

**Therapeutisch relevante ^{14}NO - und ^{15}NO - Donoren mit
Sydnonimin und *S*-Nitrosothiol-Struktur**

-

**Untersuchungen zur Synthese, Biotransformation und
biologischen Aktivität**

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

Tong Zhang

aus Tianjin (China)

Bonn 2002

Inhaltsverzeichnis

A	Einleitung	1
1	NO und NO-Donoren	1
1.1	„Entdeckung“ und biologische Eigenschaften von Stickstoffmonoxid (NO).....	1
1.2	Molekulare Quellen von NO (NO-Donoren).....	3
1.3	Therapeutische Anwendungsmöglichkeiten von NO-Donoren.....	5
1.4	Molsidomin – Therapeutische Anwendung, Synthese und Biotransformation.....	8
1.5	Nachweis von NO mittels Laser-Magnet-Resonanz-Spektroskopie.....	9
1.6	Nitrosothiole – Therapeutische Anwendung, Synthese und Biotransformation..	11
1.7	NO- und S-Nitrosothiol-Hybridmoleküle.....	13
2	Themenstellung	15
2.1	Synthese ¹⁵ N-markierter NO-Donoren.....	15
2.2	<i>In vivo</i> -Untersuchungen: ¹⁵ NO- Messung in der Ausatemluft nach Einnahme des synthetisierten ¹⁵ N-Molsidomin.....	17
2.3	S-Nitrosothiole - Untersuchung zur Nitrosierung strukturell unterschiedlicher Thiole.....	18
2.4	Synthese von Nitrosothiol-Hybridmoleküle.....	19
B	Allgemeiner Teil	25
1	Synthese und Charakterisierung von ¹⁵N-S-Nitroso-N-acetyl-penicillamin (¹⁵N-SNAP)	25
1.1	Literaturübersicht.....	25
1.2	Synthese von ¹⁴ N-SNAP.....	26

1.3	Synthese von ^{15}N -SNAP	27
1.4	Auswertung und Vergleich der spektroskopischen Daten	27
2	Synthese und Charakterisierung von ^{15}N-Molsidomin	30
2.1	Literaturbekanntes zur Synthese von ^{14}N -Molsidomin	30
2.2	Synthese von ^{14}N -SIN-1 und ^{14}N -Molsidomin.....	31
2.3	Synthese von ^{15}N -SIN-1 und ^{15}N -Molsidomin.....	32
2.4	Massenspektrometrie.....	33
2.5	Qualitätskontrolle	37
2.6	Herstellung von ^{15}N -Molsidomin-Kapseln zur Einnahme im Selbstversuch	38
3	Darstellung von Nitrosothiolen durch Nitrosierung	38
3.1	Anorganisches Nitrit als Nitrosierungsreagenz.....	40
3.2	Versuche zur Darstellung und Isolierung von <i>DL</i> - <i>S</i> -Nitroso- mercaptobernsteinsäure.....	41
3.3	Versuche zur Darstellung und Isolierung von <i>S</i> -Nitroso-2-mercaptobenzoessäure..	42
3.4	Versuche zur Darstellung und Isolierung von <i>S</i> -Nitroso-2-mercaptobenzimidazol	43
3.5	Versuche zur Darstellung und Isolierung von <i>S</i> -Nitroso-8-mercaptomenthon....	44
3.6	Versuche zur Darstellung von <i>S</i> -Nitroso-cystein.....	45
4	Nitrosothiol-β-Blocker-Hybridmoleküle	46
4.1	NO- β -Blocker – Konzept und Beispiele	46
4.1.1	Umsetzung von Propranolol mit <i>N</i> -Acetylpenicillamin.....	47
4.1.2	Darstellung von <i>N</i> -(2,2-Dimethyl-4-oxothietan-3-yl)-acetamid.....	51
4.1.3	Umsetzung des Thiolactons (3-Acetamido-4,4-dimethylthietan-2-on) mit Benzylamin	53
4.1.4	<i>S</i> -Nitrosierung zu <i>N</i> ² -acetyl- <i>N</i> ¹ -benzyl-3-(nitrosothio)valinamide.....	54
4.1.5	Umsetzung des Thiolactons mit Norephedrin.....	57
4.1.6	Umsetzung des Thiolactons mit <i>N</i> -Benzylmethylamin	57
4.1.7	Umsetzung des Thiolactons mit Propranolol	58

4.1.8 Versuch zur <i>S</i> -Nitrosierung des Umsetzungsproduktes aus Thiolacton und Propanolol – Versuch zur Synthese von 2-Acetylamino- <i>N</i> -[1-hydroxy-2-(naphth-1-yloxy)-ethyl]- <i>N</i> -isopropyl-3-nitrosothiol-3-methylbutylamid (68).....	59
5 Nitrosothiol-NSAID-Hybridmoleküle	60
5.1 NO-NSAIDs – Konzept und Beispiele	60
5.2 Synthese von Nitrosothiol-Ibuprofen-Hybridmolekül.....	62
5.2.1 Versuche zur <i>N</i> -Acylierung von Penicillamin mit Ibuprofensäurechlorid und <i>S</i> -Nitrosierung des Produktes	62
5.3 <i>N</i> -Acylierung von Penicillaminmethylester mit Ibuprofensäurechlorid.....	63
5.3.1 <i>S</i> -Nitrosierung von 2-[2-(4-Isobutyl-phenyl)-propionylamino]-3-mercapto-3-methyl-butansäure-methylester mit Natriumnitrit	65
5.4 Synthese von Methyl- <i>N</i> -[2-(6-methoxy-2-naphthyl)propanoyl]-3-(nitrosothio)valinat, ein Nitrosothiol-Naproxen-Hybridmolekül.....	67
5.4.1 Veresterung von (<i>S</i> / <i>R</i>)-Penicillamin	67
5.4.2 Veresterung mit konz. Schwefelsäure/Alkohol	67
5.4.3 <i>N</i> -Acylierung von (<i>S</i>)- oder (<i>S</i> / <i>R</i>)-Penicillaminmethylester mit Naproxensäurechlorid	68
5.4.4 (<i>S</i>)-Nitrosierung von Methyl- <i>N</i> -[2-(6-methoxy-2-naphthyl)propanoyl]-3-mercaptovalinat.....	73
6 Nitrosothiol-Antibiotikum-Hybridmoleküle	79
6.1 NO-Antibiotika – Konzept und Beispiele	79
6.1.1 Umsetzung des Thiolactons mit Phenyl-piperazin – Synthese von <i>N</i> -[2-Mercapto-2-methyl-1-(4-phenyl-piperazin-1-carbonyl)-propyl]-acetamid	80
6.1.2 <i>S</i> -Nitrosierung zu <i>N</i> -[2-Nitrosothiol-2-methyl-1-(4-phenyl-piperazin-1-carbonyl)-propyl]-acetamid.....	81
6.1.3 Umsetzung des Thiolactons 27 mit Ciprofloxacin – Synthese von 7-[4-(2-Acetylamino-3-mercapto-3-methyl-butyryl)-piperazin-1-yl]-1-cyclopropyl-6-fluoro-4-oxo-1,4-dihydro-quinolin-3-carbonsäure	83
6.1.4 <i>S</i> -Nitrosierung von 70 zu 7-[4-(2-Acetylamino-3-nitrosothiol-3-methyl-butyryl)-piperazin-1-yl]-1-cyclopropyl-6-fluoro-4-oxo-1,4-dihydro-quinolin-3-carbonsäure.....	84
C Pharmakologischer Teil	86
1 ¹⁵NO-Freisetzung in der Ausatemluft und im Plasma nach Einnahme von ¹⁵N-Molsidomin im Selbstversuch	86

1.1	Herstellung von ^{15}N -Molsidomin-Kapseln	88
1.2	Einnahme und Messungen	88
1.3	Ergebnisse und Diskussion	89
2	Biologische Untersuchung von NO-NSAIDs-Hybridmolekülen <i>in vivo</i>	94
3	Biologische Untersuchung des NO-Ciprofloxacin-Hybridmoleküls <i>in vitro</i>	97
3.1	Methode.....	98
3.2	Ergebnisse und Diskussion	99
D	Zusammenfassung	100
E	Experimenteller Teil	105
1	Abkürzungsverzeichnis	105
2	Analysengeräte und Methoden	106
2.1	Schmelzpunktbestimmung	106
2.2	Chromatographie.....	106
2.3	Elementaranalysen	106
2.4	IR-Spektren	107
2.5	Kernresonanzspektren	107
2.6	Massenspektren.....	107
3	Allgemeine Arbeitsvorschriften (AAV)	107
4	Monographien	110
F	Literaturverzeichnis	162

A Einleitung

1 NO und NO-Donoren

1.1 „Entdeckung“ und biologische Eigenschaften von Stickstoffmonoxid (NO)

Schon lange bevor man das molekulare Wirkprinzip der organischen Nitrate erkannte, wurden diese weltweit in großem Umfang zur Therapie eingesetzt. Erst 1980 hat die Gruppe von *Robert F. Furchgott*, New York¹ durch Zufall herausgefunden, dass, wenn man auf mechanischem Wege die innenliegende Schicht der Endothelzellen entfernt, normalerweise vasodilatierende Stoffe, wie Acetylcholin, Peptide, Adeninnucleotide u.a., die Blutgefäße nicht dilatieren. Es musste einen *endothelium derived relaxing factor* (EDRF) geben, der in der Endothelzellschicht gebildet wird, in die umgebende glatte Gefäßmuskulatur einströmt und dort die Dilatation auslöst.

1987 schließlich wurde EDRF durch die Arbeitsgruppen von *Salvador Moncada*, London,² und *Lou Ignarro*, Los Angeles,³ als Stickstoffmonoxid erkannt. Das kurzlebige, gasförmige Radikal NO ist ein natürlicher, körpereigener Vasodilatator, der endogen aus der Aminosäure *L*-Arginin durch Redoxprozesse, katalysiert durch NO-Synthasen (hier die endotheliale eNOS), freigesetzt wird.



Das gasförmige NO diffundiert physikalisch in die glatte Gefäßmuskulatur, stimuliert dort die lösliche Guanylatcyclase, an deren Häm-Eisen es sich unter Änderung der Komplexgeometrie anlagert. Dies führt zu einem Anstieg an cyclischem GMP. Über weitere Signaltransduktionsvorgänge wird dann schließlich die Relaxation ausgelöst. Die Weitstellung von Blutgefäßen durch NO ist also ein schneller, lokaler Vorgang, ausgelöst durch mechanische Reize des durch ein zu enges Gefäß fließenden Blutes („shear stress“).

Inzwischen weiß man, dass die physiologische und pathophysiologische Bedeutung von NO weit über die Regelung des Gefäßtonus hinausgeht. Abb.1⁴ gibt einen Überblick über physiologisch ablaufenden Reaktionen und Umsetzungsprodukte von NO.

1.2 Molekulare Quellen von NO (NO-Donoren)

Der Mechanismus der NO-Freisetzung aus NO-Donoren – chemischen Verbindungen, aus denen NO entstehen kann - ist spontan oder von Katalysatoren und Enzymen abhängig. Im Gegensatz zur relativ kurzlebigen pharmakologischen Wirkung des NO-Gases hält jene der NO-Donoren, in Abhängigkeit vom Bildungsmechanismus, länger an.

Die am längsten bekannten NO-Donoren sind die organischen Nitrate. Sie werden schon seit über 100 Jahren zur Therapie der koronaren Herzkrankheit verwendet. Dass ihr Wirkprinzip das durch Reduktion entstehende NO ist, weiss man jedoch erst seit 1987.⁵ Weitere NO-Donoren aus dem aktuellen Arzneimittelangebot sind lediglich Molsidomin und in Einzelfällen Nitroprussid-Natrium (SNP). Zu den inzwischen entdeckten zahlreichen und vielfältigen biologischen Funktionen des NO-Radikals gehört, zu denen nicht nur Vasodilatation (Konzentration von ca. 400 nM), sondern auch z.B. Aggregationshemmung der Thrombozyten, Adhäsionshemmung der Leukozyten, Neurotoxizität nach Bildung von Peroxinitrit (bei Apoplex), neuroprotektive Wirkung durch S-Nitrosylierung von Proteinen, unspezifische Abwehr von Tumorzellen und Bakterien (Konzentrationen bis 40 000 nM) gehören, ganz allgemein auch die Beeinflussung von Rezeptoren und Enzymen durch Nitrosierung der Cystein-Bausteine. Im Missverhältnis dazu steht die geringe Zahl an zudem noch „alten“, in Unkenntnis ihres Wirkmechanismus entwickelten NO-Pharmaka. Auf der Suche nach neuen Wirkstoffen, d.h. molekularen Alternativen zur enzymkatalysierten oder auch spontanen, von einer metabolischen Reduktion unabhängigen Freisetzung von NO kommt man zu vielfältigen Forschungsergebnissen. Alle Substanzen, die in

Abb. 2 dargestellt sind, stimulieren die lösliche Guanylatcyclase und wirken vasodilatierend und teilweise auch sehr gut antithrombotisch.⁶

Auf Grund ihrer Toxizität werden die meisten dieser Substanzen nicht als Arzneimittel zum Einsatz kommen. Wie oben erwähnt, werden die Nicht-Nitrat-NO-Donoren, abgesehen von Molsidomin und SNP, bislang noch nicht in der allgemeinen Therapie verwendet. Betrachtet man allerdings die aktuelle Patentliteratur, so zeigt sich immerhin, dass die Verwendung von reinem NO, von Nitrosothiolen und von Diazoniumdiolaten gute Perspektiven zu versprechen scheint.

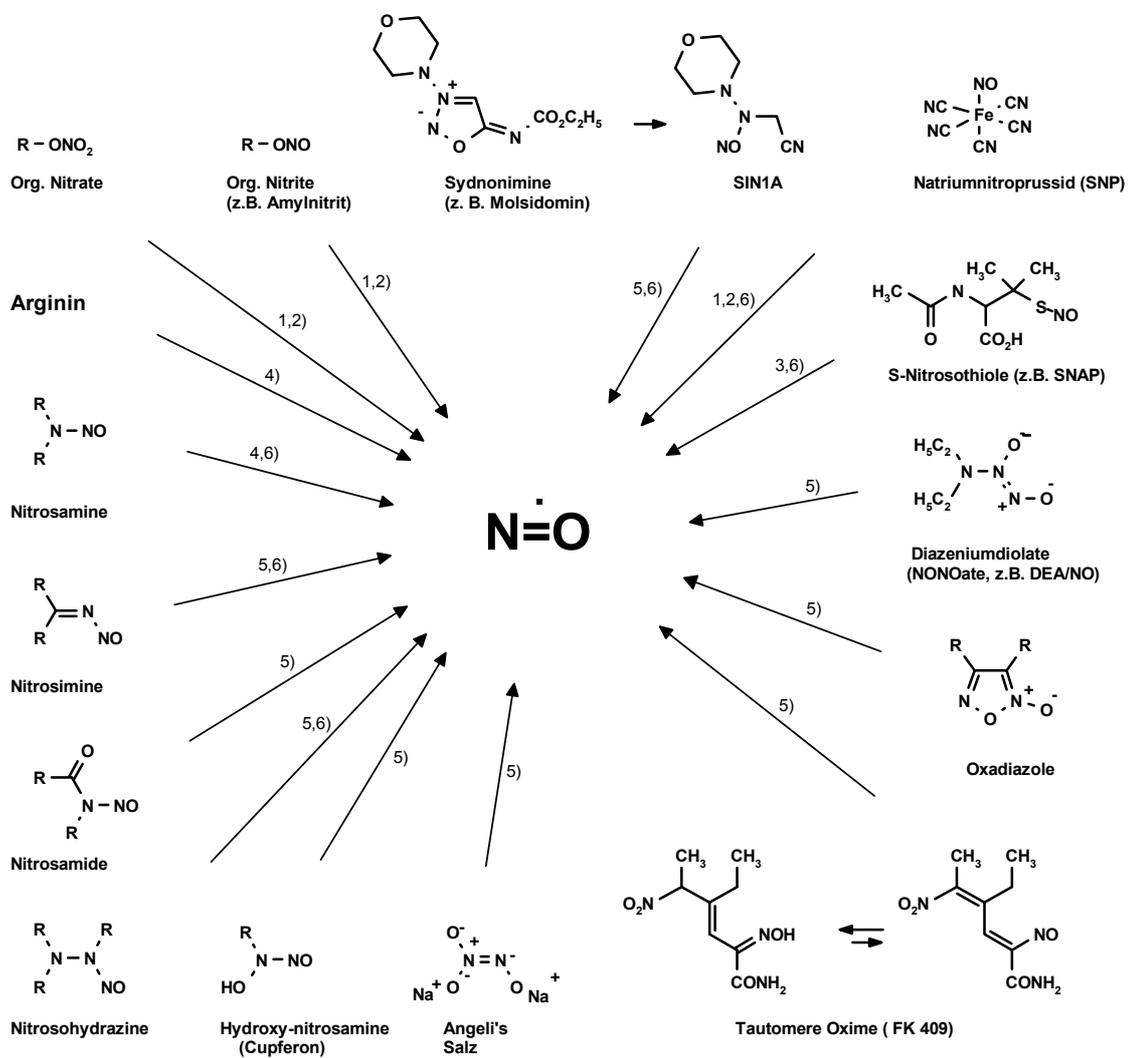
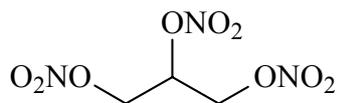


Abb. 2: NO-freisetzende Strukturen und ihre postulierten Freisetzungsmechanismen 1) Enzymatische Reduktion, 2) nicht-enzymatische Reduktion, 3) interne Redoxreaktionen unter Bildung von Disulfiden, 4) enzymatische Oxidation, 5) nicht-enzymatische Zersetzung, 6) Zersetzung durch Licht (entnommen aus⁷)

1.3 Therapeutische Anwendungsmöglichkeiten von NO-Donoren

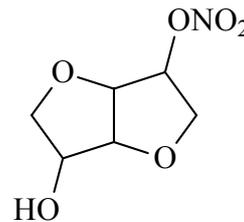
Die erste medizinische Verwendung von organischen Nitraten (Nitrovasodilatoren) wurde 1879 von *William Murrel* dokumentiert, als dieser fand, dass das organische Nitrat Glyceroltrinitrat positive Wirkungen bei *Angina pectoris* hat.⁸ Auch heute sind organische Nitrate wie Glyceroltrinitrat (GTN) (1), Isosorbid-5-mononitrat (ISMN) (2), Isosorbiddinitrat (ISDN) (3) und Pentaerythrityltetranitrat (PETN) (4) wichtige Medikamente bei der akuten oder präventiven Behandlung von myokardialer Ischämie.^{9,10} Zur Therapie der akuten Angina pectoris-Anfalls ist besonders Glyceroltrinitrat gut geeignet. Bei sublingualer Applikation wirkt es innerhalb von Sekunden bis wenigen Minuten. Chemisch gesehen sind diese Medikamente Salpetersäureester von aliphatischen, überwiegend mehrwertigen Alkoholen.



Glyceroltrinitrat

0,3-0,8 mg, 2-5 min

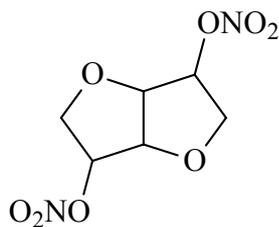
1



Isosorbid-5-mononitrat

20 mg, 30-60 min

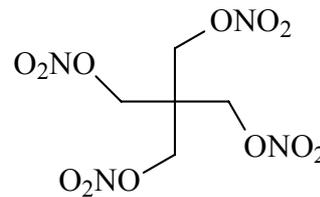
2



Isosorbiddinitrat

10-60 mg, 15-45 min

3



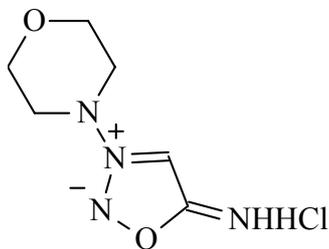
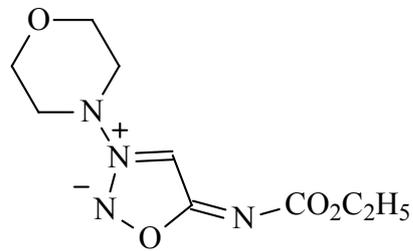
Pentaerythrityltetranitrat

80 mg, 30-60 min

4

Abb. 3: Strukturformeln von 1-GTN; 2-ISMN; 3-ISDN; 4-PETN. Weiterhin sind angegeben die üblichen Dosierungen (in mg) sowie die Zeit des Wirkungseintritts nach Einnahme (in min).¹¹

Zusätzlich zu den organischen Nitraten sind auch Sydnonimine (SIN1, **5**) (wie z.B. Molsidomin (**6**)), und anorganische Verbindungen (z.B. Nitroprussid-Na) klinisch verwendete „Nitrovasodilatoren“.

**SIN1****5****Molsidomin**

4-8 mg, 30-60 min

6

Darüber hinaus gibt es verschiedene Vasodilatoren wie z.B. Nitrosothiole oder Oxyhydrazine, die heute in der experimentellen Medizin verwendet werden.^{12,13} Obwohl alle Nitrovasodilatoren dem gleichen Funktionsprinzip (Freisetzung von Stickstoffmonoxid) folgen, zeigen sie grundlegende Unterschiede hinsichtlich ihrer Pharmakokinetik, ihrer hämodynamischen Wirkungen und demzufolge ihres Nutzens für entweder die akute oder die präventive Behandlung von myokardialer Ischämie oder akutem Herzversagen. Nitrovasodilatoren reduzieren den Tonus der glatten Muskulatur. In der Vaskulatur führt dies zu einer Venodilation und zur Entspannung der Koronararterie, der Koronarstenose und der koronarkollateralen Blutgefäße.^{14,11,9} Diese hämodynamischen Wirkungen führen zu der bekannten antiischämischen Aktivität. Zusätzlich vermag Glyceroltrinitrat auch den Blutdruck substantiell reduzieren, die glatte Muskulatur des Gastrointestinaltrakts beziehungsweise des Uterus zu entspannen und die Aktivität der Plättchenfaktoren zu hemmen. Organische Nitrate rufen nur wenige Nebenwirkungen hervor, die bekanntesten sind der sogenannte „Nitratkopfschmerz“ und eine haltungsbedingte Hypotension. Ein weiterer Nachteil dieser Medikamente ist ihre nachlassende Wirkung schon nach kurzer Behandlung, ein Effekt, den man als Nitrattoleranz bezeichnet.

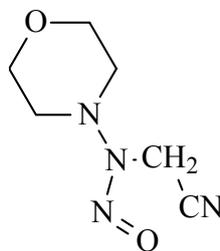
Nitrovasodilatoren rufen eine Reihe von hämodynamischen Veränderungen hervor, die mit keinem anderen kardiovaskulären Medikament erreicht werden. Unter den organischen Nitraten ist diese Wirkung annähernd vergleichbar. Die Eckpfeiler dieser für die klinische Anwendung vorteilhaften hämodynamischen Veränderungen sind eine Venodilatation und eine von der Größe der Gefäße abhängige koronare Vasodilatation. Molsidomin reduziert nachweislich bevorzugt die Vorlast, d.h. dass der venöse Druck auf das Herz durch Venendilatation sinkt, was eine Ökonomisierung der Herzarbeit bei reduziertem O₂-Bedarf zur Folge hat. Im Gegensatz dazu ist Natriumnitroprussid ein allgemeiner Vasodilatator, der eine deutliche und schnelle Reduzierung des Blutdrucks verursacht.

Der erste experimentelle Nachweis für die Wirkungsmechanismen von Nitrovasodilatoren wurde vor über 20 Jahren dokumentiert, als zunächst nachgewiesen wurde, dass Natriumnitroprussid die Menge von cyclischem Guanosinmonophosphat (cGMP) in der glatten Muskulatur erhöht.¹⁵ Später fand man, dass organische Nitrate die lösliche Guanylatcyclase aktivieren. Eine ähnliche Aktivierung konnte auch durch NO erzeugt werden.¹⁶ Die Ergebnisse weiterer Untersuchungen legten eine Beziehung zwischen der durch organische Nitrate hervorgerufenen Bildung von NO und deren biologischer Aktivität nahe.¹² Basierend auf dieser Beobachtung folgerte man, dass Nitrovasodilatoren in glatter Muskulatur Nitrosothiole erzeugen, die wiederum die lösliche Guanylatcyclase aktivieren. Tatsächlich wurde gezeigt, dass die Bildung von denitrierten Metaboliten der organischen Nitrate, z.B. 1,2- und 1,3-Glyceroldinitrat aus Glyceroltrinitrat, dem Anstieg von cGMP in der glatten Muskulatur und ihrer Entspannung vorangeht.^{17,18,19} Die direkte Messung von NO hat gezeigt, dass organische Nitrate dieses Radikal nach Inkubation mit Cystein *in vitro* freisetzen und eine Aktivierung von isolierter löslicher Guanylatcyclase induzieren.⁵ Ähnliche Ergebnisse wurden mit anderen Nitrovasodilatoren, z.B. Natriumnitroprussid, verschiedenen Nitrosothiolen oder SIN-1, dem aktiven Metabolit von Molsidomin, erzielt.²⁰ Im Gegensatz zu organischen Nitraten erzeugen diese Nitrovasodilatoren NO in Abwesenheit freier Thiole. Deshalb ist der Mechanismus der Bildung von NO ein wichtiger Unterschied zwischen den verschiedenen Nitrovasodilatoren.

1.4 Molsidomin – Therapeutische Anwendung, Synthese und Biotransformation

Molsidomin ist ein gut wirksamer Vasodilatator, der zur Therapie bei stabiler und instabiler Angina pectoris eingesetzt wird. Im Vergleich zu den Nitraten zeichnet sich Molsidomin einerseits durch eine geringere Toleranzentwicklung, andererseits durch einen ausgeprägteren Vorlast-senkenden Effekt aus.

Da jedoch die Wirkung von Molsidomin erst relativ langsam, nämlich ca. 20 Minuten nach der Applikation, eintritt, eignen sie sich nicht zur Anfallskupierung, sondern lediglich zur Angina-pectoris-Prophylaxe. Molsidomin ist ein Prodrug, aus dem im Organismus durch enzymatische Abspaltung des Ethoxycarbonylrestes 3-Morpholino-Sydnonimin (SIN-1) gebildet wird. Dieses geht durch nichtenzymatische Ringöffnung in die ringoffene Form (SIN-1A **7**) über, aus dem als eigentliche Wirksubstanz wiederum NO abgespalten wird. Im Gegensatz zur NO-Bildung bei Nitraten sind dazu weder Cystein noch Reduktasen und andere Kofaktoren erforderlich.²¹



SIN1 A

7

Jedoch zeigt sich im Tierversuch, dass bei Ratten als Folge der Zufuhr hoher Dosen von Molsidomin ein erhöhtes Nasen-Karzinom-Risiko zu beobachten ist. Deshalb beschränkt sich die Anwendung auf Anweisung gemäß dem Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte (BfArM) auf Patienten höheren Alters bzw. solche, bei denen andere Medikamente nicht zuverlässig wirken.

1.5 Nachweis von NO mittels Laser-Magnet-Resonanz-Spektroskopie

Die Beschäftigung mit NO-Donoren erfordert meist auch eine analytische Methode zum Nachweis und zur Quantifizierung des freigesetzten NO. Will man weitergehend zwischen ubiquitärem natürlichem NO (ca. 99.7 % $^{14}\text{N}^{16}\text{O}$) und dem aus synthetischen NO-Donoren gebildeten unterscheiden, so erfordert dies nicht nur den Einsatz dotierter NO-Donoren, also z.B. $^{15}\text{N}^{16}\text{O}$ -Donoren, deren Synthese ein Thema dieser Arbeit ist, sondern auch eine analytische Methode, die zwischen $^{14}\text{N}^{16}\text{O}$ und $^{15}\text{N}^{16}\text{O}$ differenzieren kann.

Im Bereich der Spurengasanalytik sind insbesondere drei Faktoren für die Messgenauigkeit von Bedeutung: Nachweisempfindlichkeit, Selektivität und ggf. die Zeitauflösung. Z.B. ist zu beachten, dass bei der Exhalation durch den Mund nur geringste NO-Konzentrationen messbar sind, die sich für das Hauptisotopomer $^{14}\text{N}^{16}\text{O}$ in einer Größenordnung von nur wenigen ppb bewegen. Für die Exhalationsmessung ist deshalb wichtig, dass die Nachweisempfindlichkeit bei 1 ppb und besser liegt.

Genauso entscheidend für die Messgenauigkeit ist die Querempfindlichkeit zu anderen Gasen bzw. Isotopomeren, d.h. die Selektivität der Messung. Die Messung der NO-Konzentration darf keinesfalls durch die bei der Exhalation vorhandenen erheblichen Konzentrationen von H_2O bzw. CO_2 beeinträchtigt werden.

Soll die zeitliche Variation der NO-Konzentration gemessen werden, so ist eine gute Zeitauflösung der Methode unabdingbar. Weil sich aber die NO-Konzentration bei gasförmiger Freisetzung von Atemzug zu Atemzug verändert, muss das Messgerät eine Zeitauflösung im Bereich von wenigen hundert Millisekunden zulassen.

Es war für unsere Untersuchungen vorteilhaft, dass vor kurzem in der Arbeitsgruppe von Prof. Urban am Institut für Angewandte Physik an der Universität Bonn die Methode der Spurengasanalyse durch Laser-Magnet-Resonanz-Spektroskopie (LMRS) entwickelt wurde und Anwendungsbeispiele hochwillkommen waren. Bei diesem Verfahren handelt es sich im weitesten Sinne um ein spezielles

infrarotspektroskopisches Verfahren in dem sogar zwischen den Molekülschwingungen von $^{14}\text{N}^{16}\text{O}$ und $^{15}\text{N}^{16}\text{O}$ unterschieden werden kann.²²

Im Hinblick auf die oben genannten drei Bewertungskriterien zeigt LMRS folgende Besonderheiten:

- Gute Zeitauflösung (Anstiegszeit des Signals von 10% auf 90%) beträgt ungefähr 500 ms.
- Gute Empfindlichkeit mit Nachweisgrenzen bei 1 ppb und darunter.
- Querempfindlichkeit zu anderen Gasen kann vermieden werden.
- Isotopomerelektivität: LMRS unterscheidet zwischen $^{14}\text{N}^{16}\text{O}$, $^{15}\text{N}^{16}\text{O}$, prinzipiell auch zwischen weiteren Isotopomeren.
- Schwankung der Signalhöhe bei gleicher NO-Konzentration (im Verlauf eines Versuchstages) $\leq 5\%$.
- Schwankung des Signals innerhalb von 60 s bei NO-freier Luft (Offset-Schwankung) $\pm 0,5$ ppb.

Das LMRS erweist sich so als eine sehr leistungsfähige Messmethode zur Untersuchung paramagnetischer Moleküle im mittleren und fernen infraroten Spektralbereich. Ferner ist sie, neben der wenig praktikablen Massenspektroskopie, gegenwertig die einzige Methode, die isotopomerelektiv ist und somit nicht nur zur normalen NO-Analytik (wie zum Beispiel auch Chemolumineszenz-Geräte und elektromagnetische Sonden) sondern auch für alle Untersuchungen mit ^{15}N -dotierten NO-Donoren herangezogen werden kann.

LMRS verwendet einen Festfrequenzlaser. Es wird bei dieser Technik nicht die Laserfrequenz auf den Molekülübergang, sondern der Molekülübergang mit Hilfe eines externen Magnetfeldes auf die Laserfrequenz abgestimmt. Zur NO-Messung kann man durch die Kombination einer bestimmten Wellenlänge des Kohlenmonoxid-Lasers (5,303 μm) und einer bestimmten Magnetfeldstärke (0,142 T) das Linienzentrum des IR-Übergangs treffen. Die Auslenkung der Registriereinheit ist

direkt als NO-Konzentration (in ppb) zu eichen. Da die Veränderung von ^{14}NO zu ^{15}NO eine deutliche Verschiebung der Vibrationsfrequenz zur Folge hat, kann man durch Kombination einer anderen Laserwellenlänge mit einem anderen Magnetfeld das schwerere Isotopomer separat erfassen.

1.6 Nitrosothiole – Therapeutische Anwendung, Synthese und Biotransformation

S-Nitrosothiol-Verbindungen sind von großem therapeutischen Wert. Eine zellfreie, *S*-Nitroso-Hämoglobin (SNO-Hb)-haltige Lösung, die das menschliche Blut nachbildet, kann als Blutersatz dienen. Man kann z.B. die Lagerungszeit von Blutvorräten in Blutbanken verlängern bzw. abgelaufene Blutvorräte so behandeln, dass sie noch weiter für Transfusionen benutzt werden können. Bei dieser Methode erfolgt die Nitrosothiolbildung durch NO^{\oplus} , das aus Natriumnitrit gewonnen wird, bzw. durch einen Transfer aus einem niedermolekularem *S*-Nitrosothiol, aus dem SNO-Hb²³ erzeugt wird. SNO-Hb selbst wird auch als nützlicher NO-Donor betrachtet und für die Behandlung von kardiovaskulären und anderen typischen NO-abhängigen Krankheiten benutzt.²⁴

Zusätzlich nimmt man an, dass die extrakorporale Anreicherung des Blutes mit niedermolekularen *S*-Nitrosothiolen, wie z.B. *S*-Nitrosocystein (**9**), nützlich bei Krankheiten ist, die durch einen abnormalen O_2 -Metabolismus geprägt sind.²⁵ Man nimmt an, dass es ein Polypeptid gibt, das sich mit dem Blutplättchen-Rezeptor-Glykoprotein verbindet, vergleichbar mit von Willebrands Faktor, aber *S*-nitrosylierte Cysteine enthält. Bei der Verbindung mit den Plättchen aktiviert es diese nicht und hat so anti-thrombotische Eigenschaften mit einer Potenz, die um das 2,5-fache höher liegt als der unmodifizierte Faktor.²⁶ Demgegenüber reduziert die *S*-Nitrosylierung von Caspasen durch Gabe eines NO-Donors (z.B. Nitroglycerin) dessen Aktivität und gilt so als eine Methode zur Vermeidung des apoptotischen nicht-neuronalen Zelltods bzw. der Zellbeschädigung, was nützlich sein kann für die Behandlung neurodegenerativer Störungen.²⁷ Die Aktivität der HIV-1 Protease wird ebenfalls durch NO gemindert,

das von dem NO-Donor NOR-3 freigesetzt wird.²⁸ Das Nitrosothiol SNAP (**8**) wurde bereits bei der Behandlung von AIDS-, Diabetes- und Hashimoto-Thyroiditis-Patienten angewendet²⁹.

Es scheint generell so zu sein, dass die Aktivität von Enzymen und anderen Proteinen welche an Positionen, die relevant sind bezüglich der Konformation und/oder Bindungsmöglichkeit für Liganden und die weiterhin die Aminosäure Cystein enthalten, nachhaltig durch die *S*-Nitrosylation beeinflusst werden kann. Z.B. wurde kürzlich entdeckt, dass bei der extrahepatischen Methionin-Adenosyltransferase sich durch den Austausch einer einzigen Aminosäure (Glycin 120) durch Cystein, also einer NO-Bindungsmöglichkeit, die Aktivität, nicht aber die kinetischen Eigenschaften des Enzyms ändern.³⁰

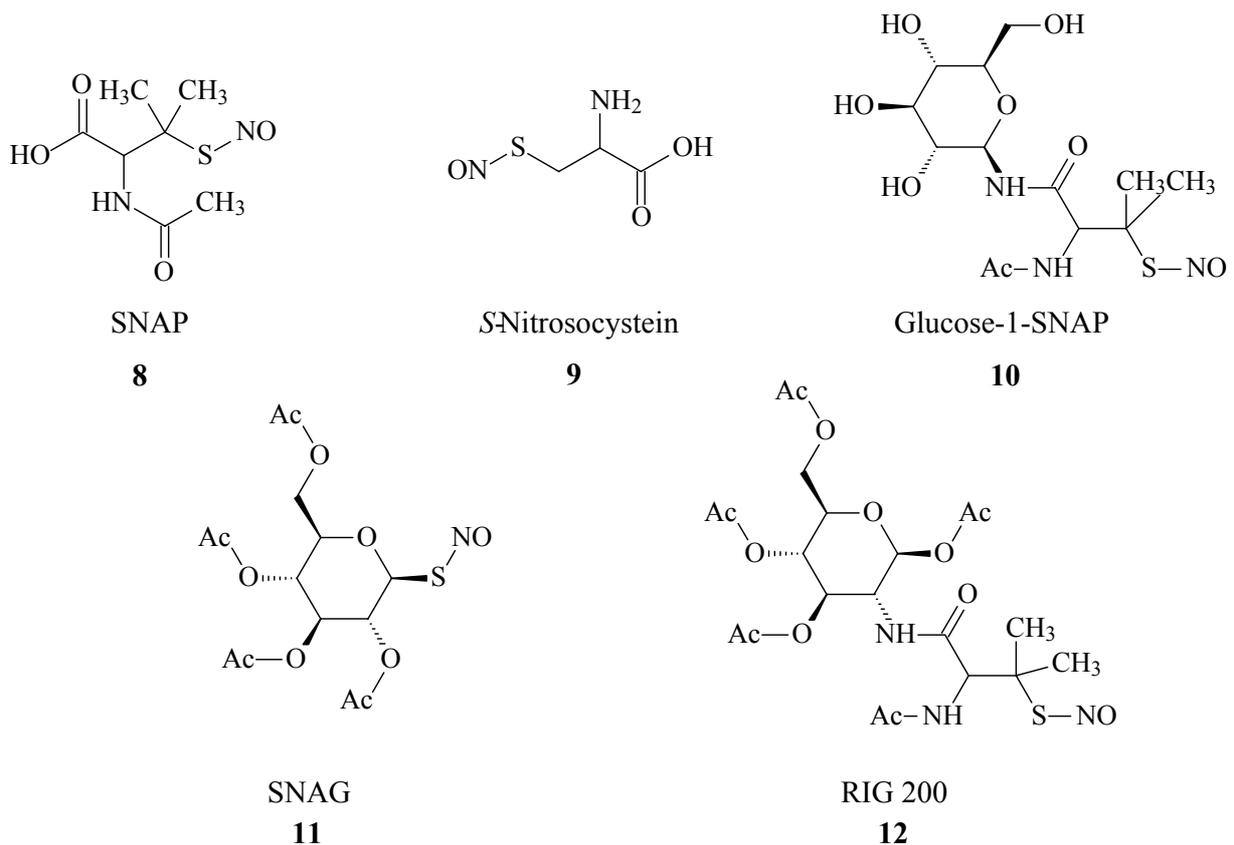


Abb. 4 Strukturformeln verschiedener Nitrosothiole

Abb. 4 zeigt einige im Rahmen von Forschungsprojekten entwickelte, relativ stabile Nitrosothiole. Kommerzielles SNAP wird häufig für pharmakologische Experimente benutzt, vor allem deshalb, weil es sich dabei um eine preiswerte und stabile NO-Quelle handelt; hingegen ist SNAP wohl kaum als innovatives therapeutisches Medikament zu betrachten. Ein bedeutender Nachteil von *S*-Nitrosothiolen ist ihre Instabilität in wässriger Lösung. Die Verbindung von SNAP – aber ebenso SIN-1A und Diazeniumdiolaten – mit Cyclodextrinen verbessert die Halbwertszeit in Lösungen beträchtlich. Solche Verbindungen können kommerziell bezogen werden. Auf der Suche nach neuen Wirkstoffen hat man die Nitrosothiol-Struktur um ein Zuckermolekül erweitert, wodurch man eine Reihe von „Zucker-SNAPs“ erhielt, z.B. **10**, entwickelt von der Gruppe um Hou und Wang,³¹ und der *S*-Nitrosothiozucker-SNAG (**11**), um die Haut mit NO zu versorgen.³² SNAG weist die richtige Polarität auf um einen lokalen Anstieg des dermalen Blutflusses nach dermalen Applikation zu erzielen. Die Verbindung von acetylierten Glucosaminen und SNAP stabilisiert das Molekül und verleiht ihm eine länger anhaltende vasodilatatorische Wirkung.³³ RIG 200 (**12**) z.B. hat man bei der Behandlung des Raynaud-Syndroms und bei der Prävention von Restenosen der Blutgefäße nach chirurgischen Eingriffen angewendet.³³ Eine weitere Methode der Stabilisierung von SNAP ist der Austausch der *N*-Acetyl-Gruppe durch andere, sperrigere Acyl-Gruppen.

1.7 NO- und *S*-Nitrosothiol-Hybridmoleküle

Wenn man eine NO-freisetzende Gruppe einem anderen Arzneistoffmolekül hinzufügt, kann man damit vielleicht dessen Toxizität reduzieren oder eine zusätzliche NO-abhängige vorteilhafte biologische Aktivität erzeugen. Es gibt bereits mehrere solcher Hybridverbindungen (Abb. 5). Von Hybrid **13**, das aus einer SNAP-verwandten Komponente und dem α -Adrenorezeptor Antagonisten Moxizylat **14** besteht, ist bekannt, dass es eine reduzierte Toxizität zeigt und weniger Nebenwirkungen hat als frühere Formulierungen bei der Behandlung von erektiler Dysfunktion.³⁴ Ein weiteres sehr ähnliches Hybrid wird gewonnen aus demselben *S*-Nitrosothiol und dem Phosphodiesterase-Inhibitor Dipyramidol. Verbindung **15** wurde

im Hinblick auf seine Fähigkeit, die Phenylephrin-induzierte Kontraktion menschlicher Biopsieproben von Corpus Kaverosum-Gewebe zu entspannen, mit Dipyridol verglichen und zeigte ein um ca. 50% besseres Ergebnis.³⁵ Das ganz andersartige Hybrid **16** wurde mit Fluticason verglichen und zeigte sich im „Ascaris sensitive Sheep-assay“ als ein effektiverer Inhibitor, was diese und andere ähnliche Verbindungen für die Behandlung von Asthma und anderen respiratorischen Störungen attraktiv erscheinen lässt.³⁶ Eine weitere neuere synergistische Verbindung, nämlich die eines vasorelaxierenden NO-Donors mit einem vasorelaxierenden ACE-Inhibitors, ist Nitrosocaptopril (CapNO).^{37,38}

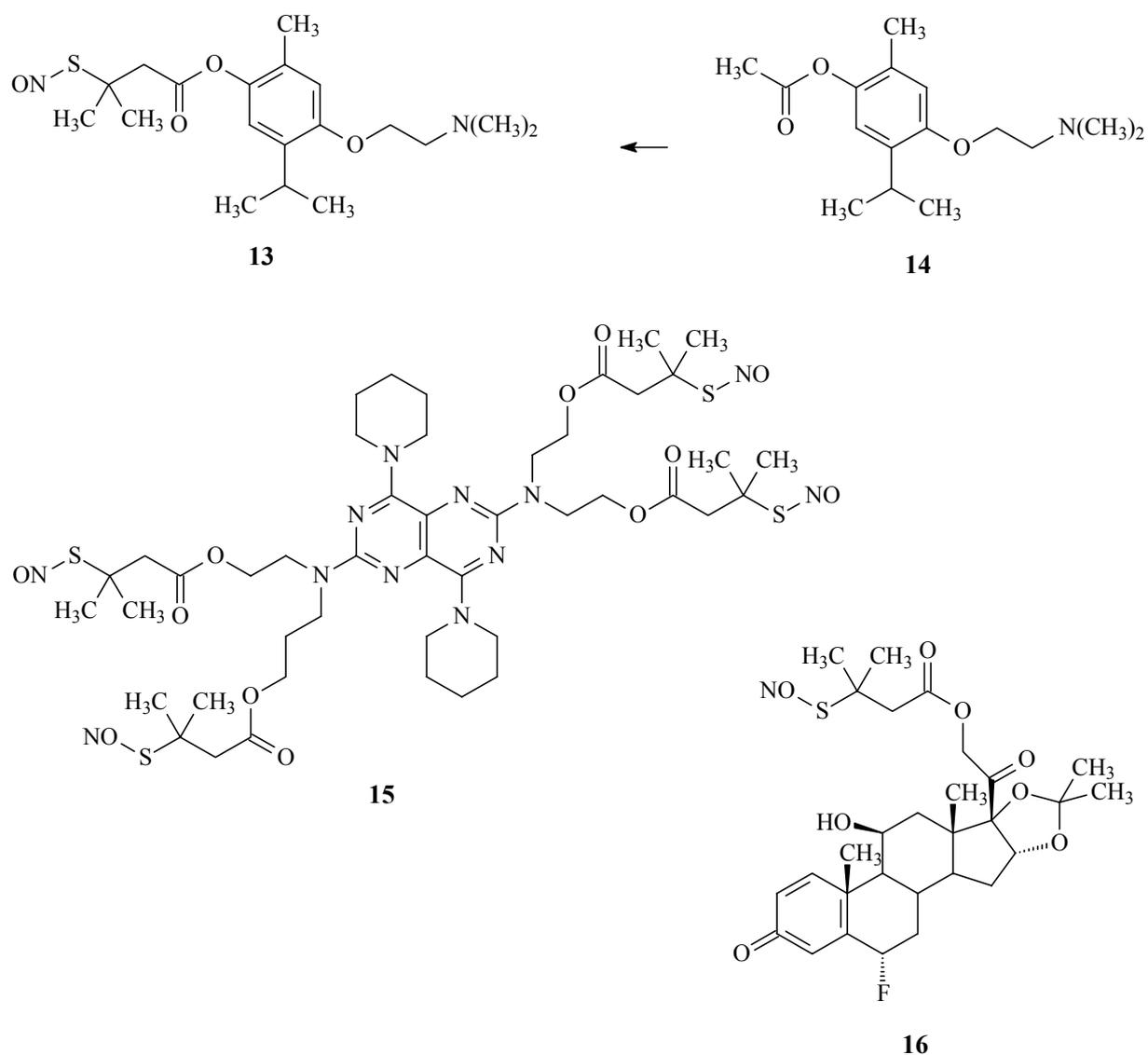


Abb. 5: Strukturformeln bekannter S-Nitrosothiol-Hybridmoleküle

2 Themenstellung

NO-Donoren, also synthetische molekulare Quellen für Stickstoffmonoxid, beschäftigen den Arbeitskreis bereits seit Jahren. Bisher standen organische Nitrate, Nitrat-Thiol-Hybride, Nitrat-Thiol-NSAID-Trihybride und neuerdings Diazeniumdiolate im Blickpunkt. Die vorliegende Arbeit sollte sich nun einerseits der Synthese und ersten Anwendungsmöglichkeiten von ^{15}N -markierten NO-Donoren widmen und andererseits einen Einstieg in die sehr aktuelle Klasse der NO-Donoren vom Nitrosothiol-Typ vornehmen. Einfache Nitrosothiole, aber auch Nitrosothiol-Hybridmoleküle sollten synthetisiert, charakterisiert und in ausgewählten Beispielen einer pharmakologischen Untersuchung zugeführt werden. Die Zielsetzungen können wie folgt umrissen werden.

