1638, 1588, 1526, 1464, 1436, 1405, 1236, 1166, 1098.

MePy2-N5 (36e)

HPLC: System A/B, linearer Gradient von 30 % auf 45 % B in 40 min

Ausbeute: 7.61 mg (13 %)

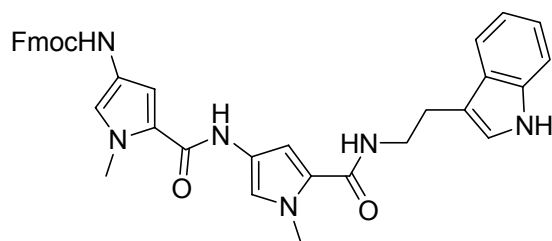
^1H NMR (DMSO- d_6 , 500 MHz) δ_{H} 10.80 (s, 1H), 9.85 (s, 1H), 9.50 (s, 1H), 8.13 (t, $J = 5.7$ Hz, 1H), 7.58 (d, $J = 7.7$ Hz, 1H), 7.40 (m, 4H), 7.34 (m, 2H), 7.17 (m, 2H), 7.07 (t, $J = 7.6$ Hz, 1H), 6.99 (t, $J = 7.5$ Hz, 1H), 6.93 (s, 1H), 6.85 (d, $J = 1.5$ Hz, 1H), 6.83 (s, 1H), 5.12 (s, 2H), 3.81 (s, 6H), 3.45 (m, 2H), 2.90 (t, $J = 7.5$ Hz, 2H).

^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 125 MHz) δ_{C} 161.2, 158.3, 153.4, 137.0, 136.2, 128.4, 128.0, 127.9, 127.3, 123.1, 123.0, 122.5, 122.1, 121.9, 120.9, 118.3, 118.2, 117.8, 117.1, 112.0, 111.4, 104.1, 103.8, 65.5, 39.4, 36.1, 36.0, 25.5.

ESI-MS m/z 539.2 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 379.4, 353.3.

FT-ICR-MS m/z 561.22218 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$, ber. 561.22207 für $\text{C}_{30}\text{H}_{30}\text{O}_4\text{N}_6\text{Na}^+$).

IR ν_{max} (cm^{-1}) 3304, 2968, 2934, 2854, 1703, 1638, 1588, 1527, 1463, 1436, 1404, 1244, 1208, 1166, 1069.

MePy2-N6 (36f)

HPLC: System A/B, linearer Gradient von 35 % auf 55 % B in 40 min

Ausbeute: 9.02 mg (13 %)

^1H NMR (DMSO- d_6 , 500 MHz) δ_{H} 10.80 (s, 1H), 9.86 (s, 1H), 9.48 (s, 1H), 8.14 (t, $J = 5.7$ Hz, 1H), 7.91 (d, $J = 7.5$ Hz, 2H), 7.74 (d, $J = 7.3$ Hz, 2H),

CC(=O)Nc1cc(C)c(C(=O)Nc2cc(C)n(C2)C(=O)NCCc3c[nH]c4ccccc34)c1

Ausbeute: 11.03 mg (22 %)

¹³C NMR (DMSO-d₆, 125 MHz) δ_C 166.5, 161.2, 158.4, 136.2, 127.3, 123.0, 122.7, 122.5, 122.1, 122.0, 120.9, 118.3, 118.2, 118.0, 117.8, 112.0, 111.4, 104.1, 103.8, 39.4, 36.1, 36.0, 25.5, 23.1.

FT-ICR-MS m/z 469.19555 ($[M+Na]^+$, ber. 469.19587 für $C_{24}H_{26}O_3N_6Na^+$).

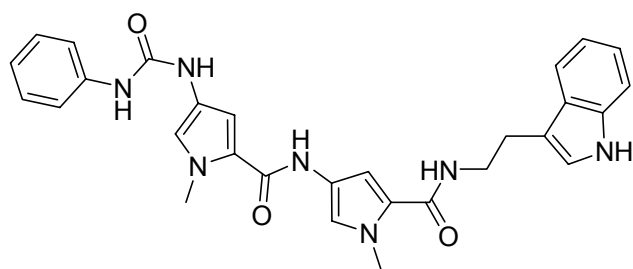
CC(C)(C)C(=O)Nc1cc(C)c(C(=O)Nc2cc(C)c(C(=O)NCCc3c[nH]c4ccccc34)c2)n1

Ausbeute: 6.46 mg (12 %)

¹³C NMR (DMSO-d₆, 125 MHz) δ_C 174.9, 161.2, 158.5, 136.2, 127.3, 123.1, 122.7, 122.5, 122.3, 122.1, 120.9, 118.5, 118.3, 118.2, 117.7, 112.0, 111.4, 104.9, 104.0, 39.5, 38.5, 36.0, 27.4, 25.5.

FT-ICR-MS m/z 489.2611 ($[M+H]^+$, ber. 489.26087 für $C_{24}H_{26}O_3N_6Na^+$).

IR ν_{max} (cm⁻¹) 3313, 2968, 2932, 2872, 1695, 1640, 1581, 1526, 1459, 1435, 1403, 1365, 1264, 1206, 1143.

MePy2-N9 (36i)

HPLC: System A/B, linearer Gradient von 30 % auf 45 % B in 40 min

Ausbeute: 8.73 mg (15 %)

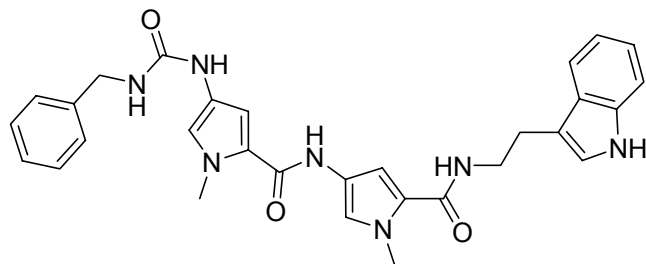
¹H NMR (DMSO-d₆, 500 MHz) δ_{H} 10.81 (s, 1H), 9.80 (s, 1H), 8.53 (s, 1H), 8.35 (s, 1H), 8.15 (t, $J = 5.7$ Hz, 1H), 7.59 (d, $J = 7.7$ Hz, 1H), 7.45 (d, $J = 7.7$ Hz, 2H), 7.34 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H), 7.25 (t, $J = 7.9$ Hz, 2H), 7.19 (d, $J = 1.5$ Hz, 1H), 7.17 (m, 1H), 7.07 (m, 1H), 7.05 (m, 1H), 6.99 (t, $J = 7.4$ Hz, 1H), 6.93 (t, $J = 7.4$ Hz, 1H), 6.86 (d, $J = 1.7$ Hz, 1H), 6.84 (d, $J = 1.5$ Hz, 1H), 3.84 (s, 3H), 3.83 (s, 3H), 3.46 (m, 2H), 2.91 (t, $J = 7.5$ Hz, 2H).

¹³C NMR (DMSO-d₆, 125 MHz) δ_{C} 161.2, 158.3, 152.5, 140.1, 136.2, 128.7, 127.3, 123.1, 122.8, 122.5, 122.1, 122.0, 121.4, 120.9, 118.3, 118.2, 117.8, 117.7, 117.5, 112.0, 111.4, 104.1, 104.0, 39.4, 36.1, 36.0, 25.5.

ESI-MS m/z 524.2 [M+H]⁺, 364.2, 338.2.

FT-ICR-MS m/z 524.24045 ([M+H]⁺, ber. 524.24046 für C₂₉H₃₀O₃N₇⁺).

IR ν_{max} (cm⁻¹) 3320, 3133, 2971, 2932, 2855, 1696, 1637, 1600, 1595, 1545, 1437, 1404, 1311, 1228.

MePy2-N10 (36j)

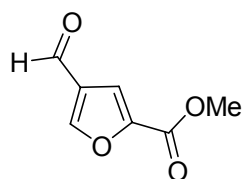
HPLC: System A/B, linearer Gradient von 30 % auf 45 % B in 40 min

Ausbeute: 5.94 mg (10 %)

- ¹H NMR** (DMSO-d₆, 500 MHz) δ_{H} 10.80 (s, 1H), 9.75 (s, 1H), 8.13 (m, 1H), 8.12 (m, 1H), 7.58 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H), 7.33 (m, 3H), 7.29 (m, 2H), 7.23 (t, $J = 7.1$ Hz, 1H), 7.18 (d, $J = 1.9$ Hz, 1H), 7.16 (d, $J = 2.1$ Hz, 1H), 7.06 (t, $J = 7.6$ Hz, 1H), 6.99 (t, $J = 7.4$ Hz, 1H), 6.95 (d, $J = 1.9$ Hz, 1H), 6.84 (d, $J = 1.7$ Hz, 1H), 6.76 (d, $J = 1.9$ Hz, 1H), 6.41 (t, $J = 5.9$ Hz, 1H), 4.27 (d, $J = 6.0$ Hz, 2H), 3.82 (s, 3H), 3.81 (s, 3H), 3.45 (m, 2H), 2.90 (m, 2H).
- ¹³C NMR** (DMSO-d₆, 125 MHz) δ_{C} 161.2, 158.4, 155.4, 140.7, 136.2, 128.2, 127.3, 127.1, 126.6, 123.0, 122.9, 122.6, 122.5, 122.1, 120.9, 118.3, 118.2, 117.7, 117.2, 112.0, 111.3, 104.1, 42.9, 39.4, 36.0, 36.0, 25.4.
- ESI-MS** m/z 538.2 [M+H]⁺, 378.3, 352.3.
- FT-ICR-MS** m/z 560.23829 ([M+Na]⁺, ber. 560.23806 für C₃₀H₃₁O₃N₇Na⁺).
- IR** ν_{max} (cm⁻¹) 3310, 2970, 2929, 2855, 1697, 1637, 1585, 1532, 1458, 1435, 1404, 1259, 1209.

2.3 Totalsynthese der Proximicine

4-Formyl-furan-2-carbonsäuremethylester (**100**).



(952 mg, 10.93 mmol, 1.05 eq) wurde in THF (75 mL) gelöst und unter Inertgasbedingungen auf $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ gekühlt. Zu dieser Lösung wurde langsam *n*-BuLi (6.830 mL, 1.6 M in Hexan, 1.05 eq) tropfenweise zugegeben und die nun leicht gelbliche Lösung wurde für 20 min gerührt. Anschließend wurde 3-Furaldehyd (1000 mg, 10.41 mmol, 1.0 eq) gelöst in THF (2 mL) langsam zugetropft. Nach weiteren 20 min wurde *s*-BuLi (8.406 mL, 1.3 M in Cyclohexan, 1.05 eq) tropfenweise zugefügt. Die erhaltene Suspension wurde für 2.5 h bei $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ gerührt. Anschließend wurde Chlorameisensäuremethylester (1082 mg, 11.45 mmol, 1.1 eq) gelöst in THF (2 mL) zugetropft und die Reaktionsmischung für 45 min bei dieser Temperatur und für weitere 20 min bei RT gerührt. Während dieser Zeit färbte sie sich rot. Danach wurde die Reaktionsmischung in eisgekühlte 10 % HCl gegossen. Die Phasen wurden getrennt und die wässrige Phase wurde mit Et_2O (4 x 50 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Extrakte wurden über MgSO_4 getrocknet, filtriert und unter vermindertem Druck eingeeengt. Das so erhaltene Rohprodukt wurde über Säulenchromatographie (Kieselgel, Hexan/EtOAc 7/1) aufgereinigt und 569 mg (34 %) des gewünschten Produktes erhalten.

^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz) δ_{H} 3.90 (s, 3H), 7.46 (d, 1H, $J=0.67$), 8.18 (d, 1H, $J=0.89$), 9.94 (s, 1H).

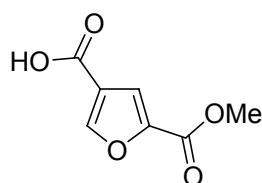
^{13}C NMR (CDCl_3 , 100 MHz) δ_{C} 52.4, 114.2, 129.4, 146.5, 152.3, 158.4, 183.7

EI-MS m/z 154 (M^+), 153, 123, 95.

EI-HRMS m/z 154.0270 (M^+ , berechnet 154.0266 für $\text{C}_7\text{H}_6\text{O}_4^+$).

IR ν_{max} (cm^{-1}) 3137, 2957, 2848, 1730, 1687, 1582.

Furan-2,4-dicarbonsäure-2-methylester (**101**).



NaClO_2 (80 %, 5.93 g, 52.45 mmol, 9.4 eq) and $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (6.094g, 39.06 mmol, 7.0 eq) wurden in 54 ml H_2O gelöst und langsam über einen Tropftrichter zu einer stark gerührten Lösung des Aldehyds **100** (860 mg, 5.58 mmol, 1.0 eq) gelöst in *tert*-BuOH (138 mL) und 2-Methyl-2-buten (34

mL) zugegeben. Nach Beendigung der Zugabe wurde die Reaktion für 50 min bei RT gerührt. Anschließend wurden 2-Methyl-2-buten und *tert*-BuOH unter vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde mit Wasser verdünnt und mit Hexan (3 x 50 mL) gewaschen. Die wässrige Phase wurde mit 10 % HCl auf pH 2 gebracht und mit EtOAc (3 x 50 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Extrakte wurden mit Na₂SO₄ getrocknet, filtriert und unter vermindertem Druck eingedampft. Das so erhaltene leicht gelbliche Rohprodukt wurde mit Chloroform gewaschen, um das gewünschte Produkt als farblosen Feststoff zu erhalten (741 mg, 78 %).

¹H NMR (DMSO-d₆, 400 MHz) δ_{H} 3.82 (s, 1H), 7.40 (d, 2H, $J=$), 8.54 (d, 2H, $J=0.83$), 13.10 (brs, 1H).

¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz) δ_{C} 52.2, 117.1, 121.6, 144.8, 151.6, 158.0, 162.9

EI-MS m/z 170 (M^{+}), 139.

EI-HRMS m/z 170.0213 (M^{+} , berechnet 170.0215 für C₇H₆O₅⁺).

IR ν_{max} (cm⁻¹) 3136, 2888, 2485, 1731, 1686.

4-*tert*-Butoxycarbonylamino-furan-2-carbonsäuremethylester, **Boc-Fu-OMe**

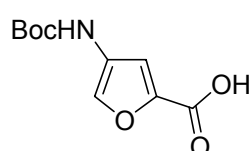
(88). Zu einer Lösung der Säure **101** (1.3 g, 7.68 mmol, 1.0 eq) in CH₃CN (1 mL/mmol) wurden nacheinander Triethylamin (1.069 mL, 7.68 mmol, 1.0 eq) und DPPA (1.657 mL, 7.68 mmol, 1.0 eq) zugegeben. Diese Lösung wurde für 3 h bei RT gerührt. Dann wurde *tert*-BuOH (0.95 mL/mmol) in einer Portion zugegeben und die Reaktionsmischung für 24 h unter Rückfluss erhitzt. Anschließend wurde die Mischung auf RT abgekühlt, in eine ges. NaHCO₃-Lösung (50 mL) gegossen und die wässrige Phase mit Et₂O (3 x 50 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Extrakte wurden über Na₂SO₄ getrocknet, filtriert und unter vermindertem Druck eingeeengt. Das Rohprodukt wurde über Flash-Chromatographie (Kieselgel, 7/1, Hexan/EtOAc) aufgereinigt. Die gewünschte Verbindung wurde als farbloser Feststoff erhalten (1.52 g, 82 %).

¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz;) δ_{H} 1.49 (s, 9H), 3.88 (s, 3H), 6.40 (brs, 1H), 7.01 (s, 1H), 7.88 (brs, 1H).

¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz;) δ_{C} 28.3, 52.0, 81.2, 111.3, 126.5, 134.4, 142.7, 152.5, 159.0.

EI-MS	m/z 241 (M^{+}), 185, 141, 57.
EI-HRMS	m/z 241.0951 (M^{+} , ber. 241.0950 für $C_{11}H_{15}O_5N_1^{+}$).
IR	$\nu_{\max}$ (cm^{-1}) 3332, 3136, 2975, 1731, 1717, 1699.

4-tert-Butoxycarbonylamino-furan-2-carbonsäure, Boc-Fu-OH (103).



Lösung des Esters **88** (374 mg, 1.55 mmol, 1.0 eq) in THF (78 mL)

wurde eine tropfenweise LiOH (186 mg, 7.75, 5.0 eq) gelöst in Wasser (78 mL) zugegeben und die Reaktionsmischung bei RT

gerührt. Nach 1.5 h wurden die flüchtigen Bestandteile unter vermindertem Druck entfernt. Der verbliebene Rückstand wurde mit etwas Wasser (20 mL) verdünnt, mit 10 % HCl auf pH 3 eingestellt und mit EtOAc (3 x 40 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Extrakte wurden mit Na_2SO_4 getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Die freie Säure wurde als gelblicher Feststoff erhalten (350 mg, quant. Ausbeute).

^1H NMR (DMSO- d_6 , 400 MHz) δ_{H} 1.45 (s, 9H), 6.98 (s, 1H), 7.86 (s, 1H), 9.45 (s, 1H), 13.12 (brs, 1H).

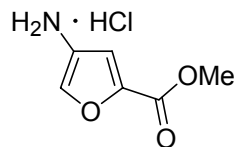
^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 100 MHz) δ_{C} 28.02, 79.5, 111.0, 127.3, 133.2, 142.9, 152.6, 159.2.

EI-MS m/z 227 (M^{+}), 171, 127, 57.

EI-HRMS m/z 227.0796 (M^{+} , berechnet 241.0794 für $C_{10}H_{13}O_5N_1^{+}$).

IR $\nu_{\max}$ (cm^{-1}) 3317, 2980, 2935, 1699, 1557.

4-Amino-furan-2-carbonsäuremethylester, H-Fu-OMe•HCl (102).



Die Boc-geschützte Aminosäure **88** (325 mg, 1.35 mmol)

wurde in 4 N HCl/Dioxan (10 mL) gelöst und die Lösung bei RT für 60 min gerührt. Anschließend wurden die flüchtigen Bestandteile

unter vermindertem Druck entfernt und das Produkt als beiger, pulveriger Feststoff erhalten. Das Produkt war lt. NMR-Daten rein genug zur weiteren Umsetzung.

^1H NMR (DMSO- d_6 , 400 MHz) δ_{H} 3.82 (s, 3H), 7.30 (d, 1H, $J=0.95$), 8.08 (d, 1H, $J=0.88$).

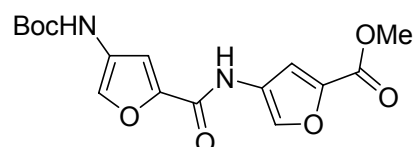
^{13}C NMR (CDCl₃, 100 MHz) δ_{C} 52.2, 114.4, 121.9, 140.0, 143.5, 157.9.

EI-MS m/z 141 (M^{+}), 110, 98, 69, 57.

EI-HRMS m/z 141.0422 (M^{+} , berechnet 141.0426 für C₆H₇O₃N₁⁺).

IR ν_{max} (cm⁻¹) 3337, 3140, 2954, 2851, 2587, 1721, 1631, 1515.

4-[(4-*tert*-Butoxycarbonylamino-furan-2-carbonyl)-amino]-furan-2-carbonsäure-



methylester, Boc-Fu-Fu-OMe (104). Boc-Fu-OH **103**

(283 mg, 1.24 mmol, 1.0 eq) und H-Fu-OMe•HCl **102**

(221 mg, 1.24 mmol, 1.0 eq) wurden in DCM (25 mL)

gelöst. Nacheinander wurden DIPEA (532 μL , 3.11 mmol, 2.5 eq), EDCI (476 mg, 2.49 mmol, 2.0 eq) und HOAt (169 mg, 1.24 mmol, 1.0 eq) jeweils in einer Portion zugegeben. Nach jeder Zugabe wurde das vollständige Auflösen des zugegebenen Reagenzes abgewartet. Die Reaktionslösung wurde für 16 h bei RT gerührt. Nach vollständiger Reaktion wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand in EtOAc (80 mL) aufgenommen. Die organische Phase wurde mit 5 % HCl (3 x 60 mL), mit ges. NaHCO₃-Lösung (3 x 60 mL) und ges. Kochsalzlösung (3 x 60 mL) gewaschen. Sie wurde über Na₂SO₄ getrocknet, filtriert und unter vermindertem Druck eingedampft. Das Rohprodukt wurde über ein kurzes Kieselgelbett (Hexan/EtOAc) aufgereinigt. Das gewünschte Produkt wurde als beiger Feststoff erhalten (296 mg, 68 %).

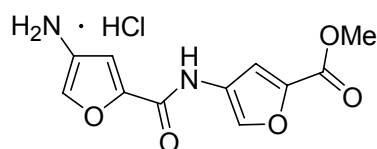
^1H NMR (DMSO-d₆, 400 MHz) δ_{H} 1.45 (s, 9H), 3.80 (s, 3H), 7.11 (s, 1H), 7.31 (d, 1H, $J=0.58$), 7.88 (s, 1H), 8.28 (s, 1H), 9.54 (s, 1H), 10.71 (s, 1H).

^{13}C NMR (DMSO-d₆, 100 MHz) δ_{C} 28.1, 52.0, 79.6, 108.7, 112.2, 126.3, 127.7, 132.0, 135.9, 141.7, 145.0, 152.7, 155.3, 158.3.

EI-MS m/z 350 (M^{+}), 294, 250, 191, 110, 57.

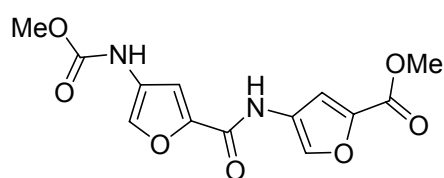
EI-HRMS m/z 350.1112 (M^{+} , berechnet 350.1114 für C₁₆H₁₈O₇N₂⁺).

IR ν_{max} (cm⁻¹) 3343, 3143, 2979, 2931, 1710, 1661, 1579.

4-[(4-Amino-furan-2-carbonyl)-amino]-furan-2-carbonsäuremethylester, H-Fu-

Fu-OMe•HCl (105). Boc-Fu-Fu-OMe **104** (110 mg, 0.31 mmol) wurde in 4 N HCl/Dioxan (8 mL) gelöst und für 60 min bei RT gerührt. Anschließend wurden die flüchtigen

Bestandteile unter vermindertem Druck entfernt und das Produkt als beiger, pulveriger Feststoff erhalten. Dieser war lt. DC rein genug zur weiteren Umsetzung. Auf Grund der Empfindlichkeit dieser Verbindung konnten keine analytischen Daten gewonnen werden.

4-[(4-Methoxycarbonylamino-furan-2-carbonyl)-amino]-furan-2-carbon-

säuremethylester, Meoc-Fu-Fu-OMe (106).

Verbindung **105** (373 mg, 1.3011 mmol, 1.0 eq) wurde in THF (50 mL) suspendiert und DIPEA (490 μ L, 2.8625 mmol, 2.2 eq) zugegeben. Nachdem die nun klare Lösung für 10 min bei RT gerührt wurde, wurde Chlorameisensäuremethylester (111 μ L, 1.4313 mmol, 1.1 eq) in einer Portion zugegeben und die Reaktionsmischung für weitere 45 min bei RT gerührt. Die flüchtigen Bestandteile wurden unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand in EtOAc (100 mL) aufgenommen. Die organische Phase wurde mit H₂O (3 x 50 mL) und ges. Kochsalzlösung (3 x 50 mL) gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde durch Säulenchromatographie (Kieselgel, Hex/EtOAc 2:1) aufgereinigt. Die gewünschte Verbindung wurde als brauner Feststoff erhalten (65 mg, 16 %).

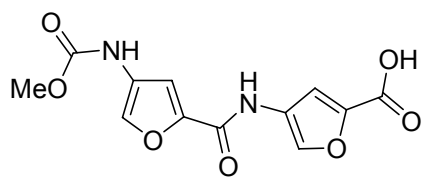
¹H NMR (DMSO-d₆, 400 MHz) δ_{H} 3.67 (s, 3H), 3.81 (s, 3H), 7.15 (s, 1H), 7.32 (d, 1H, $J=0.68$), 7.89 (s, 1H), 8.28 (d, 1H, $J=0.68$), 9.79 (s, 1H), 10.72 (s, 1H).

¹³C NMR (DMSO-d₆, 100 MHz) δ_{C} 52.0, 52.2, 108.8, 112.2, 126.3, 127.5, 132.2, 135.9, 141.8, 145.2, 154.0, 155.3, 158.3.

EI-MS m/z 308 (M^{+}), 277, 249, 168, 136, 59.

EI-HRMS m/z 308.0641 (M^{+} , ber. 308.0645 für C₁₃H₁₂O₇N₂⁺).

IR ν_{max} (cm⁻¹) 3342, 3141, 2923, 1710, 1652, 1584.

4-[(4-Methoxycarbonylamino-furan-2-carbonyl)-amino]-furan-2-carbonsäure,

Meoc-Fu-Fu-OH (107). Der Ester **106** (63 mg, 0.2044 mmol, 1.0 eq) wurde in 11 mL THF gelöst. LiOH (25 mg, 1.0219 mmol, 5.0 eq) gelöst in H₂O (11 mL) wurde tropfenweise zugegeben. Nach 1.5 h Rühren

bei RT wurden die flüchtigen Bestandteile unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand in etwas Wasser (10 mL) aufgenommen. Diese Lösung wurde mit 10 % HCl auf pH 3 eingestellt und danach mit EtOAc (3 x 10 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Na₂SO₄ getrocknet und filtriert. Nach Einengen der Lösung unter vermindertem Druck, konnte die gewünschte Verbindung als amorpher Feststoff erhalten werden (53 mg, 88 %).

¹H NMR (DMSO-d₆, 400 MHz) δ_{H} 3.67 (s, 3H), 7.15 (s, 1H), 7.25 (s, 1H), 7.89 (s, 1H), 8.23 (s, 1H), 9.80 (s, 1H), 10.69 (s, 1H), 13.18 (bs, 1H).

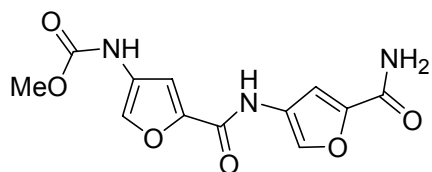
¹³C NMR (DMSO-d₆, 100 MHz) δ_{C} 52.1, 108.6, 111.6, 126.1, 127.4, 132.1, 135.3, 142.9, 145.2, 153.9, 155.2, 159.2.

EI-MS m/z 294 (M⁺), 277, 249, 168, 136.

EI-HRMS m/z 294.0483 (M⁺, ber. 294.0488 für C₁₂H₁₀O₇N₂⁺).

IR ν_{max} (cm⁻¹) 3374, 3293, 2954, 2924, 2853, 1719, 1666, 1580.

Proximicin A (20). Zu der in DCM/DMF (4:1, 5 mL) gelösten freien Säure **107** (35 mg, 0.1190 mmol, 1.0 eq) wurden HOBt (18 mg,



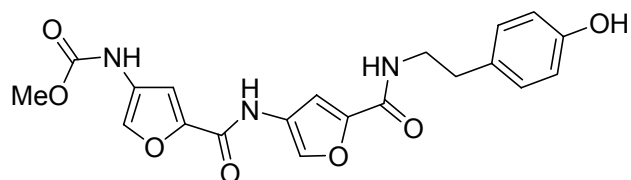
0.1309 mmol, 1.1 eq) und DIC (19 μ L, 0.1249 mmol, 1.05 eq) zugegeben und die Mischung für 75 min bei RT gerührt. Anschließend wurde wässrige NH₄OH

(25 % aq. NH₃, 12 μ L, 0.1546 mmol, 1.3 eq) zugegeben und die Reaktionsmischung für weitere 5 h bei RT gerührt. Der gebildete Niederschlag wurde abfiltriert und das Filtrat mit DCM (10 mL) verdünnt. Es wurde mit einer 5 % NaHCO₃ (3 x 5 mL), 5 % Zitronensäure (2 x 5 mL) und mit Wasser (5 mL) gewaschen und anschließend über Na₂SO₄ getrocknet. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und das Rohprodukt durch präparative RP-HPLC aufgereinigt (13 mg, 37 %).

HPLC: System C/D, linearer Gradient von 15 % auf 50 % D in 35 min

¹H NMR	(DMSO-d ₆ , 500 MHz) δ_{H} 3.68 (s, 3H), 7.17 (s, 1H), 7.18 (s, 1H), 7.42 (s, 1H), 7.85 (s, 1H), 7.89 (s, 1H), 8.12 (s, 1H), 9.80 (s, 1H), 10.69 (s, 1H).
¹³C NMR	(DMSO-d ₆ , 125 MHz) δ_{C} 52.1, 108.1, 108.5, 126.0, 127.3, 132.0, 133.2, 145.2, 146.0, 153.9, 155.2, 159.2.
ESI-MS	m/z 294 ([M+H] ⁺).
FT-ICR-MS	m/z 316.05400 ([M+Na] ⁺ , ber. 316.05401 für C ₁₂ H ₁₁ O ₆ N ₃ Na ⁺).
IR	ν_{max} (cm ⁻¹) 3463, 3420, 3308, 3199, 2956, 2924, 2852, 1734, 1693, 1667, 1583, 1565, 1397, 1364, 1249, 1198.

Proximicin B (21). Die freie Säure **107** (45 mg, 0.1529 mmol, 1.0 eq) und Tyramin



(21 mg, 0.1529 mmol, 1.0 eq) wurden in DCM/DMF (3/1, 6 mL) gelöst. Zu dieser Lösung wurden DIPEA (31 μ L, 0.1835 mmol, 1.2 eq), EDCI (59 mg, 0.3059

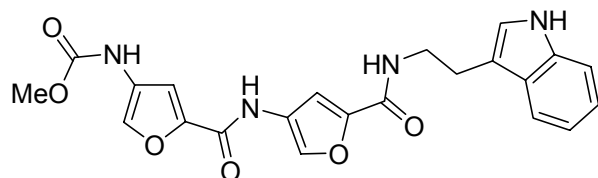
mmol, 2.0 eq) und HOAt (21 mg, 0.1529 mmol, 1.0 eq) nacheinander zugegeben. Die Reaktionsmischung wurde für 24 h bei RT gerührt. Anschließend wurde sie mit EtOAc (20 mL) verdünnt, und mit 5 % HCl (3 x 10 mL), 5 % NaHCO₃ (3 x 10 mL) und mit ges. Kochsalzlösung (3 x 10 mL) gewaschen. Die organische Phase wurde über Na₂SO₄ getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde durch präparative RP-HPLC aufgereinigt (21 mg, 33 %).

HPLC: System C/D, linearer Gradient von 28 % auf 40 % D in 40 min

¹H NMR	(DMSO-d ₆ , 400 MHz) δ_{H} 2.69 (t, 2H, $J=7.3$ Hz), 3.36(q, 2H, $J=6.7$ Hz), 3.68 (s, 3H), 6.67 (d, 1H, $J=8.6$ Hz), 7.00 (d, 1H, $J=8.3$ Hz), 7.16 (s, 1H), 7.17 (s, 1H), 7.89 (s, 1H), 8.13 (s, 1H), 8.47 (t, 1H, $J=5.6$ Hz), 9.16 (s, 1H), 9.80 (s, 1H), 10.68 (s, 1H).
¹³C NMR	(DMSO-d ₆ , 100 MHz) δ_{C} 34.3, 40.5, 52.1, 107.7, 108.5, 115.1, 126.0, 127.4, 129.4, 129.5, 132.0, 133.1, 145.2, 146.1, 153.9, 155.2, 155.6, 157.4.
FAB-MS	m/z 414 ([M+H] ⁺), 391.
FT-ICR-MS	m/z 436.11141 ([M+Na] ⁺ , ber. 436.11152 für C ₂₀ H ₁₉ O ₇ N ₃ Na ⁺).

IR $\nu_{\max}$ (cm⁻¹) 3389, 3308, 3201, 3141, 2949, 2852, 1721, 1706, 1650, 1589, 1553, 1517, 1367, 1266, 1243, 1200.

Proximicin C (22). Die freie Säure **107** (30 mg, 0.1020 mmol, 1.0 eq) wurde in DCM/DMF (1/1, 2 mL) gelöst. Zu dieser Lösung wurden nacheinander EDCI (20 mg, 0.1020 mmol, 1.0 eq) und HOAt (14 mg, 0.1020 mmol, 1.0eq) gegeben. Die



Reaktionsmischung wurde für 5 h bei RT gerührt. Anschließend wurde Tryptamin (17 mg, 0.1020 mmol, 1.0 eq) in einer Portion zugegeben und die Reaktionsmischung für weitere 16 h bei RT gerührt. Sie wurde mit EtOAc (20 mL) verdünnt, und mit 5 % HCl (3 x 10 mL), ges. NaHCO₃ (3 x 10 mL) und ges. Kochsalzlösung (3 x 10 mL) gewaschen. Die organische Phase wurde über Na₂SO₄ getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Nach Lyophilisation wurde die gewünschte Verbindung als leicht grauer Feststoff erhalten (19 mg, 34 %).

¹H NMR (DMSO-d₆, 500 MHz) δ_{H} 2.92 (t, 2H, $J=7.5$ Hz), 3.49 (q, 2H, $J=7.3$ Hz), 3.68 (s, 3H), 6.99 (t, 1H, $J=7.4$ Hz), 7.17 (m, 3H), 7.33 (d, 1H, $J=8.1$ Hz), 7.57 (d, 1H, $J=7.9$ Hz), 7.89 (s, 1H), 8.55 (t, 1H, $J=5.7$ Hz), 9.80 (s, 1H), 10.69 (s, 1H), 10.80 (s, 1H).

¹³C NMR (DMSO-d₆, 100 MHz) δ_{C} 25.2, 39.4, 52.1, 107.7, 108.5, 111.4, 111.7, 118.2, 118.3, 120.9, 122.6, 126.1, 127.2, 127.4, 132.0, 133.0, 136.4, 145.2, 146.2, 154.0, 155.2, 157.5.

EI-MS m/z 436 (M⁺), 295, 143, 130.

CI-HRMS m/z 437.1452 ([M+H]⁺, ber. 437.1456 für C₂₂H₂₁O₆N₄⁺).

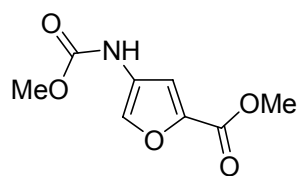
FT-ICR-MS m/z 437.14551 ([M+H]⁺, ber. 437.14556 für C₂₂H₂₁O₆N₄⁺).

IR $\nu_{\max}$ (cm⁻¹) 3286, 3057, 2951, 2854, 1714, 1652, 1558, 1365, 1247, 1199.

2.4 Synthese der potentiellen minor-groove-binder

2.4.1 Synthese der proximicinbasierenden Verbindungen

4-Methoxycarbonylamino-furan-2-carbonsäuremethylester, Meoc-Fu-OMe (108).



Boc-Fu-OMe **88** (1.5 g, 6.2179 mmol, 1.0 eq) wurde gelöst in 4 N HCl/Dioxan (30 mL). Nachdem die Reaktionsmischung für 3 h 50 min bei RT gerührt wurde, wurden die flüchtigen Bestandteile unter vermindertem Druck entfernt. Das Amin-Hydrochlorid wurde als beiger pulveriger Feststoff erhalten und ohne weitere Aufreinigung weiter umgesetzt.

Das trockene Aminosäurehydrochlorid wurde in THF (50 mL) suspendiert und DIPEA (2.661 mL, 15.5447 mmol, 2.5 eq) zugegeben. Nachdem die so erhaltene klare Lösung für 10 min bei RT gerührt wurde, wurde Chlorameisensäuremethylester (577 μ L, 7.4614 mmol, 1.2 eq) zugegeben und die Reaktionsmischung für weitere 2 h bei RT gerührt. Anschließend wurden die flüchtigen Bestandteile unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand in EtOAc (150 mL) aufgenommen. Die organische Phase wurde mit Wasser (1 x 40 mL), 10 % HCl (3 x 30 mL), ges. NaHCO₃-Lösung (2 x 30 mL) und mit ges. Kochsalzlösung (2 x 30 mL) gewaschen. Anschließend wurde sie über Na₂SO₄ getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde durch Säulenchromatographie (Kieselgel, Hexan/EtOAc 3:1) aufgereinigt. Das Produkt wurde als farbloser Feststoff erhalten (1.117 g, 90 %).

¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ_{H} 3.78 (s, 3H), 3.85(s, 3H), 6.53 (s, 1H), 7.06 (s, 1H), 7.90 (s, 1H).

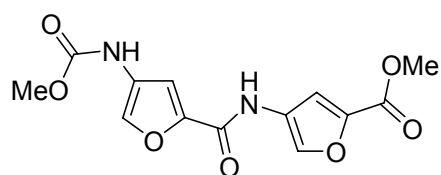
¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz) δ_{C} 52.2, 53.0, 111.5, 126.3, 134.8, 154.0, 159.0.

EI-MS m/z 199 (M⁺), 168, 140.

EI-HRMS m/z 199.0488 (M⁺, ber. 199.0481 für C₈H₉O₅N₁⁺).

IR ν_{max} (cm⁻¹) 3354, 3145, 2950, 1706, 1618, 1572.

4-[(4-Methoxycarbonylamino-furan-2-carbonyl)-amino]-furan-2-carbonsäuremethylester (106), Meoc-Fu-Fu-OMe, ausgehend von



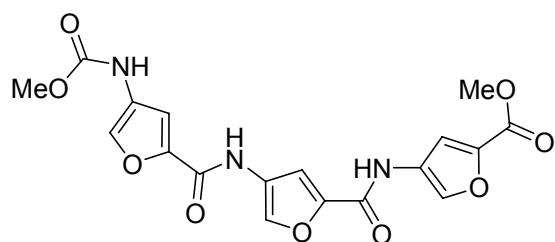
Verbindung 108. Zu einer Lösung des Esters **108** (280 mg, 1.4059 mmol, 1.0 eq) in THF (70 mL) wurde tropfenweise eine 0.1 N LiOH-Lösung (168

mg, 7.0295 mmol, 5.0 eq, gelöst in 70 mL H₂O) zugegeben. Nach vollständigem Zutropfen wurde die Lösung für weitere 1.5 h bei RT gerührt und anschließend wurden die flüchtigen Bestandteile unter vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde mit Wasser (30 mL) verdünnt und mit 10 % HCl auf pH 3 eingestellt. Die wässrige Phase wurde mit EtOAc (3 x 30 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Extrakte wurden über Na₂SO₄ getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Man erhielt die freie Säure als leicht gelblichen Feststoff (289 mg).

Die freie Säure wurde in DCM (30 mL) suspendiert und nacheinander wurden EDCI (269 mg, 1.4059 mmol, 1.0 eq) and HOAt (191 mg, 1.4059 mmol, 1.0 eq) zugegeben. Die Reaktionsmischung wurde für 1 h gerührt und anschließend wurde H-Fu-OMe•HCl (**102**) (1.0 eq) suspendiert in DCM (5 mL) tropfenweise zugegeben. Danach wurde DIPEA (241 µL, 1.4059 mmol, 1.0 eq) zugegeben und die Reaktionsmischung für weitere 16 h bei RT gerührt. Der entstandene Niederschlag wurde abfiltriert (Glasfritte, Pore 4) und mit kalten DCM (2 x 5 mL) gewaschen. Die gewünschte Verbindung wurde als beiger Feststoff erhalten (329 mg, 76 %).

Die analytischen Daten stimmen mit denen der Verbindung **106**, die ausgehend von H-Fu-Fu-OMe•HCl erhalten wurde, überein (Kapitel 2.3).

4-({4-[(4-Methoxycarbonylamino-furan-2-carbonyl)-amino]-furan-2-carbonyl}-amino)-furan-2-carbonsäuremethylester, Meoc-Fu-Fu-Fu-OMe (116).



Zu einer Lösung des Esters **106** (800 mg, 2.5954 mmol, 1.0 eq) in THF (130 mL) wurde tropfenweise eine wässrige Lösung von

LiOH (311 mg, 12.9769 mmol, 5.0 eq, gelöst in 130 mL H₂O) zugegeben. Nach Beendigung des Zutropfens wurde die Lösung für weitere 3 h bei RT gerührt und anschließend wurden die flüchtigen Bestandteile unter vermindertem Druck entfernt.

Der Rückstand wurde mit Wasser (50 mL) verdünnt und mit 10 % HCl auf pH 3 eingestellt. Die wässrige Phase wurde mit EtOAc (3 x 70 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Extrakte wurden über Na₂SO₄ getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Man erhielt die freie Säure als leicht gelblichen Feststoff.

Die freie Säure wurde in DCM (50 mL) suspendiert und nacheinander wurden EDCI (497 mg, 2.5954 mmol, 1.0 eq) and HOAt (354 mg, 2.5954 mmol, 1.0 eq) zugegeben. Die trübe Reaktionsmischung wurde für 6 h gerührt und anschließend wurde H-Fu-OMe•HCl (**102**) (1.0 eq) suspendiert in DCM (15 mL) tropfenweise zugegeben. Danach wurde DIPEA (444 µL, 2.5954 mmol, 1.0 eq) zugegeben und die Reaktionsmischung für weitere 16 h bei RT gerührt. Der entstandene Niederschlag wurde abfiltriert (Glasfritte, Pore 4) und mit kalten DCM (2 x 5 mL) gewaschen. Die gewünschte Verbindung wurde als beiger Feststoff erhalten (992 mg, 92 %)

¹H NMR (DMSO-d₆, 400 MHz) δ_{H} 3.67 (s, 3H), 3.82(s, 3H), 7.32 (s, 1H), 7.44 (s, 1H), 7.53 (s, 1H), 7.90 (s, 1H), 8.26 (s, 1H), 8.32 (s, 1H), 9.94 (s, 1H), 10.97 (s, 1H), 11.04 (s, 1H).

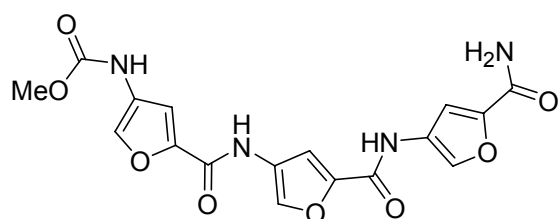
¹³C NMR (DMSO-d₆, 100 MHz) δ_{C} 51.9, 52.1, 108.7, 109.5, 112.3, 126.4, 126.5, 127.4, 132.2, 134.1, 135.9, 141.6, 144.7, 145.1, 154.0, 155.3 (vermutl. 2 x C), 158.3.

EI-MS m/z 417 (M⁺), 385, 358, 326, 277, 217, 136.

EI-HRMS m/z 417.0808 (M⁺, ber. 417.0808 für C₁₈H₁₅O₉N₃⁺).

IR ν_{max} (cm⁻¹) 3323, 2919, 2851, 1724, 1669, 1589, 1553, 1437, 1365, 1252, 1198.

Meoc-Fu-Fu-Fu-NH₂ (109). Zu einer Lösung des Esters **116** (26 mg, 0.0623 mmol,



1.0 eq) in THF (3.2 mL) wurde tropfenweise eine wässrige Lösung von LiOH (7.5 mg, 0.3115 mmol, 5.0 eq, gelöst in 3.2 mL H₂O) zugegeben. Nach Beendigung des Zutropfens wurde die Lösung für weitere 6 h

bei RT gerührt und anschließend wurden die flüchtigen Bestandteile unter vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde mit Wasser (2 mL) verdünnt und

mit 10 % HCl auf pH 3 eingestellt. Die wässrige Phase wurde mit EtOAc (3 x 10 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Extrakte wurden über Na₂SO₄ getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Man erhielt die freie Säure als leicht gelblichen Feststoff (25 mg).

Die freie Säure wurde in DMF (2 mL) gelöst und nacheinander wurden EDCI (12 mg, 0.0620 mmol, 1.0 eq) and HOAt (9 mg, 0.0620 mmol, 1.0 eq) zugegeben. Die Reaktionsmischung wurde für 5 h bei RT gerührt und anschließend wurde NH₃ (0.5 M in Dioxan, 620 µL, 5.0 eq) zugetropft und die Reaktionsmischung für weitere 16 h bei RT gerührt. Die Reaktionsmischung wurde mit EtOAc (10 mL) verdünnt und mit 10 % Na₂CO₃ (3 x 5 mL) und mit Wasser (3 x 5 mL) gewaschen. Die organische Phase wurde unter vermindertem Druck bis zur völligen Trockenheit eingedampft. Das Rohprodukt wurde in DMF (8 mL) gelöst und mit 2-Chlorotriptyl-Harz (60 mg, 1.7 mmol/g) und DIPEA (44 µL) für 2.5 h bei RT geschüttelt. Anschließend wurde das Harz abfiltriert und mit DMF gewaschen (3 x 5 mL). Das Filtrat wurde unter vermindertem Druck eingeeengt und anschließend lyophilisiert (11.5 mg). Das Lyophilisat wurde in Wasser suspendiert und mehrmals mit kleinen Portionen Wasser (3 x 2 mL) gewaschen und erneut lyophilisiert, um die gewünschte Verbindung als Feststoff zu erhalten (8.0 mg, 32 %).

¹H NMR (DMSO-d₆, 400 MHz) δ_H 3.68 (s, 3H), 7.19 (s, 1H), 7.20 (s, 1H), 7.37 (s, 1H), 7.44 (s, 1H), 7.86 (s, 1H), 7.91 (s, 1H), 8.15 (s, 1H), 8.25 (s, 1H), 9.82 (s, 1H), 10.78 (s, 1H).

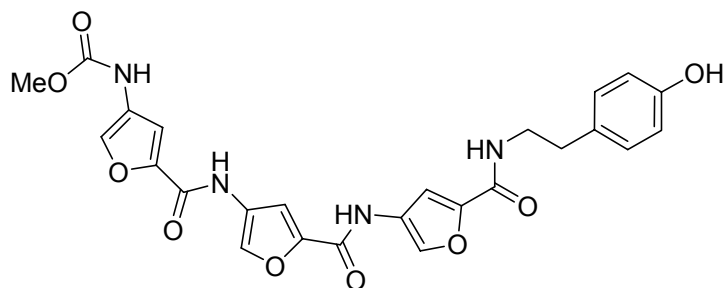
¹³C NMR (DMSO-d₆, 100 MHz) δ_C 52.1, 108.2, 108.6, 109.2, 126.1, 126.4, 127.4, 133.1, 133.3, 133.9, 145.0, 145.2, 146.1, 154.0, 155.2, 155.2, 159.2.

ESI-MS *m/z* 403.1 ([M+H]⁺).

FT-ICR-MS *m/z* 403.08849 ([M+H]⁺, ber. 403.08844 für C₁₇H₁₅O₈N₄⁺).

IR ν_{max} (cm⁻¹) 3419, 3317, 3210, 3143, 2921, 2851, 1730, 1691, 1663, 1586, 1554, 1366, 1244, 1195.

Meoc-Fu-Fu-Tyra (110). Der Ester **116** (57 mg, 0.1366 mmol, 1.0 eq) wurde in



THF (6.8 mL) gelöst und LiOH (16 mg, 0.6829 mmol, 5.0 eq) gelöst in H₂O (6.8 mL) tropfenweise zugegeben. Nach 6 h Rühren bei RT wurde die Suspension unter vermindertem

Druck eingeeengt und der Rückstand mit Wasser (10 mL) verdünnt. Die wässrige Phase wurde mit 10 % HCl angesäuert (pH 3) und mit EtOAc (3 x 15 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit Na₂SO₄ getrocknet, filtriert und unter vermindertem Druck eingedampft (50 mg).

Die freie Säure wurde in DMF (0.5 mL) und DCM (2 mL) suspendiert und EDCI (24 mg, 0.1240 mmol, 1.0 eq) und HOAt (17 mg, 0.1240 mmol) wurden nacheinander zugegeben. Die Reaktionsmischung wurde 5 h bei RT gerührt bis eine klare Lösung entstand. Anschließend wurde Tyramin (17 mg, 0.1240 mmol, 1.0 eq) als Feststoff in einer Portion zugegeben und die Reaktionsmischung für weitere 16 h bei RT gerührt. Nach Beendigung der Reaktion wurde die Reaktionsmischung mit EtOAc (15 mL) verdünnt und die organische Phase mit ges. NaHCO₃-Lösung (1 x 10 mL) gewaschen. Der dabei entstehende Niederschlag an der Phasengrenze wurde abfiltriert (Glasfritte, Pore 4), mit Wasser (10 mL) gewaschen und getrocknet (56 mg). Die organische Phase des Filtrats wurde mit anschließend nochmals mit ges. NaHCO₃-Lösung (2 x 10 mL) gewaschen, mit Na₂SO₄ getrocknet, filtriert und unter vermindertem Druck eingeeengt (14 mg). Es wurden so insgesamt 60 mg Rohprodukt erhalten. Ein Teil des Rohproduktes (20 mg) wurde in DMF (3 mL) gelöst und für 2.5 h bei RT mit 2-Cl-Trt-Harz (44 mg, 1.7 mmol/g) in der Gegenwart von DIPEA (26 µL) geschüttelt. Das Harz wurde abfiltriert, gewaschen (DMF, 3 x 5 mL) und lyophilisiert (20 mg). Das Lyophilisat wurde mit Wasser (3 x 2 mL) gewaschen und erneut lyophilisiert, um die gewünschte Verbindung zu erhalten (12 mg, 50 %).