2.1 Synthese ^{15}N -markierter NO-Donoren

Seit kurzem benutzen wir zur Untersuchung der NO-Freisetzung aus den NO-Donoren die Laser-Magnet-Resonanz-Spektroskopie, ein in Bonn entwickeltes Verfahren, das schnell, empfindlich und – im Gegensatz zu anderen etablierten Verfahren – Isotopomeren-selektiv ist, also zwischen dem natürlich sehr seltenen ^{15}NO und ^{14}NO unterscheiden kann. Diese Besonderheit ermöglicht neue Möglichkeiten für NO-Freisetzungs- und NO-Transfer-Studien, wenn ^{15}N -markierte NO-Donoren zur Verfügung stehen. Geplant war deshalb die Synthese des experimentellen ^{15}NO -Donors ^{15}N -SNAP (**158**) und des therapeutischen ^{15}NO -Donors ^{15}N -Molsidomin (**156**). Zunächst sollte *N*-Acetylpenicillamin (**17**) mit ^{15}N -dotiertem Natriumnitrit zu ^{15}N -SNAP nitrosyliert werden (Abb. 6) und die Substanz in reiner Form für unseren und andere Arbeitskreise verfügbar gemacht werden.

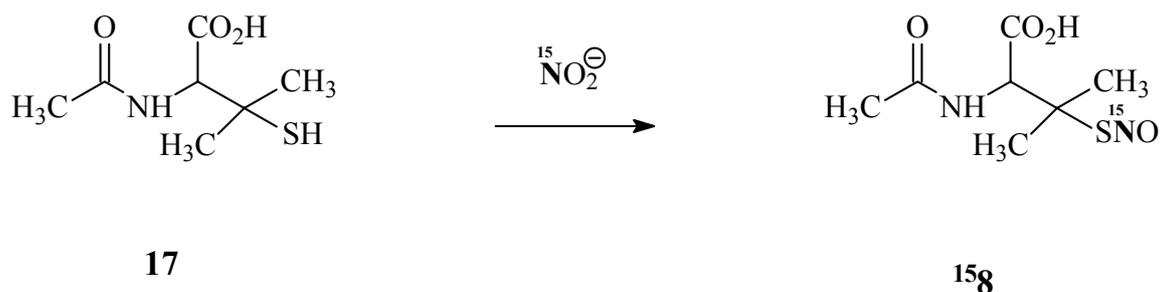


Abb. 6: Herstellung von ^{15}N -SNAP

Zur ebenfalls erstmaligen Synthese von ^{15}N -Molsidomin ($^{15}\mathbf{6}$) (5-[(Ethoxycarbonyl)amino]-3-(4-morpholiny)- ^{15}N -1,2,3-oxadiazolium) war folgendes Vorgehen geplant: In einer 3-stufigen Reaktion sollte ausgehend von N -Aminomorpholin ($\mathbf{18}$) zunächst $\mathbf{19}$ synthetisiert und dieses mit Hilfe von ^{15}N -Natriumnitrit zu ($^{15}\mathbf{20}$) umgesetzt werden, welche zur weiteren Synthese von ^{15}N -SIN1 (3-Morpholino- ^{15}N -sydnonimin) ($^{15}\mathbf{5}$) eingesetzt werden sollte. $^{15}\mathbf{5}$ sollte abschließend zu ^{15}N -Molsidomin ($^{15}\mathbf{6}$) acyliert werden.

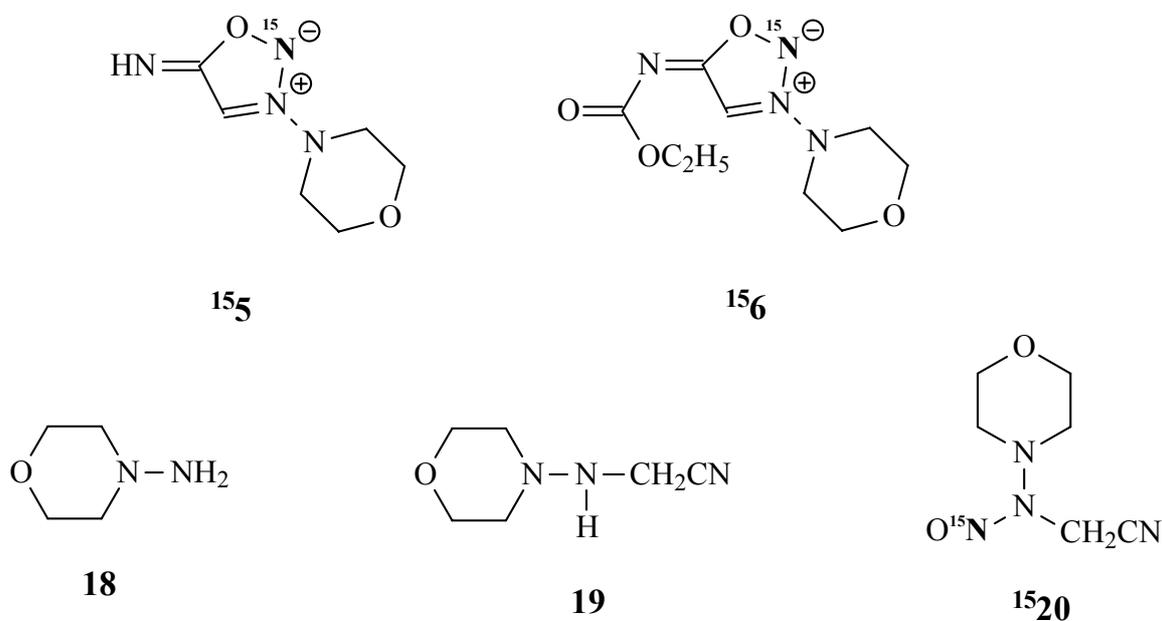


Abb. 7: Synthesepfad für ^{15}N -Molsidomin zur Einnahme im Selbstversuch

Syntheseverlauf und Reinheit sollen sehr hohen Ansprüchen genügen, da das ^{15}N -Molsidomin zur Einnahme im Selbstversuch vorgesehen ist. Dazu müssen die Qualitätskriterien der Firma *Aventis* erfüllt werden.

2.2 ***In vivo*-Untersuchungen: ^{15}NO - Messung in der Ausatemluft nach Einnahme des synthetisierten ^{15}N -Molsidomin**

Die *in vivo* Freisetzung von NO aus therapeutisch eingesetzten NO-Donoren ist angesichts der ungleich größeren natürlichen NO-Produktion aus Arginin praktisch nicht zu bestimmen. Molsidomin ist in der Literatur als „spontaner“ NO-Donor beschrieben, der die intramolekular präformierte NO-Gruppe aus dem aktiven Metaboliten SIN-1/SIN-1A unter Sauerstoffbeteiligung freisetzt.³⁹ SIN-1/SIN-1A wird über die Blutbahn im Körper verteilt und NO wird ubiquitär freigesetzt. Ein Ansatz zur Bestimmung des „molsidomin-derived“ NO liegt unserer Ansicht nach in der Verwendung ^{15}N -dotierten Molsidomins in Kombination mit der neuen isotopmerenselektiven Analysenmethode der LMR-Spektroskopie, die ^{14}NO und ^{15}NO unterscheiden und selektiv quantifizieren kann.

Um zu untersuchen, ob eine NO-Freisetzung aus Molsidomin *in vivo* in der Ausatemluft festzustellen ist, sollen aus dem hergestellten ^{15}NO -Molsidomin, nach Qualitätskontrolle, mit Lactose Kapseln der Dosierung 2 mg hergestellt und diese von freiwilligen Probanden eingenommen werden. Zum Nachweis erfolgreicher Resorption und Wirkung sollen Blutdruck und Puls kontrolliert werden und schließlich die exhalierte Luft in definierten Zeitabständen durch isotopomerenselektive LMR-Spektroskopie vermessen werden.

2.3 **S-Nitrosothiole - Untersuchung zur Nitrosierung strukturell unterschiedlicher Thiole**

SNAP ist durch die sterische Abschirmung der Thiolnitrit-Gruppe bekanntermaßen eine stabile Nitrosoverbindung. Verschiedenen Hinweisen aus der Literatur zufolge, sind die meisten anderen Nitrosothiole instabil und können sich schon bei der Herstellung unter Ausbildung einer Disulfidstruktur zersetzen (G 1.1). Bei der Anwesenheit durch Spuren von Kupferionen können S-Nitrosothiole $\cdot\text{NO}$ freisetzen. (G 1.2)^{40,41} (Abb. 8).

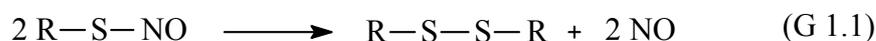
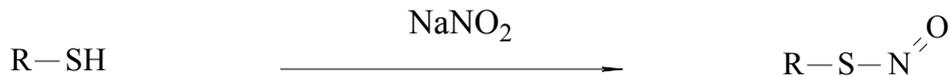


Abb. 8: Zersetzung von Nitrosothiolen

In dieser Arbeit sollte deshalb zunächst grundsätzlich das Verhalten strukturell unterschiedlicher Thiole gegenüber nitrosierender Reagenz wie NaNO_2/H^+ untersucht werden. Abb. 9 zeigt einen Überblick, welche Thiole in diese Untersuchungen mit einbezogen werden sollten.



Ausgewählte Thiole für Nitrosierungsreaktionen:

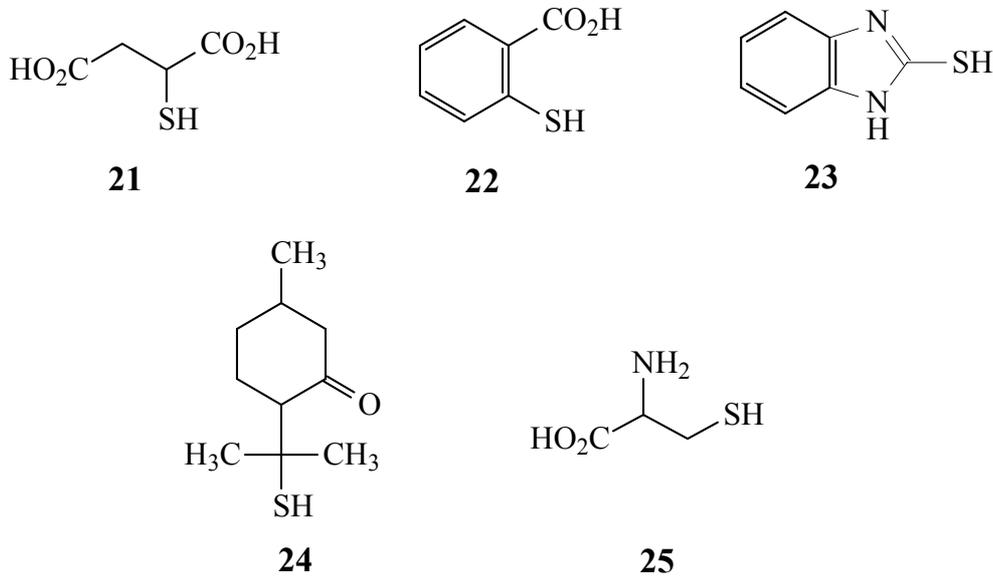


Abb. 9: Prinzip der Herstellungen der geplanten Nitrosothiole

2.4 Synthese von Nitrosothiol-Hybridmoleküle

Nitrosothiol- β -Blocker-Hybridmoleküle

β -Blocker werden zur Anfallsprophylaxe von Angina pectoris angewendet. Durch die Blockade der β_1 -Rezeptoren am Herzen sinken Herzfrequenz und Kontraktionsgeschwindigkeit. Der O_2 -Bedarf des Myokards wird verringert. Andererseits können β -Blocker zu Vasospasmen führen, da sie gleichzeitig den β_2 -Rezeptor blockieren. Durch die Freisetzung von NO reduzieren die Nitrate den Tonus der glatten Muskulatur und dilatieren die Kapazitätsgefäße. Zur prophylaktischen Therapie der stabilen Angina pectoris werden β -Blocker und Nitrate in Kombination eingesetzt. Es erscheint also sinnvoll, eine molekulare Kombination, also eine Hybridstruktur aus β -Blocker und NO-Donor zu synthetisieren. Hybridverbindungen

enthalten zwei pharmakologisch wirksame Gruppen. Falls diese in vivo nach der Spaltung des Moleküls ihre eigene Wirkung entfalten, könnten zwei Effekte synergistisch eintreten. Hybride aus β -Blockern und organischem Nitrat sind in der Literatur bereits beschrieben und als potentielle Arzneistoffe sehr interessant.⁴² Hybride aus β -Blockern und Nitrosothiol dagegen, sind bislang nicht bekannt. Als erster Vertreter sollte in der vorgelegten Arbeit das Propranolol-SNAP-Hybrid **26** (Abb. 10) hergestellt werden.

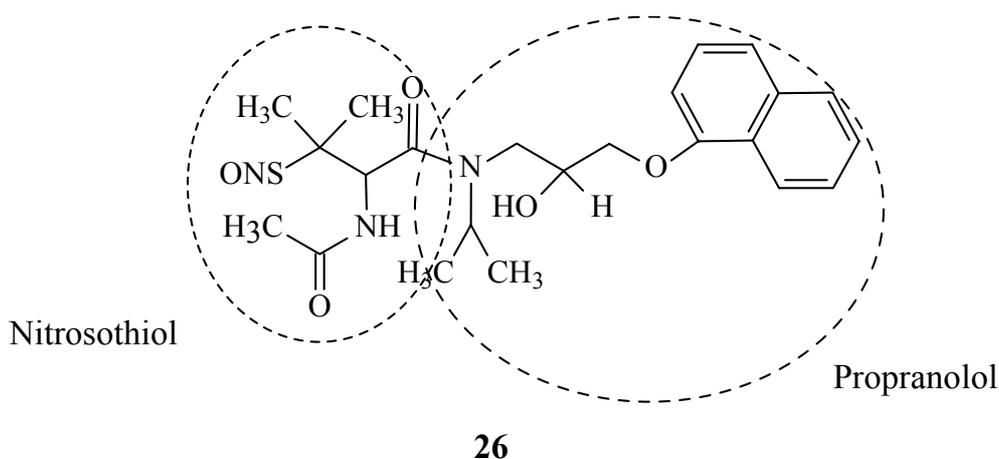


Abb. 10 Struktur eines geplanten Hybridmoleküls aus Propranolol und SNAP

Die in Abb. 11 gezeigte Synthese zeigt die erforderliche Acylierung des basischen β -Blocker-Stickstoffes mit einer SNAP-Vorstufe, genauer einem *N*-Acetyl-penicillamin-Derivat. Diese wird auch anzuwenden sein bei zukünftigen Anbindungen von SNAP an andere Wirkstoffe mit basischem Stickstoff. Deshalb sollten in der geplanten Arbeit beispielhaft sowohl die Acylierung von primären und sekundären Aminen mit *N*-Acetyl-penicillamin **17** oder dem vermutlich sehr reaktiven Vierring-Lacton **27** und auch die abschließende *S*-Nitrosierung studiert werden.

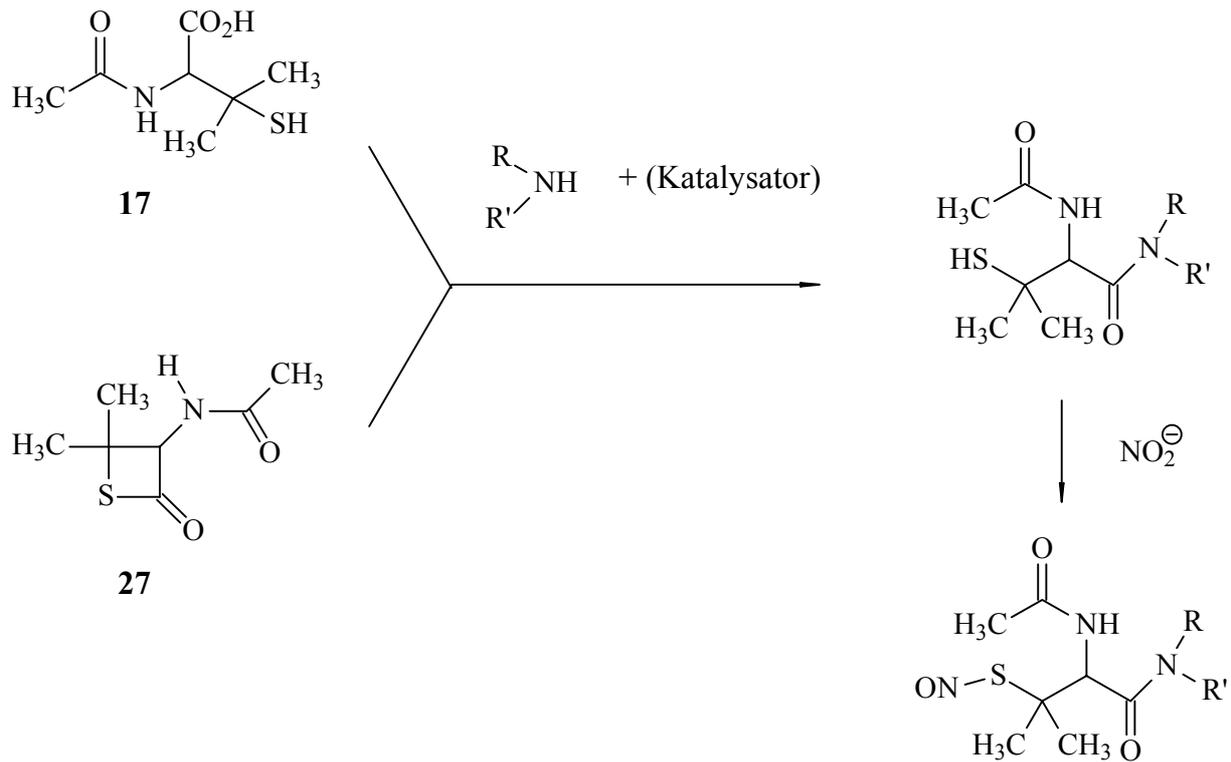


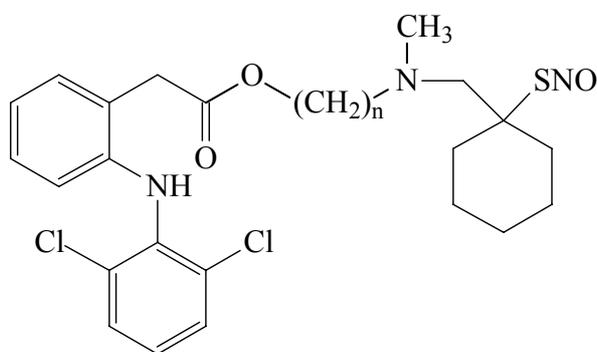
Abb. 11: Acylierung von primären und sekundären Aminen mit N-Acetyl-penicillamin und Lacton und S-Nitrosierung

Nitrosothiole-NSAIDs-Hybridmoleküle

Nichtsteroidale Antirheumatika (Nonsteroidal Antiinflammatory Drugs NSAIDs) wirken analgetisch und antiphlogistisch durch die Hemmung der Prostaglandin-Synthese. Werden NSAIDs jedoch über längere Zeiträume und in höheren Dosen verabreicht, führt genau dies zu einer Störung der positiven, Prostaglandin-regulierten Prozesse im Gastrointestinaltrakt. Als unerwünschte Nebenwirkung können bei Patienten unter NSAID-Therapie starke Blutungen im Gastrointestinaltrakt auftreten; auch können sich dort lebensbedrohliche Geschwüre bilden. Diese Faktoren begrenzen den therapeutischen Nutzen von NSAIDs. Die Entdeckung sicherer, nichttoxischer NSAIDs ist Gegenstand aktueller Forschung.⁴³

Die Pharmakologie des Stickstoffmonoxid auf der Ebene der Schleimhaut des Gastrointestinaltrakts kann unter Umständen eine wichtige Rolle beim Schutz der Schleimhaut gegen von NSAIDs induzierte Toxizität spielen. NO verhindert die lokale

Freisetzung von Entzündungsmediatoren ebenso wie die neutrophil-endothelische Zelladhäsion. Zusätzlich erhöht NO die Durchblutung der Schleimhaut des Gastrointestinaltrakts und verdickt die schützende Gel-artige Schicht der Schleimhaut, indem es die Sekretion des Schleims fördert. Auf Grundlage dieser Überlegung synthetisierten Bandarage et al.⁴³ eine Reihe von Diclofenacestern (**28a, b, c, d**), die eine Nitrosothiol-Funktionsgruppe enthalten. In vorklinischen Studien konnte nachgewiesen werden, dass diese neuen, stabilen, NO-freisetzenden Prodrugs vergleichbare analgetische und antiinflammatorische Eigenschaften aufweisen wie Diclofenac und bei den getesteten Nagetieren bedeutend weniger gastrointestinale Blutungen hervorrufen.⁴³



28 a, b, c, d

a n=2

c n=4

b n=3

d n=5

In der von uns geplanten Arbeit sollten die vier Hybridverbindungen **33, 34, 35, 36**, bestehend aus zwei anderen NSAIDs, nämlich Ibuprofen (**29**) und Naproxen (**30**), und einer stabilen Nitrosothiol-Komponente synthetisiert und für pharmakologische *in-vitro* und *in-vivo* Versuche zugänglich gemacht werden. Die geplante Synthese über intermediäre Säurechloride wird aus Abb. 12 deutlich.

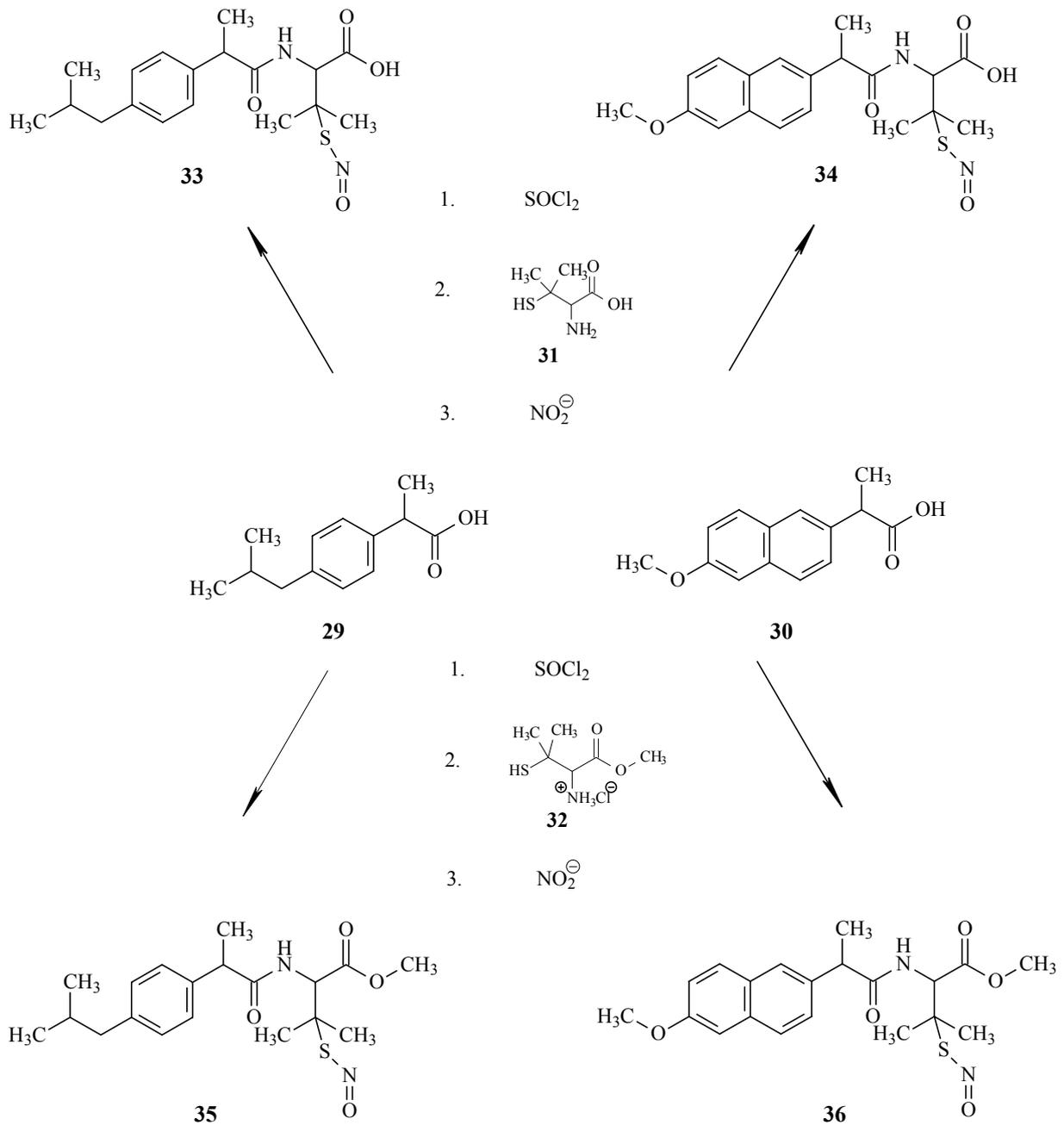


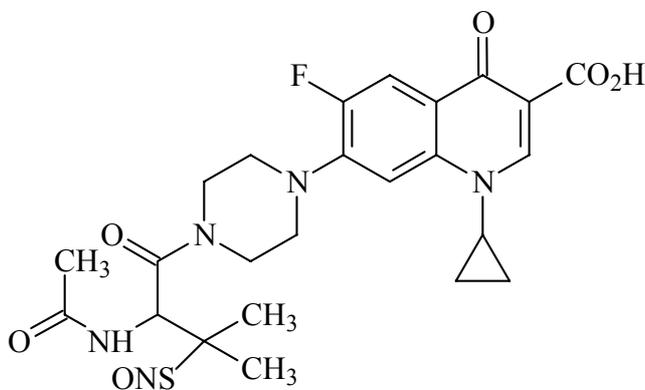
Abb. 12: Herstellung der Hybridverbindungen aus Ibuprofen und Naproxen

Nitrosothiol-Chinolon-Hybridmolekül

Eine Reihe Derivate der 4-Chinolon-3-carbonsäure werden als Gyrase-Hemmstoffe bei der antibakteriellen Therapie angewendet. Sie wirken über eine Hemmung der bakteriellen Topoisomerase II, welche für die ordnungsgemäße „Spiralisierung“ der DNS notwendig ist, was zum schnellen Zelltod führt. Die auffälligsten Nebenwirkungen sind zentralnervöse Störungen.

Die antibakterielle Wirkung von NO und Superoxid *in vivo* wurde am deutlichsten in einer Studie bei mit *Salmonella typhimurium*-infizierten Mäusen nachgewiesen, bei denen XO (Xanthinoxidase) und iNOS als Teil der Abwehrreaktion des Wirts stark hochreguliert werden, wie auch bei Virusinfektionen.⁴⁴ Reaktive molekulare Spezies, z.B. NO, Superoxid, OCI^- , Hydrogen-Peroxid (H_2O_2) und Peroxynitrit greifen die eindringenden Pathogene lokal, in den meisten Fällen intrazellulär an, so dass während des Abwehrprozesses im Wirt eine effektive zytotoxische Wirkung gegen die Pathogene, bei nur minimaler Verletzung des Gewebes in der Umgebung, erzielt wird.

Eine Verbindung, welche die zwei sehr unterschiedlichen antiinfektiven Prinzipien von Chinolon und NO molekular in sich vereinigt, ist pharmazeutisch interessant und wurde bisher nicht hergestellt. In dieser Arbeit sollte die Synthese des „Prototyps“ **37**, einem Ciprofloxacin-SNAP-Hybrid, versucht werden.



B Allgemeiner Teil

1 Synthese und Charakterisierung von ^{15}N -S-Nitroso-N-acetylpenicillamin (^{15}N -SNAP)

Wie schon in der Einleitung ausgeführt beschäftigt sich unsere Arbeitsgruppe – in Zusammenarbeit mit der Firma INVIVO mit der Weiterentwicklung von Laser-Magnet-Resonanz-Spektrometern (siehe Einleitung 1.5) zur isotopomerenselektiven NO-Analyse und entsprechenden Anwendungen dieser Methode. Dotiertes ^{15}N -S-Nitroso-N-acetylpenicillamin (^{15}N -SNAP) wäre eine wichtige Verbindung zur Untersuchung der NO-Freisetzung oder des NO-Transfers auf andere biologische Targets. Deswegen sollte erstmals ^{15}N -SNAP hergestellt und charakterisiert werden.

1.1 Literaturübersicht

In der Literatur ist die zur Darstellung von SNAP angewendete Methode der Umsetzung von N-Acetylpenicillamin (17) mit Natriumnitrit (Abb. 13) nach *Field et al.*⁴⁵ am häufigsten zu finden. Danach wird N-Acetylpenicillamin in einer Lösung von Methanol-HCl (1:1) und konzentrierter H_2SO_4 mit NaNO_2 in doppelten Molmengen umgesetzt. 15 Minuten nach dem 20 minütigen Rühren wird festes SNAP (8) isoliert und lediglich mit Wasser gewaschen. Das an der Luft getrockneten Produkt (63% Ausbeute) fällt in dunkelgrünen Kristallen mit roter Reflexion an.

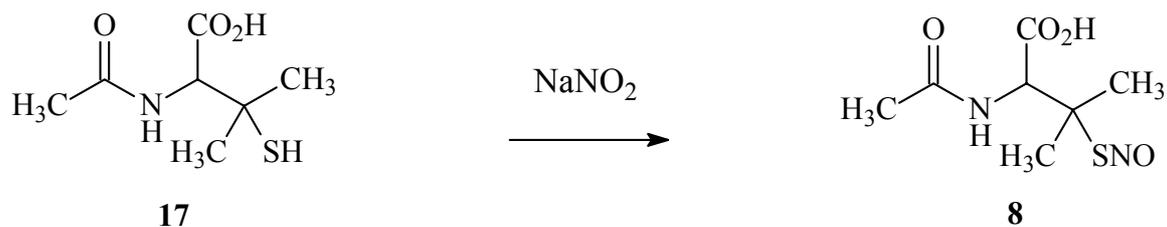


Abb. 13: Darstellung von SNAP nach Field

Nach *Miyahara et al.*⁴⁶ (Abb. 14) wird *N*-Acetyl-penicillamin in einer Mischung von Methanol, 0,5 N Salzsäure und konzentrierter Schwefelsäure (5:10:0,5) gelöst, dann 8 Stunden bei 25°C mit 1-(2-Chlorethyl)-1-nitroso-3-(1-oxy-pyridin-3-ylmethyl)-harnstoff (**38**) stark gerührt. Das Produkt **8** wird durch Extraktion mit Diethylether und Ethanol/Diethylether (1:1) isoliert. Die Ausbeute ist mit 42% geringer als bei der Umsetzung mit Natriumnitrit.

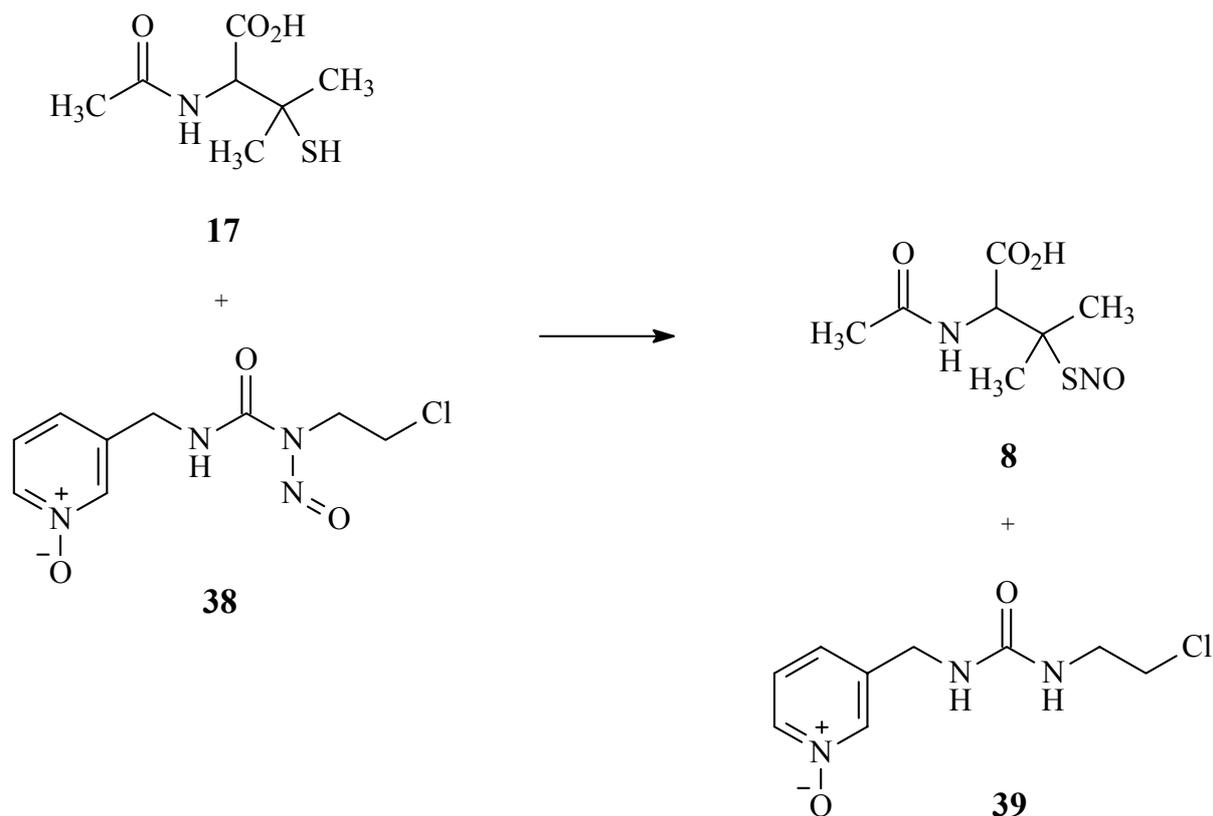


Abb. 14: Darstellung 3 von SNAP nach Miyahara

1.2 Synthese von ¹⁴N-SNAP

Zur Synthese von ¹⁴N-SNAP wurde *N*-Acetyl-penicillamin mit Na¹⁴NO₂ nach der Methode von *Field et al.* (Abb. 13) in einer wässrigen Methanollösung 15 min gerührt. Nach der Trennung und Trocknung erhält man dunkelgrüne, rot reflektierende Kristalle.

H-Position	Verschiebung [ppm]		
	17	8 (Abb. 16)	¹⁵ 8 (Abb. 17)
COCH ₃	1,91	1,93	1,95
a	1,36	1,86	1,88
b	1,38	1,96	1,98
COCHNH	4,41	5,15	5,17
COCHNH	8,07	8,45	8,47

Tab. 1: ¹H-NMR-Daten von **17**, **8** und ¹⁵**8**

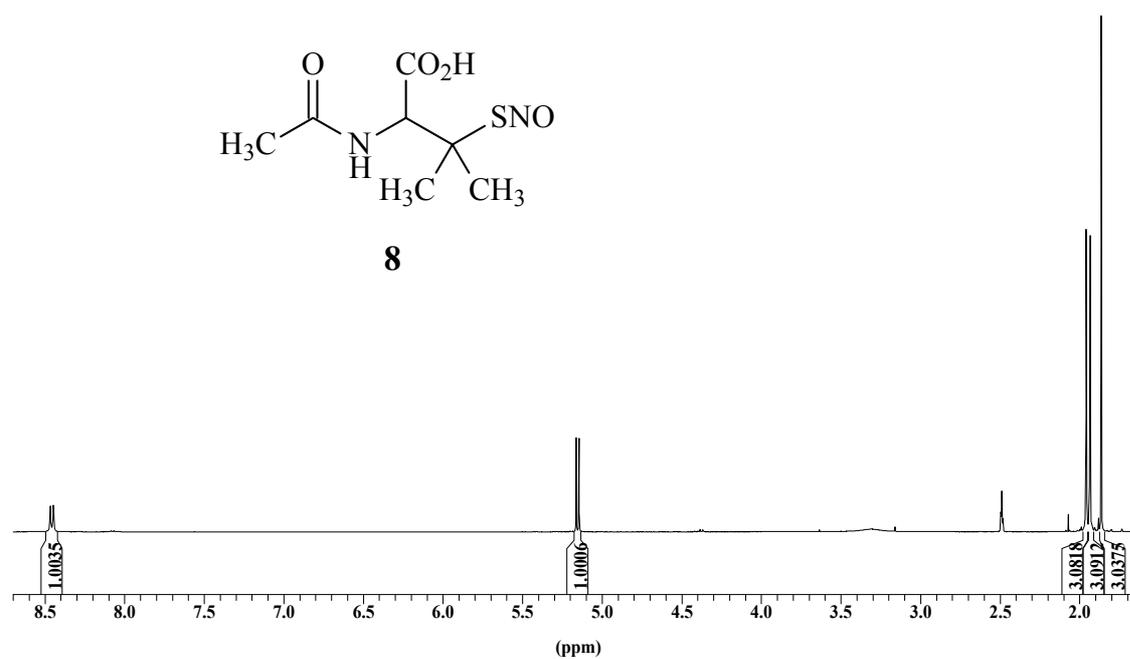


Abb. 16: ¹H-NMR-Spektrum (500 MHz, DMSO-d₆) von **8**

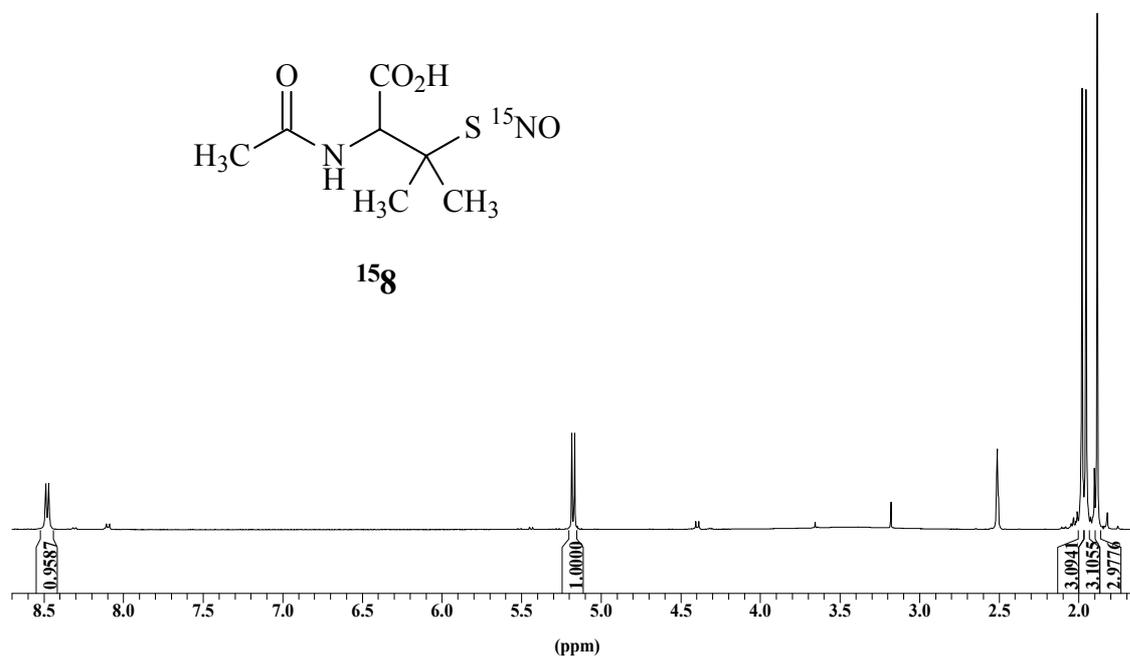


Abb. 17: ¹H-NMR-Spektrum (500 MHz, DMSO-d₆) von **158**

Die in Abb.4 und 5 abgebildeten Spektren der beiden Nitrosothiole bestätigen Struktur und auch Reinheit, selbstverständlich sind sie identisch.

In FAB-Massenspektren von **8** und **158** findet man ausgehend vom Molekülionenpeak bei $m/z = 221$ ($M^+ + 1$) und $m/z = 222$ ($M^+ + 1$) eine für Nitrosothioverbindungen typische, schnelle Abspaltung von ¹⁴NO, bzw. ¹⁵NO zu $m/z = 191$. Die weiteren denitrosierten Fragmente sind bei **8** und **158** identisch.

2 Synthese und Charakterisierung von ^{15}N -Molsidomin

2.1 Literaturbekanntes zur Synthese von ^{14}N -Molsidomin

^{14}N -Molsidomin ist ein Arzneistoff, der seit vielen Jahren zur Therapie von *Angina pectoris* eingesetzt wird. Das Wirkprinzip beruht auf der Abspaltung von NO aus dem Heterocyclus durch enzymatischen und nicht-enzymatischen Abbau. Die erste Darstellung erfolgte durch *Casas et al.*⁴⁷, die (Di-hydroxyethyl-amino)-sydnonimin (**40**) mit Triphenylphosphindiethylester in Dichlormethan 48 Stunden bei Raumtemperatur umgesetzt haben. **40** wurde durch Triphenylphosphindiethylether unter Ringschluß dehydratisiert (Abb. 18). Das Produkt **6** wurde in 83%iger Ausbeute erhalten.

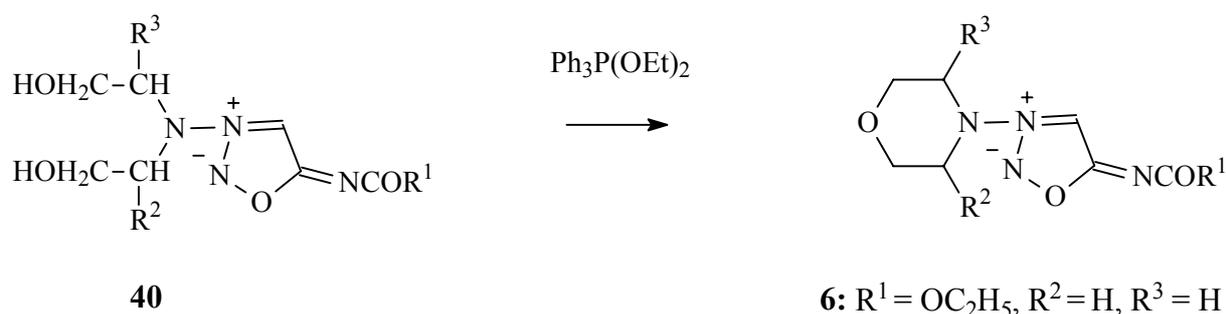


Abb. 18: Darstellung von Molsidomin nach *Casas et al.*

Nach *Gregorio et al.*⁴⁸ (Abb. 19) wurde zunächst Cyanomethanol durch Reaktion von Paraformaldehyd mit Kaliumcyanid hergestellt. Dieses wurde mit *N*-Aminomorpholin **18** drei Tage bei Raumtemperatur umgesetzt, und nach Zugabe von SOCl₂ bei 0°C erhielt man Cyanomethylaminomorpholinhydrochlorid **19**, welches durch NaNO₂ und HCl in einer wässrigen Lösung nitrosiert wurde. Anschließend wurde Morpholinonitrosoaminoacetonitril **20** durch HCl in Methanol cyclisiert. Morpholinosydnoniminhydrochlorid **5** wurde schließlich mit

Chlorameisensäureethylester in wässriger NaHCO_3 -Lösung acyliert. Die Ausbeute an Produkt **6**, bezogen auf Aminomorpholin betrug 33,5 %.