¹H NMR (DMSO-d₆, 400 MHz) δ_H 2.69 (t, 2H, *J*=7.2 Hz), 3.36 (m, 2H), 3.68 (s, 3H), 6.67 (d, 2H, *J*=8.3 Hz), 7.00 (d, 2H, *J*=8.4 Hz), 7.18 (m, 2H), 7.37 (s, 1H), 7.91 (s, 1H), 8.15 (s, 1H), 8.26 (s, 1H), 8.49 (t, 1H, *J*=5.7 Hz), 9.19 (s, 1H), 9.83 (s, 1H), 10.78 (s, 2H).

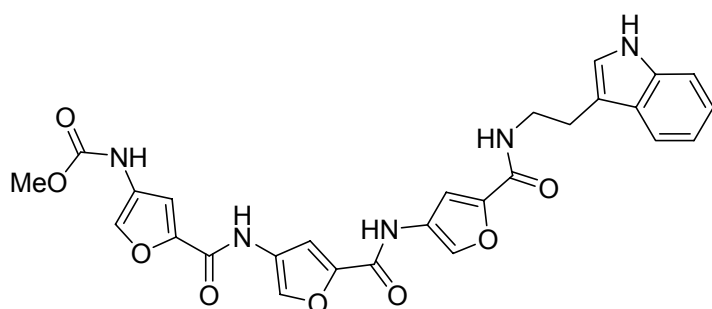
^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 100 MHz) δ_{C} 34.3, 40.5, 52.1, 107.7, 108.6, 109.2, 115.1, 126.0, 126.4, 127.4, 129.4, 129.5, 132.1, 133.1, 133.9, 145.0, 145.1, 146.1, 154.0, 155.2, 155.2, 155.6, 157.4.

FAB-MS m/z 523 ($[\text{M}+\text{H}]^+$), 391, 246.

FT-ICR-MS m/z 523.14568 ($[\text{M}+\text{H}]^+$, ber. 523.14595 für $\text{C}_{25}\text{H}_{23}\text{O}_9\text{N}_4^+$).

IR ν_{max} (cm^{-1}) 3318, 3206, 3143, 2952, 1721, 1661, 1587, 1551, 1366, 1241, 1196.

Meoc-Fu-Fu-Fu-Trpa (111). Der Ester **116** (57 mg, 0.1366 mmol, 1.0 eq) wurde in



THF (6.8 mL) gelöst und LiOH (16 mg, 0.6829 mmol, 5.0 eq) gelöst in H_2O (6.8 mL) tropfenweise zugegeben. Nach 6 h Rühren bei RT wurde die Suspension unter vermindertem

Druck eingeeengt und der Rückstand mit Wasser (10 mL) verdünnt. Die wässrige Phase wurde mit 10 % HCl angesäuert (pH 3) und mit EtOAc (3 x 15 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit Na_2SO_4 getrocknet, filtriert und unter vermindertem Druck eingedampft (50 mg).

Die freie Säure wurde in DMF (0.5 mL) und DCM (2 mL) suspendiert und EDCI (24 mg, 0.1240 mmol, 1.0 eq) und HOAt (17 mg, 0.1240 mmol) wurden nacheinander zugegeben. Die Reaktionsmischung wurde 5 h bei RT gerührt bis eine klare Lösung entstand. Anschließend wurde Tryptamin (20 mg, 0.1240 mmol, 1.0 eq) als Feststoff in einer Portion zugegeben und die Reaktionsmischung für weitere 16 h bei RT gerührt. Nach Beendigung der Reaktion wurde die Reaktionsmischung mit EtOAc (15 mL) verdünnt und die organische Phase mit ges. NaHCO_3 -Lösung (1 x 10 mL) gewaschen. Der dabei entstehende Niederschlag an der Phasengrenze wurde abfiltriert (Glasfritte, Pore 4), mit Wasser (10 mL) gewaschen und getrocknet (61 mg). Die organische Phase des Filtrats wurde mit anschließend nochmals mit ges. NaHCO_3 -Lösung (2 x 10 mL) gewaschen, mit Na_2SO_4 getrocknet, filtriert und unter vermindertem Druck eingeeengt (7 mg). Es wurden so insgesamt 68 mg Rohprodukt erhalten. Ein Teil des Rohproduktes (32 mg) wurde in DMF (3 mL) gelöst und für 2.5 h bei RT mit 2-Cl-Trt-Harz (44 mg, 1.7 mmol/g) in der Gegenwart von DIPEA (26 μL)

geschüttelt. Das Harz wurde abfiltriert, gewaschen (DMF, 3 x 5 mL) und lyophilisiert. Das Lyophilisat wurde mit Wasser (3 x 2 mL) gewaschen und erneut lyophilisiert, um die gewünschte Verbindung zu erhalten (20 mg, 57 %).

^1H NMR (DMSO- d_6 , 400 MHz) δ_{H} 2.92 (t, 2H, $J=7.5$ Hz), 3.49 (m, 2H), 3.68 (s, 3H), 6.98 (t, 1H, $J=7.3$ Hz), 7.06 (t, 1H, $J=7.5$ Hz), 7.18 (m, 3H), 7.33 (d, 1H, $J=8.1$ Hz), 7.38 (s, 1H), 7.57 (d, 1H, $J=7.7$ Hz), 7.91 (s, 1H), 8.17 (s, 1H), 8.26 (s, 1H), 8.58 (t, 1H, $J=5.8$ Hz), 9.83 (s, 1H), 10.80 (m, 3H).

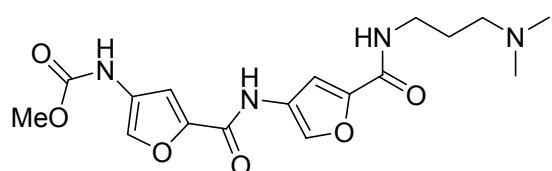
^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 100 MHz) δ_{C} 25.2, 39.5, 52.1, 107.8, 108.6, 109.2, 111.4, 111.7, 118.2, 118.3, 121.0, 122.6, 126.1, 126.4, 127.3, 127.4, 132.1, 133.1, 133.9, 136.3, 145.0, 145.2, 146.2, 154.0, 155.2, 155.3, 157.5.

ESI-MS m/z 546.1 ($[\text{M}+\text{H}]^+$).

FT-ICR-MS m/z 546.16242 ($[\text{M}+\text{H}]^+$, ber. 546.16194 für $\text{C}_{27}\text{H}_{24}\text{O}_8\text{N}_5^+$).

IR ν_{max} (cm^{-1}) 3319, 3209, 2953, 2924, 2851, 1718, 1660, 1567, 1549, 1366, 1241, 1196.

Meoc-Fu-Fu-Dp (112). Verbindung **106**, Meoc-Fu-Fu-OMe, (100 mg, 0.3244 mmol,



1.0 eq) wurde in THF (16 mL) gelöst und LiOH (39 mg, 1.6221 mmol, 5.0 eq) gelöst in H_2O (16 mL) tropfenweise zugegeben. Nach

vollständiger Zugabe wurde die Reaktion für weitere 3 h bei RT gerührt, bevor die flüchtigen Bestandteile unter vermindertem Druck entfernt wurden. Der Rückstand wurde mit Wasser (20 mL) verdünnt und mit 10 % HCl angesäuert (pH 3). Anschließend wurde die wässrige Phase mit EtOAc (3 x 40 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit Na_2SO_4 getrocknet, filtriert und unter vermindertem Druck eingedampft (92 mg).

Die freie Säure (85 mg) wurde in DMF/DCM (1/8, 9 mL) gelöst und EDCI (56 mg, 0.2889 mmol, 1.0 eq) and HOAt (40 mg, 0.2289 mmol, 1.0 eq) nacheinander zugegeben. Die Reaktionsmischung wurde für 3 h bei RT gerührt. Anschließend wurde 3-Dimethylamino-1-propylamin (44 μL , 0.3467 mmol, 1.2 eq) zugetropft und die Mischung für 16 h bei RT gerührt. Nach Beendigung der Reaktion wurde sie mit EtOAc (30 mL) verdünnt und mit ges. NaHCO_3 -Lösung (3 x 15 mL) gewaschen. Die organische Phase wurde mit Na_2SO_4 getrocknet, filtriert und unter vermindertem

Druck eingengt (58 mg). Ein Teil des Rohproduktes (10 mg) wurde durch präparative RP- HPLC aufreinigt (6.2 mg, 32 %).

HPLC: System C/D, linearer Gradient von 10 % auf 40 % D in 20 min

^1H NMR (DMSO- d_6 , 500 MHz) δ_{H} 1.67 (m, 2H), 2.27 (s, 6H), 2.42 (bs, 2H), 3.23 (m, 2H, $J=6.2$ Hz), 3.68 (s, 3H), 7.16 (s, 1H), 7.17 (s, 1H), 7.89 (s, 1H), 8.14 (s, 1H), 8.25 (bs, 1H), 8.54 (t, 1H, $J=5.5$ Hz), 9.83 (s, 1H), 10.72 (s, 1H).

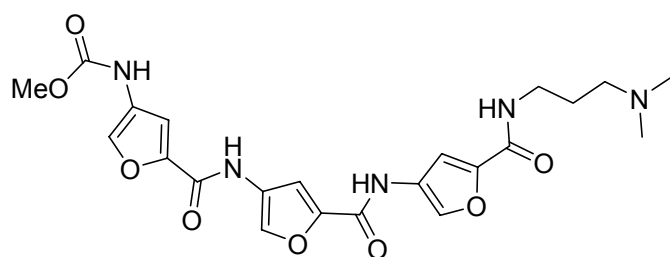
^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 125 MHz) δ_{C} 26.6, 36.9, 44.6, 52.1, 56.5, 107.7, 108.5, 126.0, 127.4, 133.0, 145.2, 146.1, 153.9, 155.2, 157.5.

EI-MS m/z 378 (M^+), 269, 168, 58.

EI-HRMS m/z 378.1532 (M^+ , ber. 378.1539 für $\text{C}_{17}\text{H}_{22}\text{O}_6\text{N}_4^+$).

IR ν_{max} (cm^{-1}) 3261, 3041, 2955, 2781, 2703, 1725, 1652, 1559, 1364, 1245, 1200.

Meoc-Fu-Fu-Fu-Dp (113). Der Ester **116** (29 mg, 0.0695 mmol, 1.0 eq) wurde in



THF (3.5 mL) gelöst und LiOH (8.3 mg, 0.3474 mmol, 5.0 eq) gelöst in H_2O (3.5 mL) tropfenweise zugegeben. Nach 6 h Rühren bei RT wurde die Suspension unter

vermindertem Druck eingengt und der Rückstand mit Wasser (5 mL) verdünnt. Die wässrige Phase wurde mit 10 % HCl angesäuert (pH 3) und mit EtOAc (3 x 10 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit Na_2SO_4 getrocknet, filtriert und unter vermindertem Druck eingedampft (27 mg).

Die freie Säure wurde in DMF (1 mL) gelöst und EDCI (13 mg, 0.0669 mmol, 1.0 eq) und HOAt (9 mg, 0.0669 mmol, 1.0 eq) wurden nacheinander zugegeben. Die Reaktionsmischung wurde 2 h 45 min bei RT gerührt bis eine klare Lösung entstand. Anschließend wurde 3-Dimethylamino-1-propylamin (9.2 μL , 0.0736 mmol, 1.1 eq) gelöst in DMF (83 μL) zugegeben und die Reaktionsmischung für weitere 16 h bei RT gerührt. Nach Beendigung wurde sie unter vermindertem Druck zur völligen Trockenheit eingedampft und der Rückstand in MeOH (2 mL) suspendiert. Der entstandene Niederschlag wurde abgetrennt, mit MeOH (1 mL) und EtOAc (2 mL)

gewaschen und getrocknet (25 mg). Er enthielt immer noch kleine Mengen HOAt. Ein Teil des Rohproduktes (16 mg) wurde in DMF (1 mL) gelöst, auf eine SPE-Kartusche beladen mit PL-TBD (Polymer Laboratories, 0.6 mmol/SPE-Kartusche) aufgetragen und mit DMF (20 mL) eluiert. Die vereinigten Eluate wurden unter vermindertem Druck eingeeengt und anschließend lyophilisiert. Die gewünschte Verbindung wurde als leicht gelber Feststoff erhalten (11 mg, 53 %).

^1H NMR (DMSO- d_6 , 400 MHz) δ_{H} 1.62 (m, 2H), 2.13 (s, 6H), 2.24 (t, 2H, $J=6.9$ Hz), 3.22 (q, 2H, $J=6.5$ Hz), 3.69 (s, 3H), 7.17 (s, 1H), 7.19 (s, 1H), 7.37 (s, 1H), 7.90 (s, 1H), 8.15 (s, 1H), 8.25 (s, 1H), 8.50 (t, 1H, $J=5.8$ Hz), 9.81 (s, 1H), 10.76 (s, 1H), 10.77 (s, 1H).

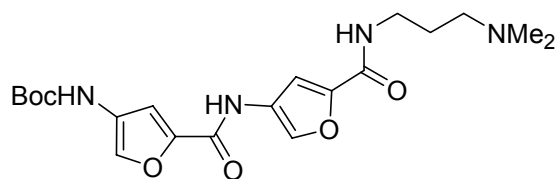
^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 125 MHz) δ_{C} 27.0, 37.1, 45.1, 52.1, 56.9, 107.7, 108.6, 109.2, 126.0, 126.4, 127.4, 132.1, 133.1, 133.9, 145.0, 145.1, 146.1, 153.9, 155.2, 155.2, 157.4.

ESI-MS m/z 488.1 ($[\text{M}+\text{H}]^+$).

FT-ICR-MS m/z 488.17772 ($[\text{M}+\text{H}]^+$, ber. 488.17759 für $\text{C}_{22}\text{H}_{26}\text{O}_8\text{N}_5^+$).

IR ν_{max} (cm^{-1}) 3317, 3202, 3142, 2957, 2929, 2852, 2672, 1721, 1663, 1583, 1552, 1365, 1241, 1195.

Boc-Fu-Fu-Dp (117). Zu einer Lösung des Esters **104** (100 mg, 0.2855 mmol, 1.0 eq) in THF (14 mL) wurde tropfenweise eine wässrige Lösung von LiOH (34 mg, 1.4273 mmol, 5.0 eq, gelöst in 14 mL H_2O) zugegeben. Nach Beendigung des



Zutropfens wurde die Lösung für weitere 2 h bei RT gerührt und anschließend wurden die flüchtigen Bestandteile unter vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde mit Wasser (10 mL) verdünnt und mit 10 % HCl auf pH 3 eingestellt. Die wässrige Phase wurde mit EtOAc (3 x 20 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Extrakte wurden über Na_2SO_4 getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Man erhielt die freie Säure als leicht gelblichen Feststoff (96 mg, quant.).

Ein Teil der freien Säure (70 mg, 0.2081 mmol, 1.0 eq) wurde in DMF (5 mL) gelöst und EDCI (80 mg, 0.4163 mmol, 2.0 eq) und HOAt (28 mg, 0.2081 mmol, 1.0 eq)

nacheinander zugegeben. Die resultierende Lösung wurde für 2h bei RT gerührt, bevor 3-Dimethylamino-1-propylamin (31 μ L, 0.2498 mmol, 1.2 eq) zugegeben und für weitere 16 h bei RT gerührt wurde. Die Reaktionsmischung wurde in EtOAc (30 mL) gegossen und mit ges. NaHCO₃-Lösung (3 x 30 mL) gewaschen. Anschließend wurde die organische Phase mit Na₂SO₄ getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Der erhaltene leicht gelbliche Feststoff wurde in wenig Et₂O suspendiert und die überstehende Lösung abpipettiert (2 x). Die gewünschte Verbindung wurde als farbloser Feststoff erhalten (65 mg, 74 %)

¹H NMR (DMSO-d₆, 400 MHz) δ_{H} 1.47 (s, 9H), 1.61 (p, 2H), 2.12 (s, 6H), 2.22 (t, 2H, $J=7.0$ Hz), 3.22 (q, 2H, $J=6.3$ Hz), 7.13 (s, 1H), 7.14 (s, 1H), 7.88 (s, 1H), 8.13 (s, 1H), 8.50 (t, 1H, $J=5.7$ Hz), 9.55 (s, 1H), 10.68 (s, 1H).

¹³C NMR (DMSO-d₆, 125 MHz) δ_{C} 27.0, 28.0, 37.1, 45.2, 56.9, 79.5, 107.6, 108.5, 126.0, 127.5, 131.8, 133.0, 145.0, 146.1, 152.6, 155.2, 157.4.

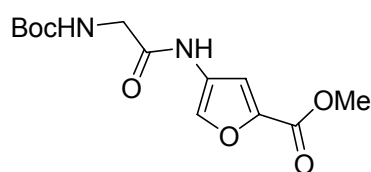
EI-MS m/z 420 (M⁺), 320, 218.

EI-HRMS m/z 420.20129 (M⁺, ber. 420.20088 für C₂₀H₂₈O₆N₄⁺).

IR ν_{max} (cm⁻¹) 3321, 2976, 2941, 2863, 2817, 2781, 1701, 1651, 1558, 1457, 1366, 1304, 1247, 1197, 1161, 1052.

2.4.2 Synthese des Furan-Netropsin-Derivates

4-(2-*tert*-Butoxycarbonylamino-acetylamino)-furan-2-carbonsäuremethylester,



Boc-Gly-Fu-OMe (123). Verbindung **88**, Boc-Fu-OMe, (500 mg, 2.07 mmol) wurde in 4 N HCl in Dioxan (10 mL) gelöst. Nach 3 h 20 min Rühren bei RT wurden die flüchtigen Bestandteile unter vermindertem Druck entfernt

und ein beiges Pulver erhalten.

Boc-Gly-OH (363 mg, 2.07 mmol, 1.0 eq) wurde in DCM (40 mL) gelöst und nacheinander wurden HOAt (282 mg, 2.07 mmol, 1.0 eq) and EDCI (397 mg, 2.07 mmol, 1.0 eq) zugegeben und die Reaktionsmischung für 3 h bei RT gerührt. Das Aminosäurehydrochlorid aus dem ersten Reaktionsschritt (2.07 mmol) wurde in DCM (15 mL) suspendiert und tropfenweise zugegeben. Nach der Zugabe von DIPEA (355 μ L, 2.07 mmol, 1.0 eq) wurde die nun klare Reaktionsmischung für 19 h bei RT gerührt. Anschließend wurde DCM unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand in EtOAc (60 mL) aufgenommen. Die organische Phase wurde mit 10 % HCl (3 x 20 mL), ges. NaHCO₃-Lösung (3 x 20 mL) und mit ges. Kochsalzlösung (1 x 30 mL) gewaschen. Sie wurde mit Na₂SO₄ getrocknet, filtriert und unter vermindertem Druck eingeeengt. Das Rohprodukt wurde durch Säulenchromatographie (Kieselgel, Hexan/EtOAc 2:1) aufgereinigt und 387 mg eines leicht gelblichen Feststoffes erhalten. Dieser wurde mit Et₂O (4 x 3 mL) gewaschen, um die gewünschte Verbindung als farblosen Feststoff zu erhalten (364 mg, 59 %).

¹H NMR (DMSO-d₆, 400 MHz) δ_{H} 1.39 (s, 9H), 3.69 (d, 2H, $J=6.2$ Hz), 3.80 (s, 3H), 7.14 (t, 1H, $J=6.2$ Hz), 7.19 (s, 1H), 8.20 (s, 1H), 10.21 (s, 1H).

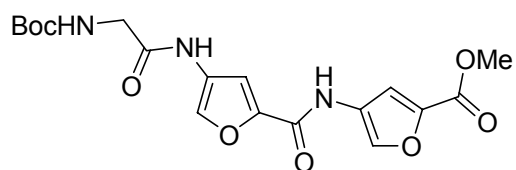
¹³C NMR (DMSO-d₆, 100 MHz) δ_{C} 28.2, 43.4, 51.9, 78.2, 111.7, 118.2, 126.4, 141.6, 155.9, 158.2, 167.9.

EI-MS m/z 298 (M^{+}), 242, 141, 84, 66, 57.

EI-HRMS m/z 298.1165 (M^{+} , ber. 298.1165 für C₁₃H₁₈O₆N₂⁺).

IR ν_{max} (cm⁻¹) 3311, 2978, 2933, 1718, 1684, 1562, 1517, 1367, 1325, 1202, 1166 1102.

Boc-Gly-Fu-Fu-OMe (124). Verbindung **123** (320 mg, 1.07 mmol, 1.0 eq) wurde in



THF (54 mL) gelöst und eine Lösung von LiOH (128 mg, 5.36 mmol, 5.0 eq) in H₂O (54 mL) wurde langsam zugetropft. Anschließend wurde

für 220 min bei RT gerührt und dann die flüchtigen Bestandteile unter vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde mit Wasser (20 mL) verdünnt und mit einer 10 % HCl-Lösung angesäuert (pH 4). Die wässrige Phase wurde mit EtOAc (3 x 30 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Extrakte wurden mit Na₂SO₄ getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt. Die freie Säure wurde als farbloser Feststoff erhalten (302 mg).

Die Säure wurde in DCM (20 mL) suspendiert, nacheinander mit HOAt (145 mg, 1.06 mmol, 1.0 eq) und EDCI (204 mg, 1.06 mmol, 1.0 eq) versetzt und die Reaktionsmischung für 3 h bei RT gerührt bis eine klare Lösung entstand. Verbindung (**102**), H-Fu-OMe·HCl, (1.0 eq) wurde als Suspension in DCM (10 mL) langsam zugetropft. Nach der Zugabe von DIPEA (182 µL, 1.06 mmol, 1.0 eq) resultierte eine klare Lösung, die für 13 h bei RT gerührt wurde. DCM wurde unter vermindertem Druck entfernt und die verbliebene Lösung mit EtOAc (60 mL) verdünnt. Die Lösung wurde mit 10 % HCl (3 x 20 mL), mit ges. NaHCO₃-Lösung (3 x 20 mL) und mit ges. Kochsalzlösung (1 x 20 mL) gewaschen, mit Na₂SO₄ getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Man erhielt ein Öl, das nach Lyophilisation einen farblosen Feststoff ergab (184 mg, 43 %).

¹H NMR (DMSO-d₆, 400 MHz) δ_H 1.40 (s, 9H), 3.71 (d, 2H, *J*=6.0 Hz), 3.82 (s, 3H), 7.14 (t, 1H, *J*=6.0 Hz), 7.23 (s, 1H), 7.33 (d, 1H, *J*=0.7 Hz), 8.17 (s, 1H), 8.30 (d, 1H, *J*=0.6 Hz), 10.25 (s, 1H), 10.77 (s, 1H).

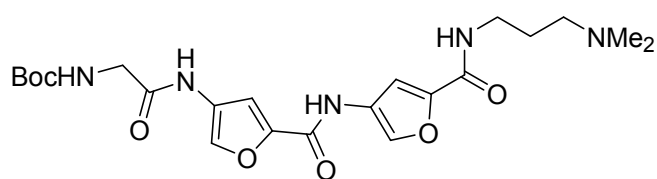
¹³C NMR (DMSO-d₆, 100 MHz) δ_C 28.2, 43.4, 52.0, 78.2, 108.9, 112.2, 126.3, 126.6, 133.7, 135.9, 141.7, 144.8, 155.3, 156.0, 158.2, 167.9.

EI-MS *m/z* 407 (M⁺), 351, 316, 250.

EI-HRMS *m/z* 407.1326 (M⁺, ber. 407.1329 für C₁₈H₂₁O₈N₃⁺).

IR ν_{max} (cm⁻¹) 3337, 3141, 2977, 2929, 1712, 1683, 1577, 1526, 1384, 1367, 1249, 1200, 1169, 1114.

Boc-Gly-Fu-Fu-Dp (125). Der Ester **124** (175 mg, 0.4296 mmol) wurde in THF (21



mL) gelöst und eine Lösung von LiOH (51 mg, 2.1462 mmol, 5.0 eq) in H₂O (21 mL) wurde langsam zugetropft.

Anschließend wurde für 3 h bei RT

gerührt und dann die flüchtigen Bestandteile unter vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde mit Wasser (20 mL) verdünnt und mit einer 10 % HCl angesäuert (pH 4). Die wässrige Phase wurde mit EtOAc (3 x 30 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Extrakte wurden mit Na₂SO₄ getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt. Die freie Säure wurde als farbloser Feststoff erhalten (169 mg).

Die freie Säure wurde in DCM (10 mL) suspendiert und EDCI (83 mg, 0.4296 mmol, 1.0 eq) und HOAt (59 mg, 0.4296 mmol, 1.0 eq) wurden nacheinander zugegeben. Die Reaktionsmischung wurde 3 h bei RT gerührt bis eine klare Lösung entstand. Anschließend wurde 3-Dimethylamino-1-propylamin (54 µL, 0.4296 mmol, 1.0 eq) gelöst in DMF (220 µL) zugegeben und die Reaktionsmischung für weitere 24 h bei RT gerührt. Der entstandene Niederschlag wurde abfiltriert (Glasfritte, Pore 4) und mit DCM gewaschen (3 x 10 mL). Das so erhaltene Rohprodukt wurde durch Säulenchromatographie (Kieselgel, DCM/MeOH/25 % NH₃, 7/1/0.1) aufgereinigt und das Produkt als farbloser Feststoff erhalten (124 mg, 58 %).

¹H NMR (DMSO-d₆, 400 MHz) δ_H 1.40 (s, 9H), 1.61 (m, 2H), 2.13 (s, 6H), 2.23 (t, 2H, *J*=7.2 Hz), 3.22 (q, 2H, *J*=6.6 Hz), 3.71 (d, 2H, *J*=6.0 Hz), 7.14 (t, 1H, *J*=5.9 Hz), 7.15 (d, 1H, *J*=0.8 Hz), 7.23 (s, 1H), 8.14 (d, 1H, *J*=0.6 Hz), 8.16 (s, 1H), 8.51 (t, 1H, *J*=5.7 Hz), 10.25 (s, 1H), 10.72 (s, 1H).

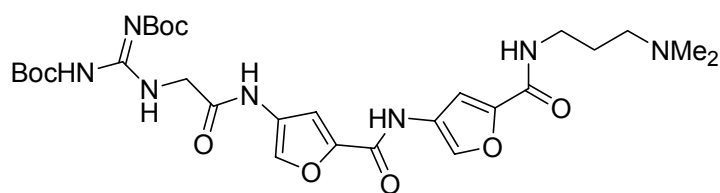
¹³C NMR (DMSO-d₆, 100 MHz) δ_C 27.0, 28.2, 37.1, 43.4, 45.2, 56.9, 78.2, 107.7, 108.7, 126.0, 126.6, 133.0, 144.9, 146.1, 155.2, 156.0, 157.4, 167.9.

EI-MS *m/z* 477 (M⁺), 430, 404, 377, 190.2.

EI-HRMS *m/z* 477.2222 (M⁺, ber. 477.2224 für C₂₂H₃₁O₇N₅⁺).

IR ν_{max} (cm⁻¹) 3282, 2977, 2943, 2867, 2780, 1683, 1651, 1559, 1522, 1367, 1303, 1197, 1169.

Boc₂-Gua-Ac-Fu-Fu-Dp (126). Das Boc-geschütztes Amin **125** (30 mg, 0.0628 mmol)



wurde in 4 N HCl in Dioxan (5 mL) gelöst, für 40 min bei RT gerührt und anschließend die flüchtigen Bestandteile unter

vermindertem Druck entfernt.

Das Hydrochlorid wurde in DMF/DCM (2/5, 7 mL) gelöst. DIPEA (22 μ L, 0.1257 mmol, 2.0 eq), das Goodmans Reagenz^[136] (**128**) (27 mg, 0.06911, 1.1 eq) und TEA (10 μ L, 0.06911 mmol, 1.1 eq) wurden nacheinander zugegeben und die Mischung bei RT gerührt. Nach 21 h wurde nochmals etwas Goodmans Reagenz (5 mg, 0.0126 mmol, 0.2 eq) und TEA (1.7 μ L, 0.0126 mmol, 0.2 eq) zugegeben und die Mischung für weitere 5 h bei RT gerührt. Die Mischung wurde mit DCM (10 mL) verdünnt und mit ges. NaHCO₃-Lösung (3 x 5 mL) gewaschen. Die vereinigten wässrigen Phasen wurden mit DCM (3 x 5 mL) nochmals extrahiert und alle vereinigten organischen Phasen wurden über NaSO₄ getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Nach Säulenchromatographie (Kieselgel, DCM/MeOH/25 % NH₃, 7/1/0.05) konnte das Produkt als farbloser Feststoff isoliert werden (29 mg, 74 %).

¹H NMR (DMSO-d₆, 400 MHz) δ_{H} 1.38 (s, 9H), 1.50 (s, 9H), 1.64 (m, 2H), 2.19 (s, 6H), 2.31 (t, 2H, $J=7.1$ Hz), 3.22 (q, 2H, $J=6.3$ Hz), 4.16 (d, 2H, $J=5.1$ Hz), 7.16 (s, 1H), 7.22 (s, 1H), 8.15 (s, 1H), 8.19 (s, 1H), 8.51 (t, 1H, $J=6.0$ Hz), 8.76 (t, 1H, $J=5.2$ Hz), 10.40 (s, 1H), 10.72 (s, 1H), 11.48 (s, 1H).

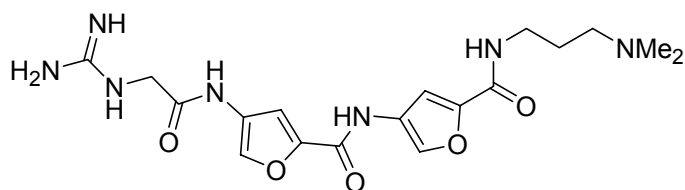
¹³C NMR (DMSO-d₆, 100 MHz) δ_{C} 26.8, 27.6, 27.9, 37.0, 43.6, 44.9, 56.7, 78.4, 83.1, 107.7, 108.5, 126.0, 126.3, 133.0, 133.7, 145.1, 146.1, 151.9, 155.1, 155.4, 157.5, 162.9, 166.3.

FAB-MS m/z 620.3 ([M+H]⁺), 520.3, 420.2, 391.3, 246.1.

FT-ICR-MS m/z 620.30397 ([M+H]⁺, ber. 620.30385 für C₂₈H₄₂O₉N₇⁺).

IR ν_{max} (cm⁻¹) 3287, 2978, 2933, 2871, 1727, 1646, 1621, 1559, 1396, 1369, 1306, 1148, 1105, 1060.

Gua-Ac-Fu-Fu-Dp (114). Verbindung **126** (7 mg, 0.01130 mmol) wurde in DCM (1.88 mL) gelöst. Zu der gerührten Lösung wurde eine Mischung aus TFA/DCM (1/2, 11.3 mL) langsam zugetropft. Die Reaktionsmischung



wurde für weitere 5 h bei RT gerührt. DCM wurde unter vermindertem Druck entfernt und der verbliebene Rückstand erneut in DCM (10 mL) aufgenommen und erneut eingeeengt um TFA-Reste zu entfernen. Danach wurde der Rückstand zweimal in Diethylether (2 x 10 mL) aufgenommen und beide Male unter vermindertem Druck vollständig eingedampft. Das Rohprodukt wurde in Wasser gelöst und lyophilisiert. Das Lyophilisat wurde mit Hexan (2 x 10 mL) gewaschen und erneut lyophilisiert. Das so erhaltene TFA-Salz der gewünschten Verbindung wurde in Wasser (1 mL) gelöst und in Gegenwart von Amberlite® IRA-400 (Cl⁻-Form) für 24 h bei RT geschüttelt. Das Harz wurde abgetrennt und mit Wasser (3 x 1 mL) gewaschen. Die vereinigten wässrigen Waschfraktionen wurden lyophilisiert. Man erhielt das Produkt als leicht gelblichen Feststoff (4.5 mg, 81 %). Die Abwesenheit von TFA wurde durch ¹⁹F-NMR-Spektroskopie überprüft.

¹H NMR (D₂O, 500 MHz) δ_{H} 2.02 (m, 2H), 2.89 (s, 6H), 3.19 (m, 2H), 3.43 (t, 2H, $J=6.6$ Hz), 4.15 (s, 2H), 7.18 (s, 1H), 7.19 (s, 1H), 8.06 (s, 1H), 8.10 (s, 1H).

¹³C NMR (D₂O, 125 MHz) δ_{C} 24.2, 35.8, 42.7, 43.6, 52.2, 109.2, 109.9, 125.1, 125.3, 135.7, 135.9, 144.5, 144.8, 157.4, 157.5, 160.3, 167.5.

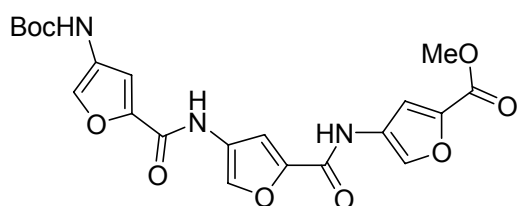
ESI-MS m/z 420.2 ([M+H]⁺).

FT-ICR-MS m/z 420.19920 ([M+H]⁺, ber. 420.19899 für C₁₈H₂₆O₅N₇⁺).

IR ν_{max} (cm⁻¹) 3293, 2957, 2926, 2854, 2713, 2523, 1664, 1560, 1466, 1379, 1311, 1208, 1166, 1125.

2.4.3 Synthese des Furan-Distamycin-Derivates

Boc-Fu-Fu-Fu-OMe (131). Der Ester **104**, Boc-Fu-Fu-OMe, (165 mg, 0.4710 mmol,



1.0 eq) wurde in THF (24 mL) gelöst und eine Lösung von LiOH (56 mg, 2.3550 mmol, 5.0 eq) in H₂O (24 mL) wurde langsam zugetropft. Anschließend wurde für 3 h bei RT gerührt und

dann die flüchtigen Bestandteile unter vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde mit Wasser (30 mL) verdünnt und mit einer 10 % HCl angesäuert (pH 4). Die wässrige Phase wurde mit EtOAc (3 x 40 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Extrakte wurden mit Na₂SO₄ getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt. Die freie Säure wurde als farbloser Feststoff erhalten (151 mg).

Die freie Säure wurde in DCM (7 mL) suspendiert und EDCI (90 mg, 0.4710 mmol, 1.0 eq) und HOAt (64 mg, 0.4710 mmol, 1.0 eq) wurden nacheinander zugegeben. Die Reaktionsmischung wurde 3.5 h bei RT gerührt bis eine klare Lösung entstand. Anschließend wurde Verbindung H-Fu-OMe•HCl (**102**), (1.0 eq) suspendiert in DCM (6 mL) zugegeben und nach Zugabe von DIPEA (81 µL, 0.4710 mmol, 1.0 eq) die Reaktionsmischung für weitere 16 h bei RT gerührt. Der entstandene Niederschlag wurde abfiltriert (Glasfritte, Pore 4) und mit kaltem DCM gewaschen (2 x 1 mL). Das Produkt wurde so als beiger Feststoff erhalten (161 mg, 74 %).

¹H NMR (DMSO-d₆, 400 MHz) δ_{H} 1.47 (s, 9H), 3.82 (s, 3H), 7.15 (s, 1H), 7.35 (d, 1H, $J=0.8$ Hz), 7.37 (s, 1H), 7.89 (s, 1H), 8.26 (s, 1H), 8.31 (d, 1H, $J=0.8$ Hz), 9.56 (s, 1H), 10.77 (s, 1H), 10.82 (s, 1H).

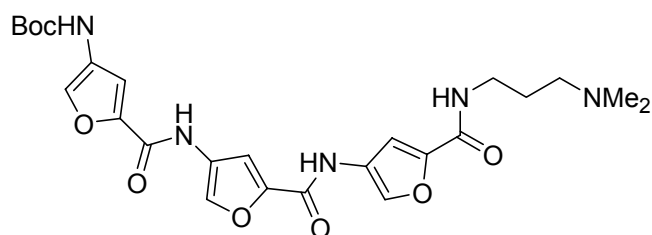
¹³C NMR (DMSO-d₆, 400 MHz) δ_{C} 28.0, 51.9, 79.6, 108.6, 109.4, 112.2, 126.3, 126.5, 127.6, 131.9, 134.0, 135.9, 141.7, 144.8, 144.9, 152.6, 155.2, 155.3, 158.2.

EI-MS m/z 459 (M⁺), 359, 300, 219, 191, 110, 57.

EI-HRMS m/z 459.1283 (M⁺, ber. 440.1278 für C₂₁H₂₁O₉N₃⁺).

IR ν_{max} (cm⁻¹) 3336, 2978, 2932, 1709, 1663, 1618, 1570, 1369, 1240, 1199.

Boc-Fu-Fu-Fu-Dp (132). Der Ester **131**, Boc-Fu-Fu-Fu-OMe, (151 mg, 0.3287 mmol,



1.0 eq) wurde in THF (16 mL) gelöst und eine Lösung von LiOH (39 mg, 1.6434 mmol, 5.0 eq) in H₂O (16 mL) wurde langsam zugetropft.

Anschließend wurde für 135 min bei RT gerührt und dann die flüchtigen Bestandteile unter vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde mit Wasser (20 mL) verdünnt und mit einer 10 % HCl angesäuert (pH 4). Die wässrige Phase wurde mit EtOAc (3 x 30 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Extrakte wurden mit Na₂SO₄ getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Die freie Säure wurde als farbloser Feststoff erhalten (141 mg).

Die freie Säure (126 mg) wurde in DCM/DMF (3/1, 8 mL) suspendiert und EDCI (55 mg, 0.2829 mmol, 1.0 eq) und HOAt (39 mg, 0.2829 mmol, 1.0 eq) wurden nacheinander zugegeben. Die Reaktionsmischung wurde 5 h bei RT gerührt bis eine klare Lösung entstand. Anschließend wurde 3-Dimethylamino-1-propylamin (39 µL, 0.3112 mmol, 1.1 eq) gelöst in DMF (156 µL) zugegeben und die Reaktionsmischung für weitere 16 h bei RT gerührt. Nach Beendigung der Reaktion wurde sie mit EtOAc (40 mL) verdünnt und der dabei entstandene Niederschlag abfiltriert (Glasfritte, Pore 4), mit Wasser (2 x 5 mL) gewaschen und getrocknet (78 mg). Die organische Phase des Filtrats wurde mit anschließend nochmals mit ges. NaHCO₃-Lösung (2 x 10 mL) und mit ges. Kochsalzlösung (1 x 15 mL) gewaschen, mit Na₂SO₄ getrocknet, filtriert und unter vermindertem Druck eingeeengt (36 mg). Es wurden so insgesamt 114 mg Rohprodukt erhalten. Ein Teil des Rohproduktes (78 mg) wurde in DMF (3 mL) gelöst und für 2.5 h bei RT mit 2-Cl-Trt-Harz (198 mg, 1.7 mmol/g) in der Gegenwart von DIPEA (115 µL) geschüttelt. Das Harz wurde abfiltriert, gewaschen (DMF, 3 x 10 mL) und lyophilisiert (85 mg). Das Lyophilisat wurde in Wasser gelöst auf eine SPE-Kartusche beladen mit PL-HCO₃ (Polymer Laboratories, 0.6 mmol/SPE-Kartusche) aufgetragen und mit Wasser (25 mL) eluiert. Die vereinigten Eluate wurden lyophilisiert. Die gewünschte Verbindung wurde als Feststoff erhalten (52 mg, 35 %).

¹H NMR (DMSO-d₆, 400 MHz) δ_H 1.47 (s, 9H), 1.61 (m, 2H), 2.12 (s, 6H), 2.22 (t, 2H, *J*=7.0 Hz), 3.22 (q, 2H, *J*=6.3 Hz), 7.14 (bs, 1H), 7.17 (s, 1H),

7.36 (s, 1H), 7.89 (s, 1H), 8.15 (d, 1H, $J=0.7$ Hz), 8.24 (d, 1H, $J=0.7$ Hz), 8.51 (t, 1H, $J=5.7$ Hz), 9.57 (s, 1H), 10.78 (bs, 2H).

^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 100 MHz) δ_{C} 27.0, 28.0, 37.1, 45.1, 56.9, 79.5, 107.7, 108.6, 109.2, 126.0, 126.5, 127.6, 131.9, 133.0, 133.9, 144.9, 145.0, 146.1, 152.6, 155.2, 155.3, 157.4.

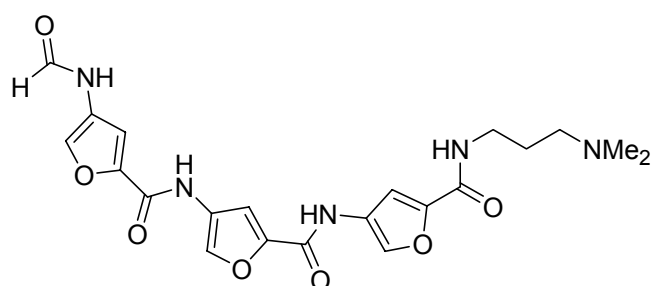
EI-MS m/z 529 (M^+), 429, 320, 191, 110, 58.

FAB-MS m/z 530.2 ($[\text{M}+\text{H}]^+$), 552.2 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$).

FT-ICR-MS m/z 530.22449 ($[\text{M}+\text{H}]^+$, ber. 530.22454 für $\text{C}_{25}\text{H}_{32}\text{O}_8\text{N}_5^+$).

IR ν_{max} (cm^{-1}) 3327, 2925, 2853, 2766, 1704, 1660, 1566, 1369, 1241, 1199.

Formyl-Fu-Fu-Fu-Dp (115). Verbindung **132** (20 mg 0.0378 mmol) wurde für 40 min



in 1 mL einer Mischung aus TFA/TIPS/ H_2O (95/2.5/2.5) bei RT gerührt. Die flüchtigen Bestandteile wurden unter vermindertem Druck entfernt und das ölige Produkt in Wasser aufgenommen und

lyophilisiert.

Das Lyophilisat wurde in DMF/THF (1/3, 1.9 mL) gelöst, auf -40 °C gekühlt und eine Lösung, die *N*-Formylimidazol enthielt, das durch Reaktion von CDI (31 mg, 0.1888 mmol, 5.0 eq) in THF (1.9 mL) mit Ameisensäure (7.1 μL , 0.1888 mmol, 5.0 eq) bei RT für 25 min erhalten wurde, versetzt. Die Reaktionsmischung wurde bei -40 °C für 1 h gerührt, dann langsam auf RT erwärmt und für weiter 4 h bei RT gerührt. THF wurde unter vermindertem Druck entfernt, Wasser zugegeben und die Lösung lyophilisiert. Das Rohprodukt (49 mg) wurde durch präparative RP-HPLC aufgereinigt. Die produktenthaltenden Fraktionen wurden vereinigt und lyophilisiert. Das gewünschte Produkt konnte so als leicht gelblicher Feststoff erhalten werden (4.7 mg, 27 %).

HPLC: System C/D, linearer Gradient von 0 % auf 40 % D in 40 min

^1H NMR (DMSO- d_6 , 400 MHz) δ_{H} 1.65 (p, 2H, $J=7.0$ Hz), 2.20 (s, 6H), 2.33 (t, 2H, $J=7.0$ Hz), 3.23 (q, 2H, $J=6.7$ Hz), 7.18 (s, 1H), 7.27 (s, 1H), 7.38

(s, 1H), 8.16 (s, 1H), 8.20 (s, 1H), 8.26 (s, 1H), 8.31 (s, 1H), 8.52 (t, 2H, $J=5.8$ Hz), 10.51, (s, 1H), 10.79 (s, 1H), 10.83 (s, 1H).

^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 100 MHz) δ_{C} 26.7, 37.0, 44.8, 56.6, 107.7, 108.7, 109.2, 125.6, 126.1, 126.4, 133.1, 133.9, 134.1, 145.0 (2 x C), 146.1, 155.2 (2 x C), 157.5, 159.2.

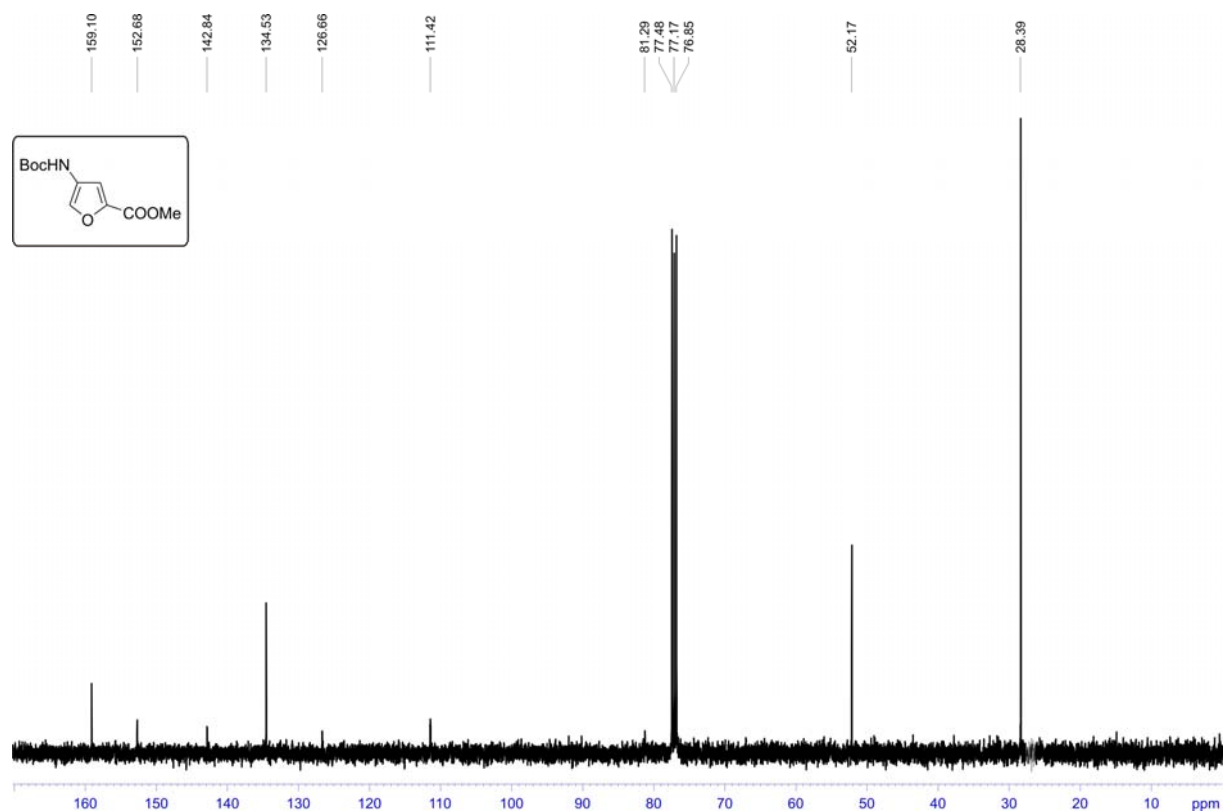
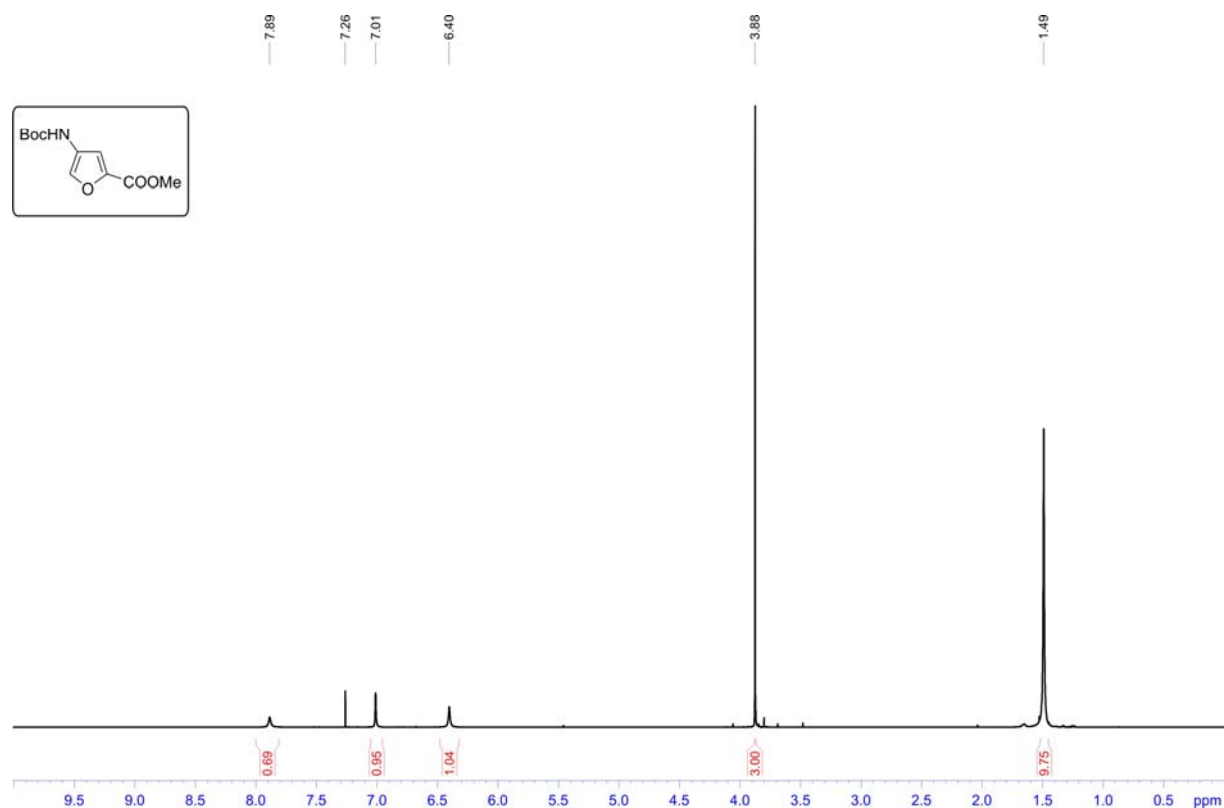
ESI-MS m/z 458.1 ($[\text{M}+\text{H}]^+$).