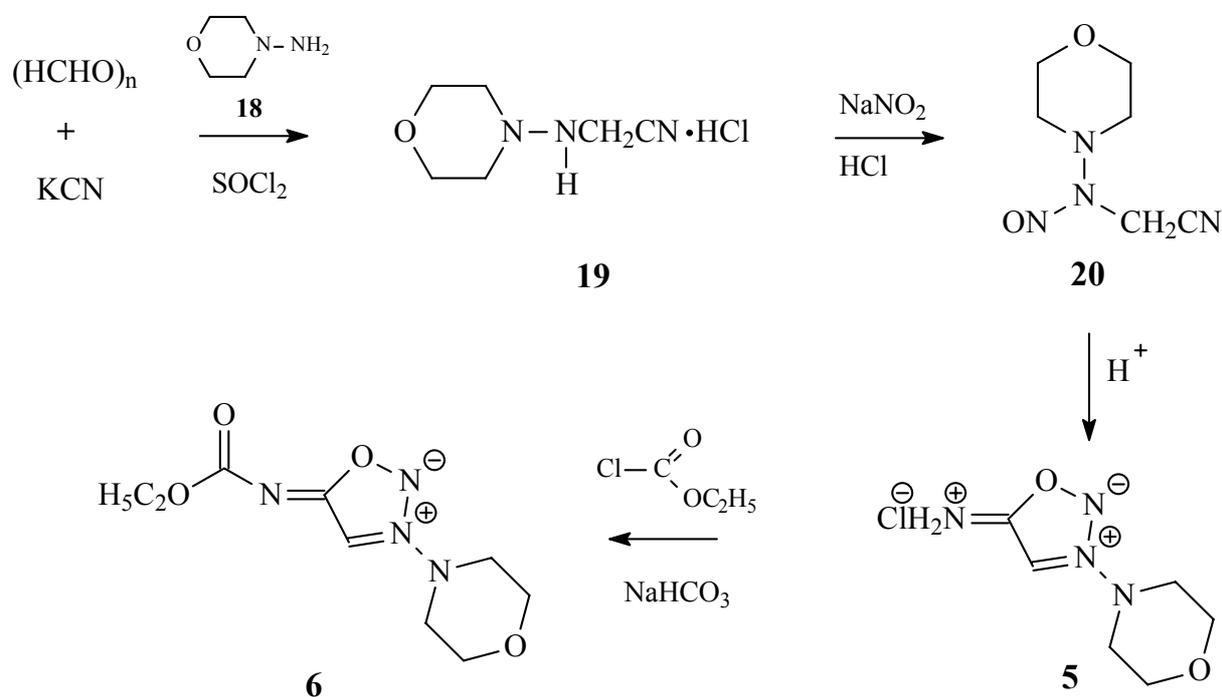


Abb. 19: Darstellung von Molsidomin nach Gregorio et al.

2.2 Synthese von ¹⁴N-SIN-1 und ¹⁴N-Molsidomin

Die Darstellung von SIN-1 (**5**) erfolgte in einer „Eintopfreaktion“, 0,1 mol *N*-Aminomorpholin (**18**) wurde mit der equimolaren Menge Natriumcyanid bei pH 4,0 und 0,11 mol Formaldehyd in Form einer Formalin-Lösung bei pH 7,5 versetzt und das gebildete **19** direkt durch Zugabe von einer wässrigen Lösung von NaNO_2 zu **20** nitrosiert. Zur Cyclisierung wurde HCl -Gas eingeleitet, worauf **5** (SIN-1) als farbloser Feststoff ausfiel und abgesaugt wurde. **5** wurde danach mit Chlorameisensäureethylester und NaHCO_3 zu Molsidomin (**6**) acyliert. Nach Aufarbeitung und Reinigung konnte **6** in einer Ausbeute von 76 % (in Bezug auf **5**) erhalten werden.

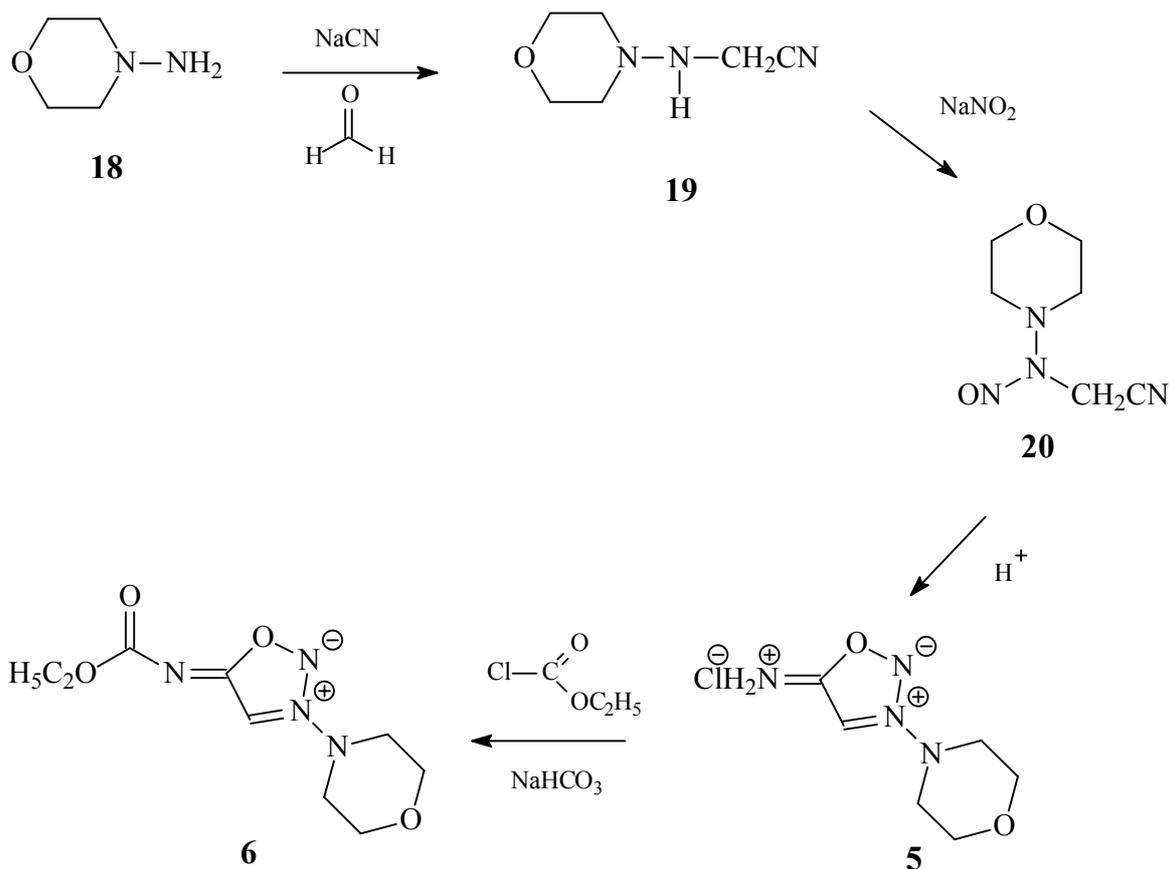


Abb. 20: Darstellung von ^{14}N -SIN-1 und ^{14}N -Molsidomin

2.3 Synthese von ^{15}N -SIN-1 und ^{15}N -Molsidomin

Analog zur bereits beschriebenen Darstellung von ^{14}N -SIN-1 und ^{14}N -Molsidomin wurden ^{15}N -SIN-1 und ^{15}N -Molsidomin unter Verwendung von $\text{Na}^{15}\text{NO}_2$ als Nitrosierungsmittel hergestellt (Abb. 21).

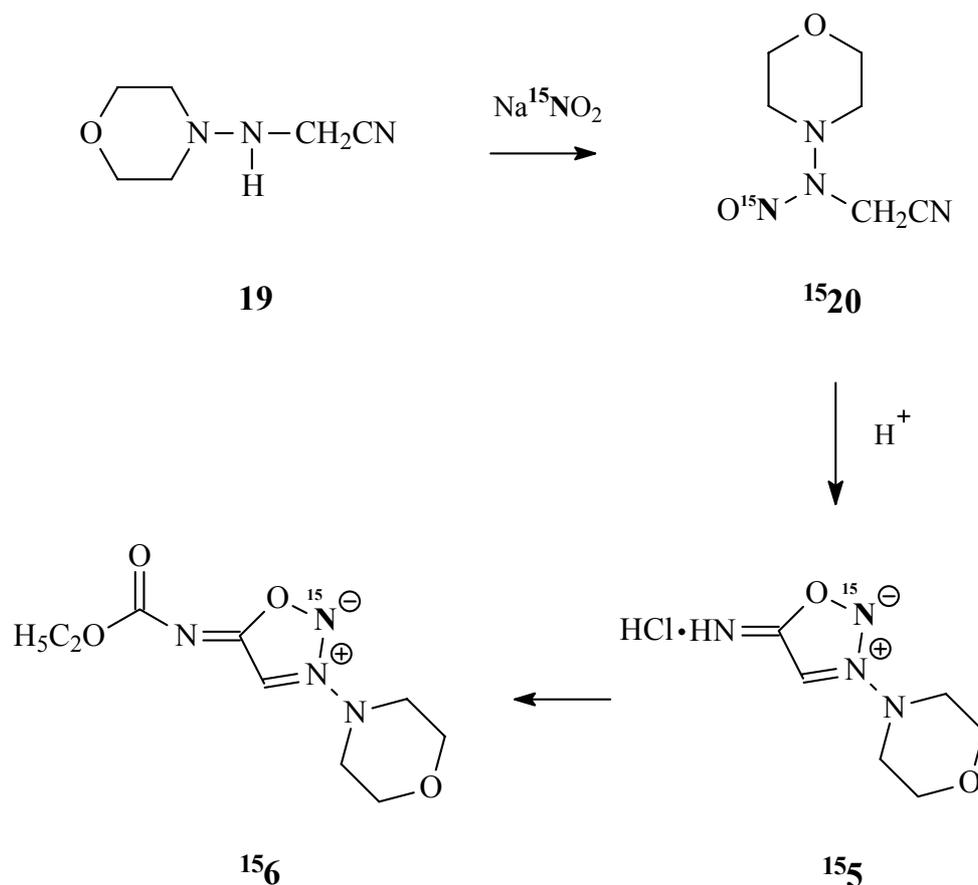


Abb. 21: Darstellung von $^{15}\text{SIN1}$ und ^{15}N -Molsidomin

2.4 Massenspektrometrie

Im Massenspektrum von Molsidomin **6** (Abb. 24) findet man ausgehend vom Molekülionenpeak bei $m/z = 242$ (**6**) eine Abspaltung von NO zu $m/z = 212$ (**42**) sowie eine Abspaltung der Ethoxygruppe zu $m/z = 197$ (**41**). Ausgehend vom Fragment $m/z = 212$ (**42**) erfolgt eine Decabonylierung und Abspaltung von Ethen zum Fragment mit $m/z = 140$ (**43**). Die Fragmente mit $m/z = 113$ (**44**) und $m/z = 86$ (**45**) werden jeweils durch Abspaltung von HCN erklärt. Die Abspaltung von CH_2O führt zum Basispeak mit $m/z = 56$ (**46**) (Abb. 22).

Im Massenspektrum von Molsidomin $^{15}\text{6}$ (Abb. 25) erfolgt die Fragmentierung von ^{15}N -Molsidomin $^{15}\text{6}$ ausgehend vom Basispeak bei $m/z = 243$ wie für **6** beschrieben (Abb. 22).

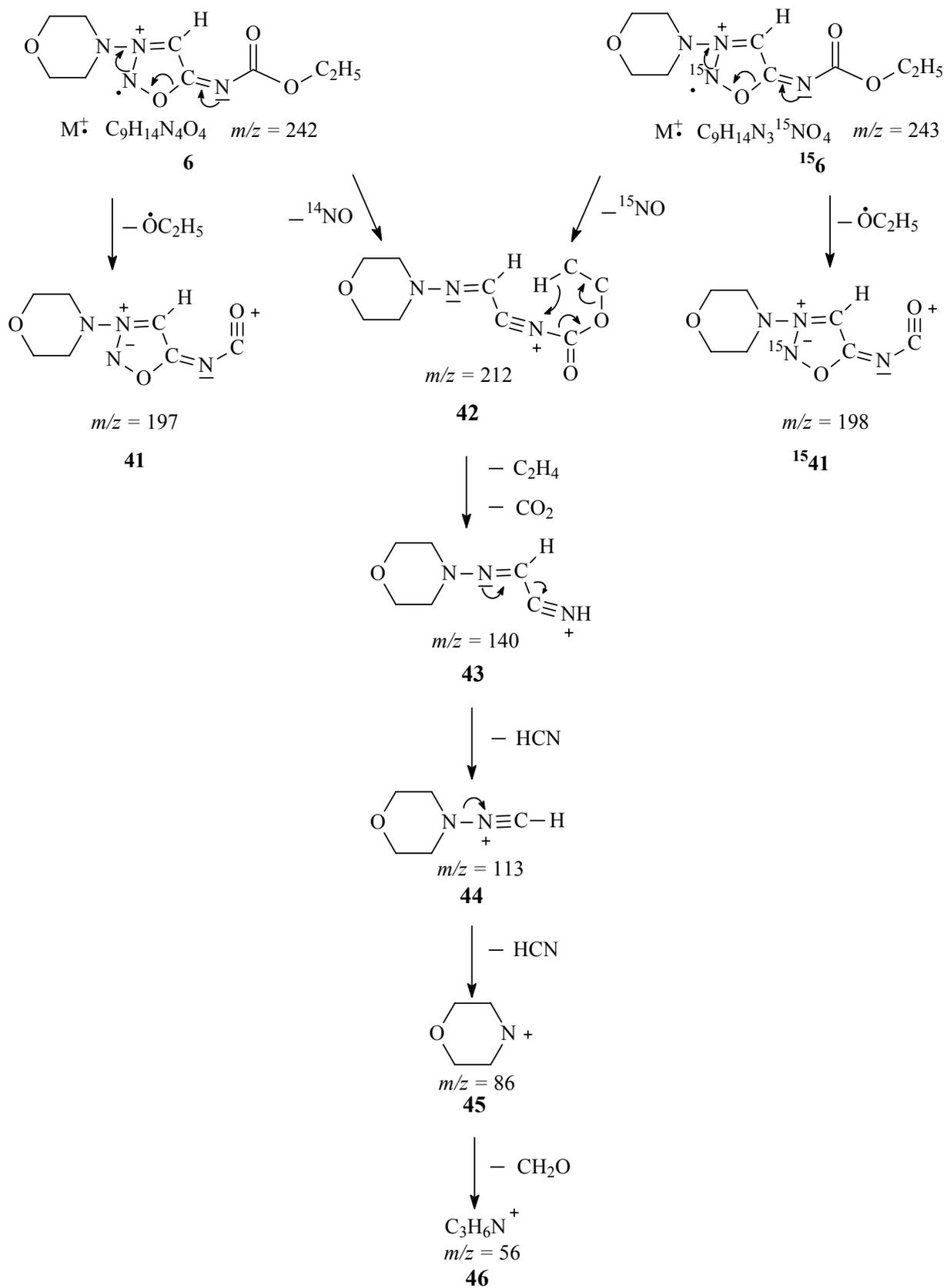


Abb. 22: Fragmentierungen von **6** und ¹⁵**6**

Die Fragmentierung des Molsidominmoleküls unter selektiver Eliminierung von NO, die in Abb. 22 beschrieben ist und im Falle von ^{14}N - und ^{15}N -Molsidomin zum identischen Ester-Fragment **42** führt, ist ein bemerkenswerter Befund in Hinblick auf die Pharmakokinetik des Molsidomins. Nach wissenschaftlichem Kenntnisstand²¹ verläuft die Freisetzung von NO aus Molsidomin über eine kombinierte enzymatische und nicht-enzymatische Biotransformation mit **SIN-1** und **SIN-1 A** als Zwischenprodukten vor der NO-Bildung. (Abb. 23) Das Verhalten unter massenspektroskopischen Bedingungen könnte zumindest als Hinweis gewertet werden, dass auch *in vivo* eine unmittelbare NO-Freisetzung aus Molsidomin möglich ist. Eine Hypothese, die überprüft werden sollte.

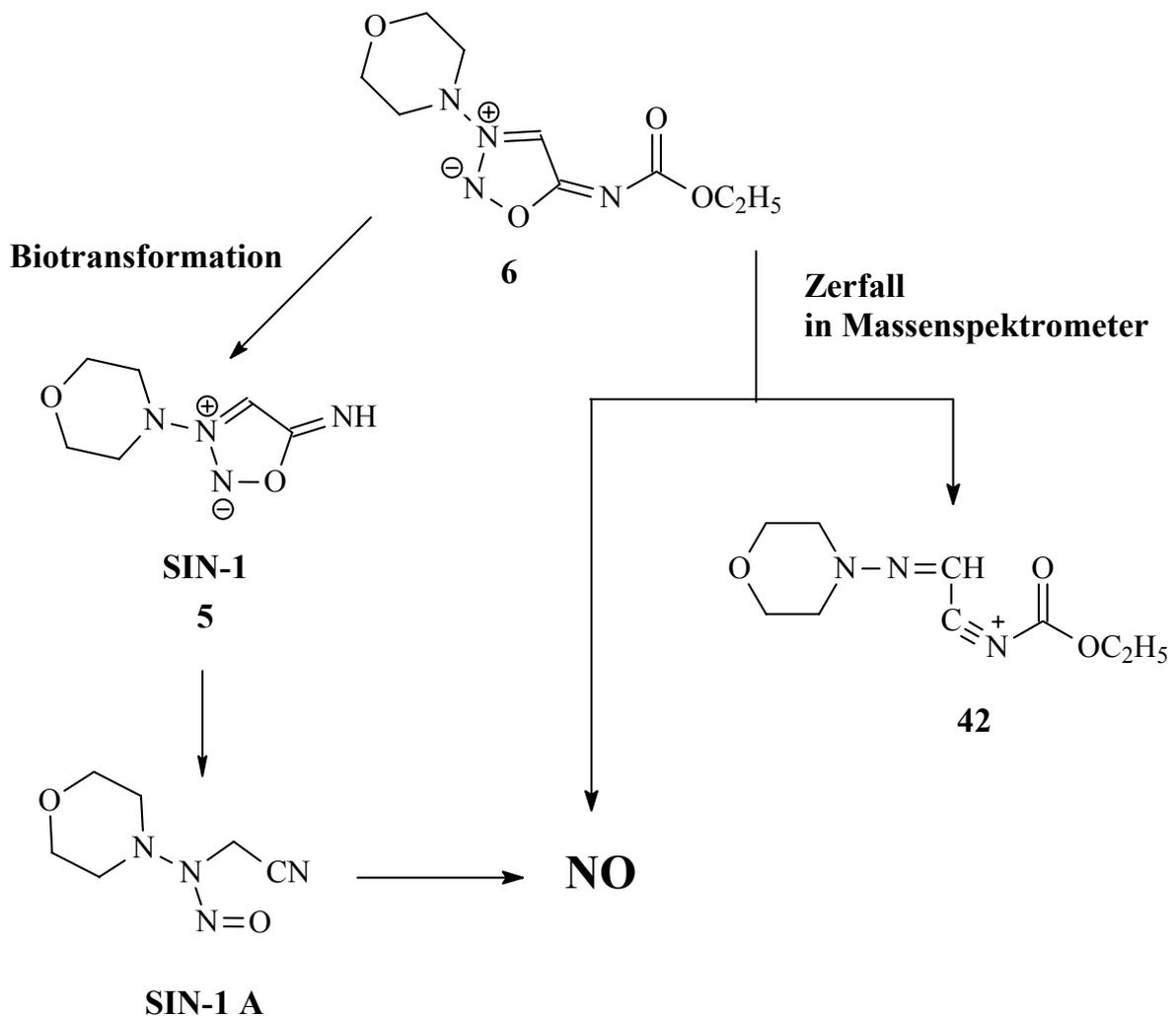


Abb. 23: Biotransformation von Molsidomin versus Zerfall im Massenspektrum

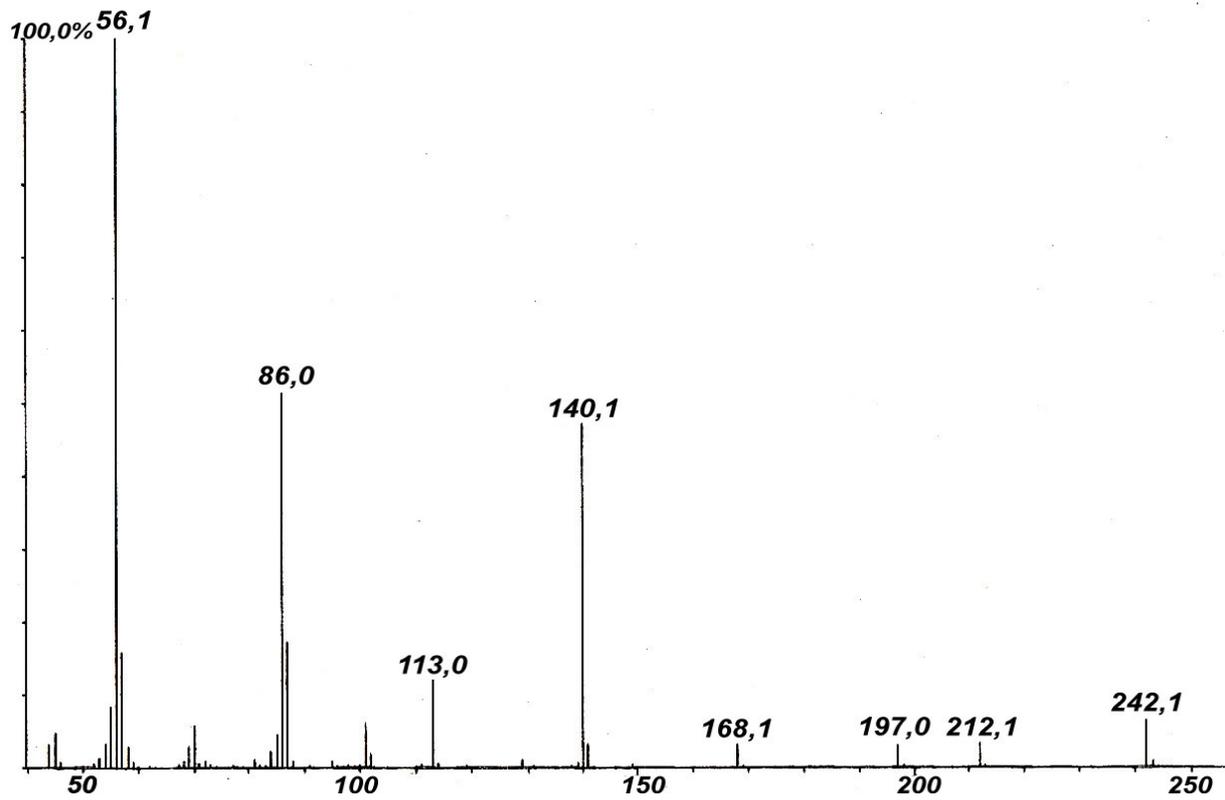


Abb. 24: Massenspektrum (MS-50, EI mit Hochauflösung) von **6** (^{14}N -Molsidomin)

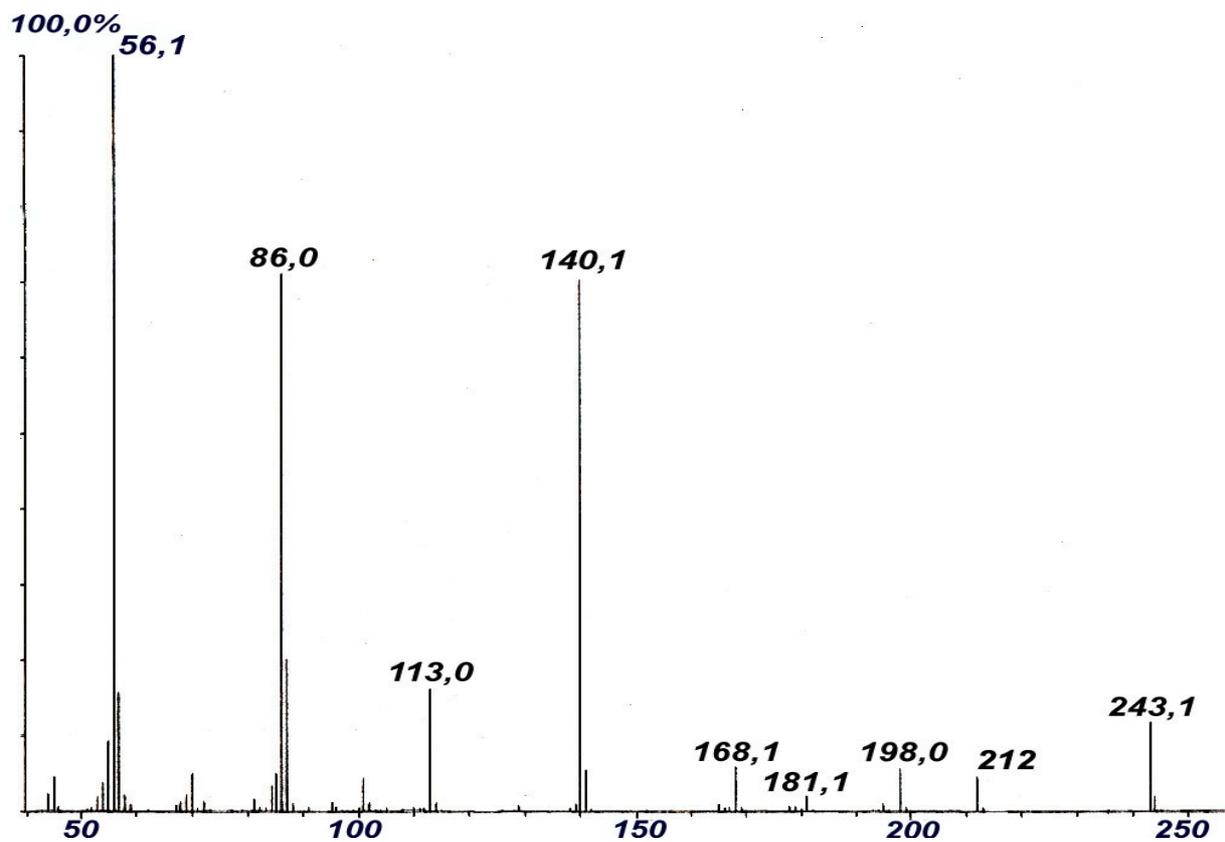


Abb. 25: Massenspektrum (MS-50, EI mit Hochauflösung) von **156** (^{15}N -Molsidomin)

2.5 Qualitätskontrolle

Das vorangegangene Kapitel 2.3 beschrieb die Darstellung von ^{15}N -Molsidomin. Wie in der Einleitung (2.2) ausgeführt, sollte das erhaltene Produkt in therapeutischen Dosen von 2 mg im Selbstversuch eingenommen werden. Im Sinne der Arzneimittelsicherheit wurde dazu bei der Firma Aventis (Clariant) eine Qualitätskontrolle durchgeführt, wie sie für handelsübliches ^{14}N -Molsidomin Standard ist. 500 mg unseres Produktes wurden untersucht (HPLC/GC), das Ergebnis ist in Tab. 2 dargestellt.

Potentielle Verunreinigungen	Ergebnisse Für ^{15}N -Molsidomin	Spezifikationen für kommerzielles ^{14}N -Molsidomin
HPLC:		
2,4-Oxazolindindion	n. n.*	< 0,1 %
4-Morpholinecarboxamid	n. n.	< 0,1 %
4-Hydroxyacetylmorpholin	n. n.	< 0,1 %
(4-Morpholinylamino)-acetonitril	n. n.	< 0,1 %
4-Formylmorpholin	n. n.	< 0,1 %
(4-Morpholinylimino)-acetamid	n. n.	< 0,1 %
3-Morpholinopyrrolidin	n. n.	< 0,1 %
(4-Morpholinylnitrosoamino)-acetonitril	n. n.	< 0,1 %
(4-Morpholinylimino)-acetonitril	n. n.	< 0,1 %
Morpholin- <i>N</i> -carboxylicacid-ethylester	n. n.	< 0,1 %
<i>N</i> -[2-(4-Morpholinylimino)acetyl]-carbaminsäureethylester	< 0,01 %	< 0,1 %
Unbekannte < 0,05 %	n. n.	< 0,1 %
Unbekannte, Summe	0,01 %	< 0,1 %
Morpholin	< 100 µg/g	≤ 100 µg/g
4-Nitrosomorpholin	< 3 µg/g	≤ 3 µg/g
Summe	< 0,01 %	≤ 0,5 %

Lösungsmittel (GC)**		
Methanol	0,07 %	≤ 0,1 %
Ethanol	0,54 %	≤ 0,5 % (ICH-Richtlinie)
Ethylacetat	< 0,01 %	≤ 0,1 %
Gehalt (HPLC)**	99,0%	99,0 to 101,0%

* nicht nachweisbar

** Nach zweitem Trocknen

Tab. 2: Analysenzertifikat für ¹⁵N-Molsidomin (Clariant)

Resultat:

- Gehalt und Reinheit entsprechen den Spezifikationen des kommerziellen Produktes.
- Die Mengen an Lösungsmitteln entsprechen der ICH-Richtlinie für Lösungsmittel der Klasse III.

Das Analysenergebnis, in Verbindung mit den spektroskopischen Befunden ließ eine Einnahme unbedenklich erscheinen.

2.6 Herstellung von ¹⁵N-Molsidomin-Kapseln zur Einnahme im Selbstversuch

22 mg ¹⁵N-Molsidomin und 88 mg Lactose wurden in einem Porzellanmörser gut verrieben. Je 10 mg des gemischten Pulvers wurden in Hartgelatine-Kapseln abgefüllt. Diese Arbeiten wurden im Arzneimittellabor der Pharmazeutischen Technologie der Universität Bonn durchgeführt. Die 10 gefüllten Kapseln wurden im Kühlschrank trocken aufbewahrt.

3 Darstellung von Nitrosothiolen durch Nitrosierung

Wie in der Einleitung 2.3 ausgeführt, sollte das Verhalten verschiedener, strukturell unterschiedlicher Thiole unter den Standardbedingungen einer Nitrosierung mit

Natriumnitrit untersucht werden. Eine erfolgreiche Nitrosierung kann an Farbänderungen erkannt werden. Die reinen Nitrosothiolverbindungen sind entweder rote oder grüne Flüssigkeiten oder Feststoffe.

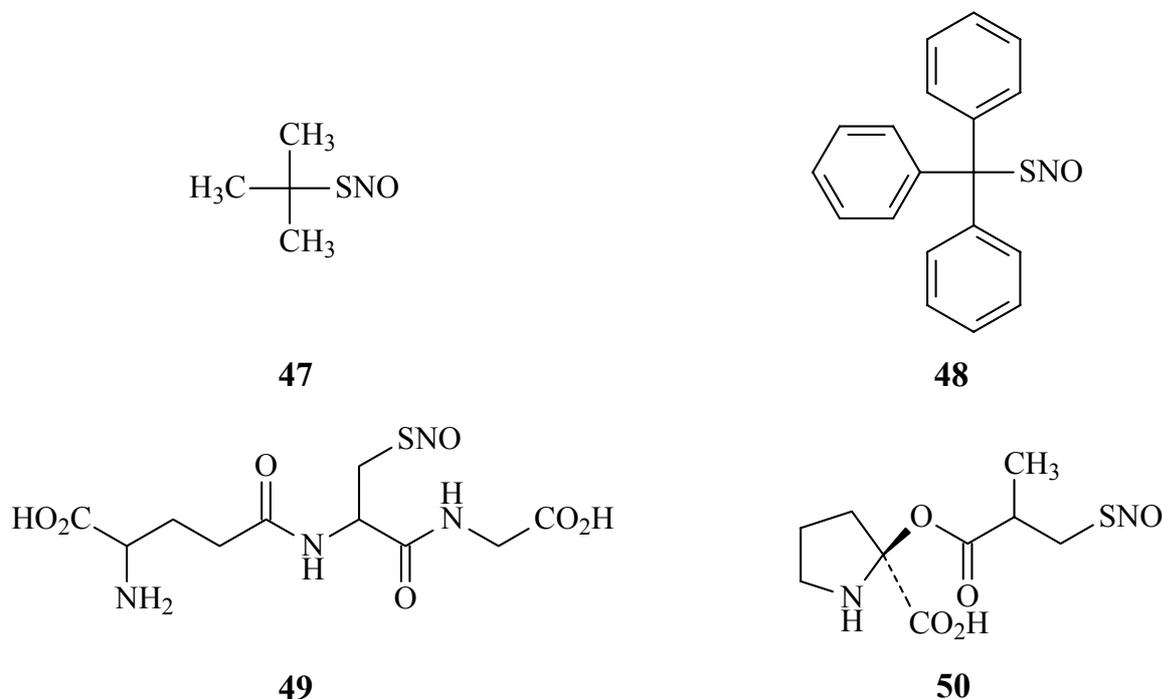


Abb. 26: Beispiele für tertiären und primären Nitrosothiolverbindungen

Wang et al. erklären dies wie folgt: Nitrosothiolverbindungen haben charakteristische UV-vis Spektren.⁴⁹ Die tertiären Nitrosothiole sind normalerweise grün, wie z.B. SNAP, **47**, und **48**; die primären, wie **49**, **50**, rötlich.⁵⁰ Die UV-vis Spektren zeigen drei Banden: Zwei intensive Banden im UV und eine schwache Bande im sichtbaren Bereich. Die erste Bande liegt in der Region von 225 bis 261 nm und gehört zu einem $\pi \rightarrow \pi^*$ Übergang⁵¹. Die zweite Bande liegt bei 330 bis 350 nm Region und gehört zu einem erlaubten $n \rightarrow \pi^*$ Übergang. Die dritte Bande liegt im visuellen Bereich bei 550 bis 600 nm Region und kann einem verbotenen $n \rightarrow \pi^*$ Übergang zugeordnet werden. Letzte Bande ist für die Farbe der Verbindung verantwortlich.

Die S-NO Bindung in Nitrosothiolverbindungen hat aufgrund der Delokalisierung von Elektronenpaaren am Schwefel und der Nitrosogruppe signifikanten Doppelbindungscharakter. Es treten deshalb zwei Isomeren, syn und anti, auf.⁵²

Welche Konformation bevorzugt wird hängt von der aliphatischen Substitution ab: Die syn-Konformation wird bevorzugt bei primären und sekundären aliphatischen Gruppen, während tertiäre Alkylgruppen, wie in SNAP, die anti-Konformation bevorzugen.

3.1 Anorganisches Nitrit als Nitrosierungsreagenz

Bei der Nitrosierung mit NaNO_2 fungiert das Nitrosylkation NO^+ , gebildet aus anionischem Nitrit durch zweifache Protonierung und Dehydratisierung, als elektrophiles Agens (Abb. 27).

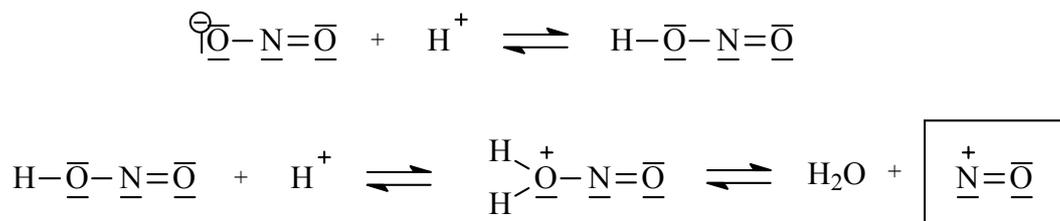


Abb. 27: Bildung des Nitrosylkations NO^+

Die Reaktion verläuft analog der Nitrierung mit Salpetersäure, bei der das Nitroniumkation NO_2^+ als Elektrophil reagiert. Da NO^+ weniger reaktionsfähig als NO_2^+ ist, bleibt die Nitrosierung auf sehr reaktionsfähige Verbindungen (Alkohole, Thiole, Amine, aktivierte Aromaten) beschränkt.

Die spezifische Nitrosierung von Thiolen mit NaNO_2 ist – abhängig vom eingesetzten Thiol – sehr temperatursensitiv. Bei einer zu hohen Reaktionstemperatur kommt es leicht zur Zersetzung der Reaktionsprodukte unter Abspaltung von NO und Bildung der korrespondierenden Disulfide. Außerdem sind viele Nitrosothiole sehr lichtempfindlich. Bei der photochemischen Zersetzung von Nitrosothiolverbindungen werden ebenfalls wiederum Disulfide und NO gebildet. (Abb. 28)

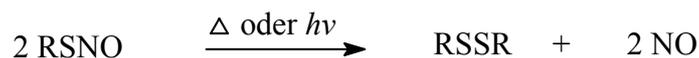


Abb. 28: Thermische und photochemische Zersetzung von Nitrosothiolverbindung

3.2 Versuche zur Darstellung und Isolierung von *DL*-*S*-Nitrosomercaptobernsteinsäure

DL-Mercaptobernsteinsäure (**21**) ist eine sterische wenig anspruchsvolle Verbindung. Sie wurde in einer salzsauren, methanolischen Lösung mit NaNO_2 nitrosiert. Dazu wurde ein Gemisch aus gleichen Teilen Methanol, 1N-Salzsäure und konz. Schwefelsäure mit dem Thiol und anschließend mit einer wässrigen Lösung der doppelmolaren Menge Natriumnitrit versetzt. Bei der Zugabe der NaNO_2 -Lösung färbt sich die Mischung sofort hellrot, was auf die rasche Bildung eines instabilen Nitrosothiols hinweist. Nach 20 min. bei Raumtemperatur war die Färbung noch zu beobachten, allerdings wurde kein Nitrosothio-Niederschlag wie im Falle von SNAP gebildet. Alle Versuche, nach Aufarbeitung ein gefärbtes Produkt zu isolieren, schlugen fehl. Auch verschwand die rote Farbe während der Aufarbeitung, was auf eine vollständige Zersetzung hindeutete.

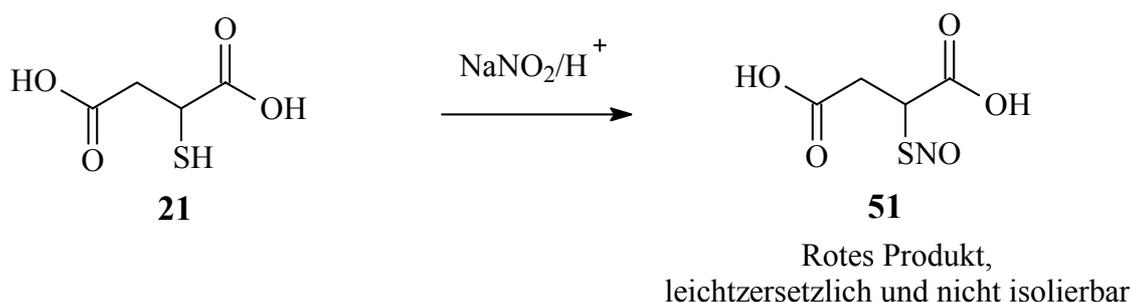


Abb. 29: Darstellung von *DL*-*S*-Nitrosomercaptobernsteinsäure

3.3 Versuche zur Darstellung und Isolierung von *S*-Nitroso-2-mercaptobenzoessäure

Thiosalicylsäure **22** wurde – wie bereits in Kapitel 3.3 für Mercaptobernsteinsäure beschrieben – mit NaNO_2 nitrosiert. Da die Löslichkeit von **22** in Methanol geringer ist, wurde die doppelte Menge Lösungsmittel verwendet. Während der Zugabe der NaNO_2 -Lösung färbte sich die Mischung zunächst hellrot. Noch während der langsamen Zugabe – insgesamt ca. 25 min – erfolgte bereits ein Farbumschlag nach dunkelrot und auch schon die Bildung eines gelben Niederschlages. Sehr wahrscheinlich wurde unter Bildung von nitrosen Gasen das entsprechende Disulfid gebildet. Das Verhalten weist auf die Bildung und den umgehenden Zerfall eines sehr instabilen Nitrosothiols hin. (Abb. 30)

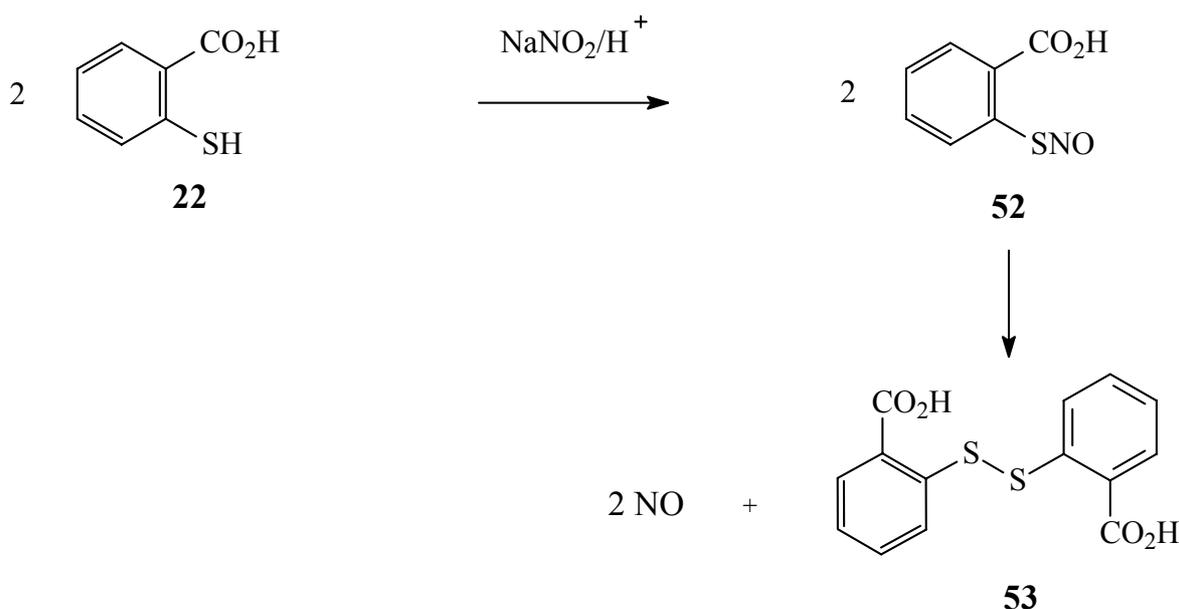


Abb. 30: Versuche zur Darstellung von *S*-Nitroso-2-mercaptobenzoessäure

Der gelbe Niederschlag wurde isoliert und durch NMR-spektroskopisch untersucht. Die ^1H -NMR- und Schmelzpunktdaten werden in Tab. 3 mit den aus der Literatur bekannten⁵³ Daten von 2-2'-Dithiolbisbenzoessäure verglichen.

	¹ H-NMR				Smp.
	H-Position	Verschiebung δ	Multiplizität	H- Anzahl	
53	aromat. H	7,2-7,7	m	8	287-
	2×COOH	7,9-8,2	dd ($J = 8.0, <1$)	2	292°C
2-2'- Dithiolbis(benzoesäure) ⁵³	aromat. H	7,3-7,7	m	8	289-
	2×COOH	8,0	br s	2	291°C

Tab. 3: ¹H-NMR-Daten und Schmelzpunkte von **53** und 2-2'-Dithiolbis(benzoesäure)

Tatsächlich handelt es sich demnach um das Disulfid **53**, was den Schluß erlaubt, dass zunächst das Nitrosothiol **52** entsteht, welches dann umgehend zu **53** und NO in einer internen Redoxreaktion zerfällt. Es sei darauf hingewiesen, dass nach unserer Kenntnis in der Literatur bislang kein stabiles aromatisches Nitrosothiol beschrieben wurde.