FT-ICR-MS m/z 458.16701 ($[\text{M}+\text{H}]^+$, ber. 458.16702 für $\text{C}_{21}\text{H}_{24}\text{O}_7\text{N}_5^+$).

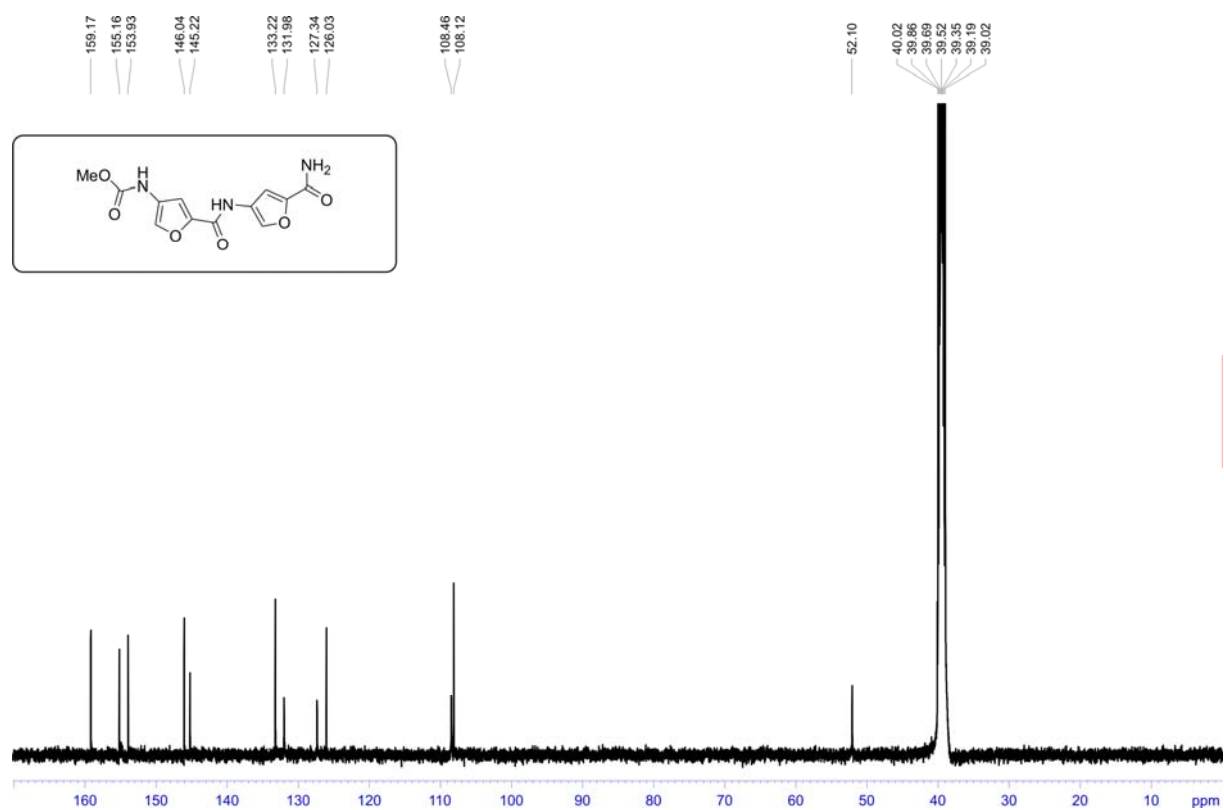
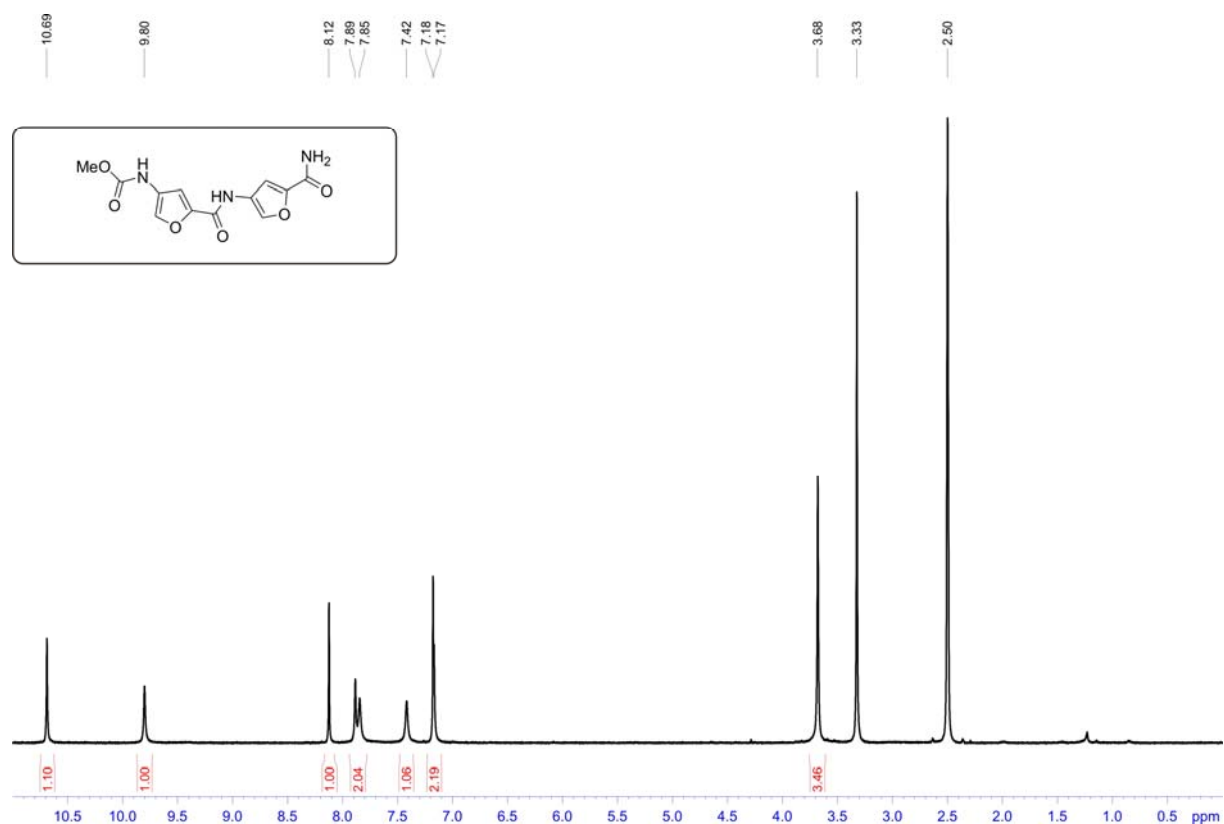
IR ν_{max} (cm^{-1}) 3311, 3209, 3141. 3072, 2929, 2860, 2775, 1661, 1581, 1571, 1550, 1365, 1297, 1196.

3 NMR-Spektren ausgewählter Verbindungen

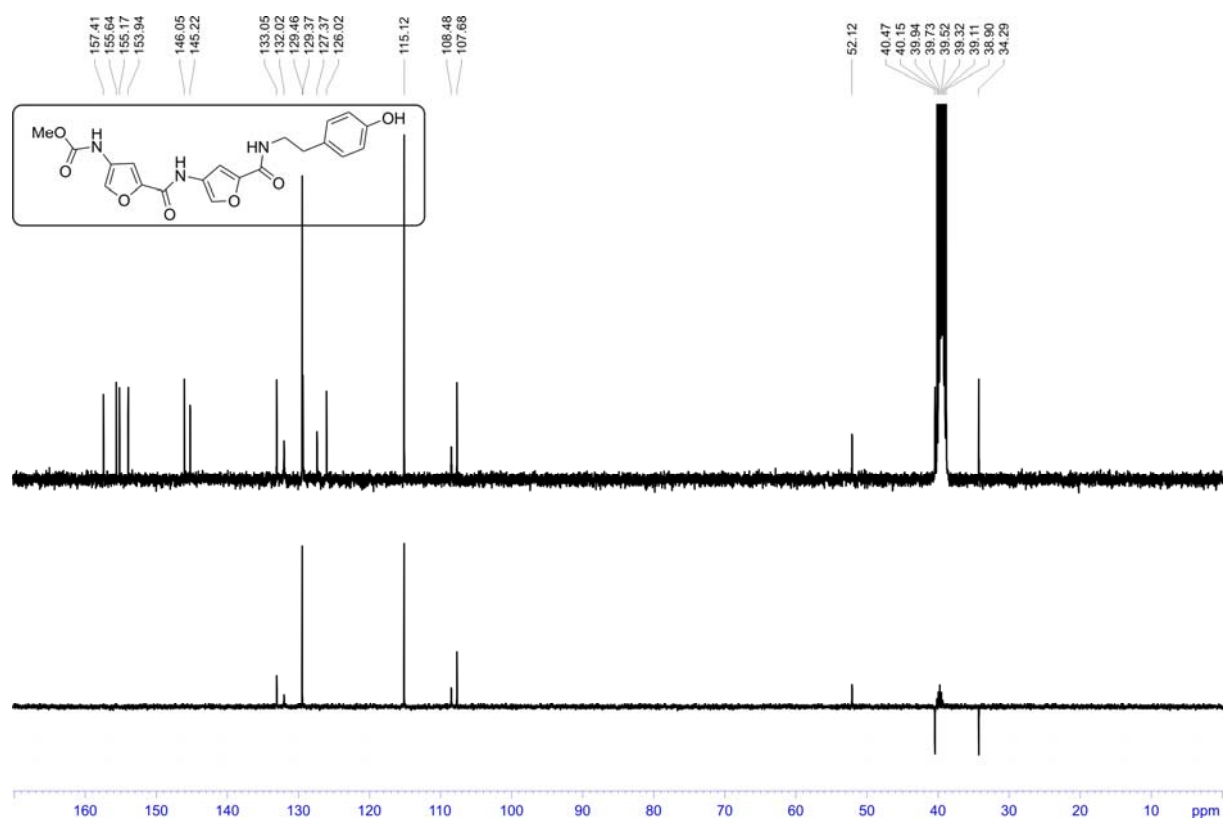
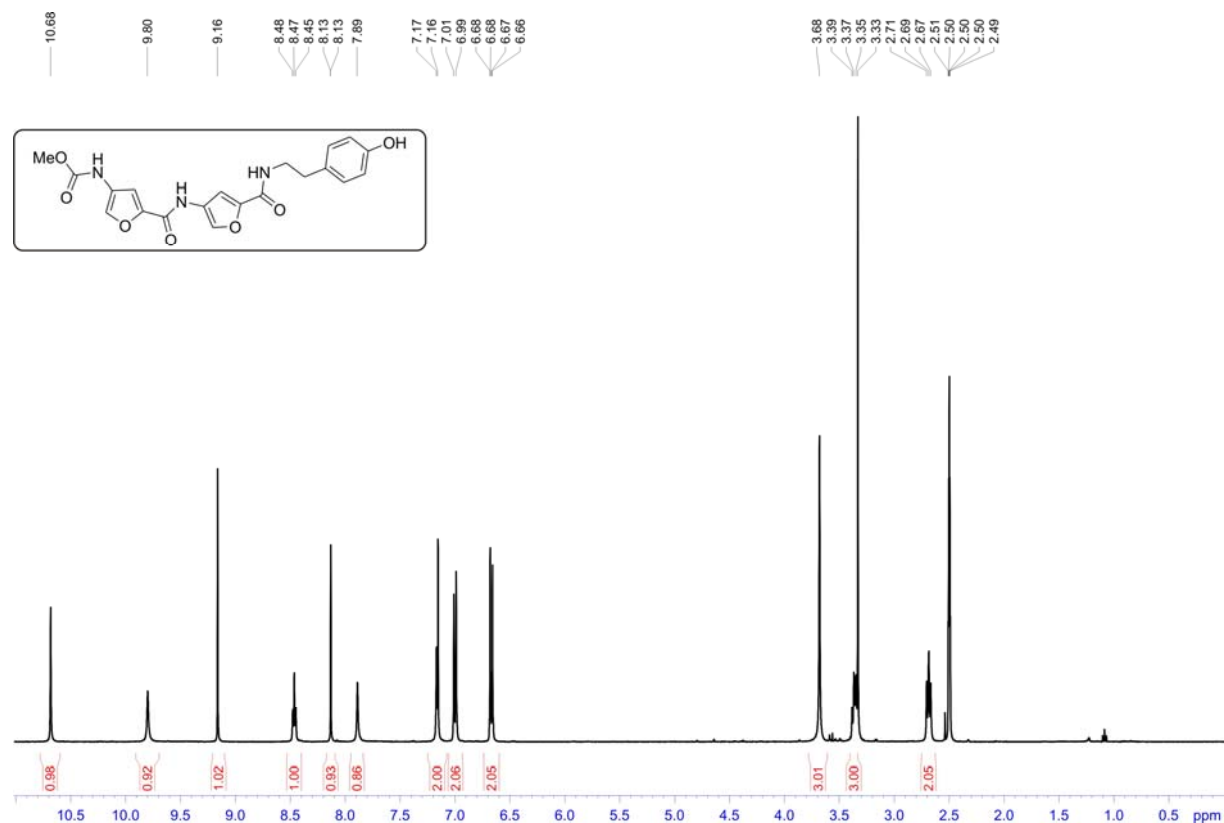
3.1 Boc-Fu-OMe (88)



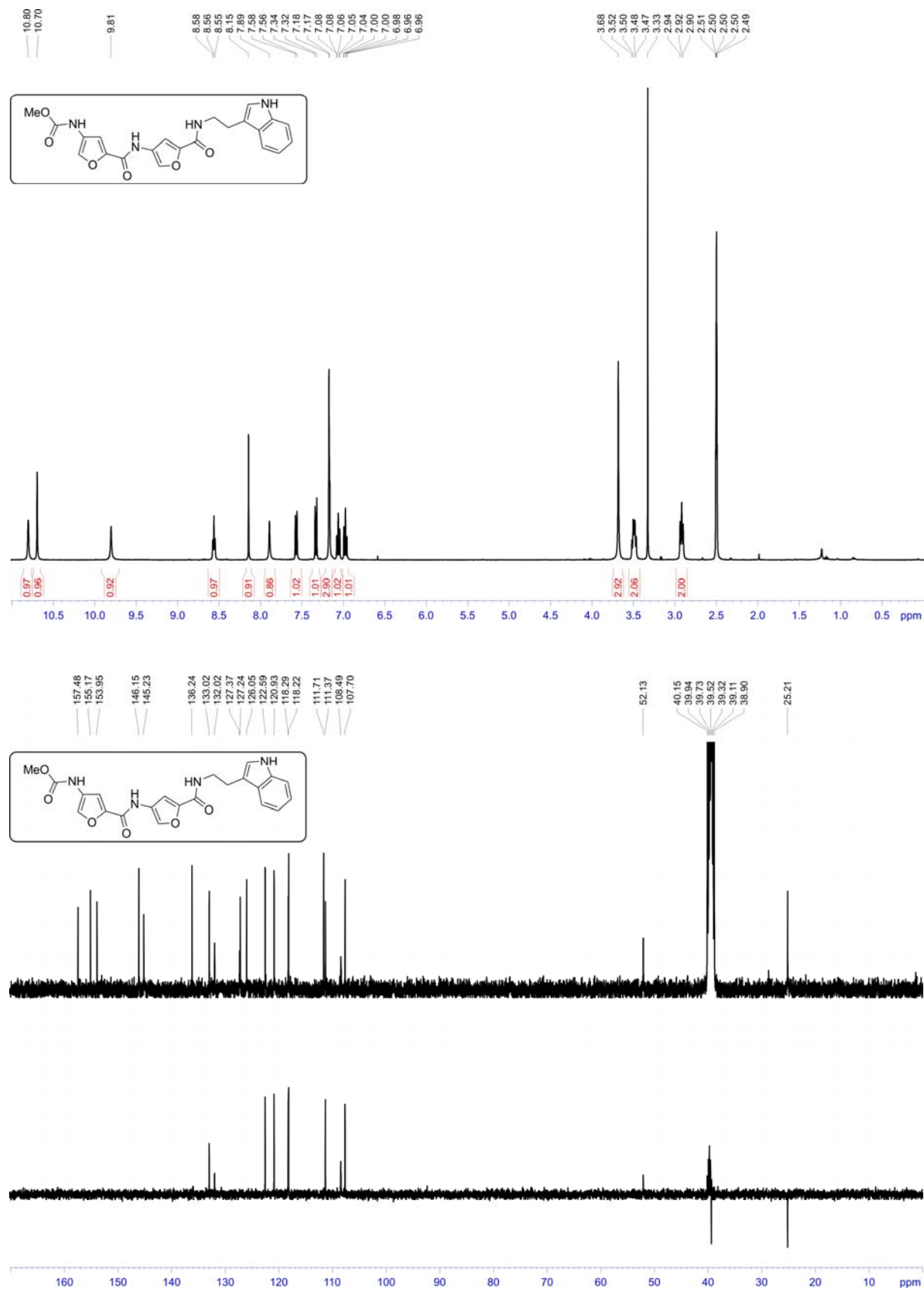
3.2 Proximicin A (20), synthetisch

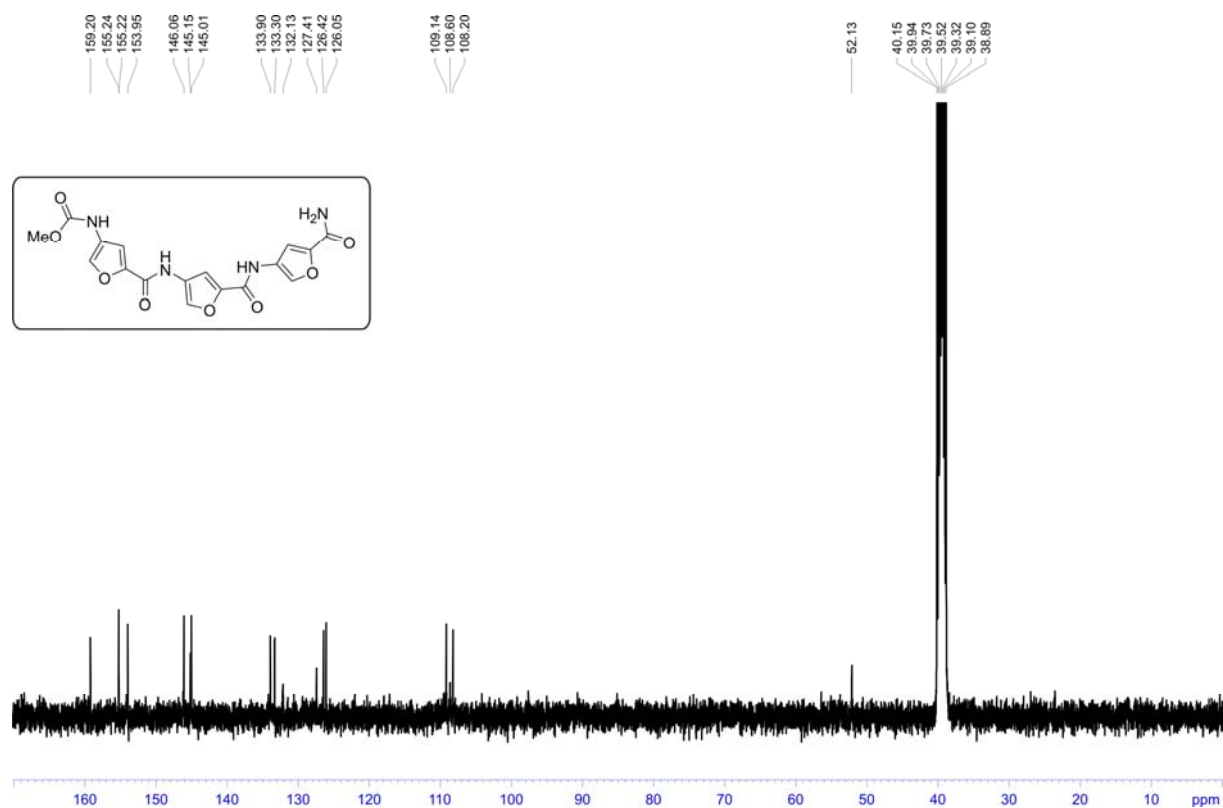
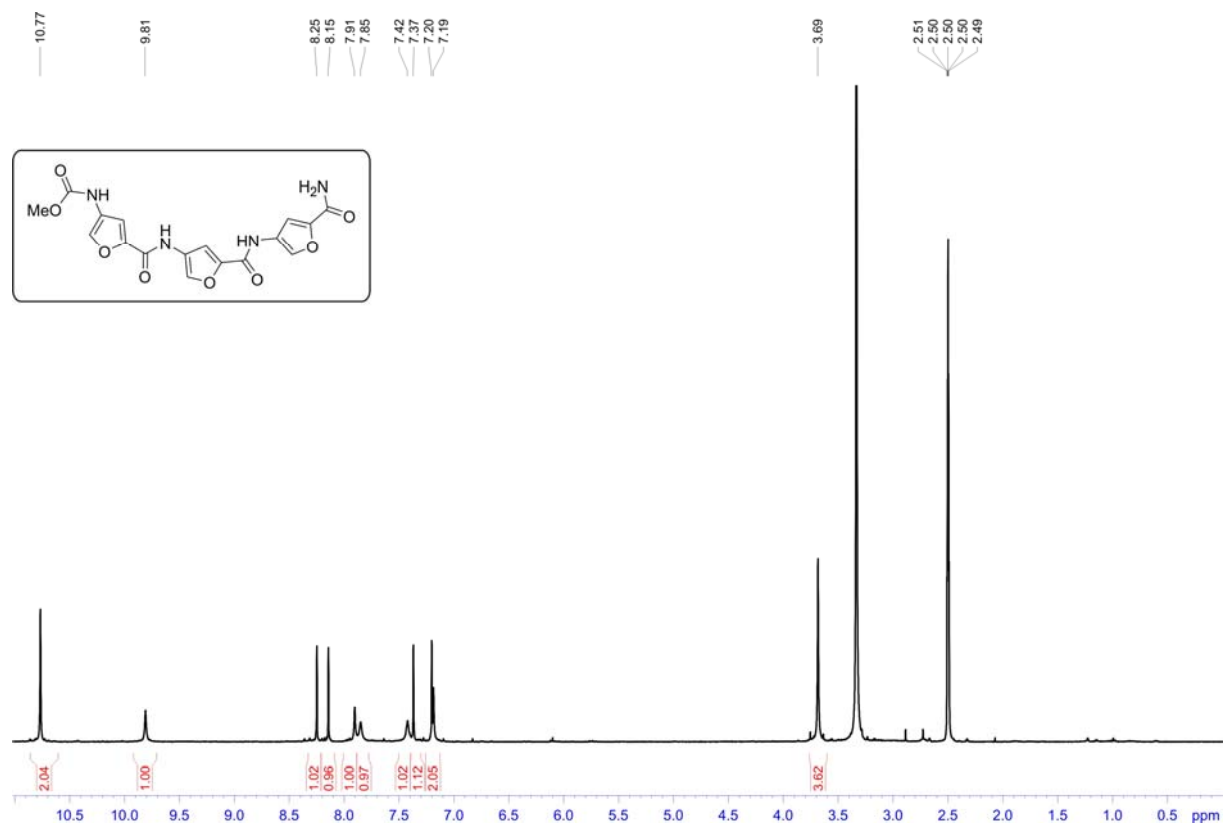


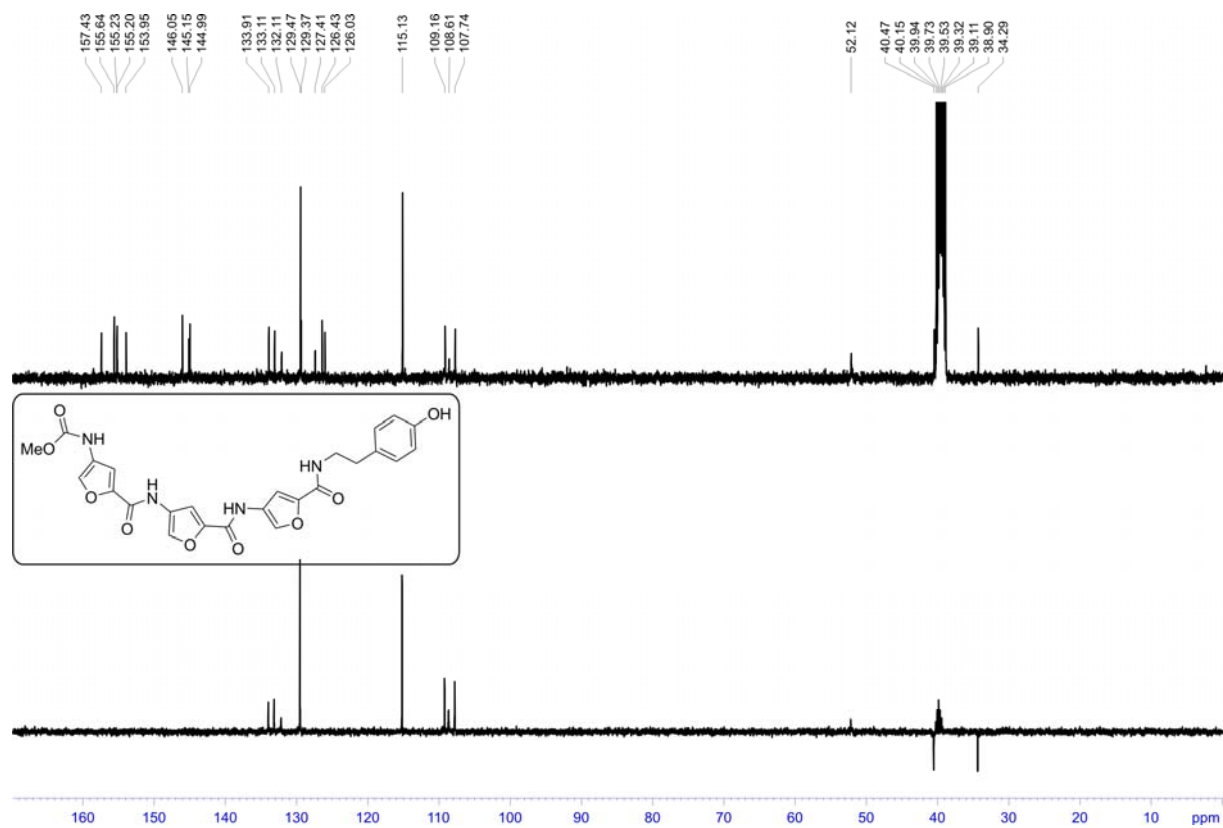
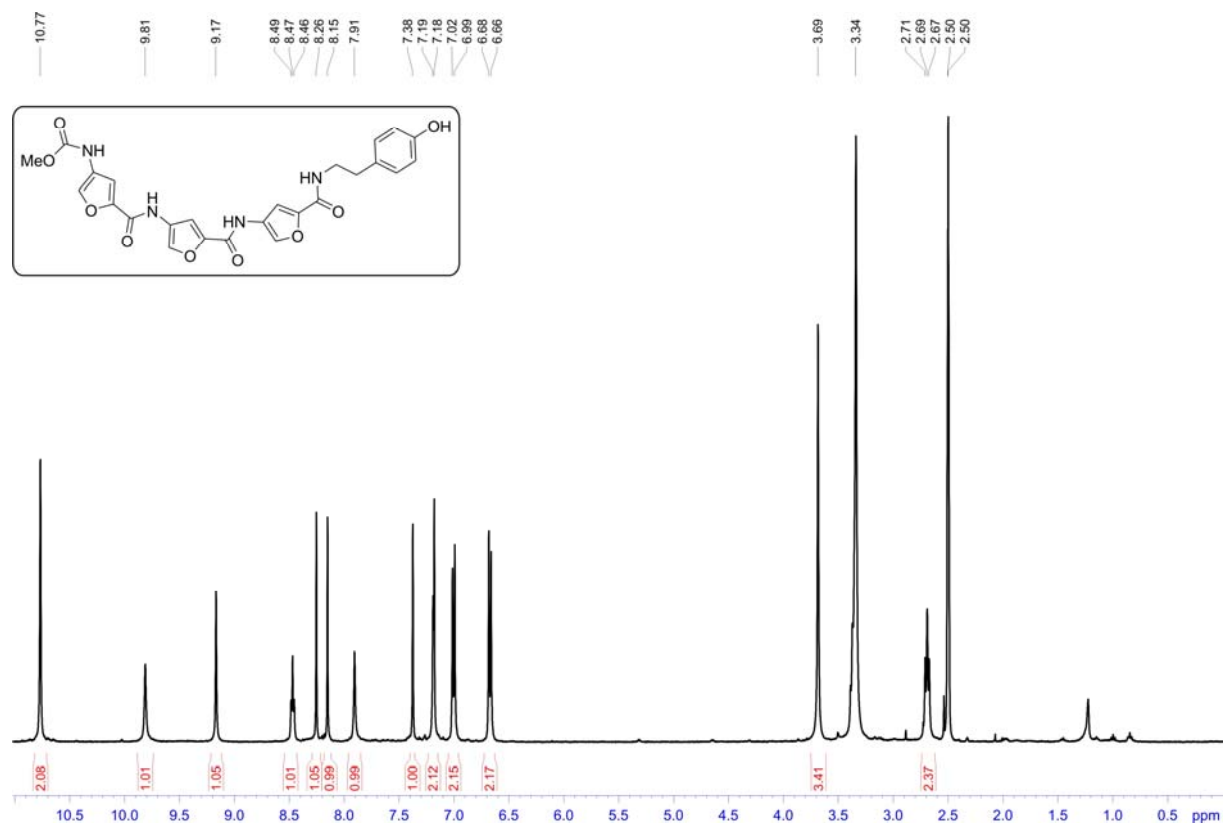
3.3 Proximicin B (21), synthetisch



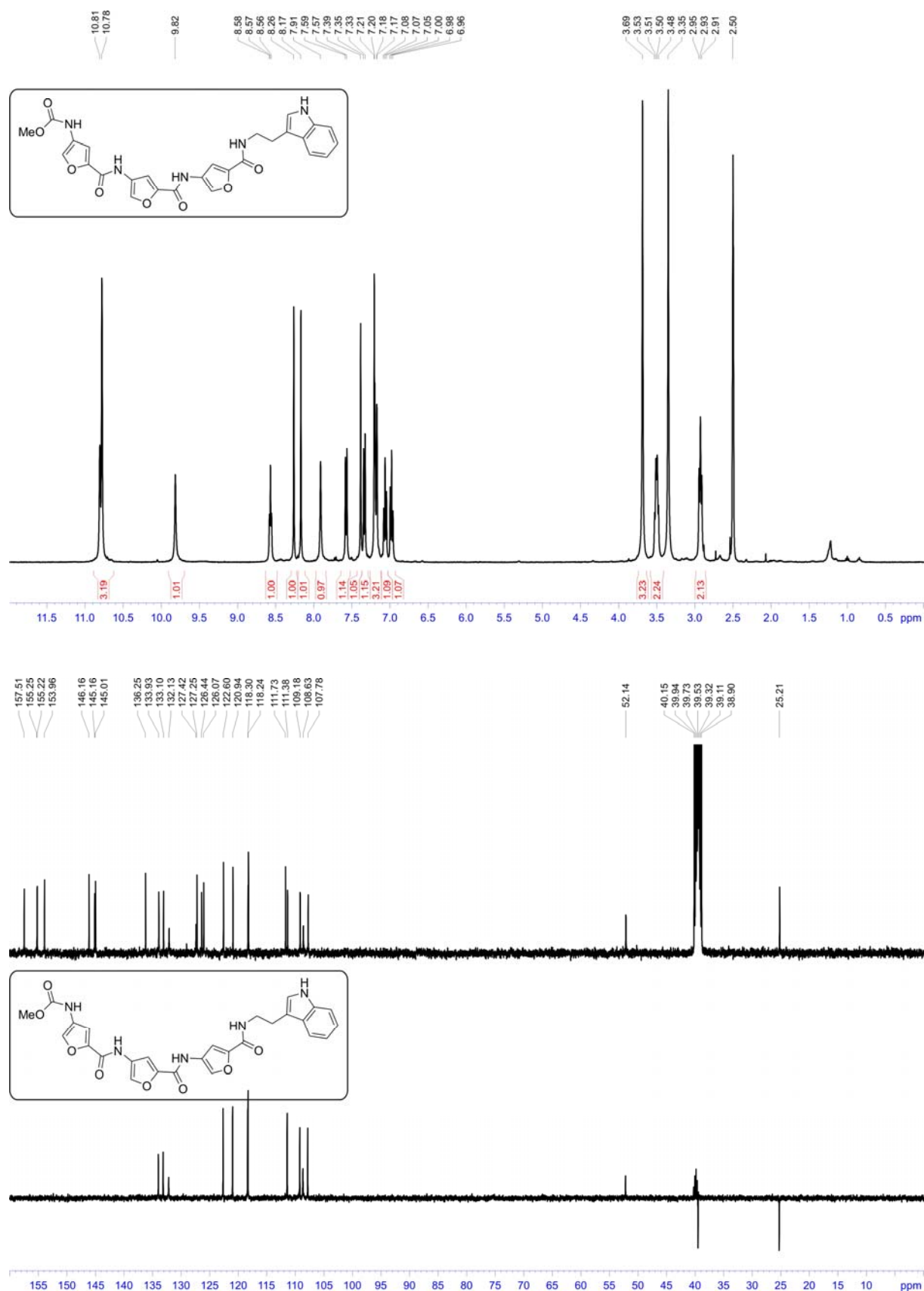
3.4 Proximicin C (22), synthetisch



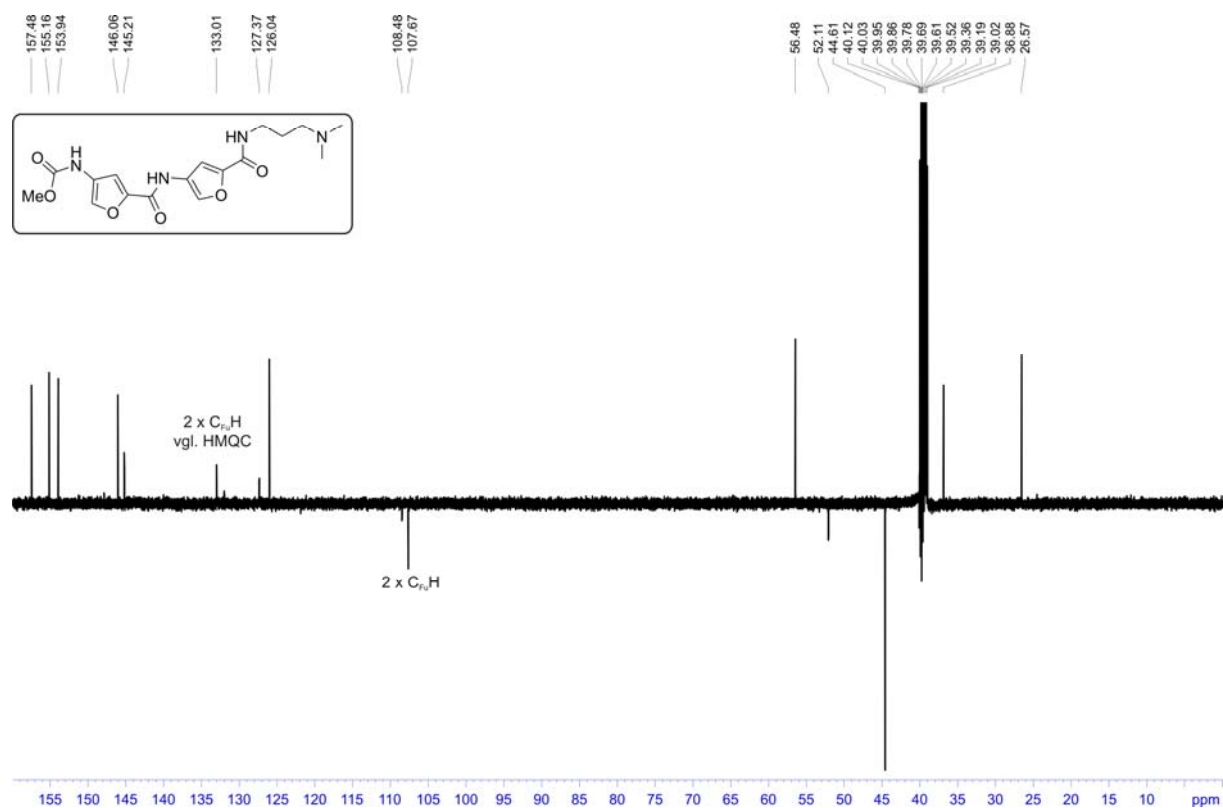
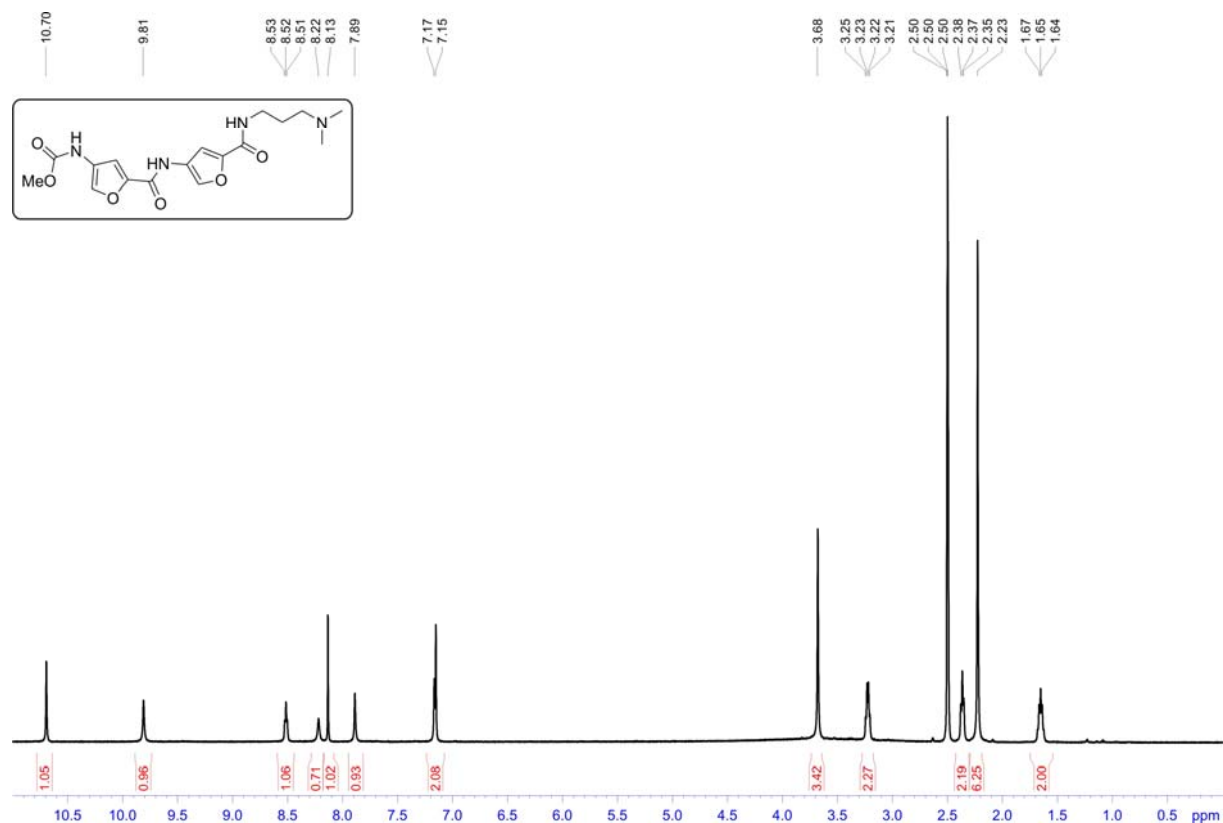
3.5 Meoc-Fu-Fu-Fu-NH₂ (109)

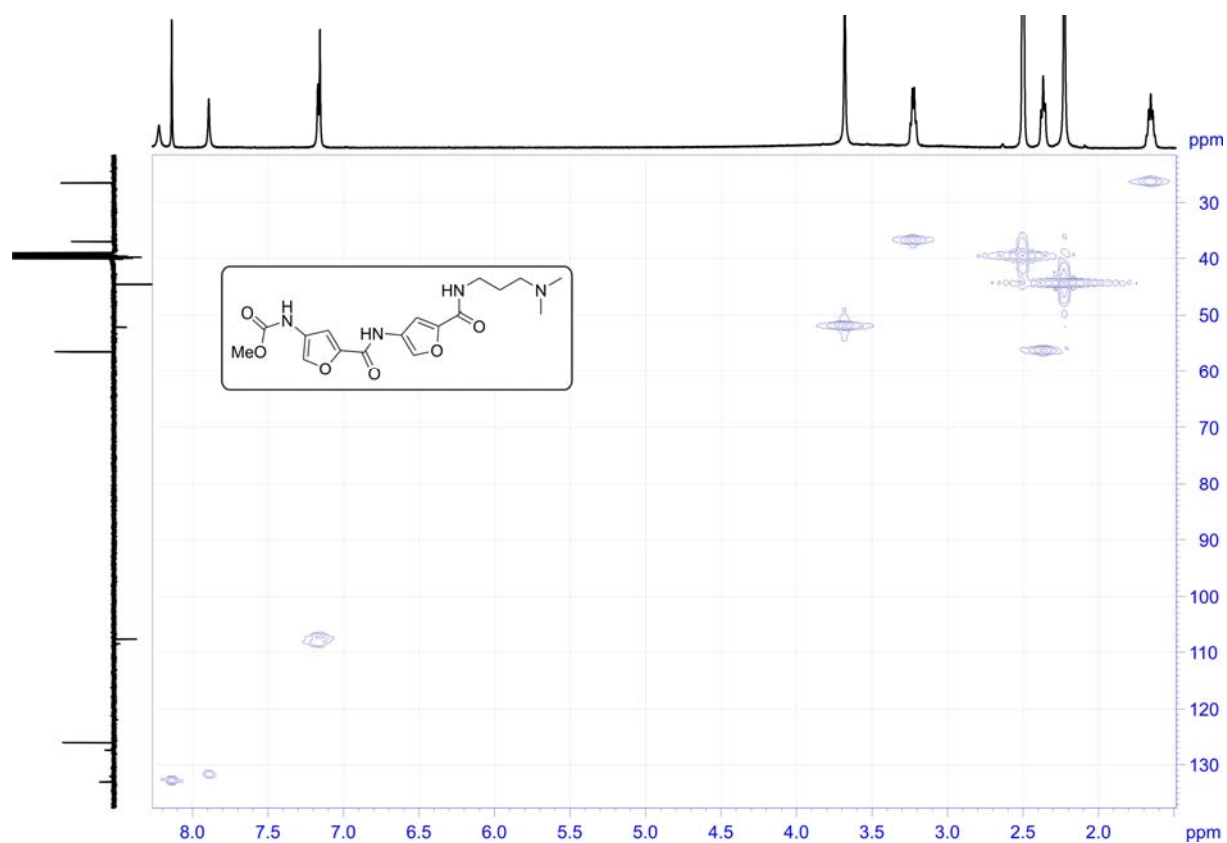
3.6 Meoc-Fu-Fu-Fu-Tyra (110)

3.7 Meoc-Fu-Fu-Fu-Trpa (111)

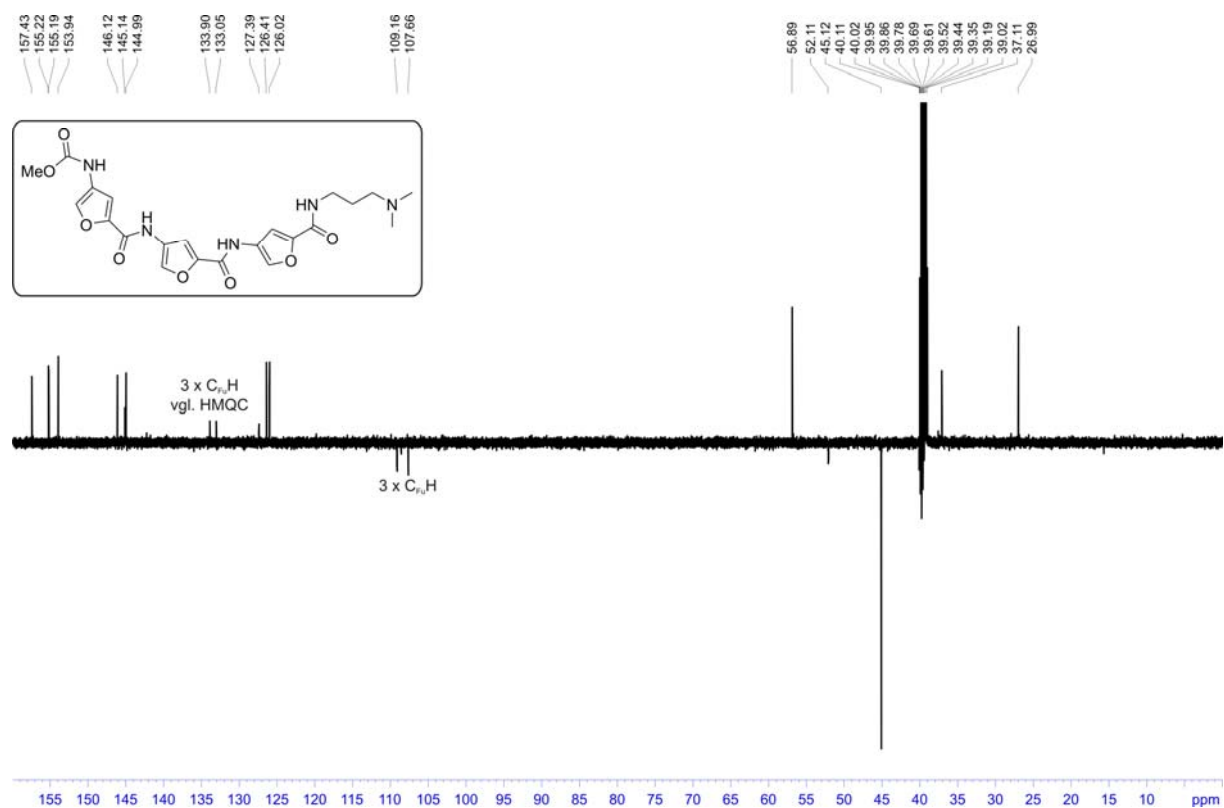
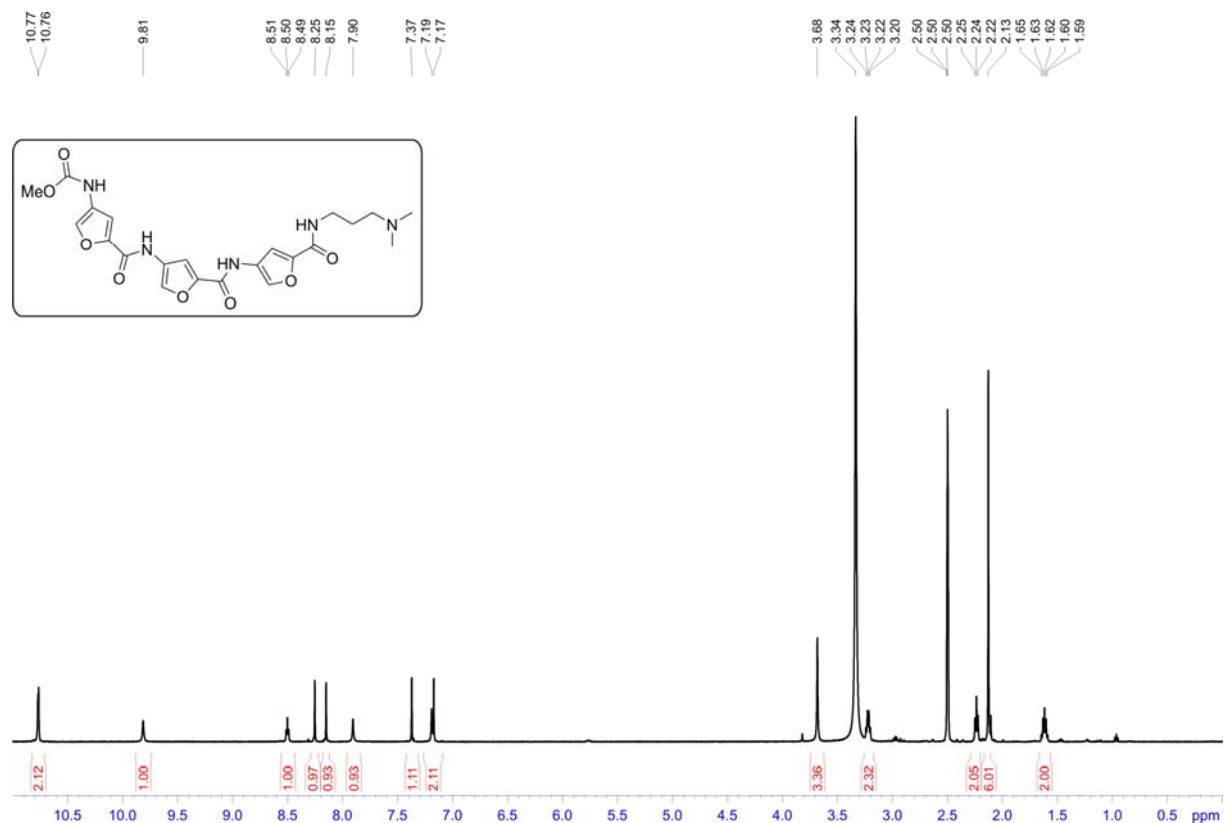