3.4 Versuche zur Darstellung und Isolierung von *S*-Nitroso-2-mercaptobenzimidazol

2-Mercaptobenzimidazol **23** wurde wie üblich in salzsaurer methanolischer-Lösung unter H₂SO₄-Zusatz mit NaNO₂ nitrosiert. Auffällig war hier, dass beim Zutropfen der NaNO₂-Lösung zunächst eine Grünfärbung auftritt, die sehr sehr schnell nach hellgelb wechselte. Später bildete sich ein gelber Niederschlag unter gleichzeitiger Bildung von nitrosen Gasen. Letzteres zeigte eindeutig den Zerfall des Nitrosothiols zu NO und dem analogen Disulfid **55** an. Das intermediäre Nitrosothiol war in diesem Fall grün und nicht rot gefärbt.

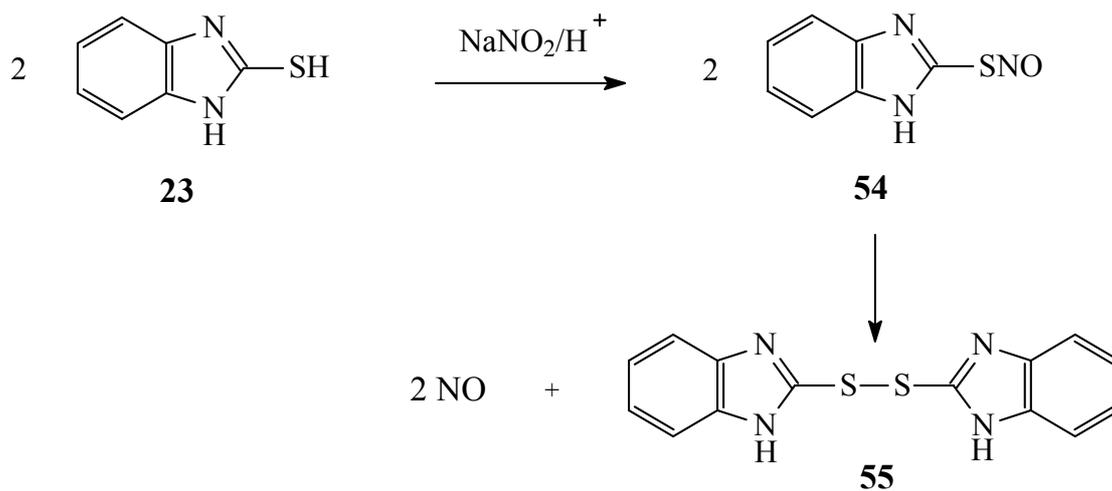


Abb. 31: Versuche zur Darstellung von *S*-Nitroso-2-mercaptobenzimidazol

Das $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von **55** zeigt bei 5,3 ppm ein breites Signal, das den beiden NH-Protonen zugeordnet werden kann. Für die aromatischen Protonen finden sich Multipletts bei 7,1-7,9 ppm. Erwartungsgemäß fehlt das Signal der SH-Gruppe, welches beim Edukt **23** bei 12,5 ppm gefunden wurde.

3.5 Versuche zur Darstellung und Isolierung von *S*-Nitroso-8-mercaptomenthon

8-Mercaptomenthon **24** wurde nach der Standardmethode mit NaNO_2 nitrosiert. Bei Zugabe der NaNO_2 -Lösung färbte sich die Mischung dunkelgrün. Vom Rohprodukt, einer dunkelgrünen öligen Substanz wurde ein IR-Spektrum aufgenommen, das eine – für Nitrosothiolverbindungen typische⁵⁴ – Bande bei 1458 cm^{-1} zeigt. Die Reinigung gelang nicht, da sich das Rohprodukt bei allen versuchten Reinigungsoperationen, unter Verlust der grünen Farbe, zersetzte.

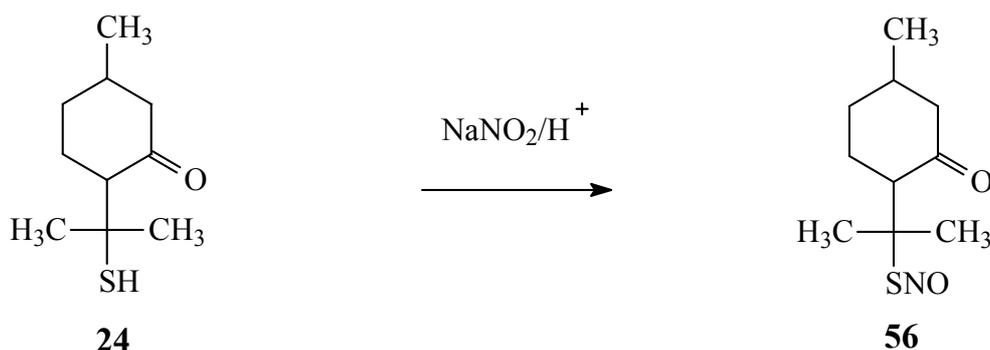


Abb. 32: Darstellung von *S*-Nitroso-8-mercaptomenthon

3.6 Versuche zur Darstellung von *S*-Nitroso-cystein

Cystein wurde – wie bereits in den vorangegangenen Kapiteln beschrieben – mit NaNO₂ nitrosiert. Bei Zugabe der NaNO₂-Lösung färbte sich die Mischung zunächst hellbraun, danach hellrot. Danach erfolgte Entfärbung unter Bildung eines Niederschlages.

In einem weiteren Versuch wurde die Reaktionstemperatur von 25°C auf 1-3°C reduziert. Zur Komplexierung von Metallspuren im destillierten Wasser, welche eine Nitrosothiol-Zersetzung katalysieren, wurde EDTA zugesetzt. Auch unter diesen Bedingungen fiel aus der zunächst hellroten Lösung ein weißer Niederschlag aus, bei dem es sich nicht um ein Nitrosothiol handeln konnte. In der Literatur wird verschiedentlich über Untersuchungen mit *S*-Nitrosocystein berichtet. Nachfragen ergaben, dass diese Untersuchung nie mit der festen Reinsubstanz gemacht worden sind, sondern immer mit einer *in situ* hergestellten Lösung gemeint. Auf Grund der zu fehlenden strukturellen Stabilisierung – vergl. mit SNAP – muss *S*-Nitrosocystein als instabil angesehen werden.

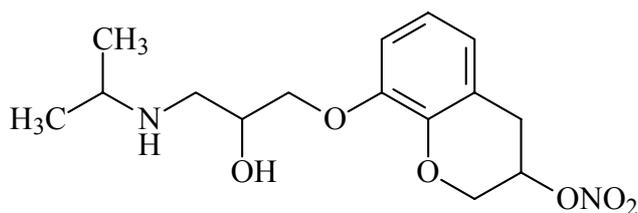
4 Nitrosothiol- β -Blocker-Hybridmoleküle

4.1 NO- β -Blocker – Konzept und Beispiele

Wie in Kapitel 2.4 der Einleitung bereits beschrieben, sollte eine NO- β -Blocker-Hybridverbindung zwei Effekte besitzen: Herzfrequenz und Kontraktionsgeschwindigkeit sollen durch Blockade von β_1 -Rezeptoren gesenkt werden, woraus eine Senkung des Blutdrucks resultiert, während das freigesetzte NO die Blutgefäße erweitert und gleichzeitig Vasospasmen, eine häufige Nebenwirkung von β -Blockern, verhindert. In NO- β -Blocker-Hybridverbindungen werden somit zwei verschiedene Funktionalitäten mit unterschiedlichen pharmakologischen Aktivitäten kombiniert. Die blutdrucksenkende Wirkung wird verstärkt und der O₂-Bedarf des Myokards wird gesenkt, was NO- β -Blocker-Hybridverbindungen zur Prophylaxe eines *Angina pectoris* Anfalls geeignet erscheinen lässt.

Die Idee, durch Kombination von zwei pharmakologischen Wirkstoffen in einer Verbindung, die gewünschte Wirkung zu erzielen ist auch im Bereich der β -Blocker nicht neu: Beim Nipradilol (3,4-dihydro-8-(2-hydroxy-3-isopropylamino)propoxy-3-nitroso-2H-1-benzopyran) (**57**)⁴² einem Hybridmolekül aus β -Blocker und Nitrat sind zwei Herzkreislauf-aktive Wirkstoffklassen molekular vereinigt. **57** wird derzeit in Form von Augentropfen bei Glaukom und okulärer Hypertension klinisch eingesetzt. In vitro erhöht **57** die Zahl der überlebenden postnatalen retinalen Ganglienzellen von Ratten, das freigesetzte NO könnte zu dieser Wirkung beitragen.

Untersuchungen des PC12 Zelltods haben gezeigt, das Nipradilol – im Gegensatz zu Timolol und Prazosin, eine cytoprotektive Wirkung besitzt und den PC12 Zelltod in einem dosisabhängigem Umfang verhindert. *Tomita et al* argumentieren, dass die cytoprotektive Wirkung auf einer S-Nitrosierung der Cysteingruppen im Enzym Caspase-3 durch das freigesetzte NO beruht. Die Aktivierung der Caspase-3 wird dadurch inhibiert, was sich wiederum auf die Aktivierung der Kinase G auswirkt.⁵⁵



57

Diesem offensichtlich erfolgreichen Konzept folgend, sollte in der vorliegenden Arbeit erstmals ein β -Blocker molekular mit einer NO – oder auch NO⁺ – freisetzenden Nitrosothiolgruppe kombiniert werden. Angestrebte Zielverbindung war das Propranolol-SNAP-Hybrid **26**. Propranolol sollte also mit *N*-Acetylpenicillamin acyliert und das entstehende Produkt nitrosiert werden.

4.1.1 Umsetzung von Propranolol mit *N*-Acetylpenicillamin

Al-Sa'doni, Khan et al. acylierten erfolgreich verschiedene Aminosäureester mit *N*-Acetylpenicillamin in Gegenwart von *N*-Cyclohexyl-*N'*-2(*N*-morpholinoethyl)-carbodiimidmethyl-*p*-toluolsulfonat (CMC-*p*-toluolsulfonat)⁵⁶. In Anlehnung an dieses Verfahren wurden äquimolare Mengen an Propranolol, freigesetzt durch Neutralisierung mit Triethylamin aus Propranololhydrochlorid (**58**), mit *N*-Acetylpenicillamin in Gegenwart von CMC-*p*-toluolsulfonat, bei 0°C versetzt und danach weitere 48 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach dem Absaugen wurde das Filtrat zuerst mit gesättigter Zitronensäure-Lösung, danach mit gesättigter Kaliumhydrocarbonat-Lösung und anschließend mit Wasser gewaschen. Nach Entfernen des Lösungsmittels i. Vak. erhielt man einen gelben Feststoff, der zur Reinigung mit absoluten Diethylether gewaschen wurde.

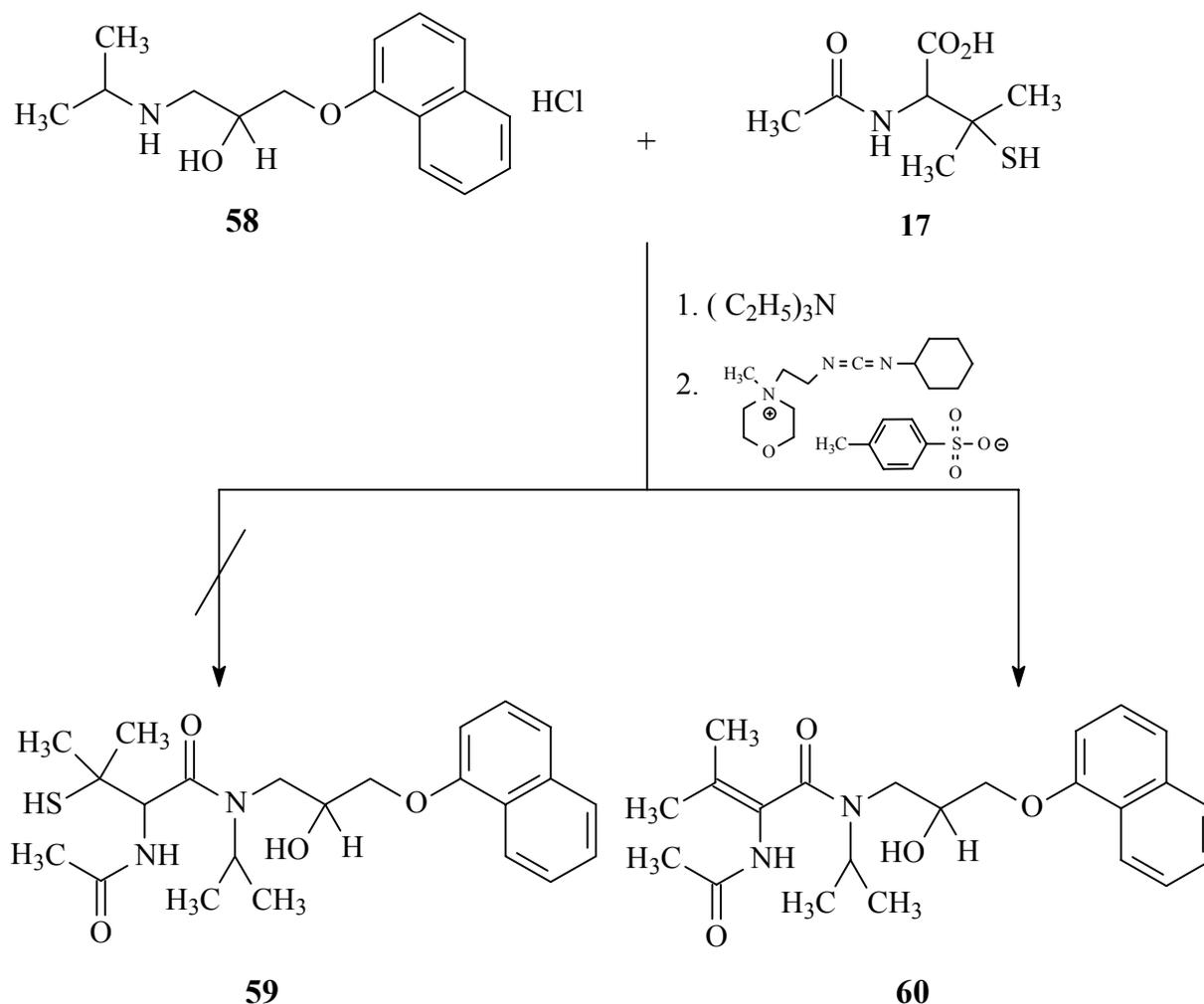


Abb. 33: Darstellung von **59** mittels *N*-Acetylpenicillamin als Acylierungsreagenz

Die Sicherung der Struktur des Reaktionsproduktes gestaltete sich problematisch. Im ^1H -NMR-Spektrum (Abb. 34) waren fast alle für Struktur **59** zu erwartenden Signale vertreten, zum Teil mit etwas überraschenden chemischen Verschiebungen. Ein 1-Protonen-Signal fehlte allerdings. Die Elementaranalyse, bezogen auf **59**, zeigte einen erhöhten Kohlenstoffwert, was auf die Abwesenheit der „schweren“ Thiolgruppe hinweist. Aufschlussreich war vor allem das ^{13}C -Spektrum (Abb. 35), welches schließlich belegte, dass es sich bei dem erhaltenen Reaktionsprodukt nicht um das gewünschte Thiol **59** sondern um das aus einer H_2S -Abspaltung resultierende Alken **60** handelte.

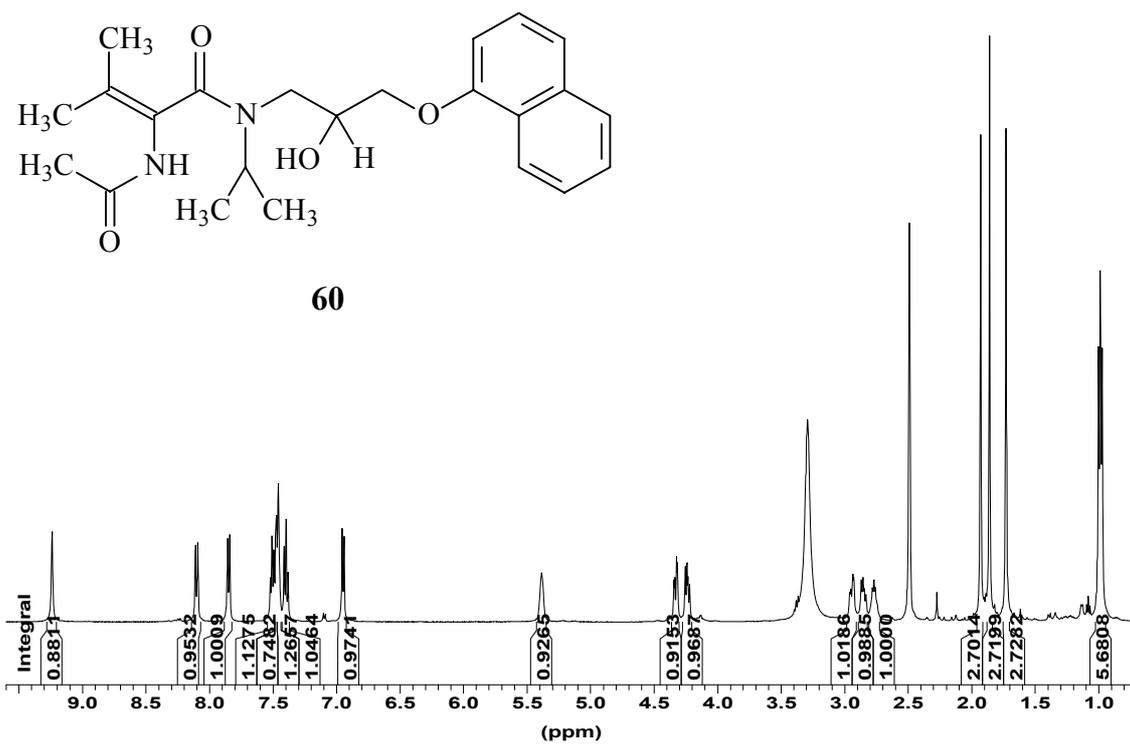


Abb. 34: $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum (DMSO- d_6 , 500 Hz) von **60**

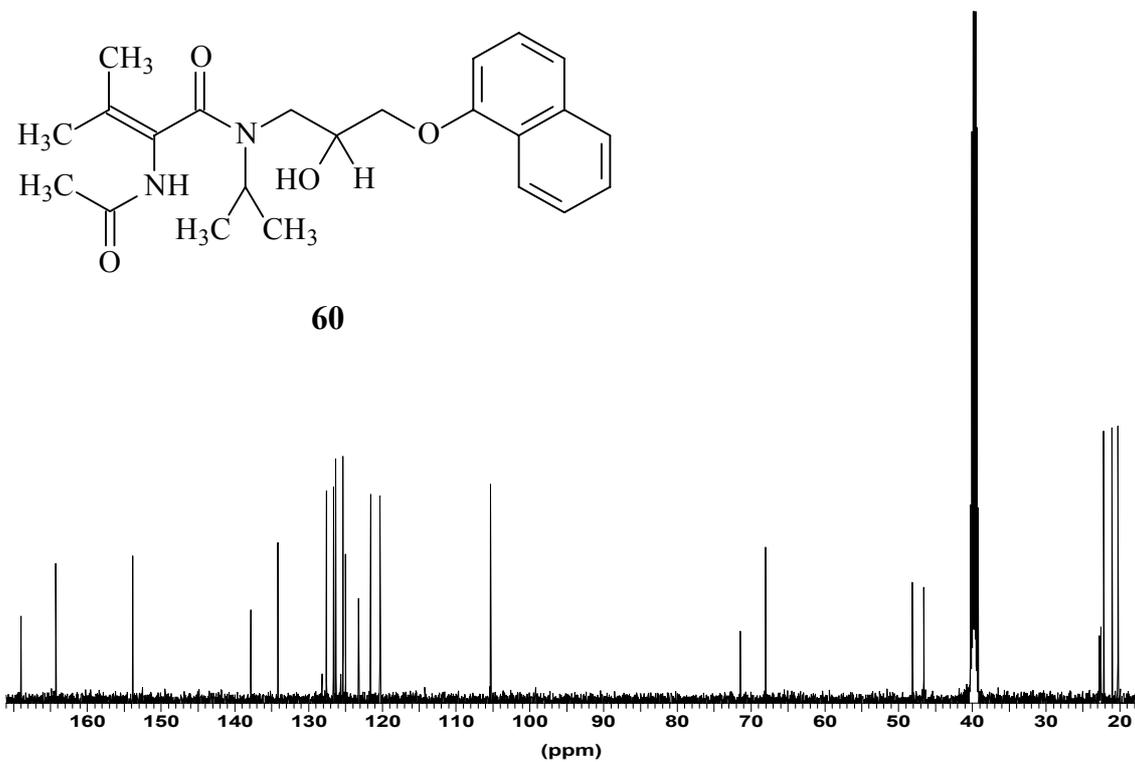
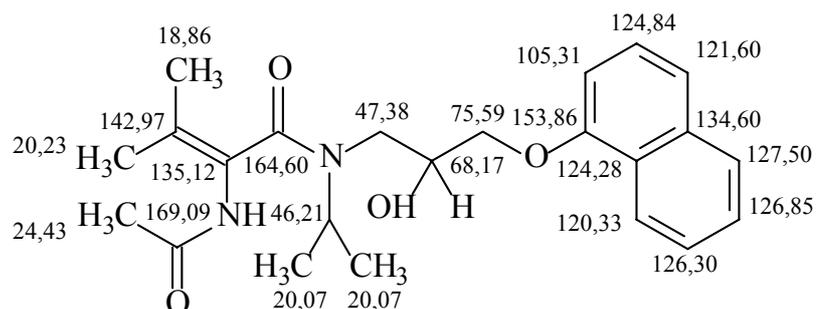


Abb. 35: $^{13}\text{C-NMR}$ -Spektrum (DMSO- d_6 , 125 Hz) von **60**

Abb. 36 zeigt einer Gegenüberstellung der für die Struktur **60** mit Hilfe des Programms C-NMR-Predictor (ACD) berechneten Verschiebungen im Vergleich mit den gefundenen. Entscheidend sind vor allem die gefundenen Alken-C-Peaks bei 138 und 134 (ber. 143 und 135).

C-NMR-Predictor (ACD) berechnete Werte:



gefundene Werte:

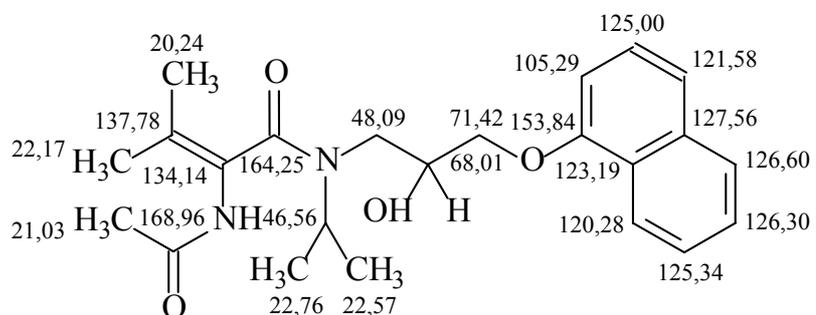
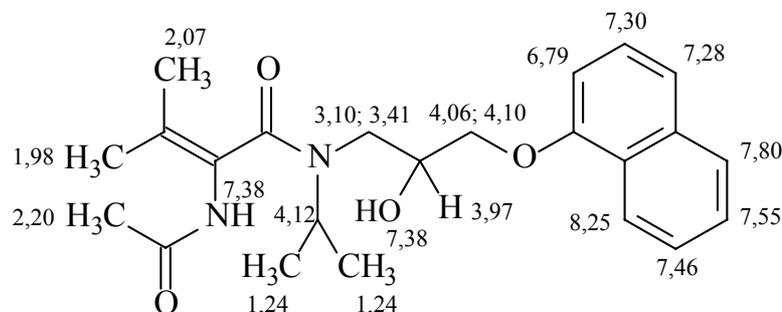


Abb. 36: ^{13}C -NMR-Spektrum-Dateien von Predictor (ACD) berechneten und **60**

Im ^1H -NMR-Spektrum fällt vor allem die Tieffeldverschiebung der beiden CH_3 -Signale im Penicillaminbereich auf, der Grund ist die Lage an der neuen C,C-Doppelbindung. In Penicillamin-Derivaten treten diese Signale in der Regel zwischen 1,16 und 1,45 auf hier liegen sie bei 1,74 und 1,94 ppm. Auffällig ist die starke Tieffeldverschiebung des 1-H-Signal neben der OH-Gruppe auf einen Wert von

$\delta = 5.42$ ppm. Abb. 37 zeigt wiederum die tatsächlich gefundenen und die mit dem ^1H -NMR-Predictor berechnete Werte.

^1H -NMR-Predictor berechnete Werte:



gefundene Werte:

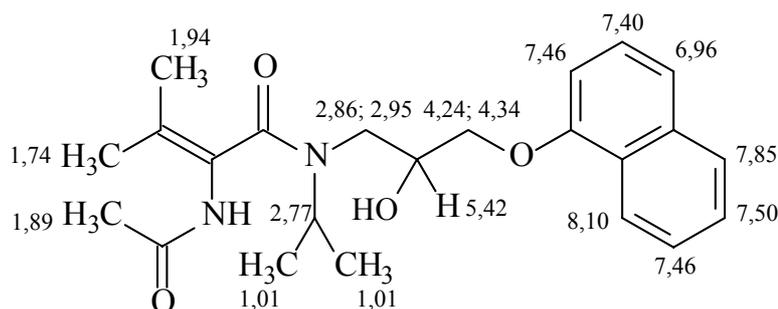


Abb. 37: ^1H -NMR-Spektrum-Dateien von Predictor (ACD) berechneten und **60**

Angemerkt sein noch, dass im Massenspektrum einer allerdings noch verunreinigten Probe der Molpeak von 398, entsprechend der Masse des Alkens **60**, beobachtet wurde.

4.1.2 Darstellung von *N*-(2,2-Dimethyl-4-oxothietan-3-yl)-acetamid

Bei der Suche nach geeigneteren Reagenzien und Methoden, einen Acetylpenicillamin-Rest an Amine, wie z.B. β -Blocker, anzubinden war ein dem Acetylpenicillamin analoges Vierring-thiolacton (**27**) interessant. Durch Ringspannung

ist dieses Molekül reaktiv und sollte grundsätzlich mit allen basischen Aminen unter Ringöffnung reagieren. Zur Darstellung wurde nach *Moynihan et al.*⁵⁷ Acetanhydrid zu einer Mischung von *DL*-Penicillamin in getrocknetem Pyridin langsam bei 0°C bis -5 °C zugetropft. Nach 14stündigem Rühren wurde die Suspension in Dichlormethan mit Salzsäure gewaschen. Nach Entfernen des Lösungsmittels erhielt man einen gelben Feststoff, der mit Petrolether angerieben und mit Ethanol umkristallisiert wurde.

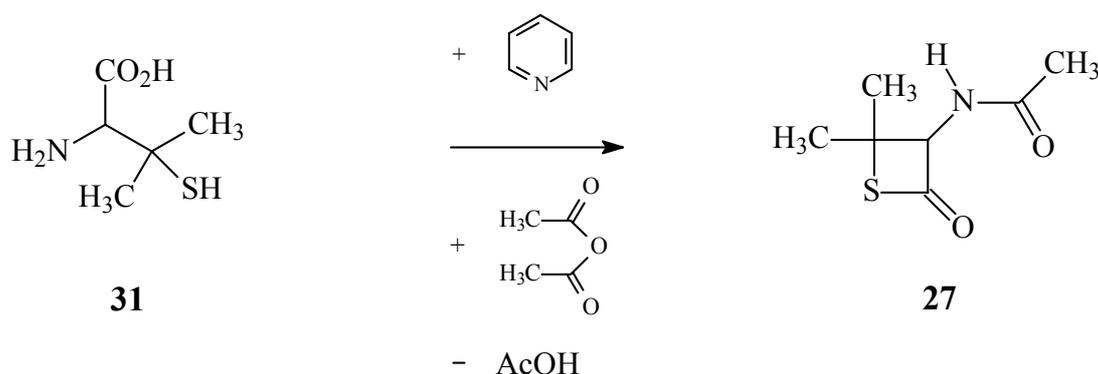
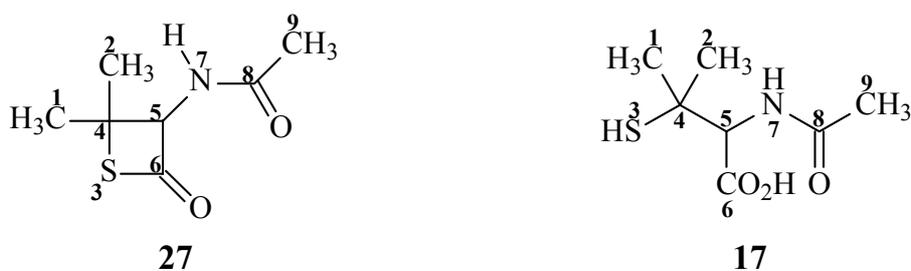


Abb. 38: Darstellung von Acylierungsreagenz – *N*-(2,2-Dimethyl-4-oxothietan-3-yl)-acetamid

Tab. 4 und Tab. 5 zeigen ¹H- und ¹³C-Spektren von **27** im Vergleich zu **17**.⁵⁷ Die deutliche Tiefeldverschiebung der Signale im gespannten Vierring wird daraus deutlich, am ausgeprägtesten die Verschiebung des Methinprotonen-Signals 5 im ¹H-NMR von $\delta = 4,50$ ppm um 1,14 auf 5,64 ppm und im ¹³C-NMR die Verschiebung des Carbonylatoms-Signals in Position 6 um $\delta = 17,2$ ppm von 175,2 auf 192,4.



H-Position von 27 (CDCl ₃ , 500 MHz)	Verschiebung δ	H-Position von 17 (DMSO-d ₆ , 60 MHz)	Verschiebung δ
2	1,61	1; 2	1,46
1	1,83		
9	2,03	9	2,00
5	5,64	5	4,50
7	6,51	7	8,08
—	—	3	2,60

Tab. 4: ¹H-NMR-Dateien von **27** und **17**⁵⁷

C-Position von 27 (CDCl ₃ , 125 MHz)	Verschiebung δ	C-Position von 17 (DMSO-d ₆ , 25 MHz)	Verschiebung δ
9	22,7	9	26,4
2	26,3	2	33,6
1	30,3	1	34,0
4	51,3	5	49,2
5	76,4	8	65,4
8	169,7	8	173,6
6	192,4	6	175,2

Tab. 5: ¹³C-NMR-Dateien von **27** und **17**⁵⁷

4.1.3 Umsetzung des Thiolactons (3-Acetamido-4,4-dimethylthietan-2-on) mit Benzylamin

61 wurde langsam zu einer methanolischen Lösung von **27** zugetropft. Nach 16-stündigem Rühren wurde der entstandene weiße Rückstand mit wenig Methanol gewaschen und getrocknet. Schmelzpunkt des bereits in der Literatur erwähnten Produktes⁵⁸ belegt die angenommene Struktur.

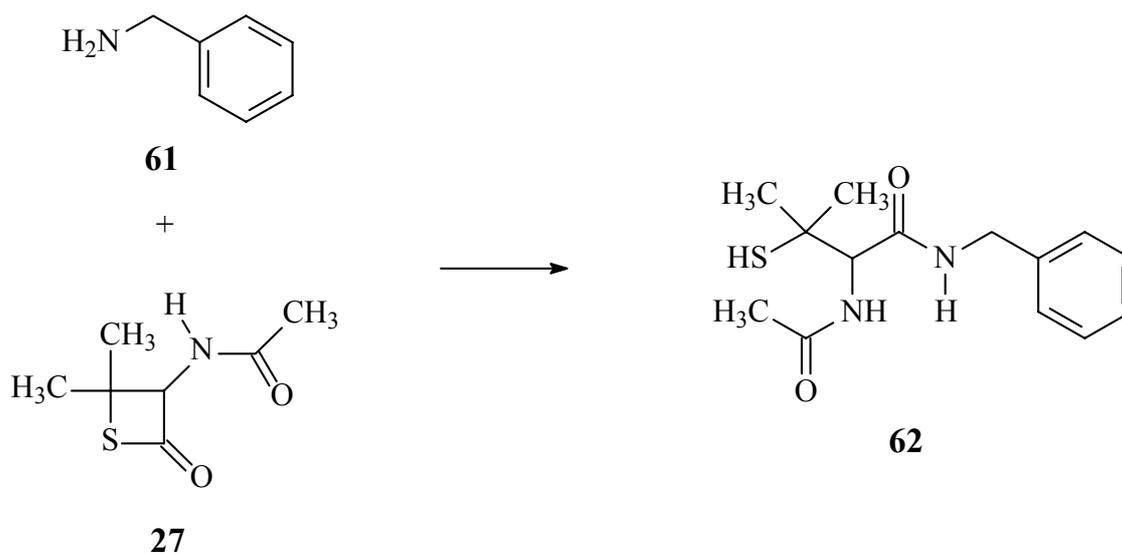


Abb. 39: Darstellung von 2-Acetylamino-N-benzyl-3-mercapto-3-methylbutylamid (62)

Die $^1\text{H-NMR}$ -Daten wird im folgenden Kapitel (4.1.4) gezeigt.

4.1.4 S-Nitrosierung zu N²-acetyl-N¹-benzyl-3-(nitrosothio)valinamide

62 wurde – wie bereits bei der Darstellung von SNAP beschrieben – unter N₂-Schutzgasatmosphäre mit NaNO₂ umgesetzt. Nach dem Abkühlen fällt ein grüner Niederschlag aus der dunkelroten Lösung aus.

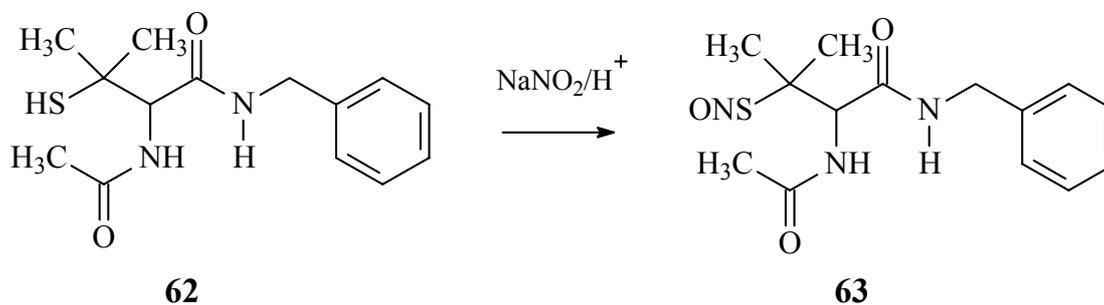


Abb. 40: Darstellung von 2-Acetylamino-N-benzyl-3-nitrosothiol-3-methylbutylamid (63)

Die Nitrosierung von **62** zu **63** induziert im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum eine signifikante Verschiebung der – zur SNO-Gruppe benachbarten Signale – nach tieferem Feld, Tab. 6 gibt einen Überblick.

Verschiebung δ (62)	Verschiebung δ (63)	Tieffeldshift $\Delta \delta$	H-Position
1,31	1,85	0,54	CH_3CCH_3
1,91	1,93	0,02	NHCOCH_3
1,34	1,96	0,62	CH_3CCH_3
2,75	—	—	$\text{C}(\text{SH})\text{CH}_3\text{CH}_3$
4,27	4,29	0,02	$\text{NHCH}_2\text{C}_6\text{H}_5$
4,53	5,27	0,74	COCHNH
7,98	8,46	0,48	COCHNH
8,63-8,65	8,97-9,03	0,36	$\text{NHCH}_2\text{C}_6\text{H}_5$

Tab. 6: Ausgewählte $^1\text{H-NMR}$ -Signale von **62** und **63**

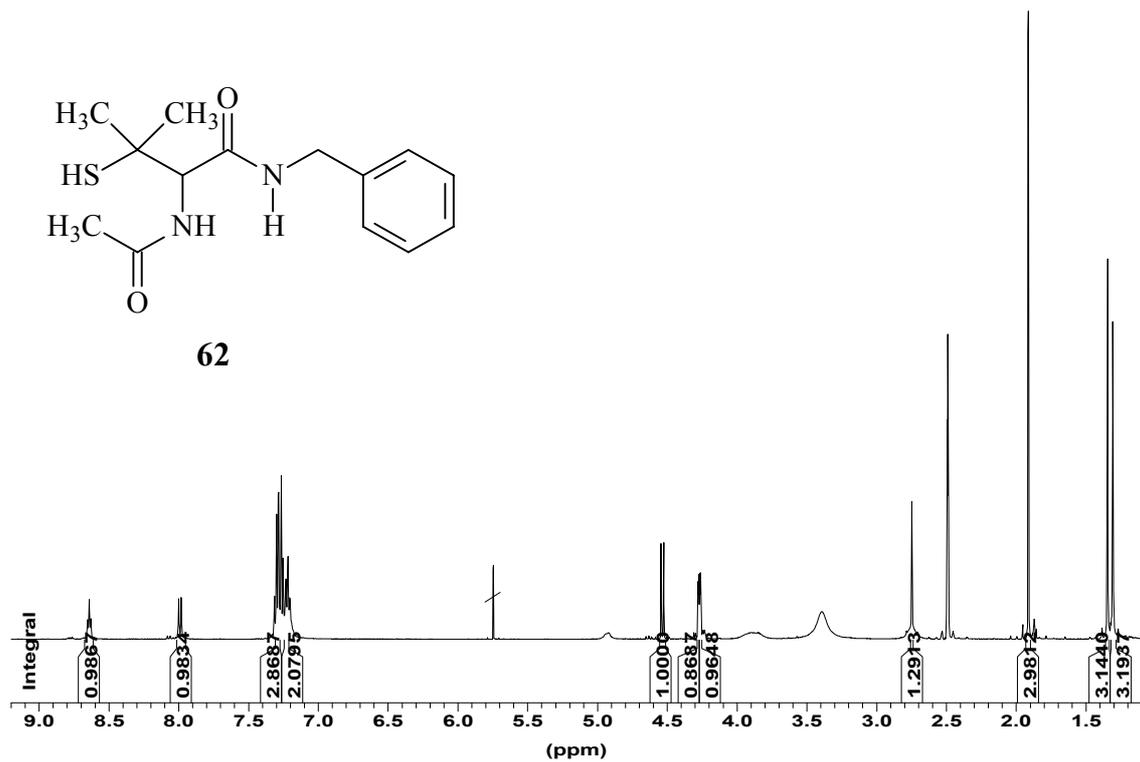


Abb. 41: $^1\text{H-NMR-Spektrum}$ ($\text{DMSO-}d_6$, 500 Hz) von **62**

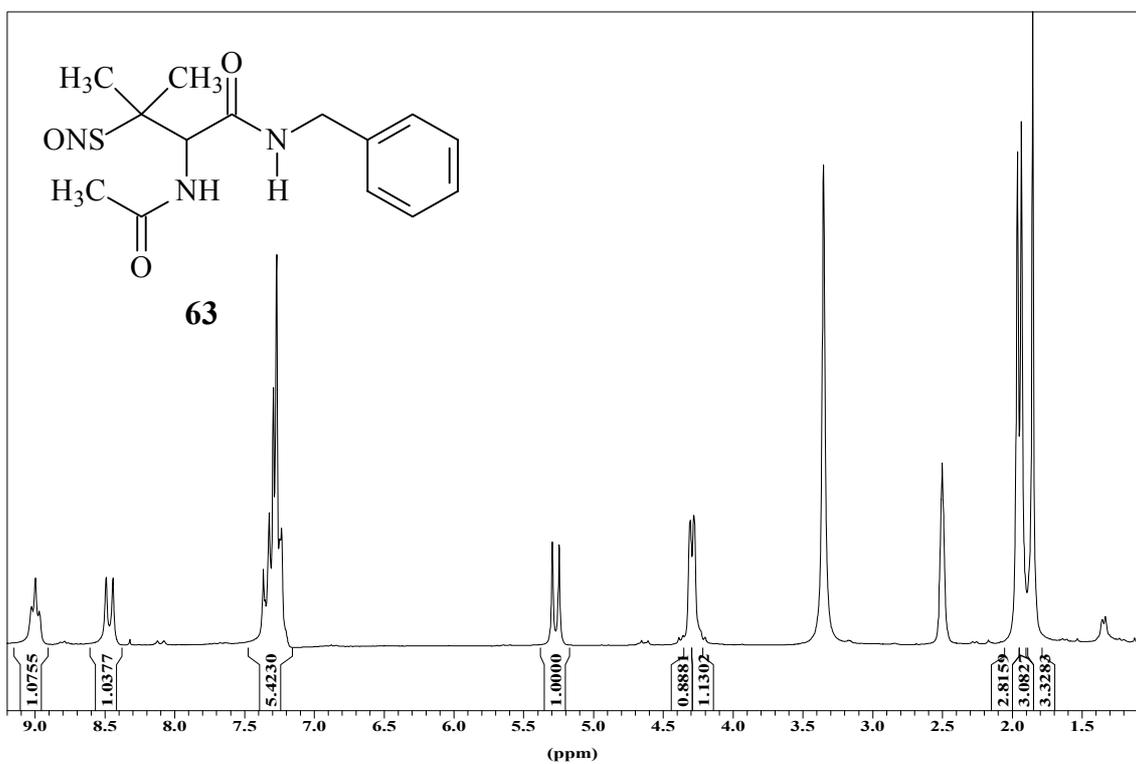


Abb. 42: $^1\text{H-NMR-Spektrum}$ ($\text{DMSO-}d_6$, 500 Hz) von **63**

4.1.5 Umsetzung des Thiolactons mit Norephedrin

Analog wie bei 4.1.3 für Benzylamin beschrieben wurde 1*R*, 2*S*-Norephedrin (**64**), ein primäres Amin mit einer Methylgruppe an α - und einer Hydroxygruppe an β - Position, mit *R,S*-**27** bei Raumtemperatur umgesetzt. Danach wurde eingedampft und getrocknet, eine Umkristallisation der sehr gut löslichen farblosen Substanz gelang nicht. Bei dieser Umsetzung wurde ein sterische einheitliches *R,S*-Norephedrin mit racemischem *R,S*-Thiolacton umgesetzt. Zwangsläufig resultiert ein *R,S,R*-, *R,S,S*-Diastereomergemischtes im Verhältnis 1:1, was sich durch einen doppelten Signalsatz im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum dokumentiert.

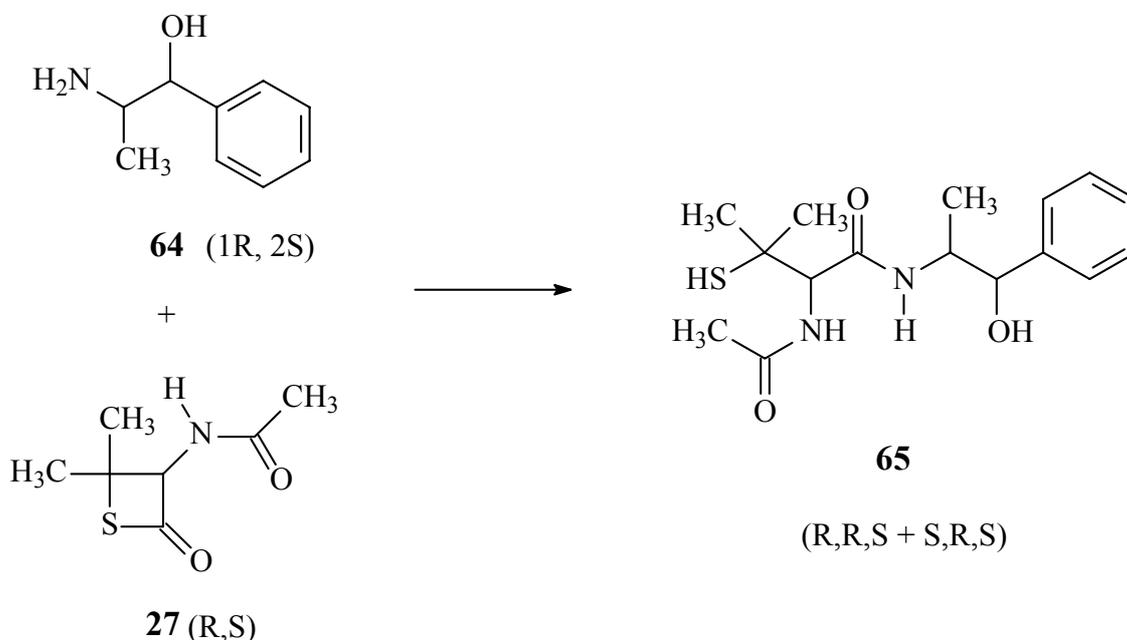


Abb. 43: Darstellung von 2-Acetylamino-*N*-(2-hydroxy-1-methyl-2-phenylethyl)-3-mercapto-3-methyl-butylamid **65**

4.1.6 Umsetzung des Thiolactons mit *N*-Benzylmethylamin

N-Benzyl-*N*-methylamin (**66**), ein sekundäres Amin mit Methylgruppe und zwei Protonen in α -Position, wurde mit **27** in Methanol acyliert. Nach Aufarbeitung konnte **67** als ein weißer Feststoff isoliert werden. Auch in **67** liegen zwei Signalsätze vor, allerdings nicht im Verhältnis 1:1 sondern etwa im Verhältnis 1:2,4. Da das Molekül

nur ein Chiralitätszentrum hat kann dies nur durch eine syn-anti-Isomerie an der nicht mehr frei drehbaren Amid-Funktion erklärt werden.