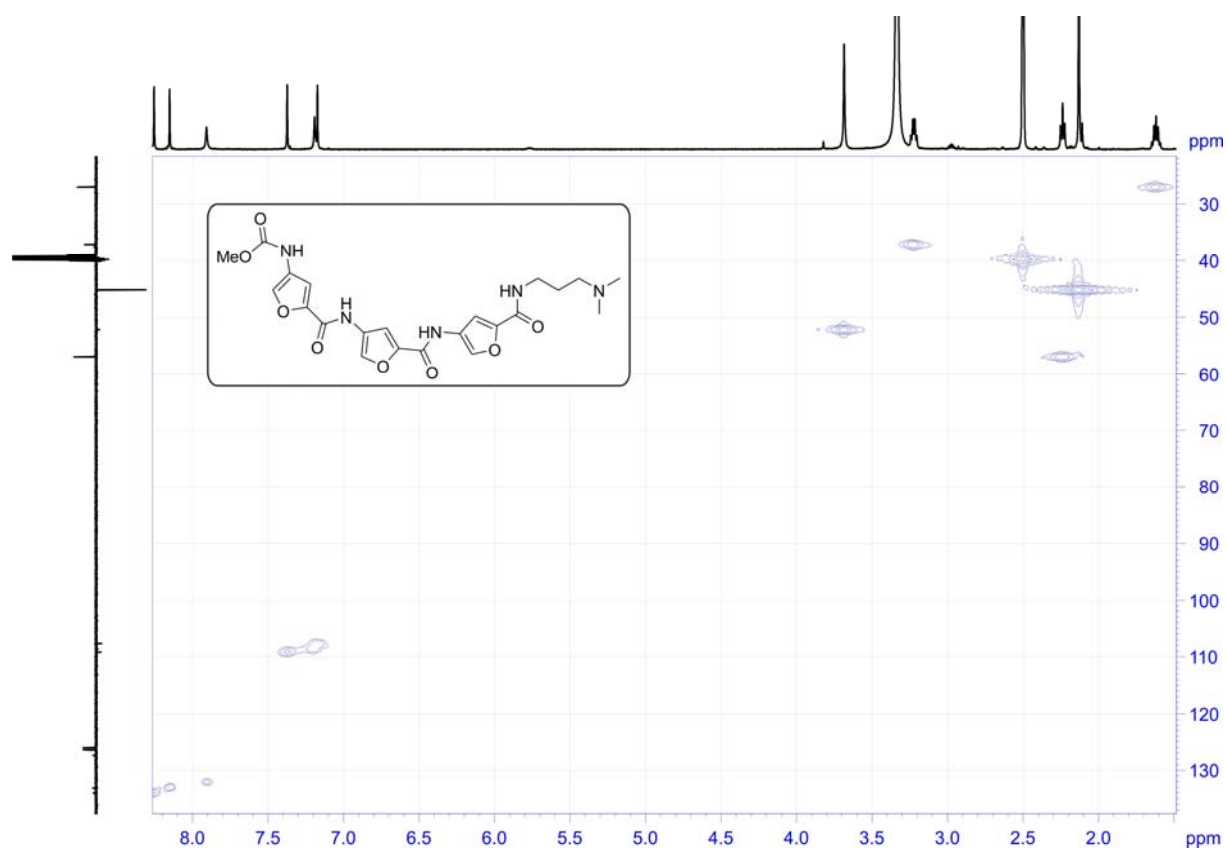
3.8 Meoc-Fu-Fu-Dp (112)

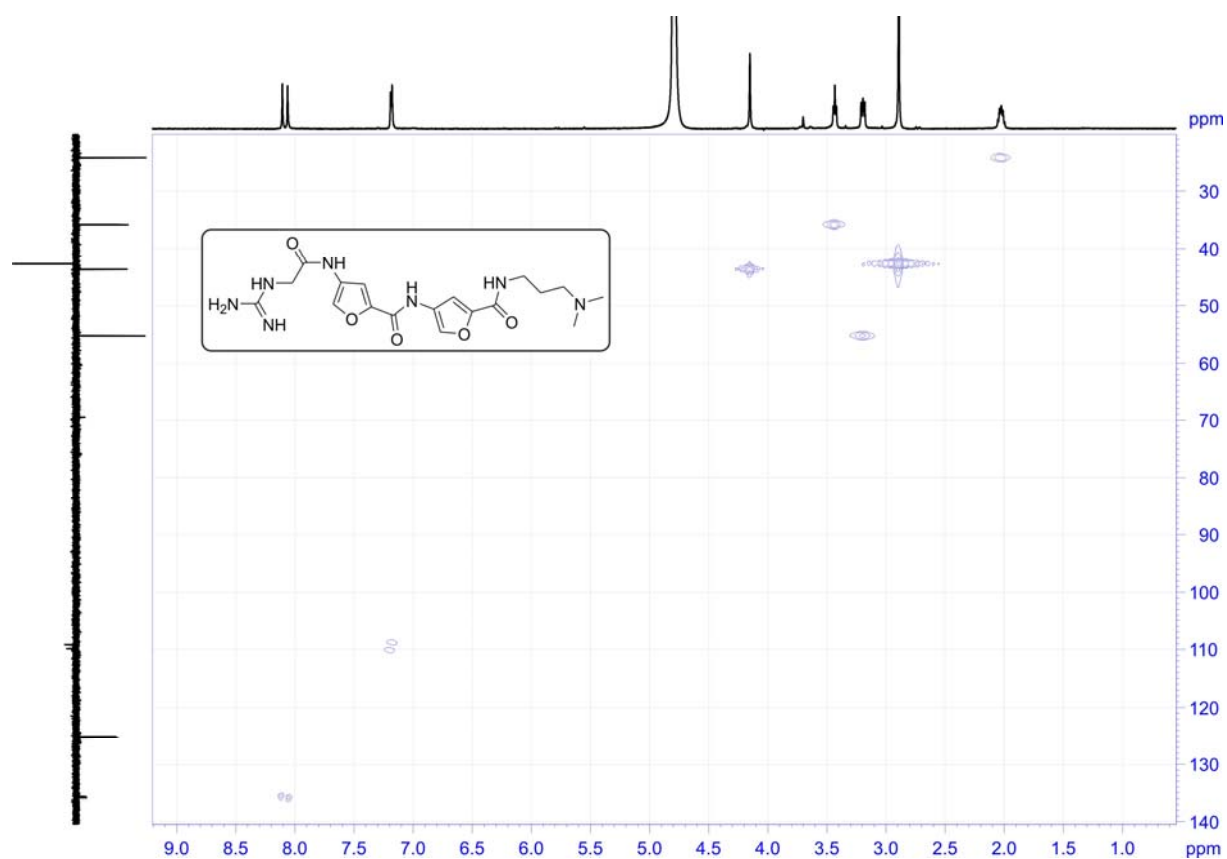




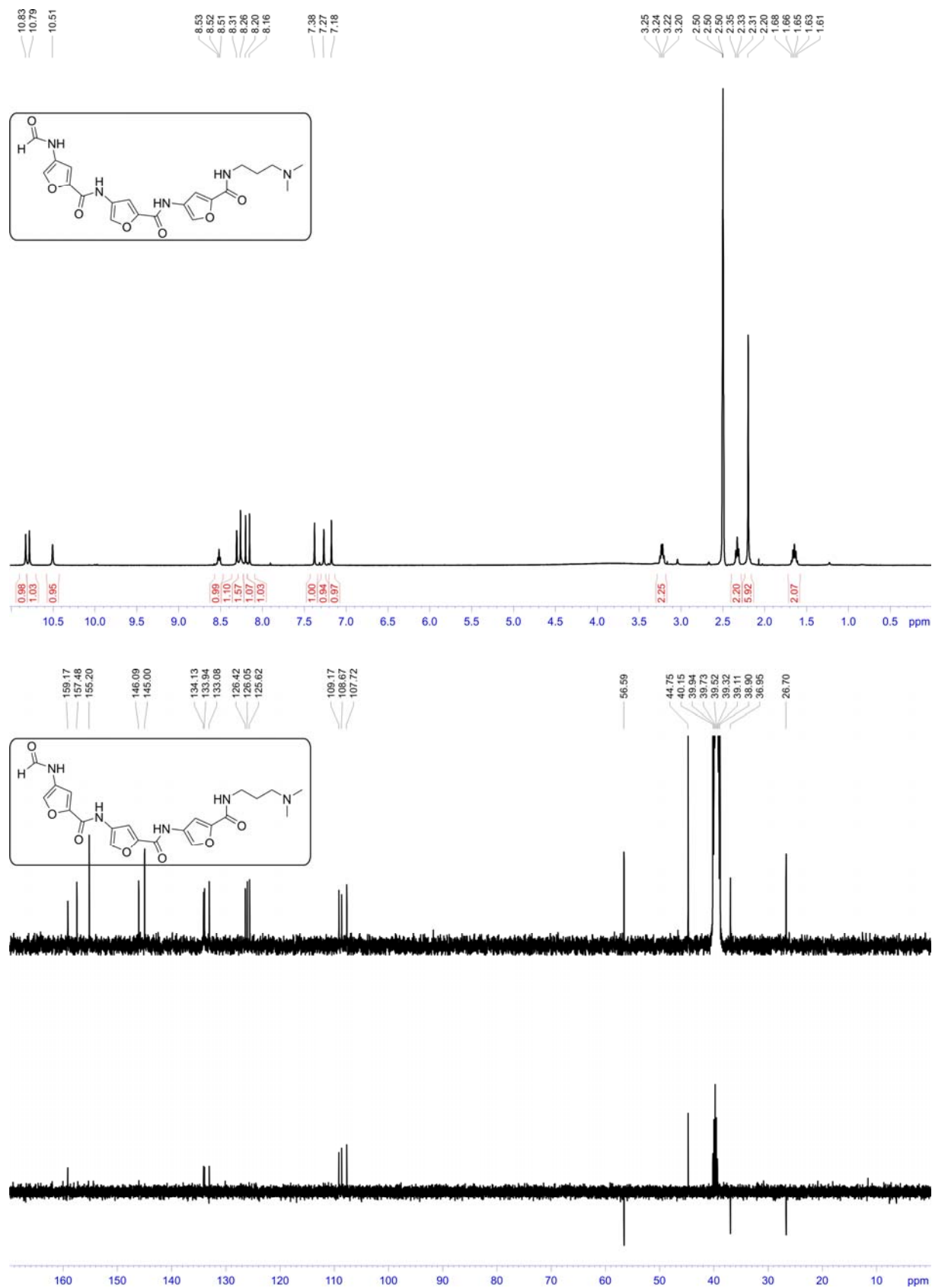
3.9 Meoc-Fu-Fu-Fu-Dp (113)







3.11 f-Fu-Fu-Fu-Dp (115)



4 Kristallographische Daten

4.1 Boc-Fu-Fu-OMe (104)

Tabelle II-1. Kristalldaten und Strukturlösung.

Identification code	wolt1 / Boc-Fu-Fu-OMe-1	
Empirical formula	C ₁₇ H ₁₉ Cl ₃ N ₂ O ₇	
Formula weight	469.69	
Temperature	150(2) K	
Wavelength	0.71073 Å	
Crystal system	Monoclinic	
Space group	C2/c	
Unit cell dimensions	a = 41.773(3) Å	α = 90°.
	b = 6.0170(4) Å	β = 112.967(6)°.
	c = 18.0458(16) Å	γ = 90°.
Volume	4176.2(6) Å ³	
Z	8	
Density (calculated)	1.494 Mg/m ³	
Absorption coefficient	0.480 mm ⁻¹	
F(000)	1936	
Crystal size	0.52 x 0.26 x 0.04 mm ³	
Theta range for data collection	3.03 to 25.00°.	
Index ranges	-49 ≤ h ≤ 49, -6 ≤ k ≤ 7, -21 ≤ l ≤ 15	
Reflections collected	9105	
Independent reflections	3654 [R(int) = 0.0835]	
Completeness to theta = 25.00°	99.5 %	
Absorption correction	Semi-empirical from equivalents	
Max. and min. transmission	0.9810 and 0.7882	
Refinement method	Full-matrix least-squares on F ²	
Data / restraints / parameters	3654 / 0 / 266	
Goodness-of-fit on F ²	0.862	
Final R indices [I > 2σ(I)]	R1 = 0.0564, wR2 = 0.0887	
R indices (all data)	R1 = 0.1694, wR2 = 0.1083	
Largest diff. peak and hole	0.406 and -0.450 e.Å ⁻³	

Tabelle II-2. Koordinaten der Atome ($\times 10^4$) und äquivalente isotrope Auslenkungsparameter ($\text{\AA}^2 \times 10^3$). $U(\text{eq})$ ist definiert als $1/3$ der Spur des orthogonalisierten U^{ij} tensors.

	x	y	z	$U(\text{eq})$
Cl(1)	5309(1)	6538(2)	-280(1)	58(1)
Cl(2)	5682(1)	10692(2)	184(1)	64(1)
Cl(3)	5058(1)	10428(3)	-1246(1)	83(1)
C(17)	5431(1)	9001(7)	-622(3)	40(1)
O(1)	8806(1)	-154(5)	6789(2)	33(1)
O(2)	8958(1)	2948(5)	6257(2)	34(1)
O(3)	8101(1)	6813(5)	4711(2)	34(1)
O(4)	7189(1)	5727(5)	3992(2)	34(1)
O(5)	6650(1)	10789(5)	2381(2)	35(1)
O(6)	6950(1)	15424(5)	1603(2)	35(1)
O(7)	6412(1)	14071(5)	1317(2)	40(1)
N(1)	8398(1)	1793(6)	5873(2)	32(1)
N(2)	7480(1)	8578(6)	3697(2)	26(1)
C(1)	9161(1)	-696(8)	7367(3)	31(1)
C(2)	9385(1)	-1319(8)	6912(3)	51(2)
C(3)	9096(1)	-2712(8)	7792(3)	42(1)
C(4)	9306(1)	1181(8)	7947(3)	48(2)
C(5)	8745(1)	1646(8)	6306(3)	28(1)
C(6)	8237(1)	3561(8)	5367(3)	29(1)
C(7)	8366(1)	5496(8)	5223(3)	34(1)
C(8)	7874(1)	3631(7)	4919(3)	29(1)
C(9)	7803(1)	5613(8)	4557(3)	27(1)
C(10)	7464(1)	6621(8)	4053(3)	30(1)
C(11)	7187(1)	9720(8)	3165(2)	23(1)
C(12)	6846(1)	9253(8)	2932(3)	34(1)
C(13)	7210(1)	11649(8)	2746(3)	30(1)
C(14)	6880(1)	12233(8)	2285(3)	29(1)
C(15)	6755(1)	14072(9)	1708(3)	32(1)
C(16)	6286(1)	15772(8)	698(3)	54(2)

Tabelle II-3. Bindungslängen [Å] und -winkel [°].

Cl(1)-C(17)	1.756(5)
Cl(2)-C(17)	1.749(4)
Cl(3)-C(17)	1.752(4)
O(1)-C(5)	1.352(5)
O(1)-C(1)	1.477(4)
O(2)-C(5)	1.212(5)
O(3)-C(9)	1.369(4)
O(3)-C(7)	1.382(4)
O(4)-C(10)	1.234(4)
O(5)-C(14)	1.357(5)
O(5)-C(12)	1.370(5)
O(6)-C(15)	1.215(5)
O(7)-C(15)	1.327(5)
O(7)-C(16)	1.454(5)
N(1)-C(5)	1.357(5)
N(1)-C(6)	1.393(5)
N(2)-C(10)	1.356(5)
N(2)-C(11)	1.405(5)
C(1)-C(4)	1.497(6)
C(1)-C(2)	1.514(6)
C(1)-C(3)	1.514(6)
C(6)-C(7)	1.350(6)
C(6)-C(8)	1.412(5)
C(8)-C(9)	1.336(5)
C(9)-C(10)	1.484(5)
C(11)-C(12)	1.349(5)
C(11)-C(13)	1.407(5)
C(13)-C(14)	1.347(5)
C(14)-C(15)	1.469(6)
Cl(2)-C(17)-Cl(3)	110.2(2)
Cl(2)-C(17)-Cl(1)	111.2(3)
Cl(3)-C(17)-Cl(1)	109.4(2)
C(5)-O(1)-C(1)	121.1(3)
C(9)-O(3)-C(7)	105.1(3)
C(14)-O(5)-C(12)	105.7(3)
C(15)-O(7)-C(16)	113.6(4)

C(5)-N(1)-C(6)	124.1(4)
C(10)-N(2)-C(11)	123.9(4)
O(1)-C(1)-C(4)	110.4(3)
O(1)-C(1)-C(2)	109.4(3)
C(4)-C(1)-C(2)	113.5(4)
O(1)-C(1)-C(3)	101.9(3)
C(4)-C(1)-C(3)	110.8(4)
C(2)-C(1)-C(3)	110.3(4)
O(2)-C(5)-O(1)	127.3(4)
O(2)-C(5)-N(1)	124.5(5)
O(1)-C(5)-N(1)	108.2(4)
C(7)-C(6)-N(1)	131.1(4)
C(7)-C(6)-C(8)	106.5(4)
N(1)-C(6)-C(8)	122.3(4)
C(6)-C(7)-O(3)	110.3(4)
C(9)-C(8)-C(6)	106.8(4)
C(8)-C(9)-O(3)	111.2(4)
C(8)-C(9)-C(10)	129.9(4)
O(3)-C(9)-C(10)	118.9(4)
O(4)-C(10)-N(2)	123.6(4)
O(4)-C(10)-C(9)	120.7(4)
N(2)-C(10)-C(9)	115.7(4)
C(12)-C(11)-N(2)	130.0(4)
C(12)-C(11)-C(13)	106.7(4)
N(2)-C(11)-C(13)	123.2(4)
C(11)-C(12)-O(5)	110.2(4)
C(14)-C(13)-C(11)	106.3(4)
C(13)-C(14)-O(5)	111.0(4)
C(13)-C(14)-C(15)	129.0(5)
O(5)-C(14)-C(15)	119.9(4)
O(6)-C(15)-O(7)	124.4(5)
O(6)-C(15)-C(14)	122.7(4)
O(7)-C(15)-C(14)	112.8(4)

4.2 Boc₂-Gua-Gly-Fu-OMe (120)

Tabelle II-4. Kristalldaten und Strukturlösung.

Identification code	wolter1 /M076	
Empirical formula	C ₂₁ H ₃₄ N ₄ O ₉ S	
Formula weight	518.58	
Temperature	150(2) K	
Wavelength	0.71073 Å	
Crystal system	Orthorhombic	
Space group	Pbca	
Unit cell dimensions	a = 11.3077(7) Å	α = 90°.
	b = 13.1410(8) Å	β = 90°.
	c = 35.352(2) Å	γ = 90°.
Volume	5253.1(6) Å ³	
Z	8	
Density (calculated)	1.311 Mg/m ³	
Absorption coefficient	0.178 mm ⁻¹	
F(000)	2208	
Crystal size	0.50 x 0.30 x 0.02 mm ³	
Theta range for data collection	2.93 to 25.00°.	
Index ranges	-12 ≤ h ≤ 13, -15 ≤ k ≤ 15, -42 ≤ l ≤ 41	
Reflections collected	48076	
Independent reflections	4621 [R(int) = 0.2201]	
Completeness to theta = 25.00°	99.9 %	
Absorption correction	Semi-empirical from equivalents	
Max. and min. transmission	0.996 and 0.944	
Refinement method	Full-matrix least-squares on F ²	
Data / restraints / parameters	4621 / 0 / 325	
Goodness-of-fit on F ²	1.077	
Final R indices [I > 2σ(I)]	R1 = 0.0902, wR2 = 0.0801	
R indices (all data)	R1 = 0.2069, wR2 = 0.1038	
Largest diff. peak and hole	0.264 and -0.245 e.Å ⁻³	

Tabelle II-5. Koordinaten der Atome ($\times 10^4$) and äquivalente isotrope Auslenkungsparameter ($\text{\AA}^2 \times 10^3$). U(eq) ist definiert als 1/3 der Spur des orthogonalisierten U^{ij} tensors.

	x	y	z	U(eq)
O(1)	6092(3)	3020(2)	3755(1)	31(1)
O(2)	5031(3)	2393(2)	3266(1)	30(1)
O(3)	771(3)	2114(2)	3443(1)	30(1)
O(4)	1889(2)	1412(2)	2972(1)	27(1)
O(5)	345(3)	3031(2)	4416(1)	27(1)
O(6)	-1454(3)	3803(2)	5412(1)	28(1)
O(7)	-2205(3)	4417(2)	6127(1)	31(1)
O(8)	-316(3)	4843(2)	6260(1)	33(1)
O(9)	3477(3)	4406(2)	5169(1)	40(1)
N(1)	4160(3)	3052(3)	3819(1)	24(1)
N(2)	2760(3)	2440(3)	3369(1)	23(1)
N(3)	2198(3)	3051(3)	3963(1)	23(1)
N(4)	1321(3)	3736(3)	4913(1)	24(1)
C(1)	7245(4)	2747(4)	3582(1)	32(1)
C(2)	7441(4)	3315(3)	3217(1)	44(2)
C(3)	7338(4)	1592(3)	3533(1)	43(2)
C(4)	8124(4)	3090(4)	3882(1)	61(2)
C(5)	5071(4)	2780(3)	3578(1)	23(1)
C(6)	3064(4)	2851(3)	3719(1)	21(1)
C(7)	1689(5)	1991(3)	3277(1)	23(1)
C(8)	925(4)	761(4)	2821(1)	29(1)
C(9)	1567(4)	167(4)	2516(1)	49(2)
C(10)	488(4)	46(4)	3129(1)	41(1)
C(11)	-38(4)	1419(4)	2656(1)	45(2)
C(12)	2418(4)	3411(3)	4342(1)	20(1)
C(13)	1256(4)	3366(3)	4556(1)	23(1)
C(14)	350(4)	3823(3)	5157(1)	21(1)
C(15)	-794(4)	3562(3)	5096(1)	27(1)
C(16)	408(4)	4233(3)	5526(1)	24(1)
C(17)	-684(4)	4209(3)	5668(1)	22(1)
C(18)	-1179(5)	4486(3)	6037(1)	26(1)
C(19)	-668(4)	5151(4)	6635(1)	40(1)
C(20)	5088(4)	4588(3)	5708(1)	37(1)
C(21)	4197(4)	6238(3)	5361(1)	34(1)
S(1)	3711(1)	5030(1)	5521(1)	32(1)

Tabelle II-6. Bindungslängen [Å] und -winkel [°].