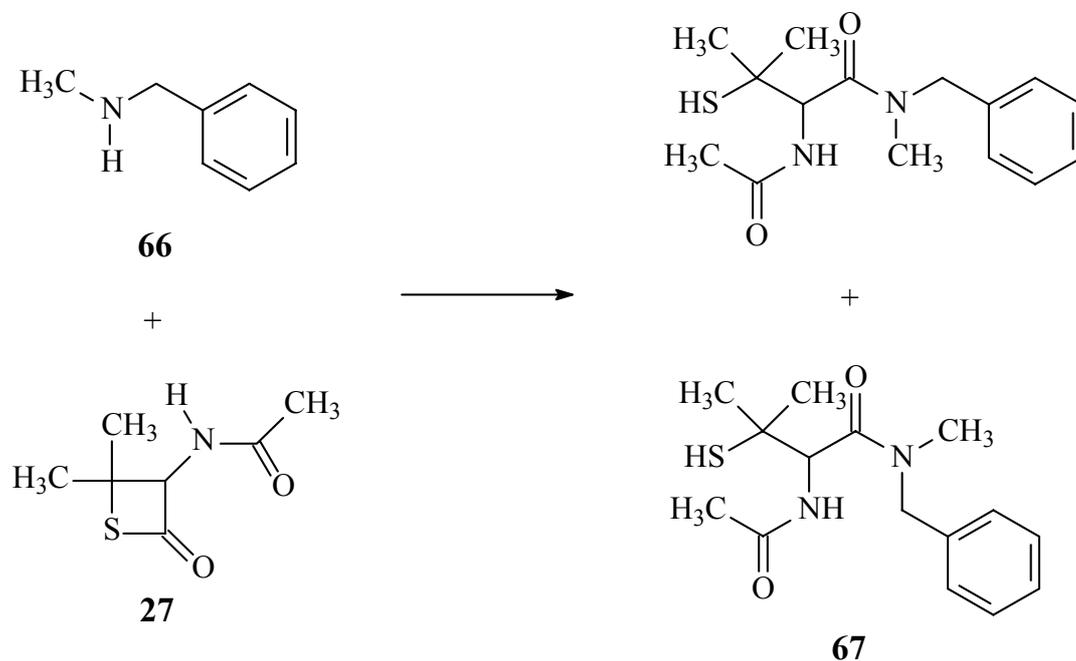


Abb. 44: Darstellung von 2-Acetylamino-N-benzyl-3-mercapto-3,N-dimethyl-butylamid **67**

4.1.7 Umsetzung des Thiolactons mit Propranolol

Nachdem die Versuche zur Umsetzung des β -Blockers Propranolol mit *N*-Acetylpenicillamin unter CMC-p-toluolsulfonat-Katalyse (siehe Kapitel 4.1.1) zur Bildung eines Thio-freien Eliminierungsproduktes geführt hatten, sollte nun versucht werden, einen Weg zum gewünschten β -Blocker-Nitrososthiol-Hybrid durch Umsetzung mit dem Thiolacton **27** anstelle von *N*-Acetylpenicillamin zu finden. Dazu wurde aus Propranololhydrochlorid (**58**) mit 10 % iger Natronlauge die Base freigesetzt und mit **27** über Nacht bei Raumtemperatur in Dichlormethan gerührt. Nach Aufarbeitung wurde ein gelblicher Feststoff erhalten. Das $^1\text{H-NMR}$ zeigte eine Mischung aus mehreren Produkten an, unter anderem wurde auch wieder das schon früher erhaltenen Eliminierungsprodukt **60** nachgewiesen. Unter den Reaktionsbedingungen scheint auch eine Disulfid-Bildung eingetreten zu sein. Zusätzlich sind natürlich bei der Umsetzung des racemischen Thiolactons mit

racemischem β -Blocker wiederum – Diastereomergemische mit unterschiedlichen Signalsätzen zu erwarten. Die Gewinnung eines einheitlichen reinen Produktes war unter diesen Umständen nicht möglich.

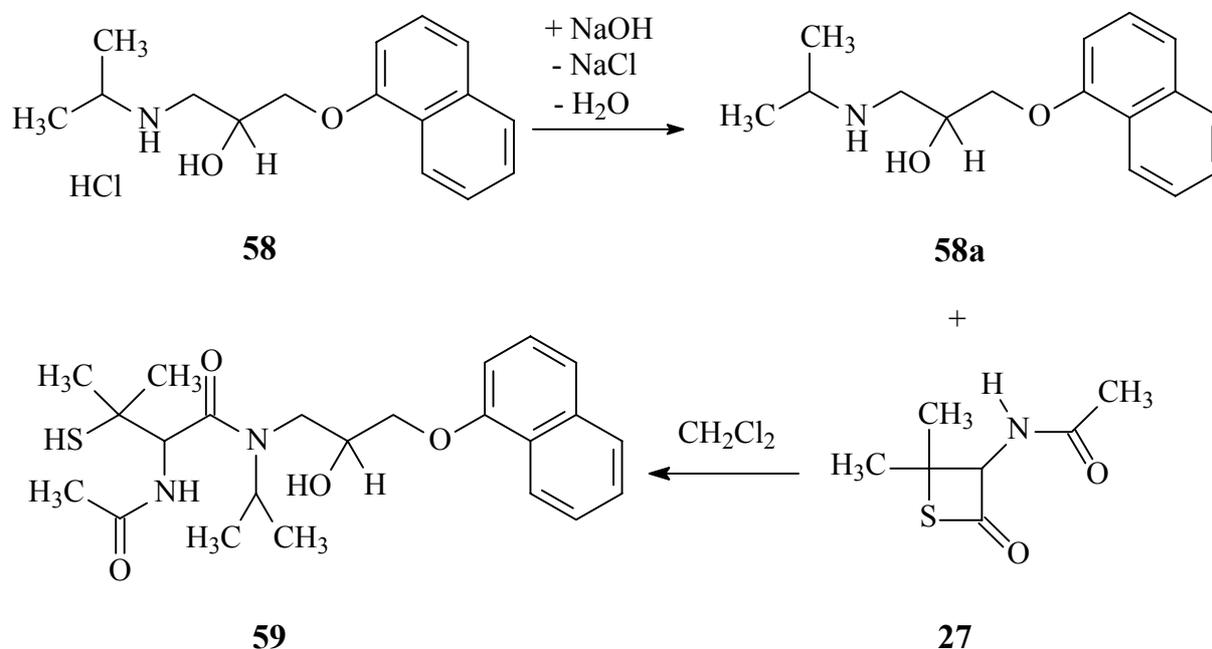


Abb. 45: Darstellung von **59** mittels Thiolacton **27** als Acylierungsreagenz

4.1.8 Versuch zur *S*-Nitrosierung des Umsetzungsproduktes aus Thiolacton und Propranolol – Versuch zur Synthese von 2-Acetylamino-*N*-[1-hydroxy-2-(naphth-1-yloxy)-ethyl]-*N*-isopropyl-3-nitrosothiol-3-methylbutylamid (**68**)

Wie oben ausgeführt resultiert aus der Umsetzung von **58** mit **27** ein nicht auftrennbares Stoffgemisch, dass dennoch einer Nitrosoierung zugeführt wurde. Dazu wurde es in einer Mischung von Methanol, 1 N HCl, konz. H_2SO_4 und Methylenechlorid mit NaNO_2 versetzt. Es trat eine grüne Färbung auf. Das Produkt ließ sich nicht isolieren.

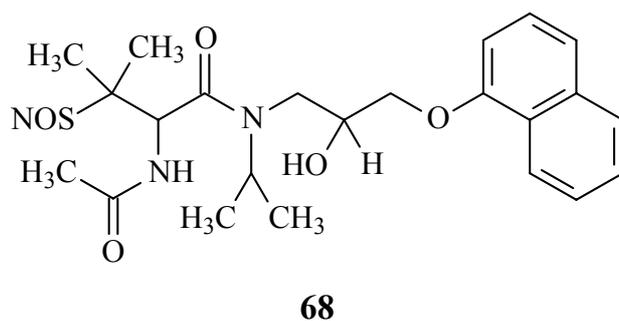
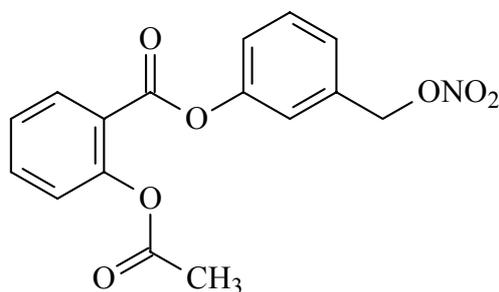


Abb. 46: Versuch zur S-Nitrosierung zu **68**

5 Nitrosothiol-NSAID-Hybridmoleküle

5.1 NO-NSAIDs – Konzept und Beispiele

Wie in Einleitung **2.4.** bereits ausgeführt besteht eine Strategie darin, die Gastrototoxizität von COX-1 Inhibitoren durch molekulare Kombination von NSAIDs mit NO-gebenden Gruppen zu überwinden. Bearbeitet wurden hier vorrangig Hybridmoleküle aus NSAIDs und organischen Nitraten. NO-Aspirin (**69**), ein Aspirin-nitratobenzylester⁵⁹ (Abb. 47) und weitere Kombinationen sind hier sehr vielversprechend, eine Markteinführung ist wahrscheinlich. Hybride aus NSAIDs und Nitrosothiolen sind dagegen bislang nur wenig bearbeitet.



NO-Aspirin (NCX 4016)

69

Abb. 47: Strukturformel von NO-Aspirin

*Bandarage et al.*⁴³ haben über eine Reihe neuer Diclofenac-Ester, die eine Nitrosothiol-Komponente mit NO-Donorfunktion enthalten, berichtet. Alle getesteten *S*-NO-Diclofenacderivate wurden *in vivo* auf ihre biologische Verfügbarkeit, ihre pharmakologische Aktivität und mögliche Störungen der Verdauung getestet. Equimolaren Dosierungen von Diclofenac und *S*-NO-Diclofenacderivaten zeigten dabei bei Ratten die gleichen antiinflammatorischen und analgetischen Wirkungen. Alle getesteten *S*-NO-Diclofenacderivate waren dabei gastrointestinal-schonend, d.h., sie verursachten weit weniger gastrointestinale Läsionen, als dies bei der Behandlung mit Diclofenac der Fall ist.

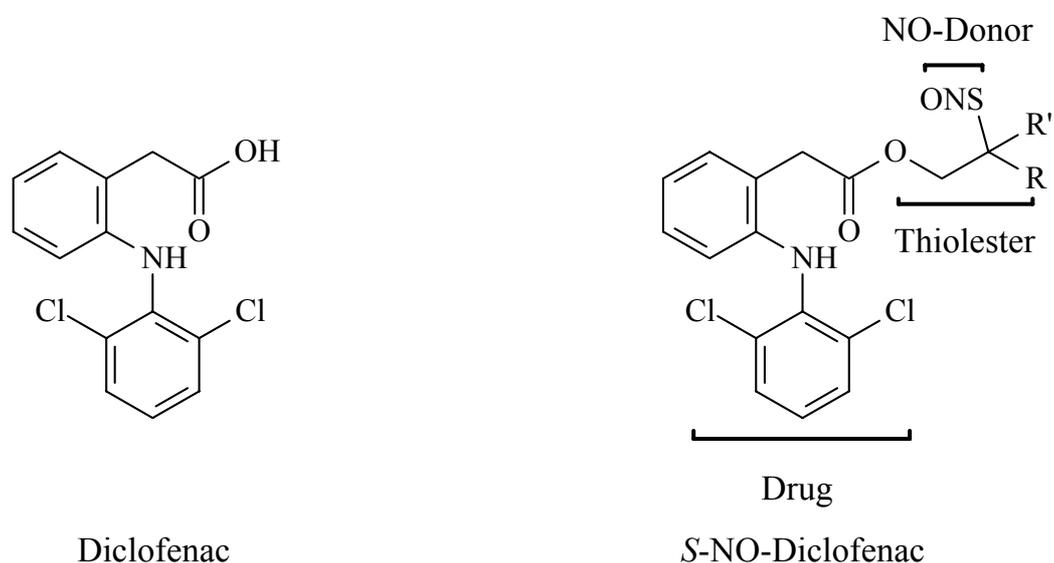


Abb. 48: Strukturformeln von Diclofenac und *S*-NO-Diclofenac (*Bandarage*)⁴³

S-NO-Diclofenac eröffnet somit eine neue Klasse von NO-freisetzenden NSAIDs, die vielversprechende therapeutische Möglichkeiten als nicht-steroidale, antiinflammatorische Wirkstoffe mit verbesserter Schonung des Gastrointestinaltrakts haben könnten.

Nach unserem Synthesekonzept sollten zwei andere NSAIDs – Ibuprofen und Naproxen – mit einer *S*-NO-Gruppe kombiniert werden. Da nitrosierte tertiäre Thiole

relativ stabil sind, im Gegensatz zu primären und sekundären, sollten Penicillamin und möglicherweise andere Mercaptovalin-Derivate als *S*-NO-Gruppenträger dienen.

5.2 **Synthese von Nitrosothiol-Ibuprofen-Hybridmolekül**

Ibuprofen als NSAID-Baustein wird zur Therapie akuter Schmerzzustände eingesetzt, hat aber wie alle NSAIDs die übliche Nebenwirkung einer Schädigung des Gastrointestinaltraktes.

5.2.1 **Versuche zur *N*-Acylierung von Penicillamin mit Ibuprofensäurechlorid und *S*-Nitrosierung des Produktes**

Die Synthese des Nitrosothiol-Ibuprofen-Hybridmoleküls wurde zunächst so, wie in der Einleitung (4.2) beschrieben, durchgeführt, d.h., Penicillamin sollte mit dem Säurechlorid des Ibuprofens acyliert und das resultierende Thiol dann nitrosiert werden.

Das Ibuprofensäurechlorid wurde durch Umsetzung von Ibuprofen mit Thionylchlorid in Dichlormethan erhalten. Das erhaltene ölige Säurechlorid wurde, wie schon früher in unserer Arbeitsgruppe von *Kartasasmita*⁶⁰ beschrieben, direkt zur Umsetzung weiterverwendet. Dazu wurden (*S/R*)-Penicillamin (**31**) mit Natriumacetat in Wasser gelöst und weiter mit dem Ibuprofensäurechlorid in Dichlormethan umgesetzt. Die organische Phase wurde zweimal mit 1 N HCl und danach mit gesättigter Kaliumhydrogencarbonat-Lösung gewaschen. Das erwartete Produkt **71** konnte im isolierten Rohprodukt nicht nachgewiesen werden, was vermutlich an der geringen Basizität der Aminogruppe in der Aminosäure Penicillamin liegt. Grundsätzlich sind Acylierungen an freien Aminosäuren problematisch.

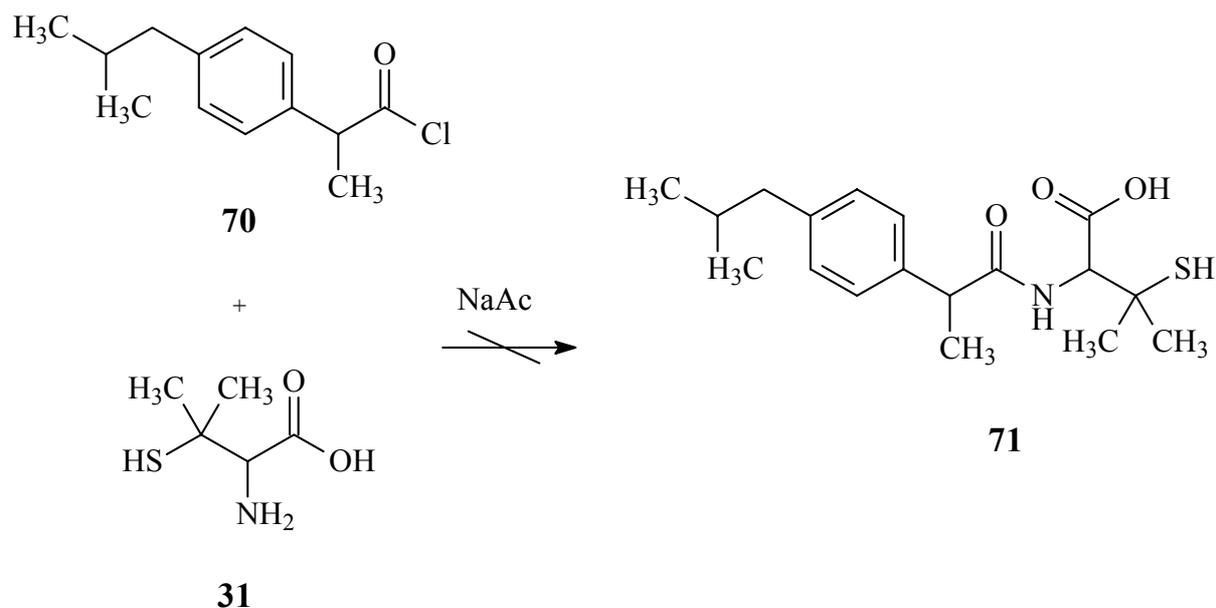


Abb. 49: geplante N-Acylierung und S-Nitrosierung von Ibuprofensäurechlorid mit (S/R)-Penicillamin

Um die Basizität der Aminogruppe zu erhöhen und ihre Acylierung zu ermöglichen, wurde vor einem weiteren Versuch die Carboxylgruppe von **31** verestert (S/R) bzw. es wurde von kommerziell erhältlichem (S)-Penicillaminmethylesterhydrochlorid ausgegangen.

5.3 N-Acylierung von Penicillaminmethylester mit Ibuprofensäurechlorid

Penicillaminmethylesterhydrochlorid **32**, 2 Mol Natriumacetat, zur Freisetzung der nicht protonierten Base und zur Bindung von einem weiteren Mol HCl, und Ibuprofensäurechlorid (**70**) wurden in einem Zweiphasensystem aus Wasser und Dichlormethan umgesetzt. Nach Aufarbeitung und Entfernung des letzten Lösungsmittels wurde **72** als weißes Pulver in einer Ausbeute von 45 % erhalten.

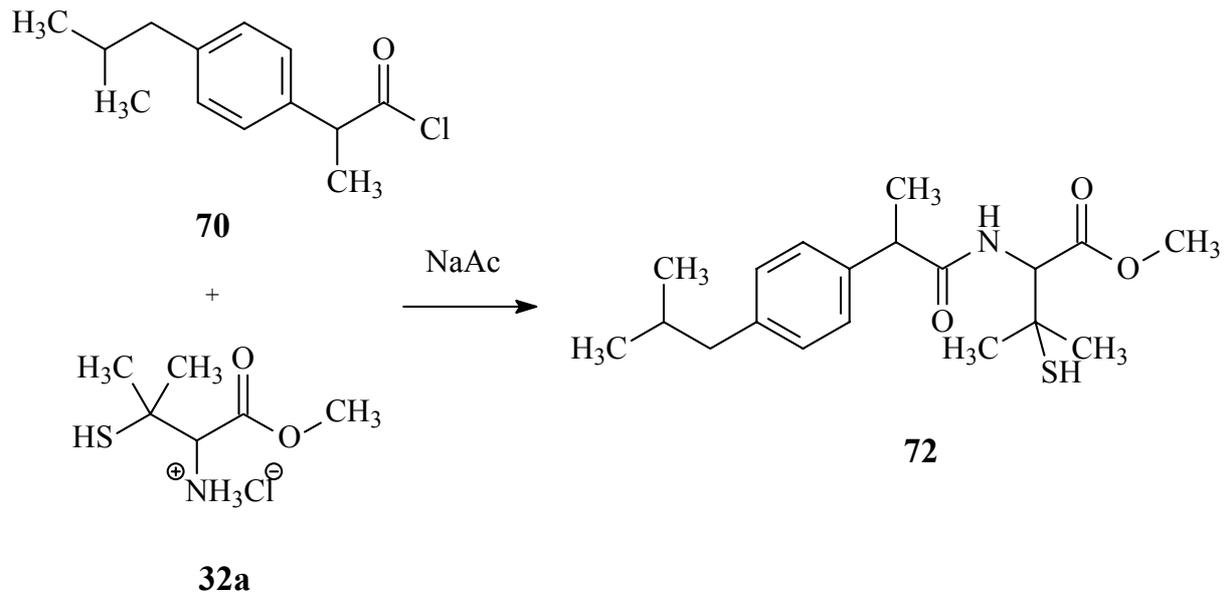


Abb. 50: N-Acylierung von Ibuprofenchlorid mit Penicillaminmethylesterhydrochlorid

Das Produkt **72** wurde durch Elementaranalyse und NMR-spektroskopisch (Abb. 51) nachgewiesen.

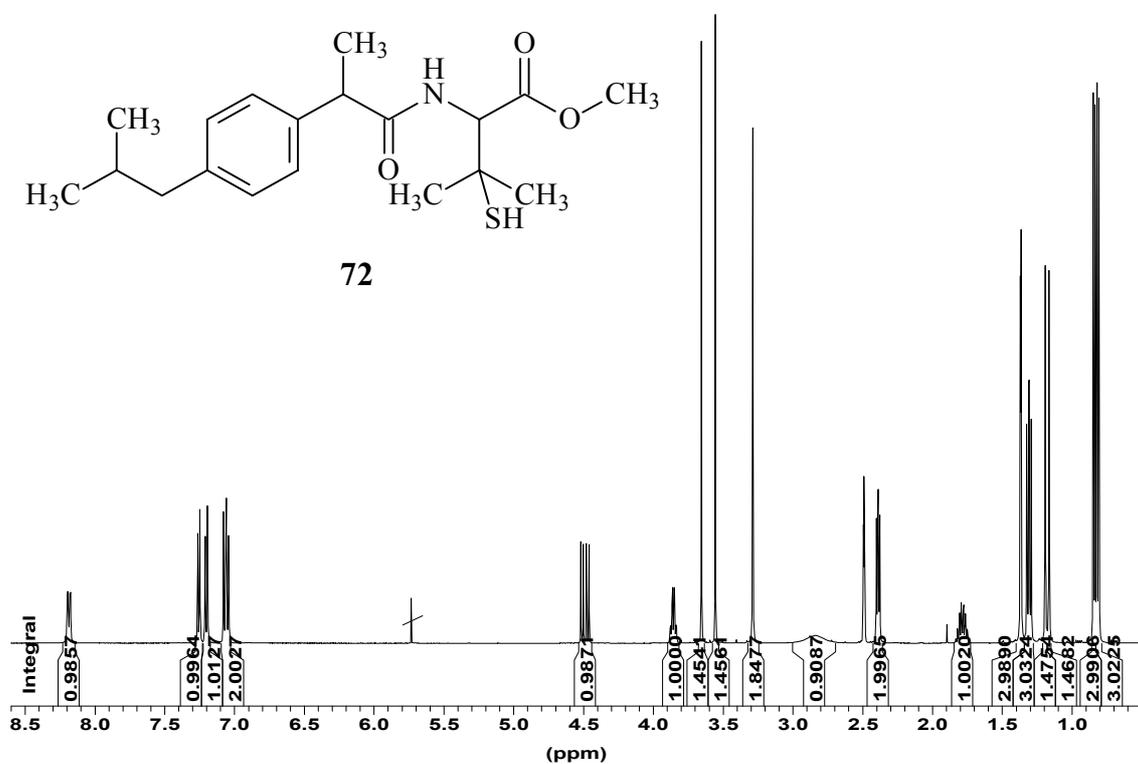


Abb. 51: ¹H-NMR-Spektrum (DMSO-d₆, 500 MHz) von **72**

5.3.1 S-Nitrosierung von 2-[2-(4-Isobutyl-phenyl)-propionylamino]-3-mercapto-3-methyl-butansäure-methylester mit Natriumnitrit

72 wurde unter N₂-Schutzgasatmosphäre und Lichtschutz mit NaNO₂ nitrosiert. Nach Aufarbeitung erhielt man **35** in Form von grünen, nadelförmigen Kristallen in einer Ausbeute von 43 %.

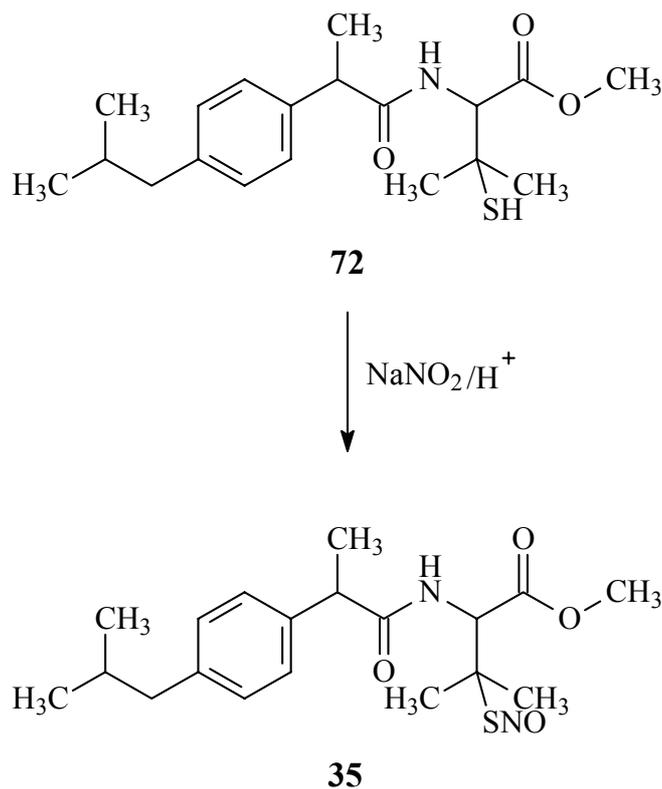


Abb. 52: Nitrosierung vom Ibuprofenderivat **35**

Die Struktur des Produktes **35** wurde nicht nur durch die typische grüne Farbe, sondern auch durch das ¹H-NMR-Spektrum (Abb. 53) und durch ein FAB-Massenspektrum bestätigt. Hier findet sich bei 381(M+1) der Molpeak für **35** und bei 351 (M+1) der Nachweis für die NO-Abspaltung.

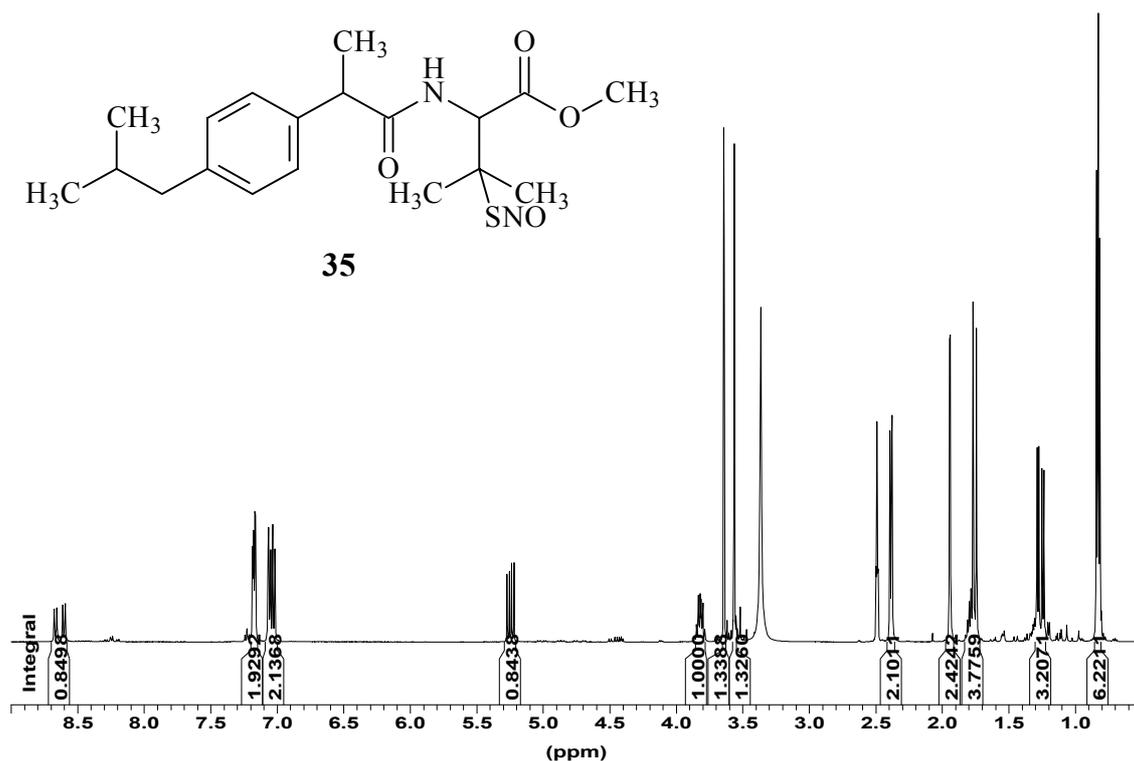


Abb. 53: ¹H-NMR-Spektrum (DMSO-d₆, 500 MHz) von **35**

Die Nitrosierung von **72** zu **35** induziert im ¹H-NMR-Spektrum eine signifikante Verschiebung der – zur SNO-Gruppe benachbarten Signale – nach tieferem Feld, Tab. 7 gibt einen Überblick.

H-Position	Verschiebung δ (72)	Verschiebung δ (35)	Tiefeldshift Δ δ
CCH ₃ CH ₃	1,16;1,19	1,74; 1,76	0,58
CCH ₃ CH ₃	1,36;1,37	1,94	0,57
C(SH)	2,84	—	
NHCHCO	4,46;4,50	5,22; 5,26	0,76
NHCHCO	8,17-8,20	8,60; 8,66	0,44

Tab. 7: Ausgewählte ¹H-NMR-Signale von **72** und **35**

5.4 Synthese von Methyl-*N*-[2-(6-methoxy-2-naphthyl)propanoyl]-3-(nitrosothio)valinat, ein Nitrosothiol-Naproxen-Hybridmolekül

Im Anschluß an die Umsetzungen in der Ibuprofenreihe sollte nun Naproxen in das Nitrosothiol-Hybrid überführt werden. Dazu musste aus Naproxen das entsprechende Säurechlorid hergestellt werden. Andererseits hatte sich nach den vorangegangenen Untersuchungen gezeigt, dass freies Penicillamin nicht zu acetylieren war, sondern als Ester eingesetzt werden musste. Während (*S*)-Penicillaminmethylesterhydrochlorid käuflich zu erwerben ist, gilt dies nicht für (*S*)- und (*S/R*)-Penicillaminmethylesterhydrochlorid. Dieses und der hohen Preis des (*S*)-Penicillaminmethylesterhydrochlorid gaben Anlaß, sich mit der Darstellung dieser Ester zu beschäftigen.

5.4.1 Veresterung von (*S/R*)-Penicillamin

Einer Vorschrift von *Sheehan et al.*⁶¹ folgend wurde HCl-Gas bei 0-10°C in eine Lösung von (*S/R*)-Penicillamin (**31**) (statt (*S*)-Penicillamin) in absolutem Methanol bis zur Sättigung eingeleitet. Danach wurde 20 h unter Rückfluß erhitzt. Nach Aufarbeitung und Reinigung erhielt man **32** in einer Ausbeute von 22 %.

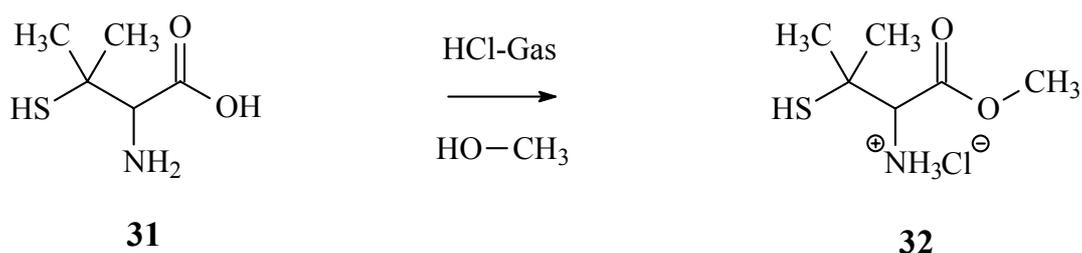


Abb. 54: Veresterung von Penicillamin mit HCl-Gas

5.4.2 Veresterung mit konz. Schwefelsäure/Alkohol

Das Arbeiten mit gasförmigem HCl zur Veresterung von Penicillamin ist die einzige in der Literatur beschriebene Methode, andererseits ist sie mit einer Reihe von Kosten-

und Verfahrensnachteilen verbunden, so dass versucht wurde hier ein einfachere Alternative, z.B. Verwendung von flüssiger Schwefelsäure anstelle von HCl-Gas, zu finden.

31 wurde mit absolutem Ethanol – Reagenz und Lösungsmittel – und konz. H_2SO_4 bei $5\text{ }^\circ\text{C}$ versetzt. Danach wurde die Mischung 3 Tage unter Rühren und Rückfluß erhitzt. Nach der Neutralisierung mit Na_2CO_3 wurde der entstehende Ester **73** (Ausbeute von 7 %) durch Dichlormethan extrahiert und i. Vak. getrocknet.

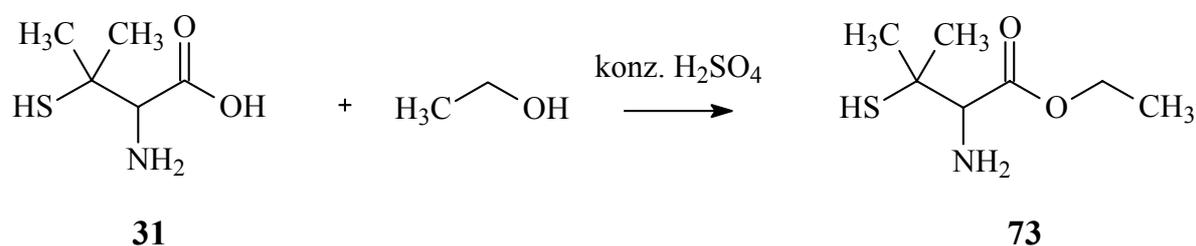


Abb. 55: Veresterung von Penicillamin mit konz. H_2SO_4

5.4.3 N-Acylierung von (S)- oder (S/R)-Penicillaminmethylester mit Naproxen-säurechlorid

Das erforderliche Säurechlorid des Naproxens (**30**) wurde, wie bereits für Ibuprofen beschrieben (Kapitel 5.2.1), durch Umsetzung von Naproxen mit Thionylchlorid erhalten (Abb. 56). Auch hier wurde der erhaltene Feststoff (**74**) ohne Umkristallisation oder sonstige Reinigung weiter umgesetzt.

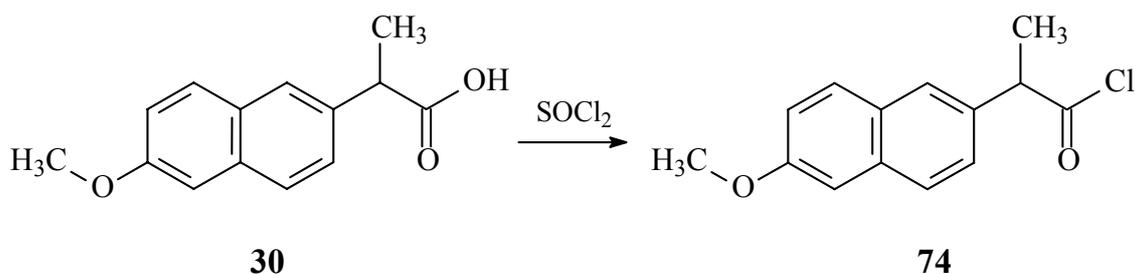
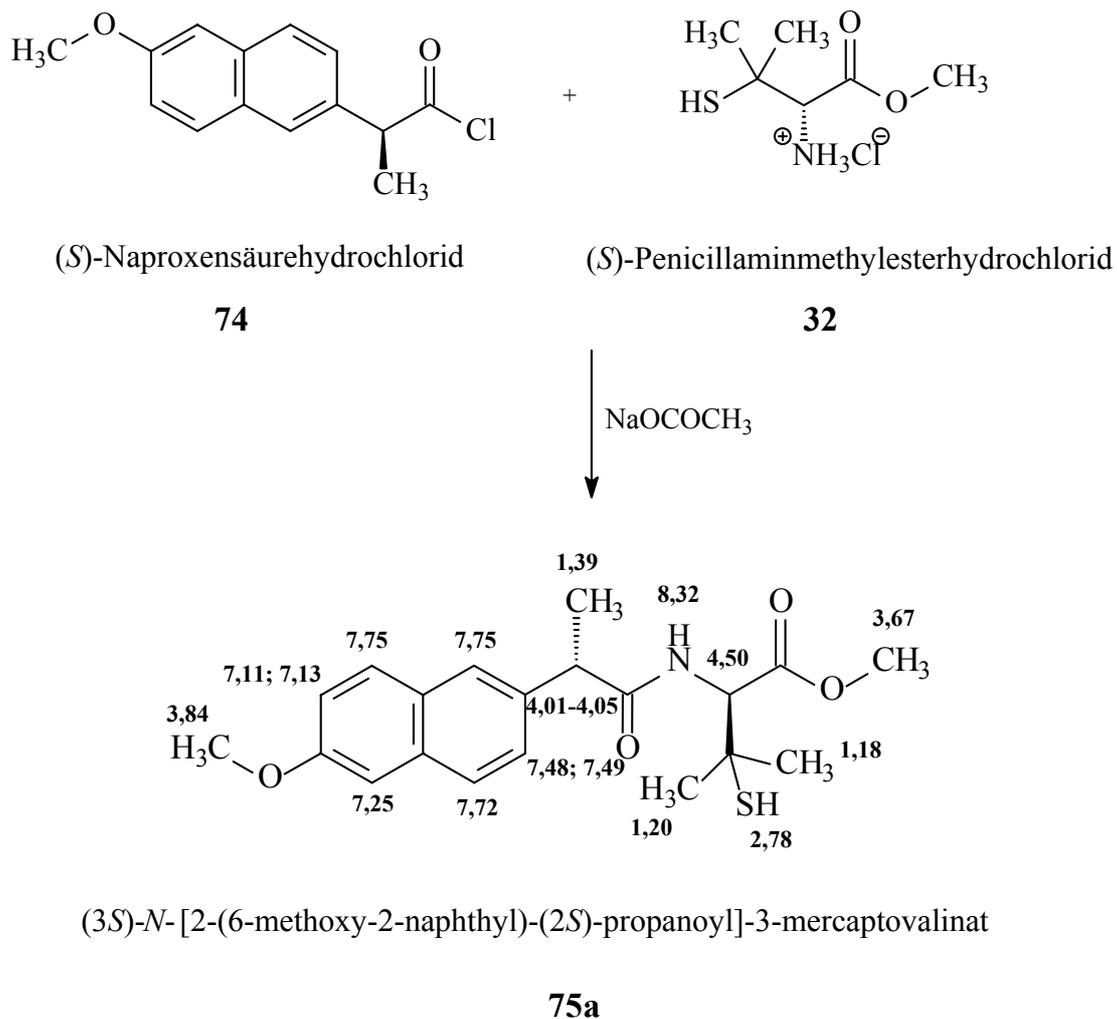


Abb. 56: Herstellung von Naproxensäurechlorid **74**

(*S*)- und auch (*S/R*)-Penicillaminmethylesterhydrochlorid wurde mit der zur Freisetzung der Base aus dem Hydrochlorid und zur Bindung des bei der Acylierung entstehenden Chlorwasserstoffes erforderlichen Menge Natriumacetat in Wasser gelöst und weiter mit Dichlormethan versetzt. Zu diesem Zweiphasensystem wurde eine Lösung von Naproxensäurechlorid in Dichlormethan unter N₂-Schutzgasatmosphäre langsam zugetropft. Nach Umkristallisation aus Hexan wurde das Produkt in Ausbeute von 45% im Falle des Methyl (3*S*)-*N*-[2-(6-methoxy-2-naphthyl)-(2*S*)-propanoyl]-3-mercapto-valinate (**75a**) hergestellt aus *S*-Penicillaminmethylester (*S*)-Naproxensäurehydrochlorid, und von 51 % im Falle des entstehenden Diastereomerengemisches aus (*S/R*)-Penicillaminmethyl und (*S*)-Naproxensäurehydrochlorid. Dieses Diastereomerengemisch besteht aus Methyl (3*R*)-*N*-[2-(6-methoxy-2-naphthyl)-(2*S*)-propanoyl]-3-mercaptovalinat (**74b**) und Methyl-(3*S*)-*N*-[2-(6-methoxy-2-naphthyl)-(2*S*)-propanoyl]-3-mercaptovalinat (**74a**), das Verhältnis beträgt laut ¹H-NMR (Abb. 59) tatsächlich etwa 1:1.