O(1)-C(5)	1.350(5)
O(1)-C(1)	1.484(5)
O(2)-C(5)	1.216(5)
O(3)-C(7)	1.203(5)
O(4)-C(7)	1.339(5)
O(4)-C(8)	1.486(5)
O(5)-C(13)	1.225(5)
O(6)-C(17)	1.365(5)
O(6)-C(15)	1.379(5)
O(7)-C(18)	1.206(5)
O(8)-C(18)	1.339(5)
O(8)-C(19)	1.441(5)
O(9)-S(1)	1.512(3)
N(1)-C(6)	1.315(5)
N(1)-C(5)	1.383(5)
N(2)-C(7)	1.385(5)
N(2)-C(6)	1.394(5)
N(3)-C(6)	1.332(5)
N(3)-C(12)	1.442(5)
N(4)-C(13)	1.355(5)
N(4)-C(14)	1.401(5)
C(1)-C(2)	1.507(6)
C(1)-C(4)	1.523(6)
C(1)-C(3)	1.531(6)
C(8)-C(11)	1.508(6)
C(8)-C(9)	1.517(6)
C(8)-C(10)	1.522(6)
C(12)-C(13)	1.518(6)
C(14)-C(15)	1.355(6)
C(14)-C(16)	1.414(5)
C(16)-C(17)	1.333(6)
C(17)-C(18)	1.466(6)
C(20)-S(1)	1.789(4)
C(21)-S(1)	1.772(4)
C(5)-O(1)-C(1)	120.3(4)
C(7)-O(4)-C(8)	119.5(4)

C(17)-O(6)-C(15)	106.3(3)
C(18)-O(8)-C(19)	116.0(4)
C(6)-N(1)-C(5)	119.0(4)
C(7)-N(2)-C(6)	126.1(4)
C(6)-N(3)-C(12)	122.6(4)
C(13)-N(4)-C(14)	124.0(4)
O(1)-C(1)-C(2)	111.3(4)
O(1)-C(1)-C(4)	102.4(4)
C(2)-C(1)-C(4)	110.8(4)
O(1)-C(1)-C(3)	110.3(4)
C(2)-C(1)-C(3)	112.5(4)
C(4)-C(1)-C(3)	109.1(4)
O(2)-C(5)-O(1)	123.4(5)
O(2)-C(5)-N(1)	129.7(5)
O(1)-C(5)-N(1)	106.9(4)
N(1)-C(6)-N(3)	118.7(4)
N(1)-C(6)-N(2)	123.3(4)
N(3)-C(6)-N(2)	118.0(4)
O(3)-C(7)-O(4)	127.9(4)
O(3)-C(7)-N(2)	125.7(4)
O(4)-C(7)-N(2)	106.4(4)
O(4)-C(8)-C(11)	109.8(4)
O(4)-C(8)-C(9)	101.5(4)
C(11)-C(8)-C(9)	111.5(4)
O(4)-C(8)-C(10)	109.7(4)
C(11)-C(8)-C(10)	113.4(4)
C(9)-C(8)-C(10)	110.3(4)
N(3)-C(12)-C(13)	107.5(4)
O(5)-C(13)-N(4)	123.5(5)
O(5)-C(13)-C(12)	122.7(4)
N(4)-C(13)-C(12)	113.8(4)
C(15)-C(14)-N(4)	129.1(5)
C(15)-C(14)-C(16)	106.7(4)
N(4)-C(14)-C(16)	124.2(4)
C(14)-C(15)-O(6)	109.3(4)
C(17)-C(16)-C(14)	107.1(4)
C(16)-C(17)-O(6)	110.6(4)
C(16)-C(17)-C(18)	133.0(5)
O(6)-C(17)-C(18)	116.4(4)

O(7)-C(18)-O(8)	124.9(5)
O(7)-C(18)-C(17)	125.6(5)
O(8)-C(18)-C(17)	109.4(4)
O(9)-S(1)-C(21)	106.1(2)
O(9)-S(1)-C(20)	106.3(2)
C(21)-S(1)-C(20)	98.0(2)

III Anhang

1 Abkürzungsverzeichnis

Boc	<i>tert</i> -Butylcarbamat
Carb	Carboxy
DCM	Dichlormethan
dDNA	doppelsträngige DNA
DIPEA	<i>N,N</i> -Diisopropyl- <i>N</i> -ethylamin
DMAP	<i>N,N</i> -Dimethylaminopyridin
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
Dp	3-(Dimethylamino)-1-propylamin
EDCI	<i>N</i> -(3-Dimethylaminopropyl)- <i>N'</i> -ethylcarbodiimid-Hydrochlorid
EI	Elektronenstoßionisation
ESI	Elektrosprayionisation
EtOAc	Ethylacetat
f	Formyl
FAB	<i>fast atom bombardement</i>
FT-ICR-MS	Fourier-Transform-Ionen-Zyklotron-Massenspektrometrie
Fu	4-Aminofuran-2-carbonsäure
Gua	Guanidino
HOBt	Hydroxybenzotriazol
Hp	3-Hydroxy- <i>N</i> -methylpyrrol
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
Im	4-Aminoimidazol-2-carbonsäure
IR	Infrarotspektroskopie
<i>J</i>	Kopplungskonstante
Meoc	Methylcarbamat
MeOH	Methanol
MS	Massenspektrometrie
NMR	<i>nuclear magnetic resonance</i> (Kernspinresonanz)
Py	4-Amino- <i>N</i> -methylpyrrol-2-carbonsäure

RT	Raumtemperatur
TEA	Triethylamin
THF	Tetrahydrofuran
δ	chemische Verschiebung

2 Literaturverzeichnis

1. Steinhilber, D.; Schubert-Zsilavecz, M.; Roth, H. J. *Medizinische Chemie*; Deutscher Apotheker Verlag Stuttgart: Stuttgart, **2005**.
2. Fischer, E. *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft* **1894**, 27, 2985-2993.
3. Koshland, D. E. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1958**, 44, 98-104.
4. Böhm, H.-J.; Klebe, G.; Kubinyi, H. *Wirkstoffdesign*; Spektrum Akademischer Verlag: Heidelberg, Berlin, Oxford, **1996**.
5. Koolman, J.; Röhm, K.-H. *Taschenatlas der Biochemie*; Georg Thieme Verlag: Stuttgart, **2003**.
6. Silverman, R. B. *The Organic Chemistry of Drug Design and Drug Action*; Elsevier Academic Press: Burlington, San Diego, London, **2004**.
7. Waksman, S. A.; Woodruff, H. B. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **1940**, 45, 609-614.
8. Schulte, G. Z. *Krebsforschung* **1952**, 58, 500-503.
9. Adair, F. E.; Bagg, H. J. *Ann. Surg.* **1931**, 93, 190-199.
10. Gilman, A.; Philips, F. S. *Science* **1946**, 103, 409-15,436.
11. Finlay, A. C.; Hochstein, F. A.; Sobin, B. A.; Murphy, F. X. *J. Am. Chem. Soc.* **1951**, 73, 341-343.
12. Julia, M.; Preau-Joseph, N. *Bull. Soc. Chim. Fr.* **1967**, 4348-4356.
13. Arcamone, F.; Penco, S.; Orezzi, P.; Nicolella, V.; Pirelli, A. *Nature* **1964**, 203, 1064-1065.
14. Berman, H. M.; Neidle, S.; Zimmer, C.; Thrum, H. *Biochim. Biophys. Acta, Nucl. Acids Prot. Synth.* **1979**, 561, 124-131.
15. Bailly, C.; Chaires, J. B. *Bioconjugate Chem.* **1998**, 9, 513-538.
16. Dervan, P. B.; Edelson, B. S. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2003**, 13, 284-299.
17. Reddy, B. S. P.; Sondhi, S. M.; Lown, J. W. *Pharmacology & Therapeutics* **1999**, 84, 1-111.
18. Wemmer, D. E. *Biopolymers* **1999**, 52, 197-211.
19. Zimmer, C.; Wahnert, U. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **1986**, 47, 31-112.
20. Zimmer, C.; Puschendorf, B.; Grunicke, H.; Chandra, P.; Venner, H. *Eur. J. Biochem.* **1971**, 21, 269-278.

-
21. Hahn, F. E. In *Antibiotics*; Corcoran, J. W.; Hahn, F. E. Eds.; Springer: New York, **1975**; pp. 79.
 22. Lown, J. W. *J. Mol. Recognit.* **1994**, *7*, 79-88.
 23. Takeda, Y.; Ohlendorf, D. H.; Anderson, W. F.; Matthews, B. W. *Science* **1983**, *221*, 1020-1026.
 24. Neidle, S. *Nat. Prod. Rep.* **2001**, *18*, 291-309.
 25. Kopka, M. L.; Yoon, C.; Goodsell, D.; Pjura, P.; Dickerson, R. E. *J. Mol. Biol.* **1985**, *183*, 553-563.
 26. Patel, D. J. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1982**, *79*, 6424-6428.
 27. Mikheikin, A. L.; Zhuze, A. L.; Zasedatelev, A. S. *J. Biomol. Struct. Dyn.* **2001**, *19*, 175-178.
 28. Dervan, P. B.; Poulin-Kerstien, A. T.; Fechter, E. J.; Edelson, B. S. *Topics in Current Chemistry* **2005**, *253*, 1-31.
 29. Pelton, J. G.; Wemmer, D. E. *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 1393-1399.
 30. Pelton, J. G.; Wemmer, D. E. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1989**, *86*, 5723-5727.
 31. Rentzeperis, D.; Marky, L. A.; Dwyer, T. J.; Geierstanger, B. H.; Pelton, J. G.; Wemmer, D. *Biochemistry* **1995**, *34*, 2937-2945.
 32. Lah, J.; Vesnaver, G. *J. Mol. Biol.* **2004**, *342*, 73-89.
 33. Dyke, M. W. V.; Hertzberg, R. P.; Dervan, P. B. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1982**, *79*, 5470-5474.
 34. Wemmer, D. E. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **2000**, *29*, 439-461.
 35. Dervan, P. B. *Science* **1986**, *232*, 464-471.
 36. Youngquist, R. S.; Dervan, P. B. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1985**, *82*, 2565-2569.
 37. Goodsell, D.; Dickerson, R. E. *J. Med. Chem.* **1986**, *29*, 727-733.
 38. Youngquist, R. S.; Dervan, P. B. *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, *109*, 7564-7566.
 39. Zakrzewska, K.; Pullman, B. *J. Biomol. Struct. Dyn.* **1988**, *5*, 1043-1058.
 40. Zakrzewska, K.; Randrianarivelo, M.; Pullman, B. *J. Biomol. Struct. Dyn.* **1988**, *6*, 331-344.
 41. Bailly, C.; Waring, M. J. *Nucl. Acids Res.* **1995**, *23*, 885-892.
 42. Waring, M. J.; Bailly, C. *Gene* **1994**, *149*, 69-79.
-

-
43. Kopka, M. L.; Yoon, C.; Goodsell, D.; Pjura, P.; Dickerson, R. E. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1985**, *82*, 1376-1380.
 44. Lown, J. W.; Krowicki, K.; Bhat, U. G.; Skorobogaty, A.; Ward, B.; Dabrowiak, J. C. *Biochemistry* **1986**, *25*, 7408-7416.
 45. Lown, J. W. *Anti-Cancer Drug Design* **1988**, *3*, 25-40.
 46. Rao, K. E.; Shea, R. G.; Yadagiri, B.; Lown, J. W. *Anti-Cancer Drug Design* **1990**, *5*, 3-20.
 47. Geierstanger, B. H.; Mrksich, M.; Dervan, P. B.; Wemmer, D. E. *Science* **1994**, *266*, 646-650.
 48. Mrksich, M.; Parks, M. E.; Dervan, P. B. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 7983-7988.
 49. Dervan, P. B.; Doss, R. M.; Marques, M. A. *Curr. Med. Chem. Anticancer Agents* **2005**, *5*, 373-387.
 50. Dervan, P. B. *Bioorg. Med. Chem.* **2001**, *9*, 2215-2235.
 51. Kielkopf, C. L.; Baird, E. E.; Dervan, P. B.; Rees, D. C. *Nat. Struct. Biol.* **1998**, *5*, 104-109.
 52. Jeffrey, G. A. *An Introduction to Hydrogen Bonding*; Oxford University Press: New York, **1997**.
 53. White, S.; Szewczyk, J. W.; Turner, J. M.; Baird, E. E.; Dervan, P. B. *Nature* **1998**, *391*, 468-471.
 54. Kielkopf, C. L.; White, S.; Szewczyk, J. W.; Turner, J. M.; Baird, E. E.; Dervan, P. B.; Rees, D. C. *Science* **1998**, *282*, 111-115.
 55. Trauger, J. W.; Baird, E. E.; Dervan, P. B. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 3534-3535.
 56. Turner, J. M.; Swalley, S. E.; Baird, E. E.; Dervan, P. B. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 6219-6226.
 57. Marques, M. A.; Doss, R. M.; Urbach, A. R.; Dervan, P. B. *Helv. Chim. Acta* **2002**, *85*, 4485-4517.
 58. Nguyen, D. H.; Szewczyk, J. W.; Baird, E. E.; Dervan, P. B. *Bioorg. Med. Chem.* **2001**, *9*, 7-17.
 59. Marques, M. A.; Doss, R. M.; Foister, S.; Dervan, P. B. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 10339-10349.
 60. Renneberg, D.; Dervan, P. B. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 5707-5716.
 61. Briehn, C. A.; Weyermann, P.; Dervan, P. B. *Chem. Eur. J.* **2003**, *9*, 2110-2122.
-

-
62. Best, T. P.; Edelson, B. S.; Nickols, N. G.; Dervan, P. B. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2003**, *100*, 12063-12068.
63. Gottesfeld, J. M.; Neely, L.; Trauger, J. W.; Baird, E. E.; Dervan, P. B. *Nature* **1997**, *387*, 202-205.
64. Fiedler, H. P.; Bruntner, C.; Riedlinger, J.; Bull, A. T.; Knutsen, G.; Goodfellow, M.; Jones, A.; Maldonado, L.; Pathom-Aree, W.; Beil, W.; Schneider, K.; Keller, S.; Sussmuth, R. D. *J. Antibiot.* **2008**, *61*, 158-163.
65. Bister, B.; Bischoff, D.; Ströbele, M.; Riedlinger, J.; Reicke, A.; Wolter, F.; Bull, A. T.; Zahner, H.; Fiedler, H. P.; Sussmuth, R. D. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 2574-2576; *Angew. Chem.* **2004**, *116*, 2628-2630.
66. Riedlinger, J.; Reicke, A.; Zahner, H.; Krismer, B.; Bull, A. T.; Maldonado, L. A.; Ward, A. C.; Goodfellow, M.; Bister, B.; Bischoff, D.; Sussmuth, R. D.; Fiedler, H. P. *J. Antibiot.* **2004**, *57*, 271-279.
67. Schneider, K.; Keller, S.; Wolter, F. E.; Roeglin, L.; Beil, W.; Seitz, O.; Nicholson, G.; Bruntner, C.; Riedlinger, J.; Fiedler, H. P.; Sussmuth, R. D. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 3258-3261; *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 3302-3305.
68. Schneider, K. *Dissertation*, TU Berlin, **2008**.
69. Lee, M.; Krowicki, K.; Shea, R. G.; Lown, J. W.; Pon, R. T. *J. Mol. Recognit.* **1989**, *2*, 84-93.
70. Baird, E. E.; Dervan, P. B. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 6141-6146.
71. Boger, D. L.; Fink, B. E.; Hedrick, M. P. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 6382-6394.
72. Grehn, L.; Ragnarsson, U. *J. Org. Chem.* **1981**, *46*, 3492-3497.
73. Poot, M.; Hiller, K. H.; Heimpel, S.; Hoehn, H. *Exp. Cell Res.* **1995**, *218*, 326-330.
74. Stevenson, H. B.; Johnson, J. R. *J. Am. Chem. Soc.* **1937**, *59*, 2525-2532.
75. Bodor, N.; Dewar, M. J. S.; Harget, A. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1970**, *92*, 2929-2936.
76. Green, T. W.; Wuts, P. G. *Protective Groups in Organic Synthesis*; John Wiley & Sons, Inc.: New York, Chichester, Weinheim, Brisbane, Toronto, Singapore, **1999**.
77. Lipshutz, B. H. *Chem. Rev.* **1986**, *86*, 795-819.
78. Keay, B. A.; Dibble, P. W. *Comprehensive Heterocyclic Chemistry II* **1996**, *2*, 395-436.
-

-
79. Lee, H. K.; Chan, K. F.; Hui, C. W.; Yim, H. K.; Wu, X. W.; Wong, H. N. C. *Pure Appl. Chem.* **2005**, *77*, 139-143.
80. Maier, M. E. *Nachrichten aus Chemie, Technik und Laboratorium* **1993**, *41*, 696, 698-702, 704.
81. Piancatelli, G.; D'Auria, M.; D'Onofrio, F. *Synthesis* **1994**, 867-889.
82. Kirsch, S. F. *Org. Biomol. Chem.* **2006**, *4*, 2076-2080.
83. Keay, B. A. *Chem. Soc. Rev.* **1999**, *28*, 209-215.
84. Jeevanandam, A.; Ghule, A.; Ling, Y. C. *Curr. Org. Chem.* **2002**, *6*, 841-864.
85. Hou, X. L.; Cheung, H. Y.; Hon, T. Y.; Kwan, P. L.; Lo, T. H.; Tong, S. Y.; Wong, H. N. C. *Tetrahedron* **1998**, *54*, 1955-2020.
86. Gilchrist, T. L. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1999**, 2849-2866.
87. Brown, R. C. D. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 850-852.
88. Bures, E.; Spinazze, P. G.; Beese, G.; Hunt, I. R.; Rogers, C.; Keay, B. A. *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 8741-8749.
89. Bures, E.; Nieman, J. A.; Yu, S.; Spinazze, P. G.; Bontront, J. L. J.; Hunt, I. R.; Rauk, A.; Keay, B. A. *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 8750-8759.
90. Karpov, A. S.; Merkul, E.; Oeser, T.; Muller, T. J. J. *Chem. Commun.* **2005**, 2581-2583.
91. Amarnath, V.; Amarnath, K. *J. Org. Chem.* **1995**, *60*, 301-307.
92. Koenig, H.; Graf, F.; Weberndorfer, V. *Liebigs Annalen der Chemie* **1981**, 668-682.
93. Levin, J. I.; Laakso, L. M. *Chem. Heterocycl. Compd.* **2003**, *60*, 417-472.
94. Eicher, T.; Hauptmann, S.; Speicher, A. In *The Chemistry of Heterocycles; Five-Membered Heterocycles*. Wiley-VCH GmbH & Co. KGaA: Weinheim, **2003**; pp. 52-221.
95. Chiarello, J.; Joulliø, M. M. *Tetrahedron* **1988**, *44*, 41-48.
96. Bock, I.; Bornowski, H.; Ranft, A.; Theis, H. *Tetrahedron* **1990**, *46*, 1199-1210.
97. Nolan, S. M.; Cohen, T. *J. Org. Chem.* **1981**, *46*, 2473-2476.
98. Tanis, S. P.; Head, D. B. *Tetrahedron Lett.* **1984**, *25*, 4451-4454.
99. Goldsmith, D.; Liotta, D.; Saindane, M.; Waykole, L.; Bowen, P. *Tetrahedron Lett.* **1983**, *24*, 5835-5838.
100. Nieman, J. A.; Keay, B. A. *Tetrahedron Lett.* **1994**, *35*, 5335-5338.
-

-
101. Wong, M. K.; Leung, C. Y.; Wong, H. N. C. *Tetrahedron* **1997**, *53*, 3497-3512.
 102. Lee, G. C. M.; Holmes, J. M.; Harcourt, D. A.; Garst, M. E. *J. Org. Chem.* **1992**, *57*, 3126-3131.
 103. Williams, D. H.; John Faulkner, D. *Tetrahedron* **1996**, *52*, 4245-4256.
 104. Zwicky, G.; Waser, P. G.; Eugster, C. H. *Helv. Chim. Acta* **1959**, *42*, 1177-1189.
 105. Burkhart, J. P.; Holbert, G. W.; Metcalf, B. W. *Tetrahedron Lett.* **1984**, *25*, 5267-5270.
 106. Adams, J. L., Holbert, Gene W., Metcalf, Brian W., Burkhart, Joseph P., and Lippert, Bruce J. Merrel Dow Pharmaceuticals Inc., EP-0145875, **1985**.
 107. Rubottom, G. M.; Marrero, R. *Synth. Commun.* **1981**, *11*, 505-511.
 108. Ainsworth, C.; Chen, F.; Kuo, Y.-N. *J. Organomet. Chem.* **1972**, *46*, 59-71.
 109. Rubottom, G. M.; Gruber, J. M.; Marrero, R.; Juve, H. D.; Kim, C. W. *J. Org. Chem.* **1983**, *48*, 4940-4944.
 110. Brands, K. M. J.; Meekel, A. P.; Pandit, U. K. *Tetrahedron* **2008**, *47*, 2005-2026.
 111. Takeshi, Kitahara and Shusuke, Watanabe Ajinomoto KK, JP2002060382, **2002**.
 112. Smith, M. B.; March, J. In *March's Advanced Organic Chemistry: reactions, mechanisms, and structure*; Rearrangements. John Wiley & Sons, Inc.: New York, Chichester, Weinheim, Brisbane, Singapore, Toronto, **2001**; pp. 1377-1505.
 113. Bal, B. S.; Childers, W. E.; Pinnick, H. W. *Tetrahedron* **1981**, *37*, 2091-2096.
 114. Curtius, T. *Journal für Praktische Chemie* **1894**, *50*, 275-294.
 115. Ninomiya, K.; Shioiri, T.; Yamada, S. *Tetrahedron* **1974**, *30*, 2151-2157.
 116. Shioiri, T.; Ninomiya, K.; Yamada, S. *J. Am. Chem. Soc.* **1972**, *94*, 6203-6205.
 117. Green, T. W.; Wuts, P. G. In *Protective Groups in Organic Synthesis*; Protection for the amino group. John Wiley & Sons, Inc.: New York, Chichester, Weinheim, Brisbane, Toronto, Singapore, **1999**; pp. 494-653.
 118. Zhang, Y.; Chen, F. X.; Mehta, P.; Gold, B. *Biochemistry* **1993**, *32*, 7954-7965.
 119. Pinner, A.; Klein, Fr. *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft* **1877**, *10*, 1889-1897.
 120. Pinner, A.; Klein, Fr. *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft* **1878**, *11*, 1475-1487.
-

-
121. Pinner, A. *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft* **1883**, 16, 1643-1655.
122. Roger, R.; Neilson, D. G. *Chem. Rev.* **1961**, 61, 179-211.
123. Taylor, J. S.; Schultz, P. G.; Dervan, P. B. *Tetrahedron* **1984**, 40, 457-465.
124. Yamamoto, Y.; Kimachi, T.; Kanaoka, Y.; Kato, S.; Bessho, K.; Matsumoto, T.; Kusakabe, T.; Sugiura, Y. *Tetrahedron Lett.* **1996**, 37, 7801-7804.
125. Cork, D.; Hird, N. *Drug Discovery Today* **2002**, 7, 56-63.
126. Booth, R. J.; Hodges, J. C. *Acc. Chem. Res.* **1999**, 32, 18-26.
127. Eames, J.; Watkinson, M. *Eur. J. Org. Chem.* **2001**, 1213-1224.
128. Novabiochem, *Polymer Supported Reagents 2008/2009*, **2008**.
129. Barlos, K.; Gatos, D.; Kallitsis, J.; Papaphotiu, G.; Sotiriu, P.; Wenqing, Y.; Schäfer, W. *Tetrahedron Lett.* **1989**, 30, 3943-3946.
130. Hoekstra, W. J. *Curr. Med. Chem.* **2001**, 8, 715-719.
131. Weidner, J. J.; Parlow, J. J.; Flynn, D. L. *Tetrahedron Lett.* **1999**, 40, 239-242.
132. Lown, J. W.; Krowicki, K. *J. Org. Chem.* **1985**, 50, 3774-3779.
133. Addicks, E.; Mazitschek, R.; Giannis, A. *ChemBioChem* **2002**, 3, 1078-1088.
134. Berlinck, R. G. S.; Kossuga, M. H.; Nascimento, A. M. *Science of Synthesis* **2005**, 18, 1077-1116.
135. Suhs, T.; Koenig, B. *Mini-Rev. Org. Chem.* **2006**, 3, 315-331.
136. Feichtinger, K.; Zapf, C.; Sings, H. L.; Goodman, M. *J. Org. Chem.* **1998**, 63, 3804-3805.
137. Staab, H. A. *Justus Liebigs Annalen der Chemie* **1957**, 609, 75-83.
138. Staab, H. A. *Chem. Ber.* **1962**, 95, 1275-1283.
139. Paul, R.; Anderson, G. W. *J. Am. Chem. Soc.* **1960**, 82, 4596-4600.
140. *Anfärbereagenzien für Dünnschicht- und Papier-Chromatographie*; E. Merck: Darmstadt, **1970**.
141. Leonard, J.; Lygo, B.; Procter, G. *Advanced Practical Organic Chemistry*; Nelson Thornes Ltd: Cheltenham, **1998**.
142. Becker, H. G. O.; Domschke, G.; Fanghänel, E.; Fischer, M.; Gewald, K.; Mayer, R.; Pavel, D.; Schmidt, H.; Schwetlick, K. *Organikum*; VEB Deutscher Verlag der Wissenschaften: Berlin, **1986**.
143. Gottlieb, H. E.; Kotlyar, V.; Nudelman, A. *J. Org. Chem.* **1997**, 62, 7512-7515.
-

144. Grever, M. R.; Schepartz, S. A.; Chabner, B. A. *Sem. Oncol.* **1992**, 19, 622-638.
145. Müller, M.; Strand, S.; Hug, H.; Heinemann, E. M.; Walczak, H.; Hofmann, W. J.; Stremmel, W.; Krammer, P. H.; Galle, P. R. *J. Clin. Invest.* **1997**, 99, 403-413.