*Abb. 57: N-Acylierung von (S)-Naproxensäurechlorid mit (S)-Penicillaminmethylesterhydrochlorid - ^1H -NMR-Daten (DMSO- d_6 , 500MHz) (Abb. 58) von **75a***

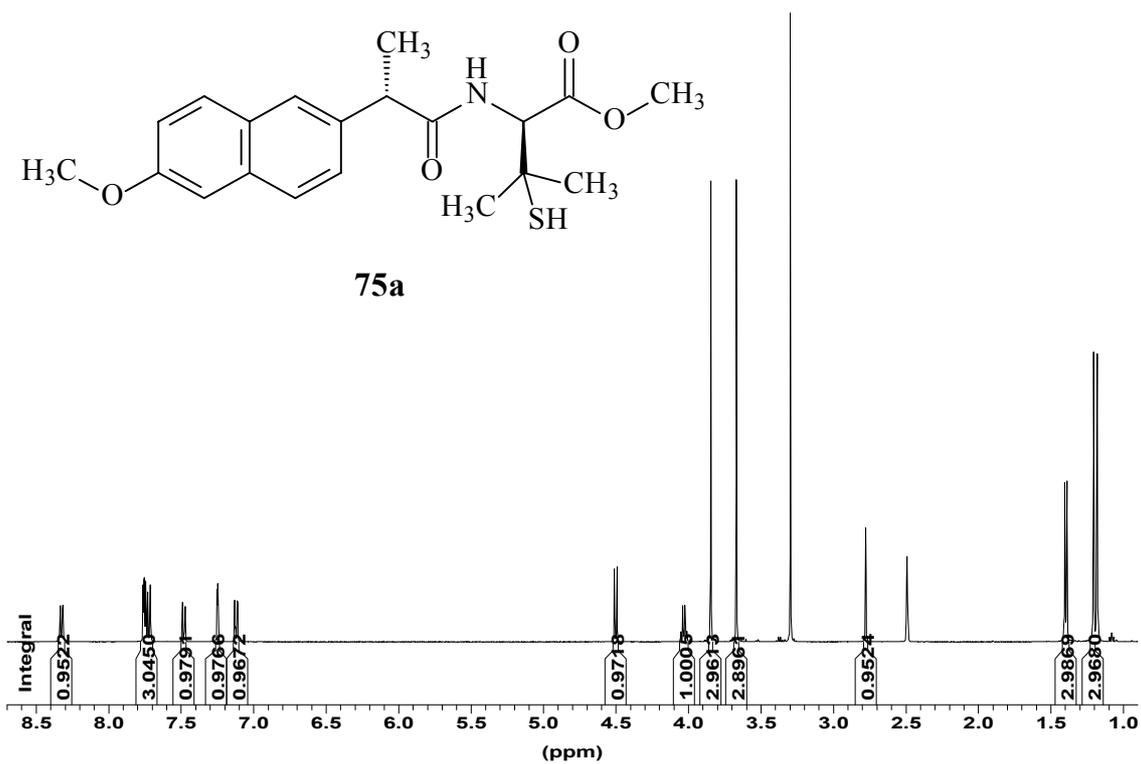


Abb. 58: $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum ($\text{DMSO-}d_6$, 500 MHz) von **75a**

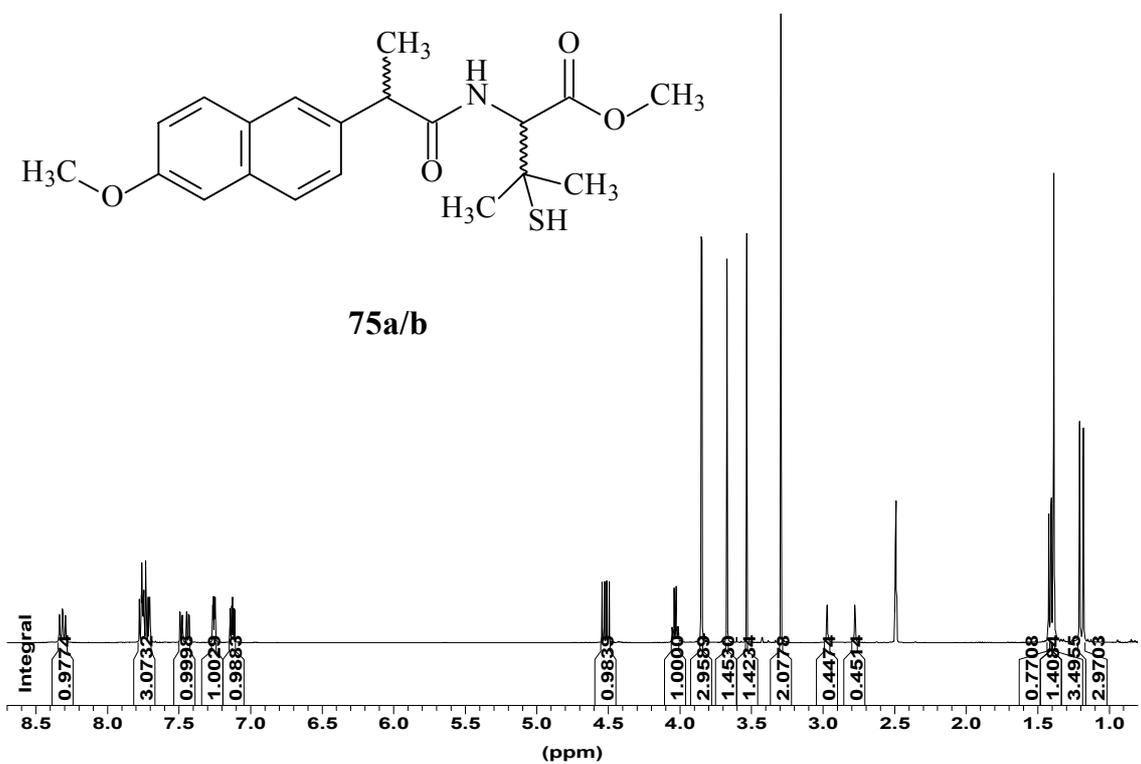


Abb. 59: $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum ($\text{DMSO-}d_6$, 500 MHz) von **75a** und **75b** in 1:1

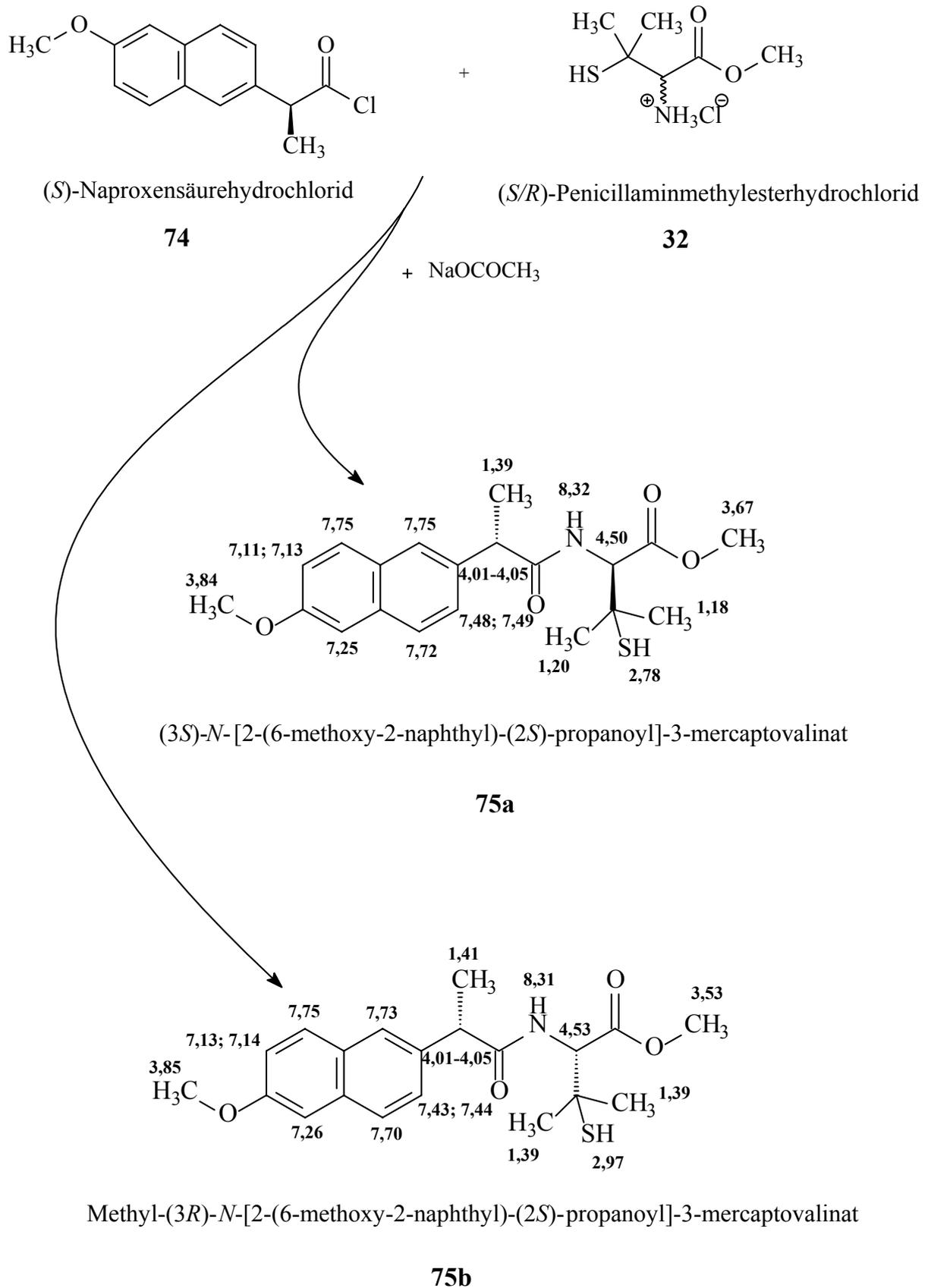


Abb. 60: N-Acylierung von (S)-Naproxensäurechlorid mit (R)-Penicillaminmethylesterhydrochlorid - ¹H-NMR-Daten (DMSO-d₆, 500MHz) von **75a** und **75b**

75a wurde auch durch ^{13}C -NMR-Spektroskopie nachgewiesen. Die Daten von Abb. 61 werden in dem kommenden Kapitel mit den Daten von deren entsprechenden Nitrosoverbindung verglichen.

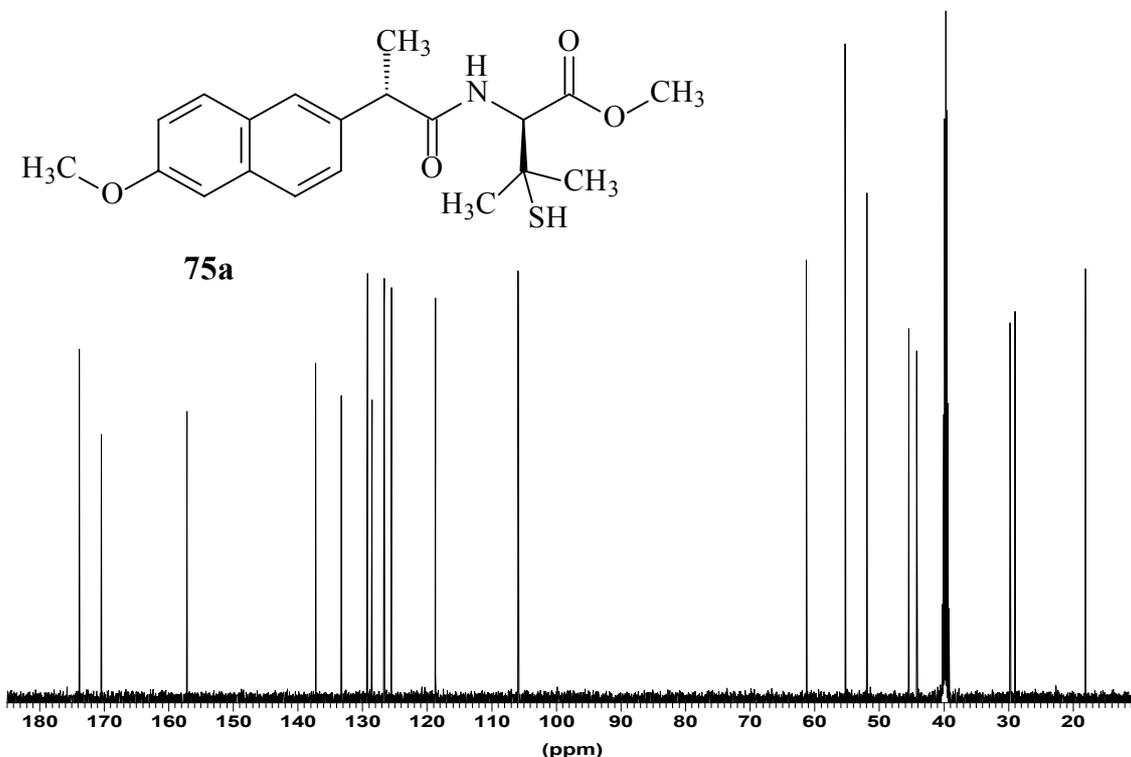
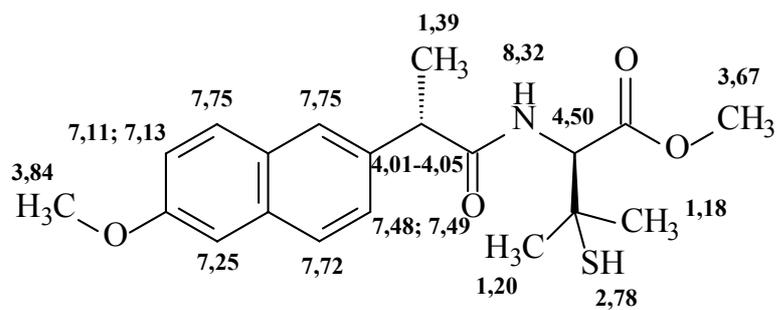
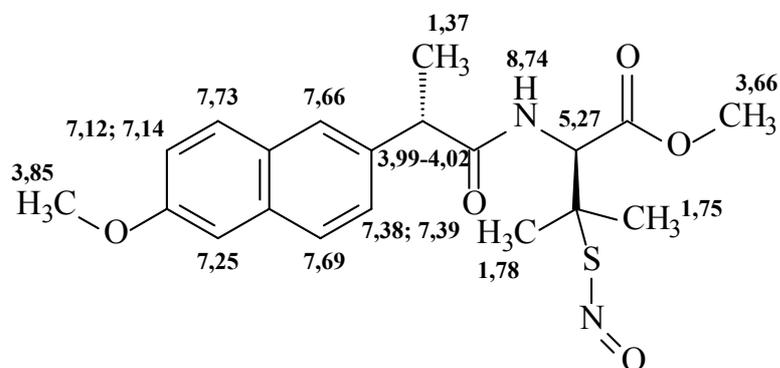
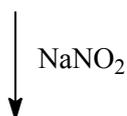


Abb. 61: ^{13}C -NMR-Spektrum (DMSO- d_6 , 125 MHz) von **75a**

5.4.4 (S)-Nitrosierung von Methyl-N-[2-(6-methoxy-2-naphthyl)propanoyl]-3-mercaptovalinat

Methode A: Wie in Kapitel 5.2.3 bereits beschrieben wurde Methyl-(3S)-N-[2-(6-methoxy-2-naphthyl)-(2S)-propanoyl]-3-mercaptovalinat (**75a**) unter N_2 -Schutzgasatmosphäre und Lichtschutz mit NaNO_2 nitrosiert. **36a** konnte in Form von grünen nadelförmigen Kristallen in 13 %iger Ausbeute erhalten werden.

(3*S*)-*N*-[2-(6-methoxy-2-naphthyl)-(2*S*)-propanoyl]-3-mercaptopropanoat**75a**(3*S*)-*N*-[2-(6-methoxy-2-naphthyl)-(2*S*)-propanoyl]-3-nitrosothiovalinat**36a**Abb. 62: Nitrosierung vom Naproxenderivat - ¹H-NMR-Daten von **75a** und **36a** (Abb. 63)

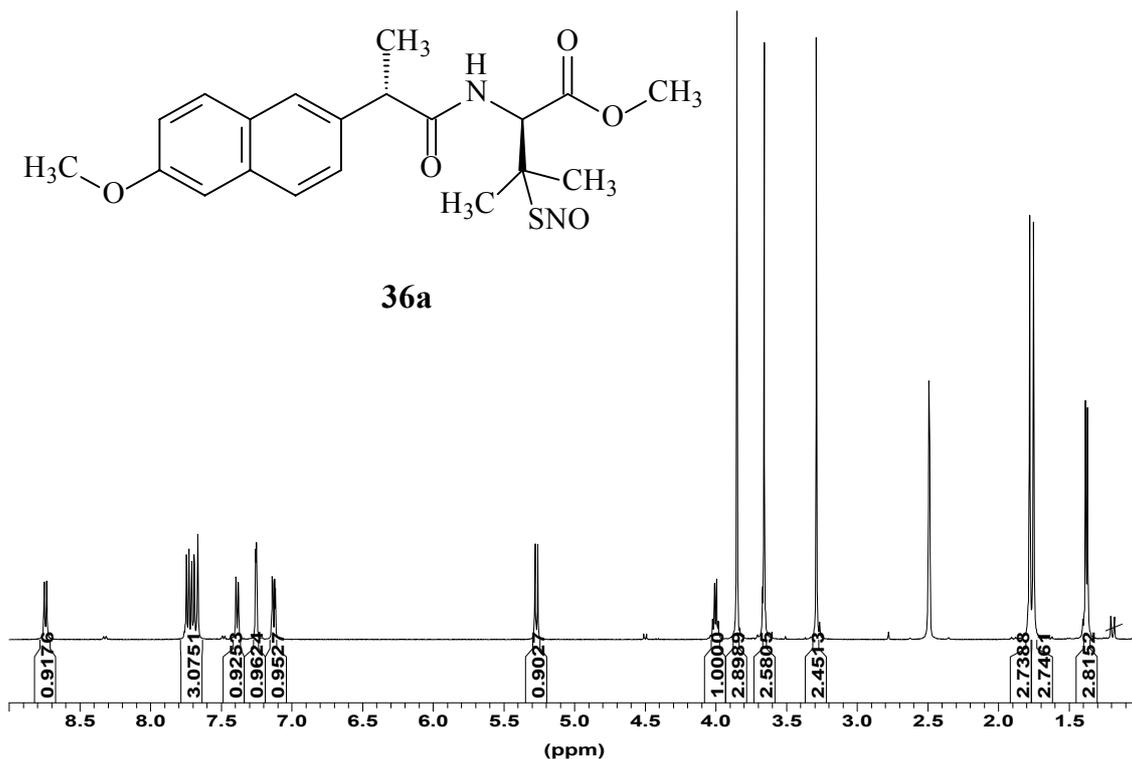


Abb. 63: ^1H -NMR-Spektrum (DMSO- d_6 , 500 MHz) von **36a**

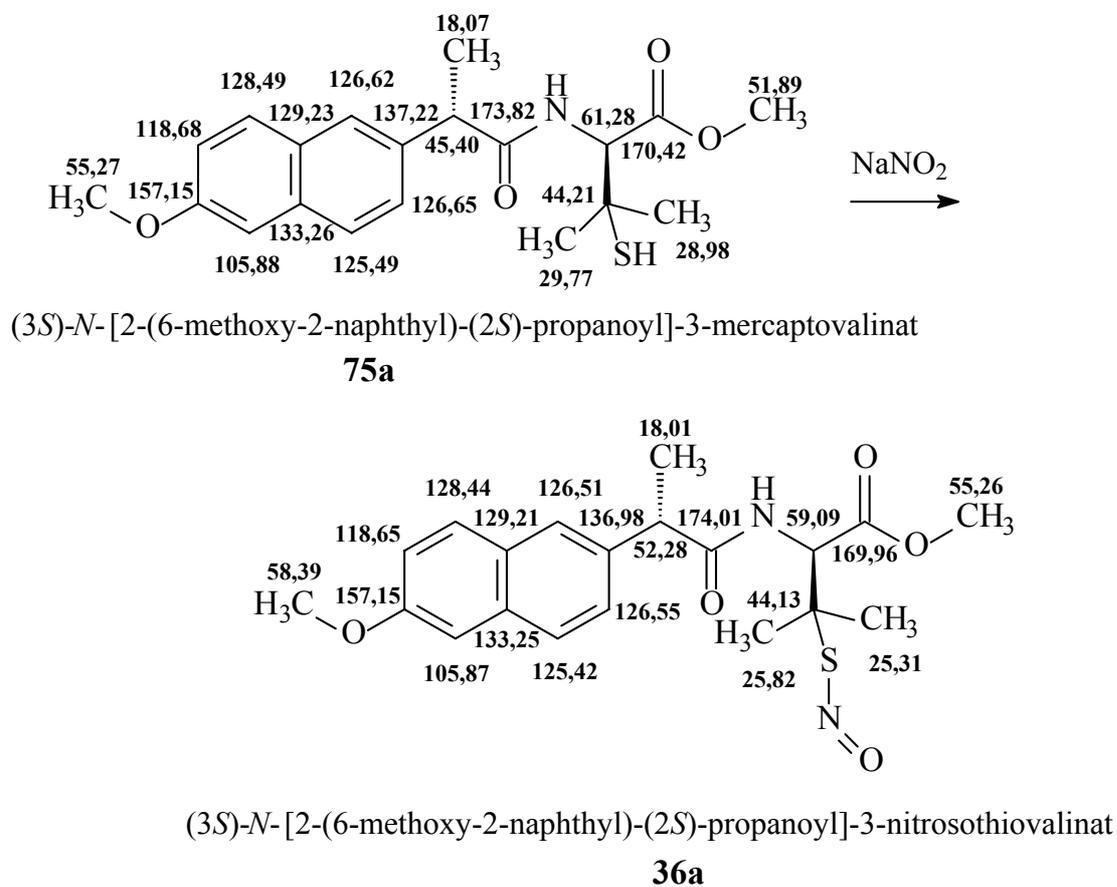


Abb. 64: Vergleich- ^{13}C -NMR-Daten von **75a** und **36a**

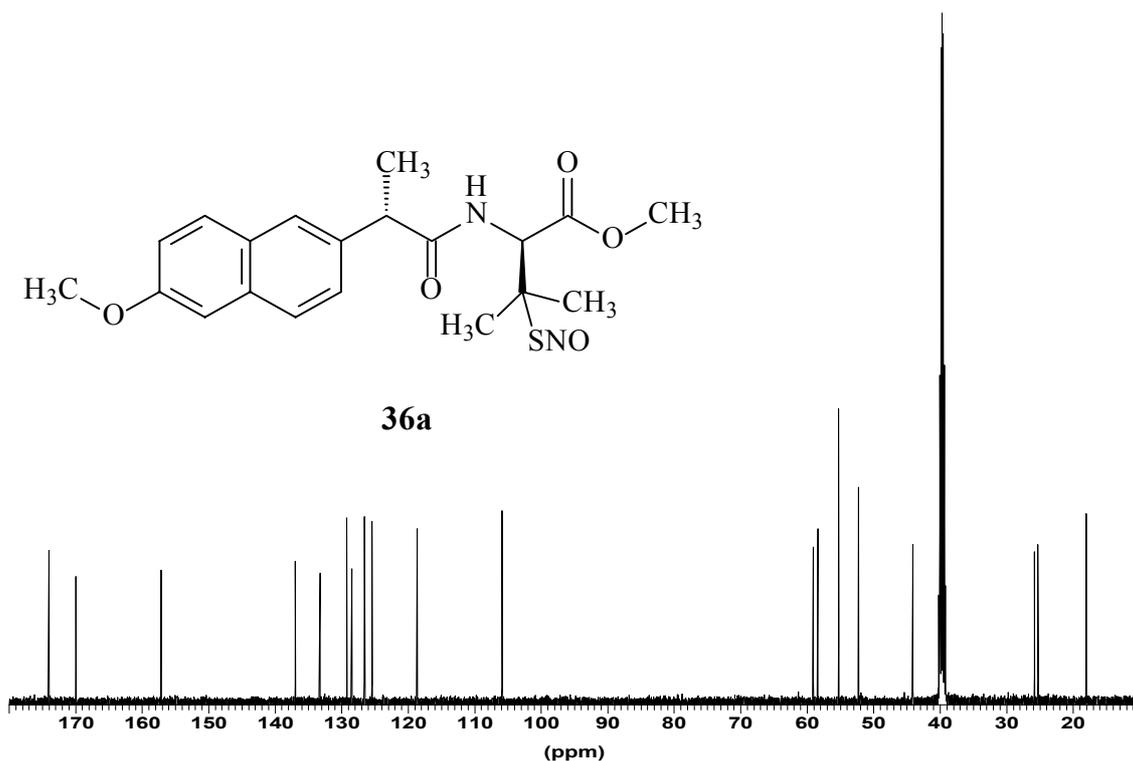


Abb. 65: ^{13}C -NMR-Spektrum (DMSO- d_6 , 125 MHz) von **36a**

Das Struktur des Nitrosierungsproduktes **36a** wird auch durch ein FAB-Massenspektrum bestätigt. Bei 405 (M+1) findet sich eine Molpeak für **36a** und bei 375 (M+1) ein Fragment, dass aus der NO-Abspaltung resultiert.

Methode B: Methode A wurde mehrfach angewendet, auch zur Nitrosierung anderer Stereoisomere von **75a**, auf eine Diskussion der Ergebnisse soll hier verzichtet werden. Es zeigt sich aber deutlich, dass die Umsetzungsprodukte durch entsprechende „dimere“ Disulfide verunreinigt waren. *S*-Nitrosoverbindungen sind im Allgemeinen in wässriger Lösung wegen Spuren von Kupferionen instabil, bei Anwesenheit von Wasser kommt es deshalb möglichst zur Zersetzung und Bildung einer Disulfidverbindung, die als farbloser bis gelblicher Niederschlag ausfällt. Diese Zersetzung macht sich auch beim Trocknen der Nitrosothiolverbindung störend bemerkbar.

Um einer Zersetzung der Nitrosothiolverbindung in Wasser vorzubeugen, wurde im Folgenden versucht, die Synthese in einem Zweiphasensystem durchzuführen. Damit soll erreicht werden, dass sich das Reaktionsprodukt *in situ* in der organischen Phase anreichert.

Field et al. hatten bei der Synthese von SNAP als Lösungsmittel eine wässrige Methanol-Lösung eingesetzt. Dies war möglich, da SNAP – im Gegensatz zu den meisten Nitrosothiolverbindungen – relativ unempfindlich gegen Wasser ist. In der hier vorliegenden Arbeit wurde nun in einem Salzsäure-Schwefelsäure-Wasser-Methanol-Methylenchlorid-Zweiphasensystem gearbeitet. Nach der Nitrosierung mit NaNO_2 wurde die organische Phase abgetrennt, mit doppelt destilliertem Wasser gewaschen und über Na_2SO_4 getrocknet. Man erhielt **36b** in Form eines grünen Feststoffes in einer Ausbeute von 62 %. Methode B ist also Methode A deutlich überlegen.

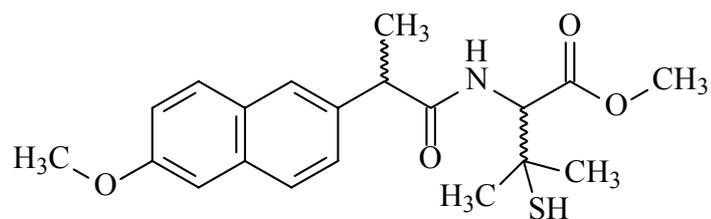
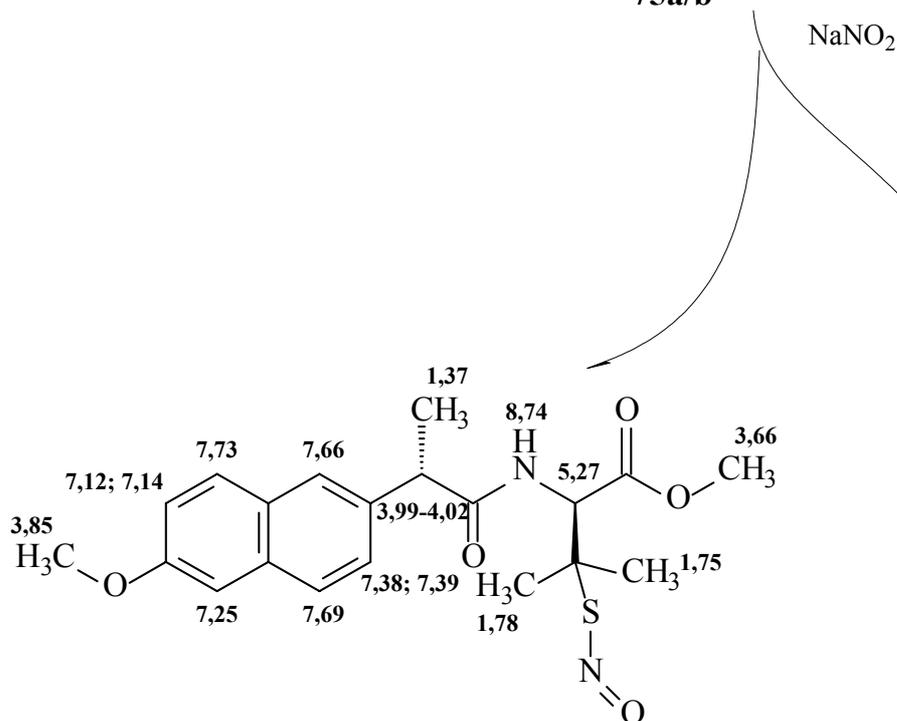
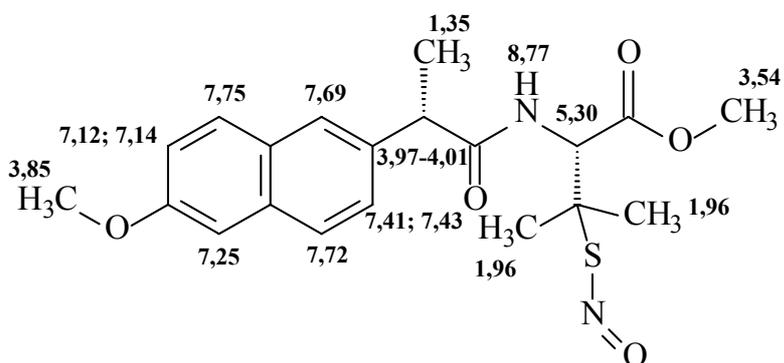
(3*R/S*)-*N*-[2-(6-methoxy-2-naphthyl)-(2*S*)-propanoyl]-3-mercaptovalinat**75a/b**(3*S*)-*N*-[2-(6-methoxy-2-naphthyl)-(2*S*)-propanoyl]-3-nitrosothiovalinat**36a**(3*R*)-*N*-[2-(6-methoxy-2-naphthyl)-(2*S*)-propanoyl]-3-nitrosothiovalinat**36b**

Abb. 66: *S*-Nitrosierung von Methyl-(3*R/S*)-*N*-[2-(6-methoxy-2-naphthyl)-(2*S*)-propanoyl]-3-mercaptovalinat - ¹H-NMR-Daten von **36a/b**

6 Nitrosothiol-Antibiotikum-Hybridmoleküle

6.1 NO-Antibiotika – Konzept und Beispiele

Die Induktion von iNOS und die verstärkte Bildung von NO sind in vielen Studien bei fast allen Arten von Entzündungskrankheiten nachgewiesen worden. Als Beispiele seien genannt: Arthritis, Diabetes, Enzephalomyelitis und andere Entzündungskrankheiten des ZNS, Kolitis, Pankreatitis, Gingivitis und Periodontitis, Lungenentzündung bis hin zur Abstoßung von Transplantaten.⁶² Generell gilt, dass die NO-Produktion bei entzündlichen Prozessen, aber auch bei Infektionen aller Art erhöht wird. Die Frage bleibt, ob dies eine Folge der Entzündung, bzw. der Infektion ist und zum Krankheitsbild beiträgt oder ob dies eine Reaktion des Körpers zur Entzündungs- und Infektionsabwehr ist. Im ersten Fall wäre eine Therapie durch NOS-Inhibitoren sinnvoll, im zweiten Fall könnte das körpereigene Abwehrverhalten durch Gabe von NO-Donoren unterstützt werden.

Bei Infektionskrankheiten gilt als sicher, dass NO tatsächlich zur Abwehr der Krankheitserreger dient.⁴⁴

Ziel dieser Arbeit war es u. a. ein Hybridmolekül aus einem NO-gebenden Nitrosothiol-Teil und dem Chinolon Ciprofloxacin, einem Gyrase-Hemmstoff, herzustellen.

Wenn obige Feststellung zutrifft, dann sollte von einem Hybridmolekül aus einem NO gebenden Nitrosothiolteil und Gyrasehemmstoff-Ciprofloxacin eine verstärkte Wirkung zu erwarten sein.

6.1.1 Umsetzung des Thiolactons mit Phenyl-piperazin – Synthese von *N*-[2-Mercapto-2-methyl-1-(4-phenyl-piperazin-1-carbonyl)-propyl]-acetamid

Vor den Kupplungs- und Nitrosierung-Versuchen am multifunktionalen Ciprofloxacinmolekül sollte die Reaktionsfolge an der Modellsubstanz Phenylpiperazin erprobt werden. Dazu wurde Phenylpiperazin (**76**) mit dem Thiolacton **27** umgesetzt. Die Mischung wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Es fielt ein hellgelber Feststoff aus, der abgesaugt und i. Vak. bei Raumtemperatur getrocknet wurde. Zum Reinigen wird das Rohprodukt in 3-5 ml siedendem Methanol suspendiert. Der Rückstand wird abgesaugt und wieder i. Vak. getrocknet.

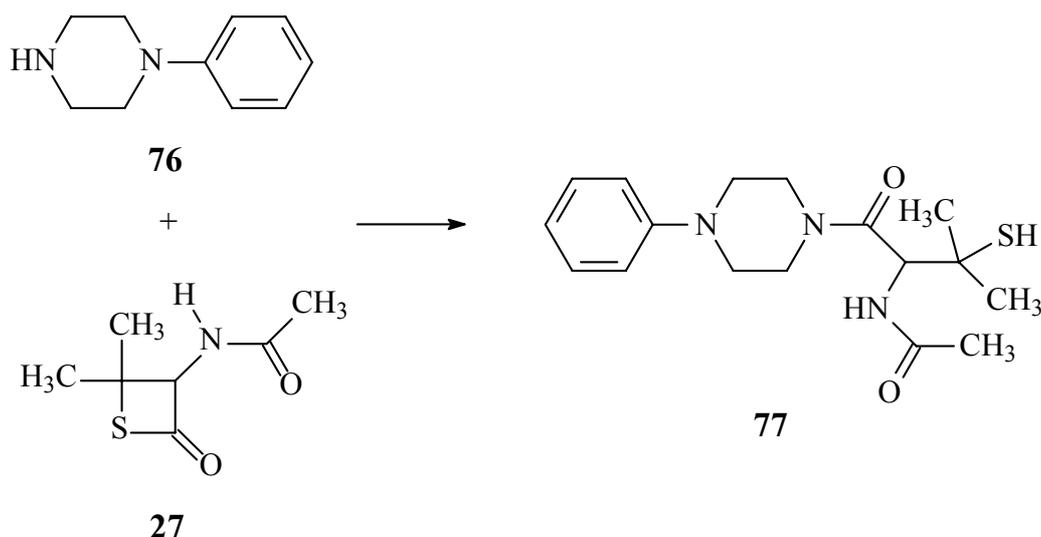


Abb. 67: Synthese von **77**

Struktur **77** wurde durch Elementaranalyse, ¹H-NMR- (Abb. 68) und ¹³C-NMR-Spektroskopie abgesichert.

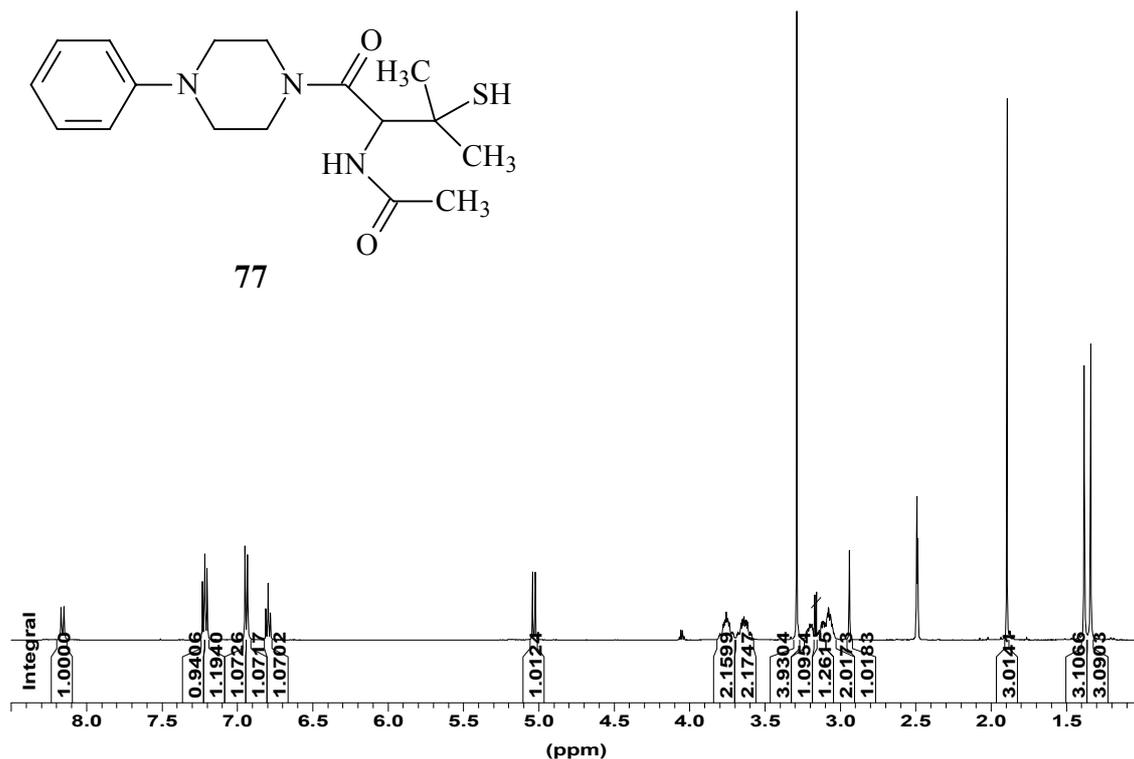


Abb. 68: ¹H-NMR-Spektrum (DMSO-d₆, 500 MHz) von 77

6.1.2 S-Nitrosierung zu N-[2-Nitrosothiol-2-methyl-1-(4-phenyl-piperazin-1-carbonyl)-propyl]-acetamid

77 wurde bei 0-5 °C unter N₂-Schutzgasatmosphäre im Gemisch Salzsäure-Schwefelsäure-Methanol-Wasser-Methylenchlorid mit NaNO₂ nitrosiert, anschließend mit Dichlormethan extrahiert. Nach Entfernen des Lösungsmittels wurde ein dunkelgrüner Feststoff erhalten.

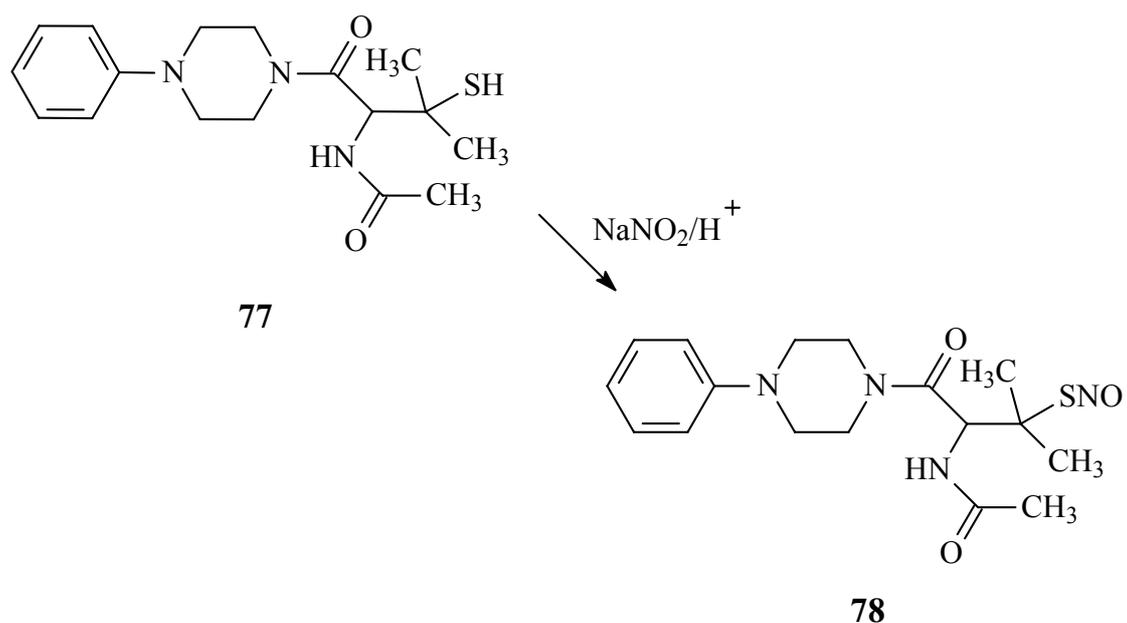


Abb. 69: Herstellung von **78**

Die Nitrosierung von **77** zu **78** induziert im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum eine signifikante Verschiebung der – zur SNO-Gruppe benachbarten Signale – nach tieferem Feld. Einen Überblick gibt Tab. 8.

H-Position	Verschiebung δ (77)	Verschiebung δ (78)	Tieffeldverschiebung $\Delta \delta$
CCH₃CH₃	1,34	1,94	0,60
CCH₃CH₃	1,38	2,03	0,65
SH	2,93	—	
COCHNH	5,03	5,72	0,69
COCHNH	8,16	8,57	0,41

Tab. 8: $^1\text{H-NMR}$ -Daten von **77** und **78**

Die Struktur von **78** wurde nicht nur durch die typische grüne Farbe und das $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum sondern auch durch ein FAB-Massen-Spektrum bestätigt. Bei 365 (M+1) findet sich eine Molpeak für **78** und bei 335 (M+1) das Fragment der NO-Abspaltung.

6.1.3 Umsetzung des Thiolactons **27** mit Ciprofloxacin – Synthese von 7-[4-(2-Acetylamino-3-mercapto-3-methyl-butyryl)-piperazin-1-yl]-1-cyclopropyl-6-fluoro-4-oxo-1,4-dihydro-quinolin-3-carbonsäure

Ciprofloxacin (**79**) wurde unter N_2 -Schutzatmosphäre mit NaHCO_3 in DMF versetzt und mit **27** bei Raumtemperatur *N*-acyliert. Nach Entfernen des DMF wurde der verbleibende gelbe Feststoff in Dichlormethan und Ethylacetat (1:1) gelöst, und die Lösung mit 0,5 N HCl gewaschen. Nach weiterer Aufarbeitung und Entfernen des Lösungsmittel wurde **80** mit Ausbeute von 21 % erhalten.

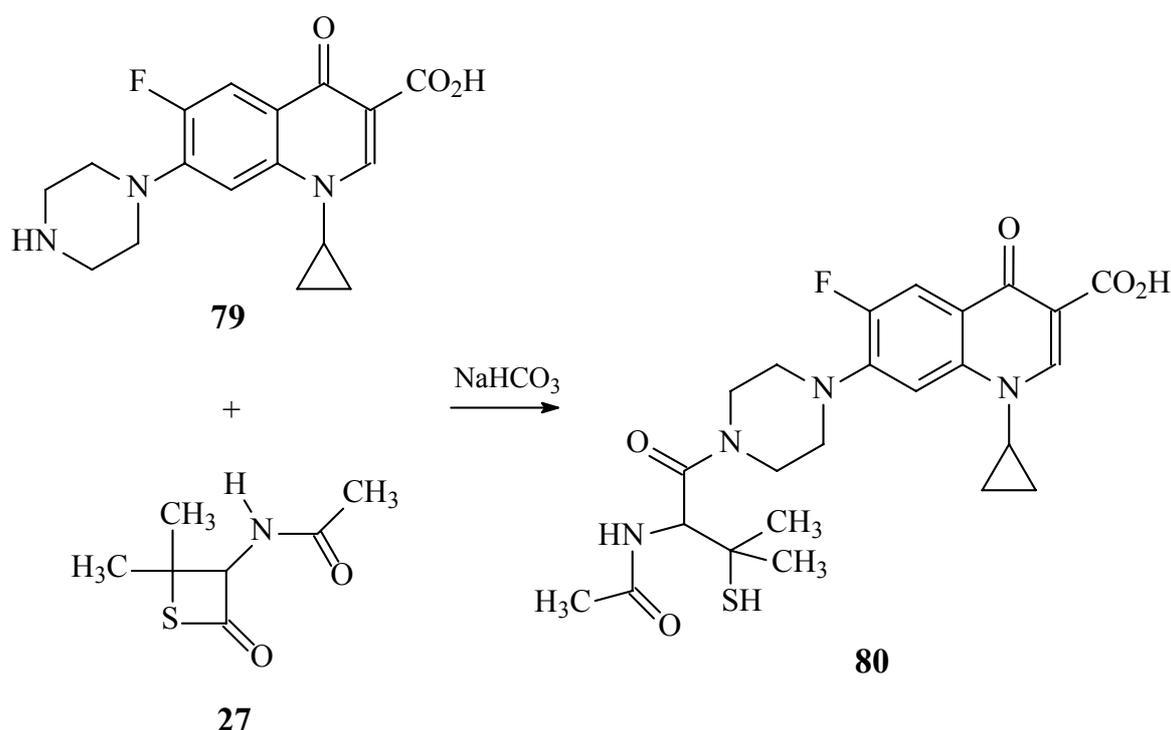


Abb. 70: Herstellung von **80**

6.1.4 S-Nitrosierung von **70** zu 7-[4-(2-Acetylamino-3-nitrosothiol-3-methyl-buteryl)-piperazin-1-yl]-1-cyclopropyl-6-fluoro-4-oxo-1,4-dihydro-quinolin-3-carbonsäure

Analog zur Herstellung von **36b** (Kapitel 5.4.3, Methode B) wurde **80** zuerst mit Methanol, 1N HCl und konz H₂SO₄ versetzt und durch Zugabe von Dichlormethan das Zweiphasensystem erzeugt. Nach der Nitrosierung mit NaNO₂ wurde die Dichlormethan-Phase abgetrennt. Nach Entfernen des Lösungsmittels wurde ein grüner Feststoff (**37**) in einer Ausbeute von 81 % erhalten.

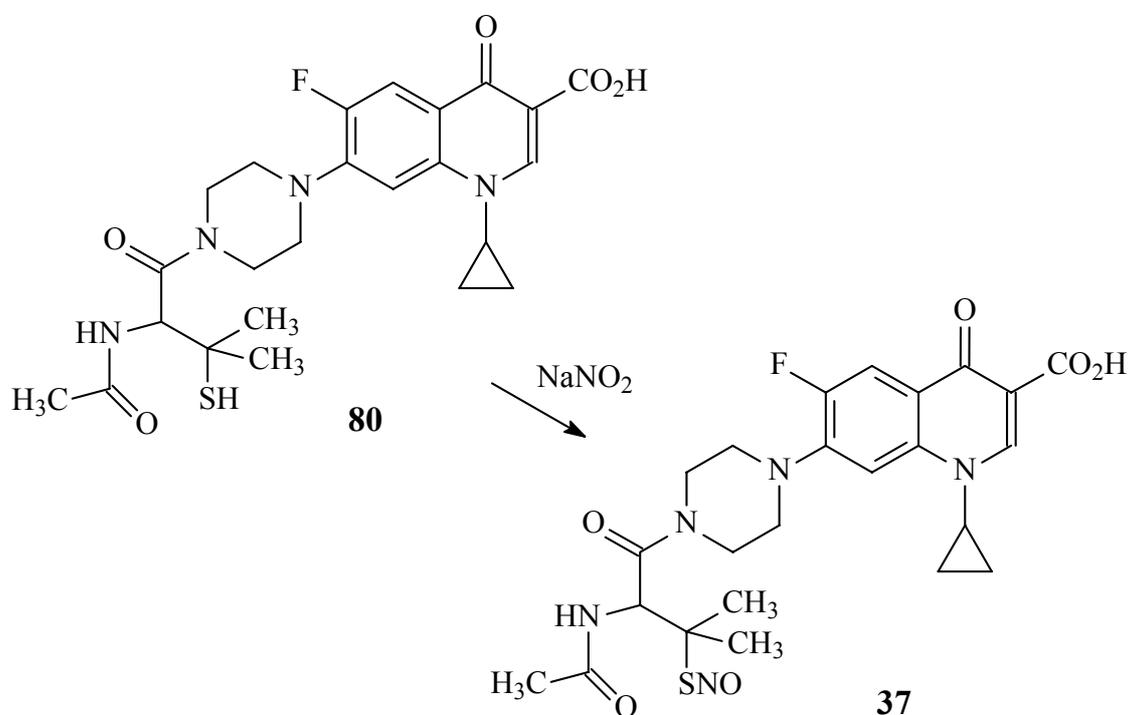
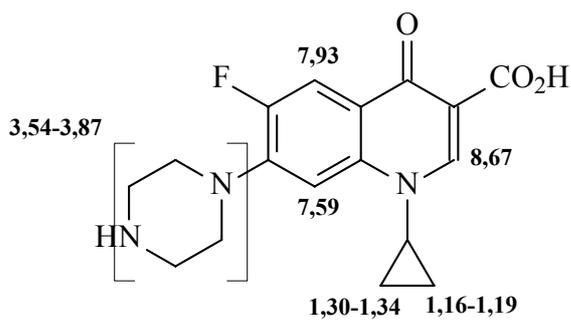


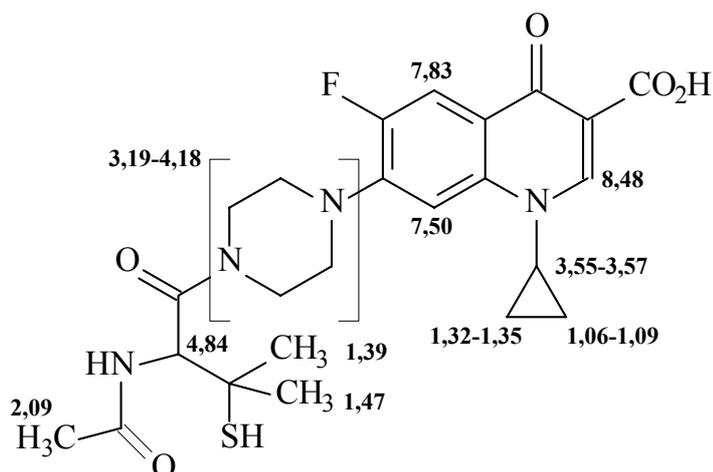
Abb. 71: Nitrosierung von **80** zu **37**

Abb. 72 zeigt die ¹H-NMR-Daten von **37** bzw. von dessen Ausgangsprodukten. Da **80** in DMSO-d₆ nicht gut löslich ist, wurden die ¹H-NMR-Spektren in D₂O/NaOD gemessen.



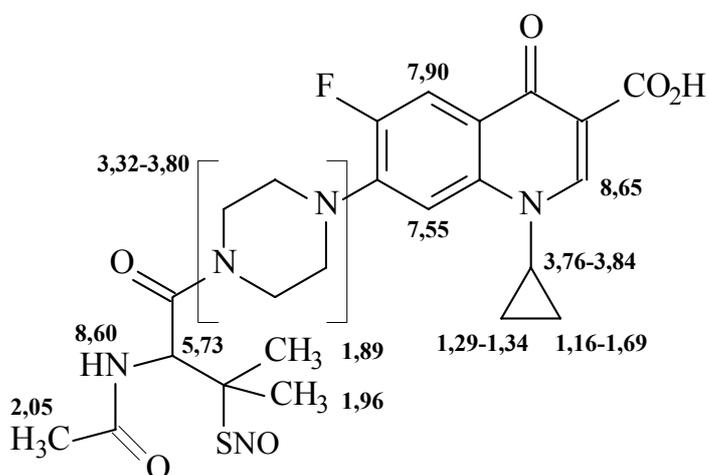
$^1\text{H-NMR}$, DMSO- d_6

79



$^1\text{H-NMR}$, $\text{D}_2\text{O}+\text{TMS}+\text{NaOD}$

80



$^1\text{H-NMR}$, DMSO- d_6

37

Abb. 72: $^1\text{H-NMR}$ -Daten von **69**, **70** und **37**

37 wurde auch durch FAB-Massen-Spektrum bestätigt. Bei 534 ($M+1$) findet sich ein Molpeak für **37** und bei 504 ($M+1$) der Nachweis für die NO-Abspaltung.

C Pharmakologischer Teil

Die im Allgemeinen Teil vorgestellten synthetischen Arbeiten sind einerseits ein Beitrag zur Grundlagenforschung auf dem Gebiet der Thiole und Nitrosothiole, andererseits stehen sie in Zusammenhang mit der Entwicklung von Wirkstoffen, bzw. sie sollen zu einem besseren Verständnis des Wirkmechanismus bekannter Arzneistoffe beitragen. Sie sind also zu ergänzen durch pharmakologische Untersuchungen.

Abgeschlossen sind die Versuche zum Nachweis von ^{15}NO nach Einnahme von ^{15}N -dotiertem Molsidomin, über die hier berichtet werden kann. Im Bearbeitung sind *in vivo* Untersuchungen zur antiinflammatorischen Potenz und zur gastrointestinalen Toxizität der NSAID-Nitrosothiol-Hybride (in Kooperation mit Prof. Kulkarni, Chandigarh, Indien) und Untersuchungen zur antimikrobiellen Potenz des Ciprofloxacin-Nitrosothiol-Hybrids (in Kooperation mit Prof. Wiedemann, Bonn).

1 ^{15}NO -Freisetzung in der Ausatemluft und im Plasma nach Einnahme von ^{15}N -Molsidomin im Selbstversuch

Bei einem früheren Experiment²² wurde einer Gruppe von 8 Freiwilligen handelsübliches ^{14}N -Molsidomin (in Form des Medikaments Corvaton[®], 2mg) verabreicht. Danach wurde die Konzentration von NO in der ausgeatmeten Luft (nach Inhalation NO-freier synthetischer Luft) über einen Zeitraum von 90 Minuten alle 15 Minuten gemessen, einmal bei den 8 therapierten und als Referenz bei 4 unbehandelten Personen. Parallel dazu wurden der systolische und der diastolische Blutdruck und die Herzfrequenz gemessen. Es wurde erwartungsgemäß eine deutliche Veränderung der hämodynamischen Parameter (Blutdruck und Puls) zwischen der 30. und 75. Minute nach Verabreichung beobachtet. Beide Gruppen atmeten NO in stark schwankenden und individuell unterschiedlichen Mengen aus, in der Gruppe, der Molsidomin verabreicht worden war, konnte kein nennenswerter Anstieg der NO-

Konzentration in der Ausatemluft im Vergleich zur Kontrollgruppe gemessen werden.

Abb. 73 zeigt erhaltene Messwerte.²²

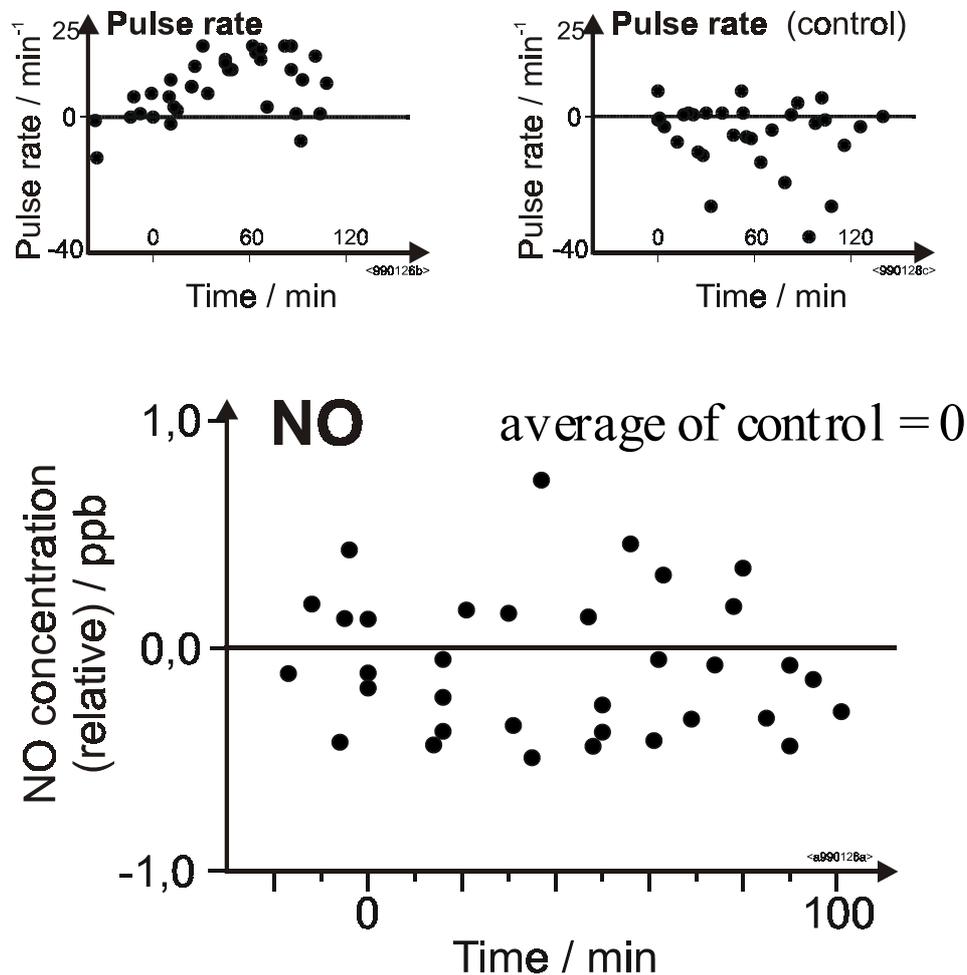


Abb. 73: Puls und gemessene NO-Konzentrationen in der Ausatemluft in der ^{14}N -Molsidomin-behandelten und in der Kontrollgruppe.

Wie in der Einleitung 1.5 bereits erläutert, eignet sich die Laser Magnet Resonanz Spektroskopie (LMRS) besonders für die Spurengasanalytik, unter anderem auch für die von NO. Vorteile der Methode: Gute Zeitauflösung (ca. 500 ms) der Messung, Fehlen der Querempfindlichkeit zu anderen Gasen, Isotopomeren-Selektivität (Unterscheidung zwischen $^{14}\text{NO}/^{15}\text{NO}$).

Im Hinblick auf die geringe Menge des natürlich vorhandenen ^{15}N (0,34%) könnte die Messung von ^{15}NO – gewonnen aus ^{15}N -dotierten NO-Donoren – die Möglichkeit eröffnen, das aus therapeutischen NO-Donoren freigesetzte NO selektiv nachzuweisen, und dies neben der enormen Menge endogenen NOs. In Kenntnis der oben beschriebenen negativen Ergebnisse mit Corvaton (= 2 mg ^{14}N -Molsidomin) synthetisierten wir den ^{15}NO -Donor (3- ^{15}N -Molsidomin) nach der für ^{14}N -Molsidomin etablierten Methode. Die pharmazeutische Qualität wurde in den Labors von *Aventis* getestet. Es wurde festgestellt, dass sie mit denen des regulären Medikaments übereinstimmen. Bedenken unsererseits gegen die Einnahme bestanden danach nicht mehr.

1.1 Herstellung von ^{15}N -Molsidomin-Kapseln

22 mg ^{15}N -Molsidomin und 88 mg Lactose wurden in einem Porzellanmörser gut verrieben. Je 10 mg des gemischten Pulvers wurden in Hartgelatine kapseln abgefüllt. Diese Arbeiten wurden im Arzneimittellabor der Pharmazeutischen Technologie der Universität Bonn durchgeführt. Die 10 gefüllten Kapseln wurden im Kühlschrank trocken aufbewahrt.

1.2 Einnahme und Messungen

In einem Experiment wurden drei gesunden Freiwilligen p.o. 2 mg ^{15}N -Molsidomin (Quelle für maximal 0,255 mg ^{15}NO) verabreicht. Danach wurden bei diesen behandelten Personen und bei einer unbehandelten Referenzperson alle 15 min Blutdruck und Puls gemessen, um die Wirksamkeit des Syntheseproduktes in der gewählten Arzneiform, und damit auch die Metabolisierung zu verfolgen. Zusätzlich exhalieren die Versuchspersonen nach Einatmung NO-freier synthetischer Luft alle 15 min in den LMR-Analysator um möglicherweise vorhandenes ^{15}NO nachzuweisen. Die Versuchsdauer wurde auf insgesamt 105 min angesetzt.

1.3 Ergebnisse und Diskussion

Die in Abb. 74 und Abb. 75 wiedergegebenen Blutdruckkurven belegen die Wirksamkeit des synthetisierten ^{15}N -Molsidomin nach peroraler Einnahme einer Hartgelatinekapselform. Sowohl die diastolischen Abb. 74 als auch die systolischen Drucke erniedrigen sich im Vergleich zu den der unbehandelten Versuchsperson. Der Anstieg in den Pulskurven war bei diesen Versuchen nur schwach (Abb. 76).

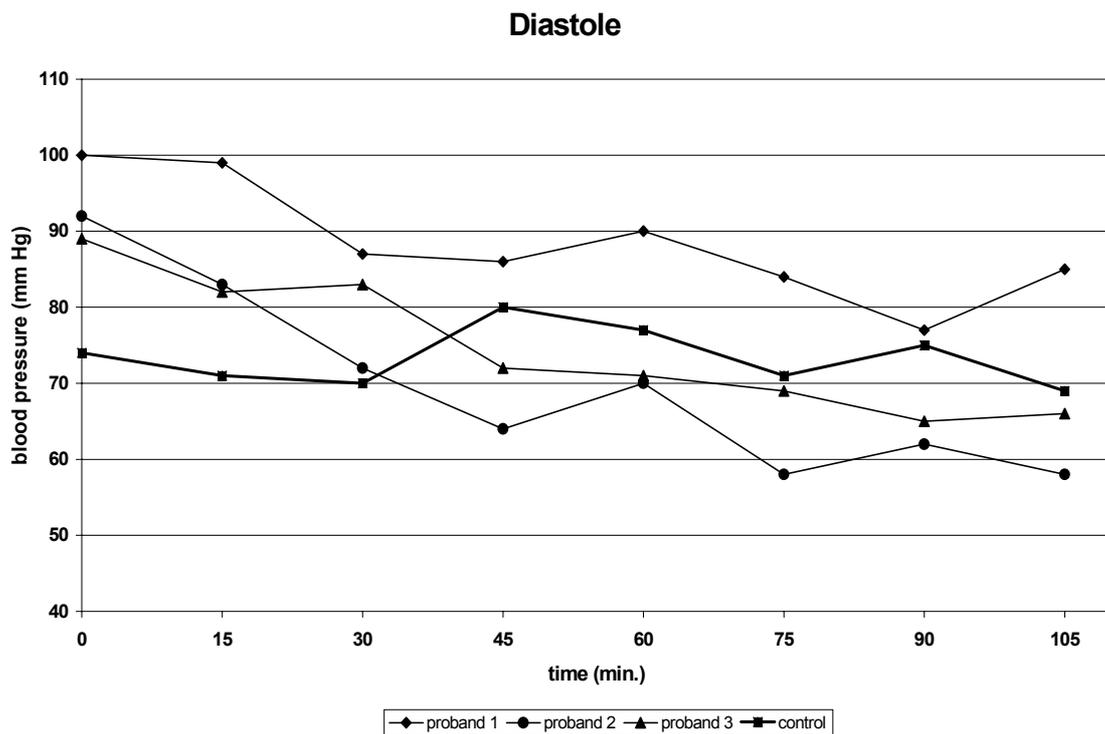


Abb. 74: Kurven der diastolischen Blutdrucke von Testgruppe und Kontrolle nach Einnahme ($t = 0$) von ^{15}N -Molsidomin

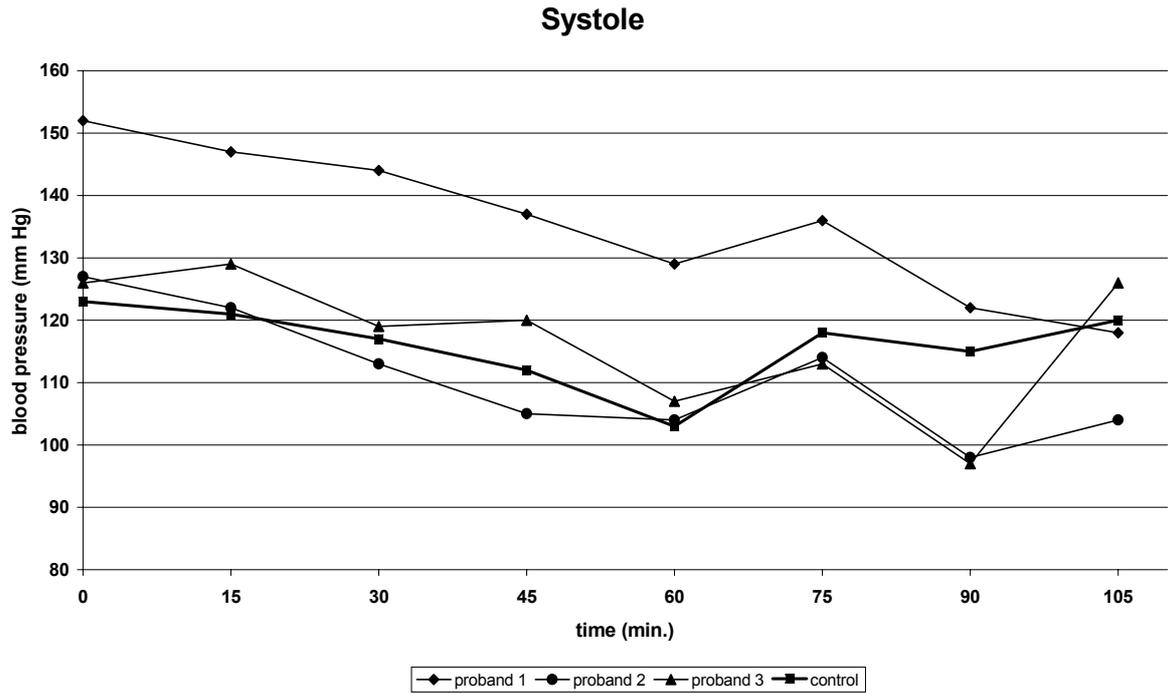


Abb. 75: Kurven der systolischen Blutdrucke von Testgruppe und Kontrolle nach Einnahme ($t = 0$) von ^{15}N -Molsidomin

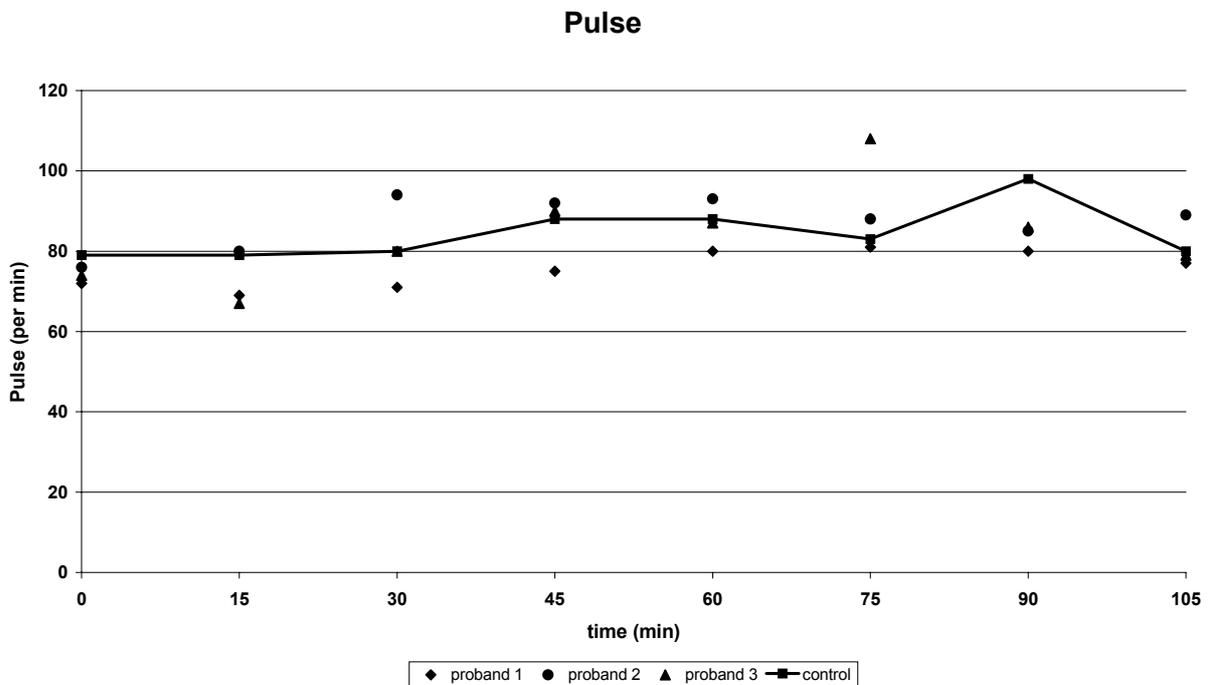


Abb. 76: Pulskurven von Testgruppe und Kontrolle bei der Untersuchung von ^{15}N -Molsidomin

Trotz der so eindeutig nachgewiesenen NO-vermittelten physiologischen Wirkung konnte keine signifikante Menge an ^{15}NO in der ausgeatmeten Luft nachgewiesen werden. Wenn man den sehr unwahrscheinlichen Fall eines quantitativen Transfers nach ebenso quantitativer Freisetzung der maximalen Menge von ca. 0,25mg ^{15}NO aus 2mg ^{15}N -Molsidomin, in ungefähr 1000 l Luft annimmt, die in einem Zeitraum von 90 Minuten ausgeatmet wurden, kann man eine NO-Konzentration von ungefähr 200 ppb errechnen. Da die Erfassungsgrenze des LMRS-Systems etwa 1 ppb ist, ist zu folgern, dass die Menge des aus Molsidomin gewonnenen NOs in der ausgeatmeten Luft auf jeden Fall deutlich unter 1% liegt. Dieses Ergebnis bestätigt im Grunde die Erwartung, das Gegenteil wäre eine – allerdings hochinteressante – Überraschung gewesen. Angesichts der chemischen und physiologischen Kurzlebigkeit des NO, z.B. seiner leichten Oxidierbarkeit, seiner Reaktionsfreudigkeit gegenüber endogenen Thiolen, eingedenk der weit entfernten Orte von Applikation und Wirkung des NO-Donors, bestätigt sich die Erwartung, dass NO aus Molsidomin nicht oder kaum den Weg in die Ausatemluft findet. Die einfache NO-Messung in der Ausatemluft als Bioverfügbarkeits-Assay nach Verabreichung von NO-Donoren scheint demnach kein gangbarer Weg zu sein.

In der Literatur ist bislang erst ein Experiment zum Nachweis von „NO-donor-derived NO“ beschrieben. Allerdings waren die Versuchsbedingungen nicht vergleichbar. Marczin et al. injizierten Patienten, die sich in Vorbereitung einer Koronarterien-Bypass Operation befanden, GTN oder SNP i.v. und untersuchten die NO-Konzentration in der Ausatemluft. Es wurde eine dosisabhängige Erhöhung der NO-Konzentration in der Ausatemluft gefunden. Bei Gabe von GTN war dieser Effekt stärker ausgeprägt als nach Gabe von SNP.⁶³

Es sei noch darauf hingewiesen, dass sich noch ein weiterer Effekt in einer Minderung der aus Molsidomin gebildeten Menge an NO auswirken könnte. Nach Feelisch⁶⁴ besteht die biologischen Wirkungen von SIN-1 nicht nur in einer Freisetzung von NO, vielmehr wird auch Peroxidnitrit gemäss nachfolgendem Biotransformationsschema (Abb. 77) gebildet. Bei der Metabolisierung von SIN-1A zu SIN-1C entstehen danach gleichzeitig NO und Superoxidionen. Diese verbinden sich rasch zu Peroxydnitrit.

Strom an NO-freier synthetischer Luft transportiert dann freies NO zum LMR-Spektrometer, das die Konzentration von ^{15}NO aufzeichnet. Abb. 78 zeigt typische Messkurven. Der natürlich Gehalt an ^{15}NO wurde als Bezugspunkt in den Diagrammen = 0 gesetzt. Tatsächlich treten signifikante Anreicherungen bis zum 13fachen der natürlichen ^{15}NO -Menge auf (Proband J nach 120 min), generell ist die Signifikanz jedoch eher gering.

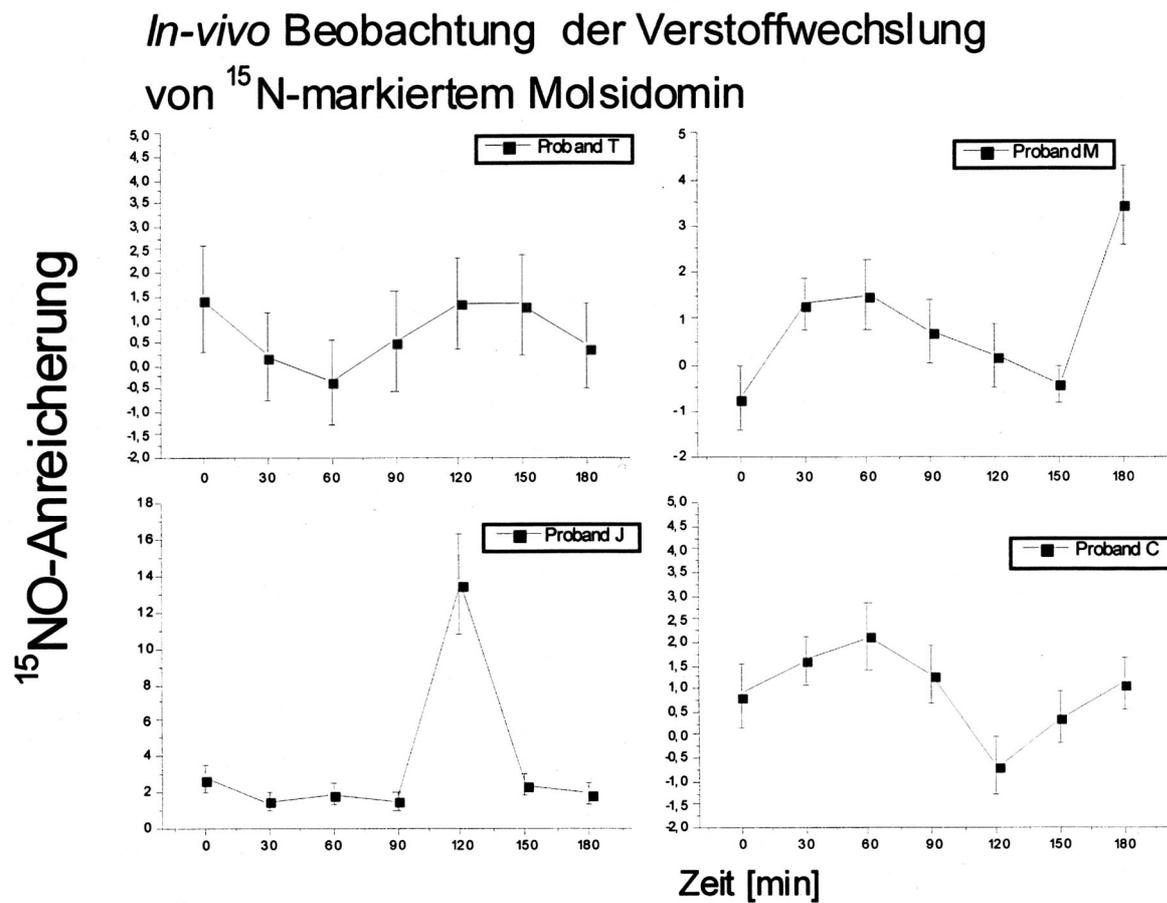


Abb. 78: Menge an ^{15}NO , gewonnen durch Reduktion von Nitrit und Nitrat im Blut von Patienten nach Einnahme von 2 mg ^{15}N -Molsidomin. Der Normalgehalt von ^{15}NO wurde gleich 0 gesetzt. (Versuche von Horstmann, Gäbler et al.)

2 Biologische Untersuchung von NO-NSAIDs-Hybridmolekülen *in vivo*

Die Hybride **71-80** (Abb. 79), hergestellt in unserer Gruppe von E. Kartasmita⁶⁰ zeigten als NSAID-prodrugs *in vitro* keine COX-1 oder COX-2-Inhibition. Bei *in vivo* Versuchen an Ratten erwiesen sich **71**, **72**, **73** und **74** ebenfalls nur als schwach wirksame Analgetika und Antiinflammatorika. Dagegen waren die *in vivo* Eigenschaften von **76** sehr vielversprechend. Naproxen-2-nitratoethylester (**76**) zeigte sich bei den – „Acetic Acid-Induced Writhing Assay“ und „Carragenan-Induced Hyperalgesia“ – Untersuchungen bessere analgetische Aktivität als Naproxen selbst. Ebenfalls zeigte **76** beim Rattenpfotenödem-Test antiinflammatorische Aktivität, bei reduzierter Gastrotoxizität⁶⁵.

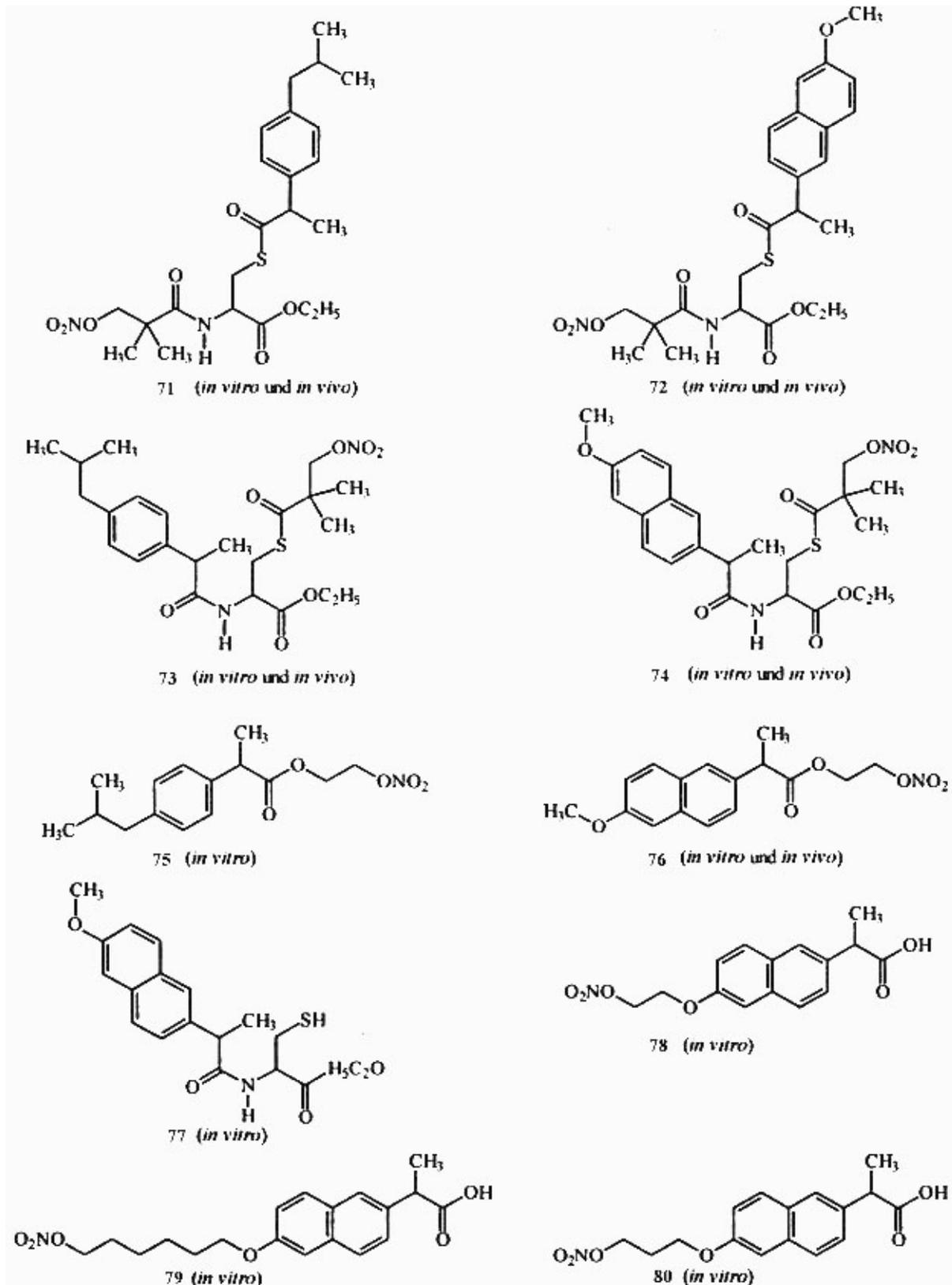


Abb. 79: Pharmakologisch untersuchte NSAID-Hybrid-Moleküle von E. Kartasmita

In Fortsetzung der Untersuchungen mit NO-gebenden NSAID's werden die Verbindungen **8**, **36a**, **36b**, und Intermediär **75a+75b** (1:1) (Abb. 80) zur Zeit im Labor von Prof. Kulkarni untersucht. Ergebnisse liegen zur Zeit noch nicht vor.

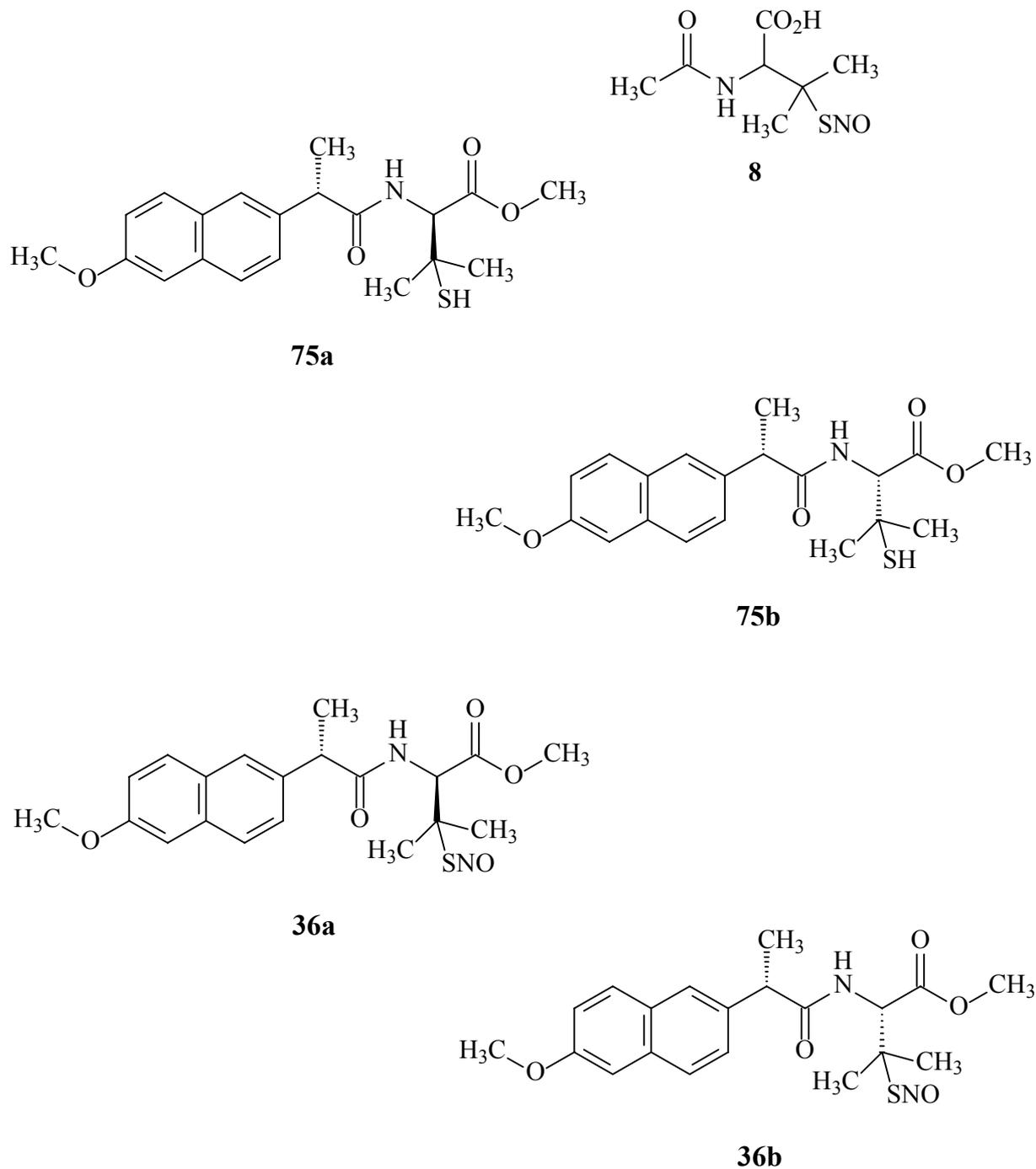


Abb. 80: Verbindungen in pharmakologischen (*in vivo*) Untersuchungen

3 Biologische Untersuchung des NO-Ciprofloxacin- Hybridmoleküls *in vitro*

Wie in der Einleitung **2.4** und im Allgemeinen Teil **6.1** beschrieben, weist NO eine antibakterielle Wirkung auf und bei entzündlichen Prozessen sowie bei Infektionen aller Art kann eine gesteigerte NO-Produktion beobachtet werden. Demzufolge könnte von einem NO-Ciprofloxacin-Hybridmolekül eine verstärkte antibakterielle Wirksamkeit erwartet werden.

Das synthetisierten NO-Ciprofloxacin-Hybridmolekül **37**, dessen Ausgangprodukt **80** und SNAP (**8**) wurden in der Arbeitsgruppe von Wiedemann⁶⁶ über die antibakteriellen (*E. coli* W 3110) Wirksamkeiten durch die Bestimmungen der minimalen Hemmkonzentration (MHK) geprüft.

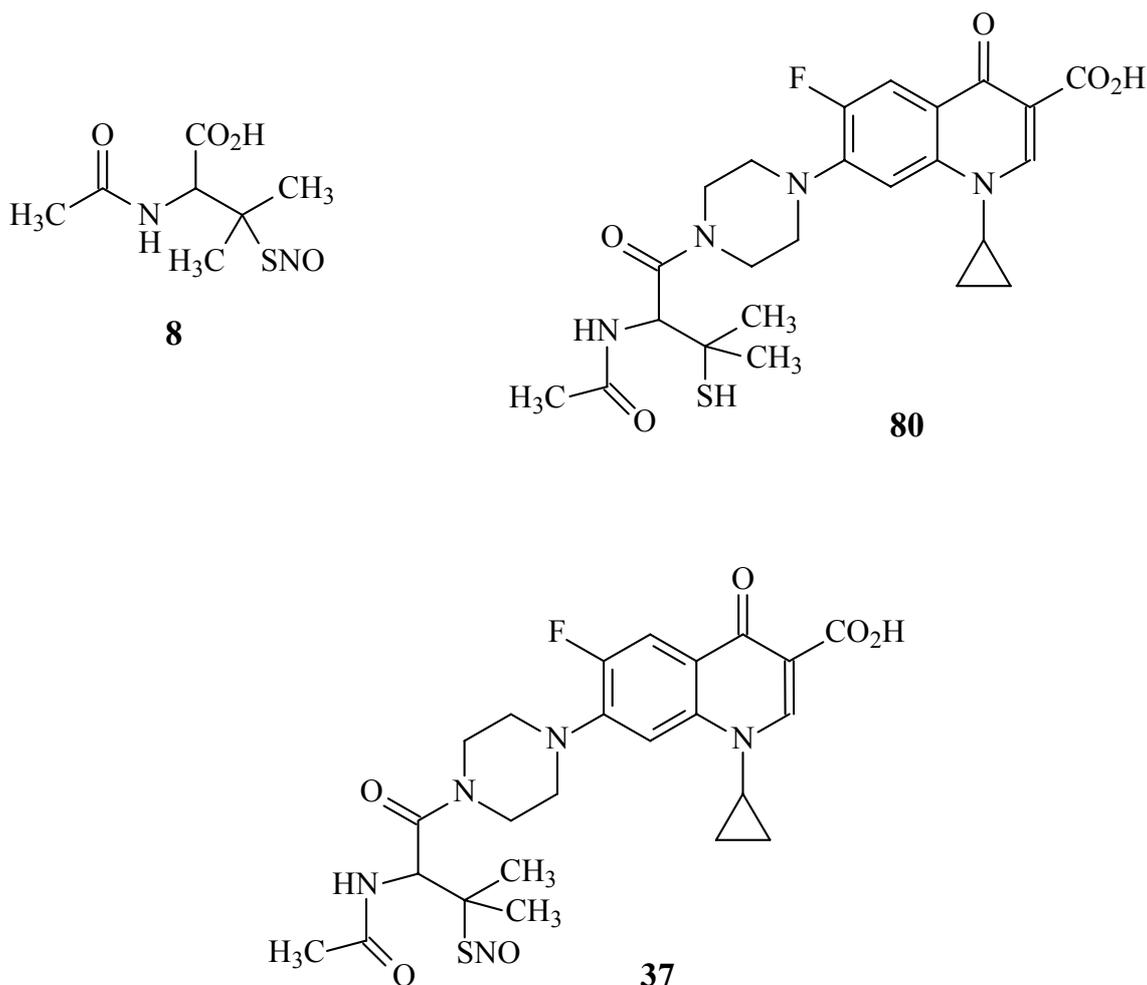


Abb. 81: Antibakterielle Wirksamkeit geprüfte Verbindungen (**8**, **80**, **37**)

3.1 Methode

Die Substanzen wurden in den angegebenen Lösungsmitteln gelöst und mit M 9 Bouillon auf 10 μMol für **80** und **37** verdünnt. Für SNAP wurde eine Stammlösung von 4 mMol hergestellt. Mit M9 Bouillon wurde in geometrischer Reihe über 12 Verdünnungsstufen in der Mikrotiterplatte weiterverdünnt, sodass pro Kavität 50 μl verdünnte Substanz vorlagen. Durch Zupipettieren von 50 μl Bakteriensuspension mit einer Keimzahl von 1×10^6 KBE/ml reduzierte sich die Substanzkonzentration um die Hälfte, die der Bakteriensuspension auf 5×10^5 KBE/ml. Die Ansatz wurde 20 h bei 36 °C bebrütet.

3.2 Ergebnisse und Diskussion

Die Tab. 9 zeigt die antibakteriellen Wirksamkeiten von **8**, **80**, **37** durch die Bestimmungen der minimalen Hemmkonzentration (MHK).

Substanzen	MG g/mol	Lösungsmittel	E. coli W 3110		
			getesteter Konzentrationsbereich	MHK $\mu\text{g/ml}$ Gesamtsubstanz	MHK μMol
8	220,24	Ethanol/Bouillon 1:3	2 mM-0,75 μM	275	125
80	504,58	NaOH/Wasser	5 μM -0,0025 μM	1,25	2,5
37	533,57	DMF/Bouillon 1,3:18,7	5 μM -0,0025 μM	0,165	0,312
Ciprofloxacin	369,43	NaOH/Wasser	16-0,007 $\mu\text{g/ml}$	0,03 ¹	0,0812

Tab. 9: Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration von **8**, **80**, **37** und Ciprofloxacin

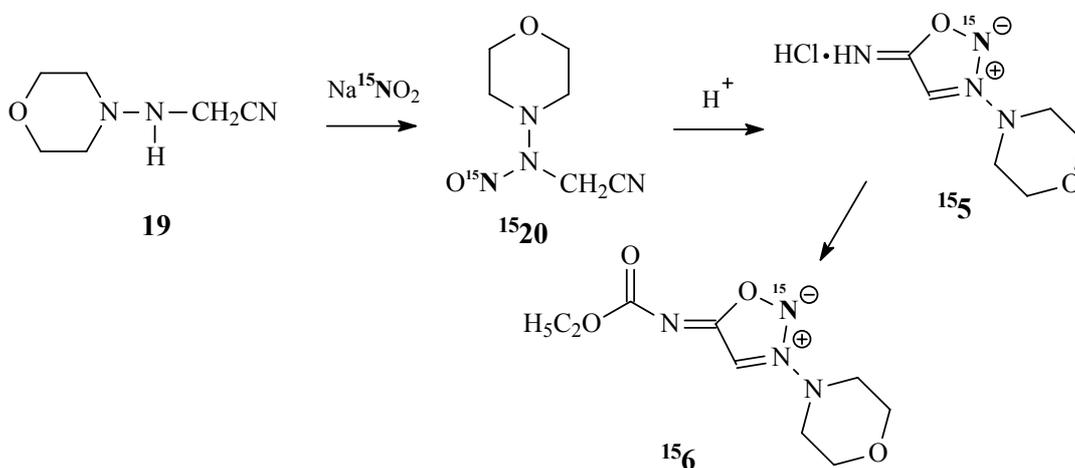
¹: Wirksame Substanz

Die Verbindung **8** (SNAP) alleine zeigt gegenüber Escherichia coli einen antibakteriellen Effekt mit MHK von 125 μMol (entspricht 275 $\mu\text{g/ml}$). Ciprofloxacin, **80** und **37** sind bereits in niedrigeren Konzentrationen antibakteriell wirksam. Die MHK von **80** gegenüber E. coli liegt mit 2,5 μMol (1,25 $\mu\text{g/ml}$) über der MHK von Ciprofloxacin, welche mit 0,03 $\mu\text{g/ml}$ (0,0812 μMol) deutlich niedriger liegt. Die Anwesenheit der NO-gebenden Nitrosothiolverbindung in Verbindung **37** steigert die antibakterielle Wirksamkeit, die MHK sinkt deutlich. Allerdings ist die minimale Hemmkonzentration von **37** immer noch 5,5fach höher als die von Ciprofloxacin. Eine Verbesserung der antibakteriellen Wirksamkeit des Ciprofloxacins konnte nicht erreicht werden.

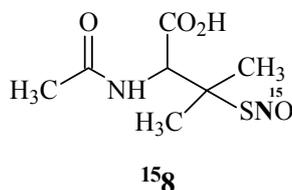
D Zusammenfassung

Niedermolekulare NO-Donoren beschäftigen den Arbeitskreis bereits seit Jahren. Bisher standen organische Nitrate, Nitrat-Thiol-Hybride, Nitrat-Thiol-NSAID-Trihybride und Diazeniumdiolate im Blickpunkt. Die vorliegende Arbeit sollte sich nun einerseits der Synthese und den ersten Anwendungsmöglichkeiten von ^{15}N -markierten NO-Donoren widmen und andererseits einen Einstieg in die sehr aktuelle Klasse der NO-Donoren vom Nitrosothiol-Typ vornehmen. Einfache Nitrosothiole, aber auch Nitrosothiol-Hybridmoleküle sollten synthetisiert, charakterisiert und in ausgewählten Beispielen einer pharmakologischen Untersuchung zugeführt werden. Die wesentlichen Ergebnisse lassen sich wie folgt zusammenfassen.

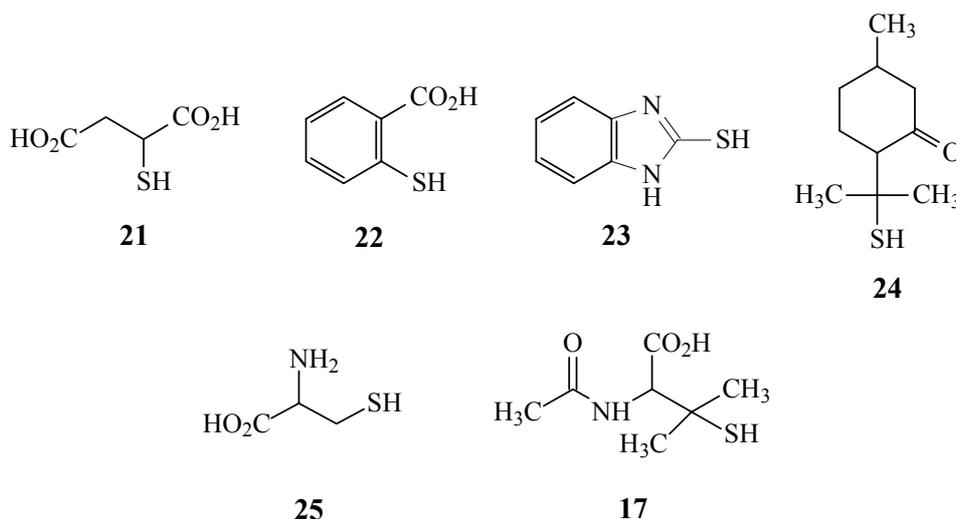
1. Molsidomin wurde in den letzten 12 Jahren als NO-lieferndes Prodrug eingeschätzt, neuere Arbeiten postulieren auch die zusätzliche Bildung von Peroxynitrit: In Diskussion mit Medizinern wurde die Frage aufgeworfen, ob Teile des aus Molsidomin *in vivo* gebildeten NO in der Ausatemluft nachzuweisen sind. Eine Chance dazu sollte in der Anwendung eines isotopomerenselektiven ^{15}NO -Nachweises durch Laser-Magnet-Resonanz-Spektroskopie (LMRS) (gemeinsame Geräteentwicklung mit der Gruppe Urban, Angewandte Physik, Bonn) und der Einnahme von ^{15}N -dotierten Molsidomins bestehen. Diese Verbindung wurde synthetisiert, einer industriellen Qualitätskontrolle unterworfen und im Selbstversuch eingenommen. Signifikante Mengen an ^{15}NO in der ausgeatmeten Luft konnten nicht nachgewiesen werden.



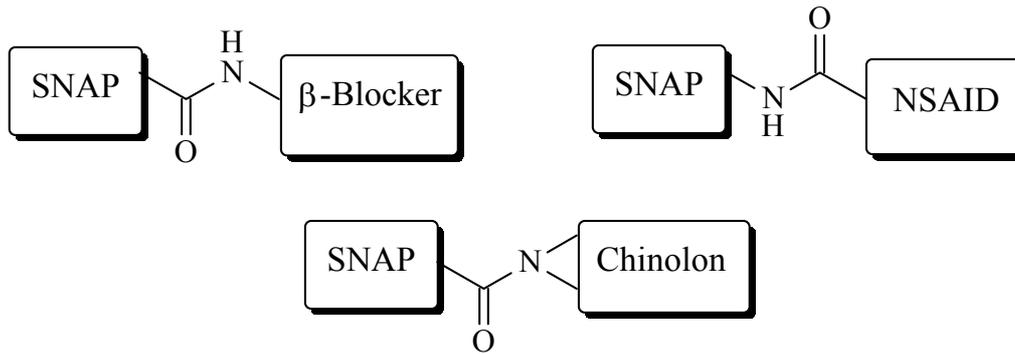
2. Als „tool“ für zukünftige NO-Transfer Untersuchungen mittels LMRS wurde in Analogie zu ^{14}N -*S*-Nitroso-*N*-acetyl-penicillamin (^{14}N -SNAP) erstmals ^{15}N -SNAP (**158**) hergestellt und charakterisiert.



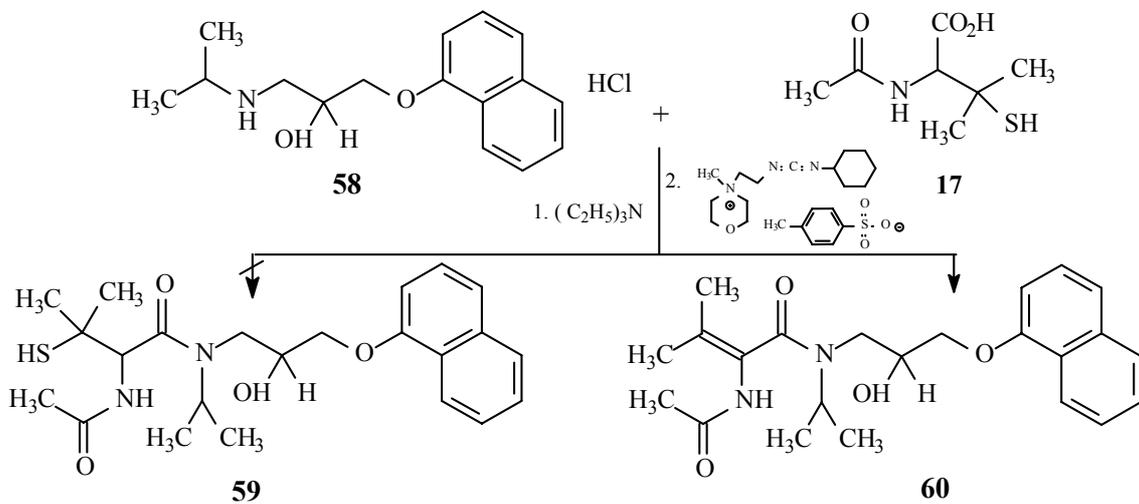
3. Nitrosothiole sind rote oder grüne Flüssigkeiten bzw. Feststoffe. In Nachbarsstellung zur SH-Gruppe alkylierte Thiole bilden nach heutigen Erkenntnissen grüne stabile Nitrosothiole mit anti-Konfiguration, ein Wegfall der sterischen Stabilisierung ergibt syn-Verbindungen. Die Nitrosierung von Thiolen mit NaNO₂ ist weiterhin – abhängig vom eingesetzten Thiol – temperatur- und lichtempfindlich. Auch können geringste Spuren von Kupferionen eine Zersetzung der *S*-Nitrosoverbindungen katalysieren. Zur weiteren Abklärung wurden strukturell unterschiedliche Thiole (**21**, **22**, **23**, **24**, **25**, **17**) mit NaNO₂ nitrosiert. In allen Fällen zeigte eine Rot- (**21**, **22**, **25**) bzw. Grünfärbung (**17**, **23**, **24**) eine *S*-Nitrosierung an, eine Isolierung eines stabilen Nitrosothiols gelang jedoch nur bei **17**. In den anderen Fällen erfolgten interne Redoxreaktionen zu Disulfid und NO im Sinne der Gleichung: $2 \text{RSNO} \rightarrow \text{RSSR} + \text{NO}$.



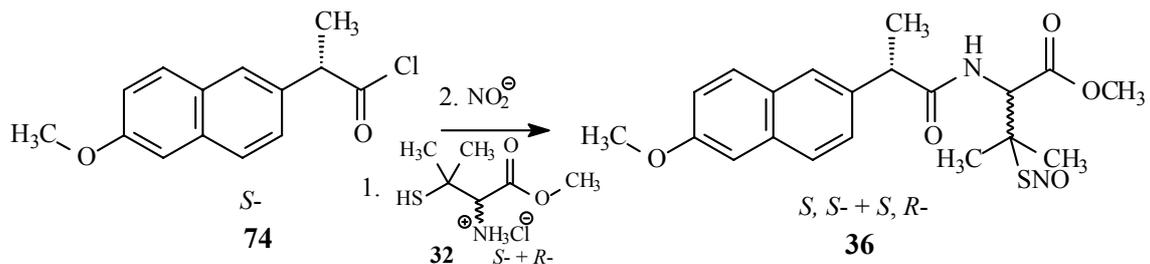
Im weiteren Verlauf wurde an der Synthese neuartiger Nitrosothiol-Hybridmoleküle mit folgenden Grundstrukturen gearbeitet:



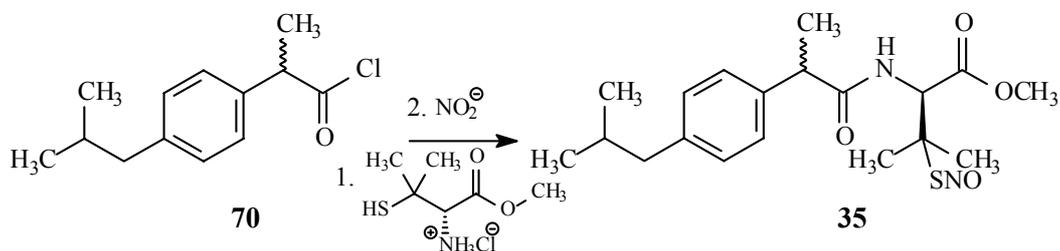
4. Die erste Hybrid-Zielstruktur war das Propranolol-Nitrosothiol-Hybrid **59**. Die Synthese gelang nicht, weil eine intermediäre Eliminierung von H_2S zu **60** nicht zu vermeiden war.



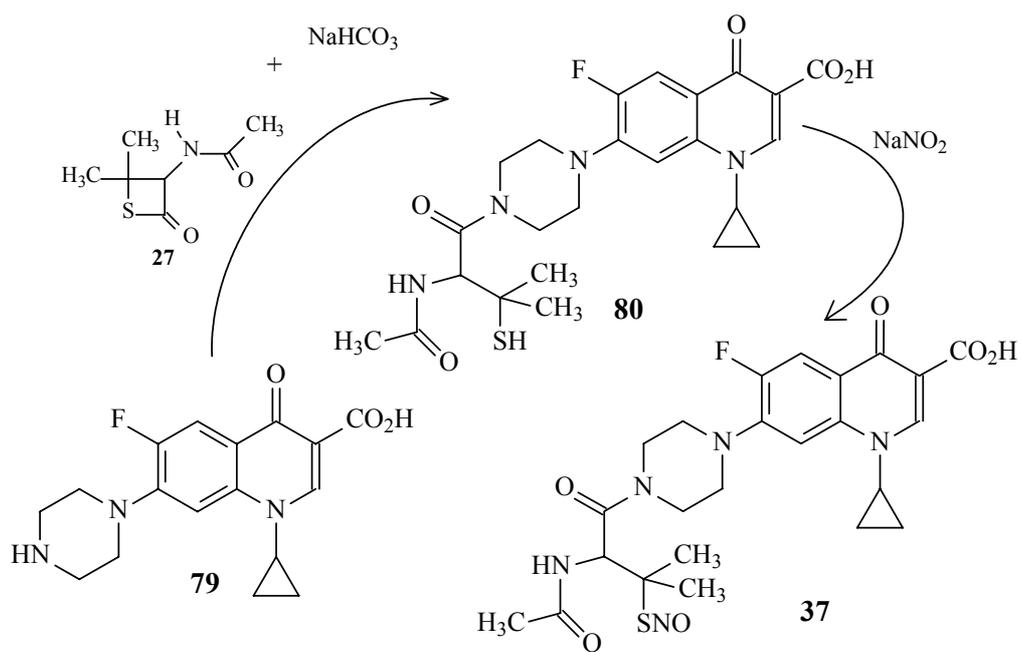
5. Hintergrund für die Synthese von NSAID-NO-Donor-Hybriden ist die Entwicklung von gastrointestinal weniger toxischen Antiinflammatorika. Proof of concept gelang bislang bei einer Reihe von NSAID-Nitrat-Hybriden, unter anderem auch bei Naproxen-2-nitratoethylester, einer Substanz aus unserer Arbeitsgruppe. In dieser Arbeit wurde nun das Naproxen-Nitrosothiol-Hybrid **36** dargestellt. Da hier racemischer Penicillaminmethylester mit Naproxensäurechlorid acyliert wurde, resultierte **36** in Form eines Diastereomeren-Gemisches.



6. Im Falle des analogen Ibuprofen-Nitrosothiol-Hybrids wurde enantiomerenreiner *S*-Penicillaminmethylester, jedoch racemisches Ibuprofen eingesetzt, so dass wiederum **35** als Diastereomergemisch erhalten wurde.



7. Die NSAID-Nitrosothiol-Hybride werden zur Zeit in der Gruppe von Kulkarni (Chandigarh, Indien) einer *in vivo* Evaluierung unterzogen.
8. Ein ganz andersartiges Hybrid stellt die Zielstruktur **37** dar. Hier verbindet sich der antimikrobielle Gyrasehemmer Ciprofloxacin mit einer Quelle von ebenfalls antimikrobiell wirksamem NO. Weiterhin könnte NO durch seine vielfältigen biologischen Funktionen, wie z. B. Vasodilatation, Aggregationshemmung der Thrombozyten, Adhäsionshemmung der Leukozyten, neuroprotektive Wirkung und unspezifische Abwehr von Tumorzellen und Bakterien, die Wirkungen des Ciprofloxacins synergistisch verbessern. Die Synthese von **37** gelang durch Verwendung des reaktiven Vierring-Lactons **27**. **69** wurde unter N_2 -Schutzatmosphäre mit NaHCO_3 in DMF versetzt und mit **27** N-acyliert. Abschließend wurde **70** mit NaNO_2 zu **37** nitrosiert.
9. Die Substanzen **8**, **80**, **37** wurden in Kooperation mit der Gruppe von Prof. Wiedemann hinsichtlich ihrer Beeinflussung des Wachstums von *E. coli* W 3110. SNAP (**8**) war schwach wirksam mit einer MHK von 125 μMol , Das Ciprofloxacin-Thiol-Hybrid (**80**) erreichte eine MHK von 2,5 μMol , die zusätzliche NO-gebende Gruppe in **37** senkte die MHK auf 0,3 μMol , ohne jedoch in diesem Assay den Wert des reinen Ciprofloxacins (MHK = 0,08 μMol) zu erreichen.



E Experimenteller Teil

1 Abkürzungsverzeichnis

AVV	Allgemeine Arbeitsvorschrift
Abb.	Abbildung
ca.	circa
CMC-p-toluolsulfonat	<i>N</i> -Cyclohexyl- <i>N'</i> -2(<i>N</i> -morpholinoethyl)- carbodiimidmethyl-p-toluolsulfonat
d	Dublett
d. Th.	der Theorie
DC	Dünnschichtchromatographie
DMSO-d ₆	deuteriertes Dimethylsulfoxid
EA	Elementaranalyse
EI	Elektronenionisation
et al.	et alter
FAB ⁶⁷	Fast Atom Bombardment
GC	gas liquid chromatography
h	hour
HR	High Resolution (Hochauflösende Massenspektroskopie)
Hz	Hertz
ICH	International Conference on Harmonisation (of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use)
i. v.	intravenös
i.Vak.	im Vakuum
IR	Infrarotspektrum
J	Kopplungskonstante
KBE:	Kolonie-bildende Einheit
konz.	konzentriert
LC	liquid chromatography
m	Multipllett
MG	Molekulargewicht
MHK	Minimale Hemm-Konzentration
MHz	Megahertz
min	minute
MS	Massenspektrum
NMR	Kernresonanzspektroskopie
n. n.	nicht nachweisbar
ppm	parts per million
q	Quartett

quint.	Quintett
RT	Raumtemperatur
s	Singulett
Smp.	Schmelzpunkt
t	Triplett
verd.	verdünnt

2 Analysengeräte und Methoden

2.1 Schmelzpunktbestimmung

Die Schmelzpunkte wurden mit dem „Melting Point Apparat“ von Gallenkamp ermittelt und sind nicht korrigiert.

2.2 Chromatographie

Dünnschichtchromatographie: Zur analytischen Dünnschichtchromatographie wurden DC-Alufolien Kieselgel 60 F₂₅₄ neutral von der Firma Merck benutzt. Die Entwicklung erfolgte unter Kammersättigung mit dem in der Monographie angegebenen Laufmittel.

Säulenchromatographie: Zur präparativen Säulenchromatographie wurde Kieselgel Typ 60 (40-63 µm) der Firma Merck eingesetzt.

Zur Detektion wurde eine Universal UV-Lampe „29200“, 254 nm und 366 nm der Firma Camag verwendet.

2.3 Elementaranalysen

Die CHN-Analysen erfolgten mit dem „Vario EL“ (Firma Elementar).

2.4 IR-Spektren

Die IR-Spektren wurden mit einem FT-IR-Spektrometer „Paragon 1000“ der Firma Perkin Elmer gemessen.

2.5 Kernresonanzspektren

¹H-NMR-Spektren wurden mit den Geräten Bruker WH 90 (90 MHz), Bruker AC 200 (200 MHz), Bruker WM 400 (400 MHz) und Bruker WM 500 (500 MHz) aufgenommen.

¹³C-NMR-Spektren wurden mit dem Gerät Bruker WM 400 (100 MHz) und Bruker WM 500 (125 MHz) aufgenommen.

Als Lösungsmittel wurden DMSO-d₆ und CDCl₃ verwendet. Als interner Standard wurden Tetramethylsilan (TMS) bzw. die undeuterierten Lösungsmittelanteile verwendet. Die Angabe der chemischen Verschiebung erfolgt in δ = ppm.

2.6 Massenspektren

Die Massenspektren wurden mit einem MS-50 Massenspektrometer (Firma Kratos, Manchester, Großbritannien) aufgenommen.

3 Allgemeine Arbeitsvorschriften (AAV)

AVV 1 *Darstellung der S-Nitrosothiol-N-acetyl-penicillamine (SNAP)*

N-Acetyl-penicillamin wird mit Methanol und 1N HCl versetzt. Unter starkem Rühren wird zuerst konz. H₂SO₄ zugegeben und danach eine wässrige NaNO₂-Lösung innerhalb von 20 min bei 25°C zugetropft. Man lässt 15 min rühren, saugt den

ausgefallenen Niederschlag ab und wäscht mit Wasser. Nach Trocknen bei Raumtemperatur erhält man dunkelgrüne Kristalle, die rot reflektieren.

AVV 2 *Darstellung der S-Nitrosothiolverbindungen*

Die Thiole werden zu einer Mischung von Methanol und 1N HCl gegeben. Unter starkem Rühren wird zuerst konz. H₂SO₄ zugegeben und danach eine wässrige NaNO₂-Lösung innerhalb von 20 min bei 25°C zugetropft. Die Mischung wird unter Ausschluß von Licht 15 min oder bei Bedarf länger gerührt. Ein entstandener Niederschlag wird abgesaugt. Fällt kein Niederschlag aus, wird die Mischung mit Dichlormethan extrahiert und über Magnesiumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wird i. Vak. entfernt.

AVV 3 *N-Acylierung von Aminen mit N-(2,2-Dimethyl-4-oxothietan-3-yl)-acetamid (27)*

N-(2,2-Dimethyl-4-oxothietan-3-yl)-acetamid wird in Methanol gelöst. Das jeweilige Amin wird langsam zugetropft. Man lässt die Mischung ca. 16 h bei Raumtemperatur rühren. Danach wird das Lösungsmittel i. Vak. entfernt.

AVV 4 *Darstellung der Säurechloride*

Zu einer Lösung von Thionylchlorid und zwei Tropfen abs. DMF in CHCl₃ gibt man bei 0°C die Carbonsäure zu. Man lässt unter Rückfluß rühren und erhöht die Temperatur langsam bis auf 63°C. Nach dem Ende der Gasentwicklung lässt man die gelbe Lösung abkühlen und entfernt das Lösungsmittel und überschüssiges Thionylchlorid i. Vak.. Der Rückstand wird mit CH₂Cl₂ gewaschen, i. Vak. getrocknet und zur weiteren Umsetzung verwendet.

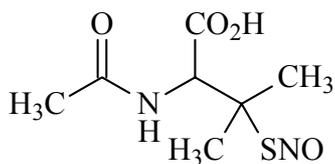
AVV 5 *N-Acylierung von Penicillaminmethylesterhydrochlorid mit Säurechloriden*

Penicillaminmethylesterhydrochlorid und Natriumacetat werden unter Rühren in Wasser gelöst. Nach Zugabe von Dichlormethan wird eine Lösung des Säurechlorids in Dichlormethan unter N₂-Schutzgasatmosphäre langsam zugetropft. Die Dichlormethanphase wird nach weiteren 45 min Rühren abgetrennt, mit 1 N HCl und gesättigter Kaliumhydrogencarbonat-Lösung gewaschen und über Na₂SO₄ getrocknet. Nach Entfernen des Lösungsmittels i. Vak. wird das Rohprodukt aus n-Hexan umkristallisiert.

4 Monographien

S- ¹⁴ N-Nitroso-N-acetylpenicillamin (8)	112
S- ¹⁵ N-Nitroso-N-acetylpenicillamin (¹⁵ 8).....	114
5-Amino-3-(4-morpholinyl)-1,2,3-oxadiazoliumhydrochlorid (5).....	115
5-Amino-3-(4-morpholinyl)-1,2- ¹⁵ N-3-oxadiazoliumhydrochlorid (¹⁵ 5).....	117
5-[(Ethoxycarbonyl)amino]-3-(4-morpholinyl)-1,2,3-oxadiazolium (Molsidomin) (6)	118
5-[(Ethoxycarbonyl)amino]-3-(4-morpholinyl)-1,2- ¹⁵ N-3-oxadiazolium	120
(¹⁵ N-Molsidomin, ¹⁵ 6).....	120
DL-S-Nitroso-mercaptobernsteinsäure (51)	121
S-Nitroso-2-mercaptobenzoessäure (52)	122
2-2'-Dithiolbis(benzoessäure) (53)	122
S-Nitroso-2-mercaptobenzimidazol (54)	123
S-Nitroso-8-mercaptomenthon (56).....	123
2-Acetylamino-N-[1-hydroxy-2-(naphth-1-yloxy)-ethyl]-N-isopropyl-3-mercapto-3- methylbutylamid (59).....	124
2-Acetylamino-3-methyl-2-en-butylsäure-[2-hydroxy-3-(naphthalyl-1-yloxy)-propyl]- isopropyl-amid (60)	125
N-(2,2-Dimethyl-4-oxo-thietan-3-yl)-acetamid (27).....	128
2-Acetylamino-N-benzyl-3-mercapto-3-methylbutylamid (62).....	130
2-Acetylamino-N-benzyl-3-nitrosothiol-3-methylbutylamid (63)	132
2-Acetylamino-N-(2-hydroxy-1-methyl-2-phenyl-ethyl)-3-mercapto-3- methylbutylamid (65).....	133
2-Acetylamino-N-benzyl-3-mercapto-3,N-dimethylbutylamid (67).....	135
2-(4-Isobutylphenyl)propansäurechlorid (70).....	137
2-(6-Methoxy-2-naphthyl)propansäurechlorid (74)	138
2-Amino-3-mercapto-3-methyl-butansäuremethylesterhydrochlorid (32).....	140

2-Amino-3-mercapto-3-methyl-butansäureethylesterhydrochlorid (73)	141
2-[2-(4-Isobutylphenyl)propionylamino]-3-mercapto-3-methylbutansäuremethylester (72)	142
2-[2-(4-Isobutylphenyl)propionylamino]-3-nitrosothiol-3-methylbutansäuremethylester (35).....	144
Methyl-(3S)-N-[2-(6-methoxy-2-naphthyl)-(2S)-propanoyl]-3-mercaptopivalinat (75a)...	146
Methyl-(3R/S)-N-[2-(6-methoxy-2-naphthyl)-(2S)-propanoyl]-3-mercaptopivalinat (75b)	146
Methyl-(3S)-N-[2-(6-methoxy-2-naphthyl)-(2S)-propanoyl]-3-(nitrosothio)valiant(36a)	150
Methyl-(3R/S)-N-[2-(6-methoxy-2-naphthyl)-(2S)-propanoyl]-3-(nitrosothio)valinat (36b)	150
N-[2-Mercapto-2-methyl-1-(4-phenyl-piperazin-1-carbonyl)-propyl]-acetamid (77)	154
N-[2-Nitroso-2-methyl-1-(4-phenyl-piperazin-1-carbonyl)-propyl]-acetamid (78)...	156
7-[4-(2-Acetylamino-3-mercapto-3-methyl-butyryl)-piperazin-1-yl]-1-cyclopropyl-6-fluoro-4-oxo-1,4-dihydro-quinolin-3-carbonsäure (80)	158
7-[4-(2-Acetylamino-3-nitrosothiol-3-methyl-butyryl)-piperazin-1-yl]-1-cyclopropyl-6-fluoro-4-oxo-1,4-dihydro-quinolin-3-carbonsäure (37)	160

S-¹⁴N-Nitroso-N-acetylpenicillamin (8)

MG: 220,24 g/mol (C₇H₁₂N₂O₄S)

Darstellung: 1,9 g (10 mmol) *N*-Acetyl-(*S/R*)-penicillamin, 20 ml Methanol und 20 ml 1N HCl, 2 ml H₂SO₄, 1,4 g (20 mmol) NaNO₂ in 20 ml H₂O wurden nach AAV 1 umgesetzt und aufgearbeitet.

Aussehen: Dunkelgrüne Kristalle mit roter Reflexion

Ausbeute: 1,2 g (54,0 % d. Th.) Lit.⁴⁵ : 63 %

Smp.: 152 °C Lit.⁴⁵ : 152 – 154 °C

EA: ber.:C=38,2% H=5,5% N=12,7%
gef.:C=38,5% H=5,4% N=12,5%

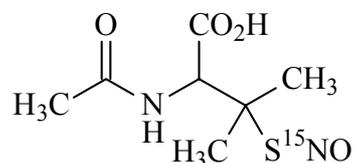
MS (FAB): 191 (89%), 221 (100%)

¹H-NMR (DMSO-d₆, 500 MHz):

Verschiebung [ppm]	Multiplizität	H-Anzahl	H-Position/ Kopplungskonst. [Hz]
1,93	s	3	COCH ₃
1,86	s	3	C(SNO)CH ₃ CH ₃
1,96	s	3	C(SNO)CH ₃ CH ₃
5,15	d	1	COCHNH (³ J=9,46)
8,45	d	1	COCHNH (³ J=9,46)

¹³C-NMR (DMSO-d₆, 125 MHz):

Verschiebung [ppm]	C-Anzahl	C-Position	Verschiebung [ppm]	C-Anzahl	C-Position
22,38	1	COCH₃	59,30	1	COCHNH
25,40	1	C(SNO)CH₃CH₃	169,71	1	H₃CCONH
26,38	1	C(SNO)CH₃CH₃	170,93	1	COCHNH
58,48	1	C(SNO)CH₃CH₃			

***S*-¹⁵N-Nitroso-*N*-acetylpenicillamin (¹⁵8)**

MG: 221,05 g/mol (C₇H₁₂N¹⁵NO₄S)

Darstellung: 1,9 g (10 mmol) *N*-Acetyl-(*S*/*R*)-penicillamin, 20 ml Methanol und 20 ml 1N-HCl, 2 ml H₂SO₄, 1,4 g (20 mmol) Na¹⁵NO₂ in 20 ml H₂O wurden nach AAV 1 umgesetzt und aufgearbeitet.

Aussehen: Dunkelgrüne Kristalle mit roter Reflexion

Ausbeute: 0,9 g (40,0 % d. Th.)

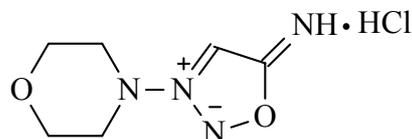
Smp.: 145 °C

EA: ber.:C=38,0% H=5,5% N=13,1%
gef.:C=38,1% H=5,5% N=12,1%

MS (FAB): 192 (8 %), 222 (33 %)

¹H-NMR (DMSO-d₆, 500 MHz):

Verschiebung [ppm]	Multiplizität	H-Anzahl	H-Position/ Kopplungskonst. [Hz]
1,95	s	3	COCH ₃
1,88	s	3	C(S ¹⁵ NO)CH ₃ CH ₃
1,98	s	3	C(S ¹⁵ NO)CH ₃ CH ₃
5,17	d	1	COCHNH (³ J=9,48)
8,47	d	1	COCHNH (³ J=9,48)

5-Amino-3-(4-morpholinyl)-1,2,3-oxadiazoliumhydrochlorid (5)

MG: 206,63 g/mol (C₆H₁₁ClN₄O₂)

Darstellung: 10,2 g (0,1 mol) *N*-Aminomorpholin wurden in 100 ml Wasser gelöst und mit wenig konz. Salzsäure auf pH 4,0 gebracht. Bei -5°C wurden 10 ml wässrige Lösung von 4,9 g (0,1 mol) NaCN zugegeben und 0,11 mol Formaldehyd in Form einer Formalin-Lösung zugetropft. Es ließ sich 4 Stunden bei -5°C und pH 7,5 und danach bei RT über Nacht rühren. Bei -5 bis 0°C wurde der pH-Wert mit konz. Salzsäure auf 2 eingestellt. Nach Zusatz von 60 ml Essigsäureethylester tropfte man eine Lösung von 6,9 g (0,1 mol) Natriumnitrit in 12 ml Wasser hinzu. Nach 2stündigem Rühren bei 5°C brachte man mit halbkonzentrierter Natronlauge den pH-Wert auf 12. Die wässrige Phase wurde abgetrennt und die gelbliche Essigesterphase mit 60 ml Methanol versetzt. Bei 10°C wurden ca. 8-9 g HCl-Gas eingeleitet, wobei die Temperatur nicht 30°C übersteigen sollte. Man rührte weitere 2 h und saugte den Niederschlag ab. Man wusch mit 5 ml Methanol, dann mit 10 ml Essigester und trocknete bei 40°C i. Vak. über Nacht.

Aussehen: Weißes Pulver

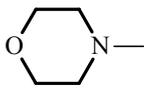
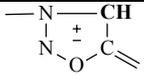
Ausbeute: 7,59 g (35,6 % d. Th.) Lit.⁶⁸: 51 %

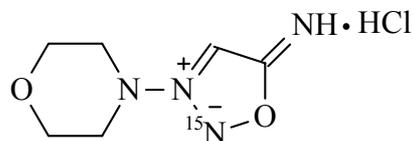
Smp.: 184,5 °C Lit.⁶⁸: 190-191 °C, aus Ethanol

MS (EI, 70 eV): 56 (53 %), 86 (18 %), 140 (36%), 170 (8 %)

HR: ber.: 170,0804 für C₆H₁₀N₄O₂
gef.: 170,0802

¹H-NMR (DMSO-d₆, 200 MHz):

Verschiebung [ppm]	Multiplizität	H-Anzahl	H-Position
3,61 3,85	m m	4 4	
8,30	s	1	
9,66	s	2	=NHHCl

5-Amino-3-(4-morpholinyl)-1,2-¹⁵N-3-oxadiazoliumhydrochlorid (¹⁵5)

MG: 207,05 g/mol (C₆H₁₁ClN₃¹⁵NO₂)

Darstellung: Na¹⁵NO₂ wurde nach Vorschrift von **5** umgesetzt und aufgearbeitet.

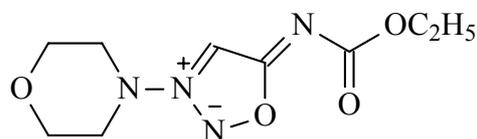
Smp.: 185 °C

MS (EI, 70 eV): 56 (63 %), 86 (22 %), 140 (49 %), 171 (7 %)

HR: ber.: 171,0774 für C₆H₁₀N₃¹⁵NO₂
gef.: 171,0773

¹H-NMR (DMSO-d₆, 200 MHz):

Verschiebung [ppm]	Multiplizität	H-Anzahl	H-Position
3,58	m	4	
3,87	m	4	
8,25	s	1	
9,60	s	2	==NHCl

5-[(Ethoxycarbonyl)amino]-3-(4-morpholinyl)-1,2,3-oxadiazolium (Molsidomin)**(6)**

MG: 242,23 g/mol (C₉H₁₄N₄O₄)

Darstellung: 4,8 g (23,3 mmol) Sydnominin (**5**) wurden in 12,2 ml Wasser gelöst und mit 3,4 ml Chlorameisensäureethylester versetzt und auf 13°C gekühlt. Der direkte Lichteinfall wurde durch Abdecken des Abzugs vermieden. Unter Rühren wurden 4 × 1,2 g (11,6 mmol) Natriumhydrogencarbonat zugegeben. Die erste Zugabe wurde bei 13°C durchgeführt, 45 Minuten danach die zweite Zugabe bei 17°C. Nach Ablauf weiterer 75 Minuten erfolgte die dritte Zugabe bei 20°C und die vierte bei 24°C, 135 Minuten nach der dritten. Der pH-Wert blieb während dieser Zeit zwischen 5 und 7. Die Mischung wurde bei RT über Nacht gerührt und dann 2 h auf 10°C gekühlt. Die Suspension wurde über eine Nutsche BN3 abgesaugt und schließlich mit 4,0 ml Wasser gewaschen. Der verbleibende pastöse Feststoff wurde i. Vak. bei 60°C bis zur Gewichtskonstanz getrocknet.

Aussehen: Weiße Kristalle

Ausbeute: 4,27 g (75,6 % d. Th.)

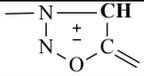
Smp.: 139-142,3 °C

EA: ber.: C=44,6% H=5,8% N=23,1%
 gef.: C=44,4% H=5,9% N=22,6%

MS (EI, 70 eV): 56 (97 %), 86 (49 %), 113 (11 %), 140 (45 %), 197 (3 %), 212 (3 %), 242 (6 %)

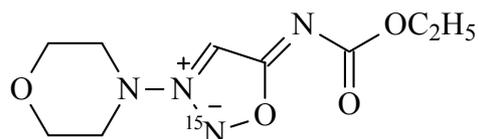
HR: ber.: 242,1015 für C₉H₁₄N₄O₄
 gef.: 242,1018

¹H-NMR (DMSO-d₆, 90 MHz):

Verschiebung [ppm]	Multiplizität	H-Anzahl	H-Position
3,6	m	4	
3,9	m	4	
1,2	t	3	COOCH ₂ CH ₃
4,0	q	2	COOCH ₂ CH ₃
8,3	s	1	

5-[(Ethoxycarbonyl)amino]-3-(4-morpholinyl)-1,2-¹⁵N-3-oxadiazolium

(¹⁵N-Molsidomin, ¹⁵6)



MG: 243,10 g/mol (C₉H₁₄N₃¹⁵NO₄)

Darstellung: ¹⁵5 wurde nach Vorschrift von **6** umgesetzt und aufgearbeitet.

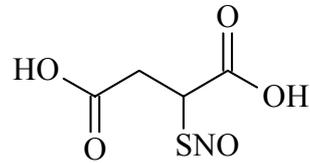
Smp.: 139-140 °C

MS (EI, 70 eV): 56 (100 %), 86 (71 %), 113 (16 %), 140 (70 %), 198 (6 %), 212 (5 %), 243 (12 %)

HR: ber.: 243.0985 für C₉H₁₄N₃¹⁵NO₄
gef.: 243,0985

¹H-NMR (DMSO-d₆, 200 MHz):

Verschiebung [ppm]	Multiplizität	H-Anzahl	H-Position
3,6 3,8	m m	4 4	
1,2	t	3	COOCH ₂ CH ₃
4,0	q	2	COOCH ₂ CH ₃
8,2	s	1	

Versuch zur Darstellung von *DL-S-Nitroso-mercaptopbernsteinsäure* (51)

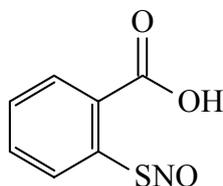
MG: 179,15 g/mol (C₄H₅NO₅S)

Darstellung: 1,5 g (10 mmol) *DL*-Mercaptopbernsteinsäure wurden mit 20 ml Methanol, 20 ml 1N HCl, 2 ml konz. H₂SO₄ und 1,4 g (20 mmol) NaNO₂ nach AAV 2 umgesetzt und aufgearbeitet.

Das Produkt in der roten Lösung liebt sich nicht isolieren.

Aussehen: Rote Lösung

Versuch zur Darstellung von *S*-Nitroso-2-mercaptobenzoessäure (52)

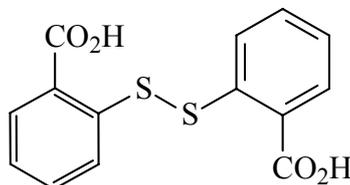


MG: 183.18 g/mol (C₇H₅NO₃S)

Darstellung: 1,5 g (10 mmol) 2-Mercaptobenzoessäure wurden mit 40 ml Methanol, 20 ml 1N HCl, 2 ml konz. H₂SO₄ und 1,4 g (20 mmol) NaNO₂ nach AAV 2 umgesetzt und aufgearbeitet.

Der Niederschlag wurde durch Schmelzpunkt und ¹H-NMR-Spektrum als das entsprechende Disulfid (53) identifiziert:

2-2'-Dithiolbis(benzoessäure) (53)

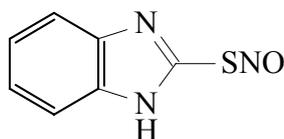


MG: 306.35 g/mol (C₁₄H₁₀O₄S₂)

Smp.: 287-292 °C Lit.⁶⁹: 289-290°C

¹H-NMR (DMSO-d₆, 200 MHz):

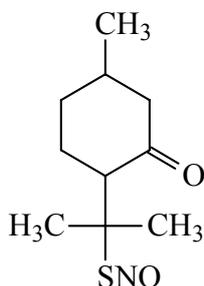
Verschiebung [ppm]	Multiplizität	H-Anzahl	H-Position
7,2-7,7	m	8	aromat. H
7,9-8,2	dd (<i>J</i> = 8,0, <1)	2	2 × COOH

Versuch zur Darstellung von *S*-Nitroso-2-mercaptobenzimidazol (54)

MG: 179.20 g/mol (C₇H₅N₃OS)

Darstellung: 10 mmol 2-Mercaptobenzimidazol wurden mit 30 ml Methanol, 10 ml 1N HCl, 2 ml konz. H₂SO₄ und 20 mmol NaNO₂ nach AAV 2 umgesetzt und aufgearbeitet.

Das Reaktionsprodukt ist nicht stabil und zersetzt sich spontan.

Versuch zur Darstellung von *S*-Nitroso-8-mercaptomenthon (56)

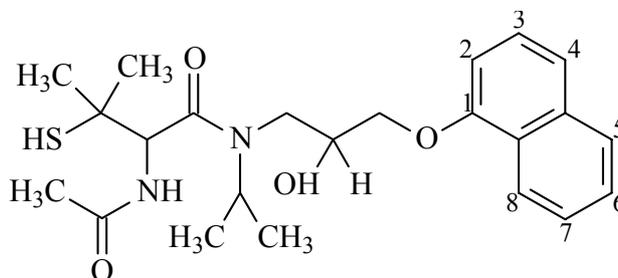
MG: 215.31 g/mol (C₁₀H₁₇NO₂S)

Darstellung: 1,9 g (10 mmol) 8-Mercaptomenthon wurden mit 40 ml Methanol, 10 ml 1N HCl, 2 ml konz. H₂SO₄ und 1,4 g (20 mmol) NaNO₂ nach AAV 2 umgesetzt und aufgearbeitet.

Das Reaktionsprodukt konnte nicht isoliert werden.

Aussehen: Dunkelgrüne Lösung

Versuch zur Darstellung von 2-Acetylamino-*N*-[1-hydroxy-2-(naphth-1-yloxy)-ethyl]-*N*-isopropyl-3-mercapto-3-methylbutylamid (59**)**



MG: 432.58 g/mol (C₂₃H₃₂N₂O₄S)

Darstellung: Methode A⁵⁶ (Darstellungsversuch unter Bildung eines ungesättigten Derivates von **59**):

Eine Suspension von 0,96 g (5 mmol) *N*-Acetyl-penicillamin in 12,5 ml Dichlormethan wurde auf 0°C gekühlt und mit 2,12 g (5 mmol) CMC-p-toluolsulfonat versetzt. Schrittweise gabe man eine Lösung von 1,55 g (5,25 mmol) Propranololhydrochlorid in 0,51 g (5 mmol) Triethylamin/12,5 ml Dichlormethan zu. Die Mischung wurde 1 h bei 0°C und danach 48 h bei RT gerührt. Es wurde filtriert und der Rückstand mit 10 ml Dichlormethan gewaschen. Das Filtrat wurde zuerst mit 15 ml gesättigter Zitronensäure-Lösung, danach mit 15 ml gesättigter Kaliumhydrogencarbonat-Lösung und anschließend mit 15 ml Wasser gewaschen. Die organische Phase wurde über MgSO₄ getrocknet. Das Lösungsmittel wurde i. Vak. entfernt. Der Feststoff wurde mit kaltem Diethylether gewaschen und danach getrocknet.

Durch ¹H- und ¹³C-NMR-Spektrum wurde das Produkt als 2-Acetylamino-3-methyl-2-en-butylsäure-[2-hydroxy-3-(naphthalyl-1-yloxy)-propyl]-isopropyl-amid (**60**) identifiziert (s. unten).

Methode B:

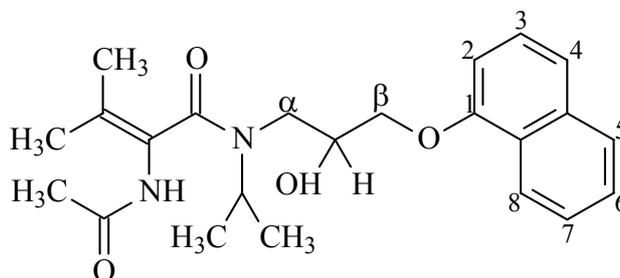
Eine Suspension von 1,85 g (6,4 mmol) Propranololhydrochlorid in 30 ml Dichlormethan wurden mit 8 ml 10 % iger Natronlauge versetzt, bis zwei klare Phasen entstanden. Die Dichlormethan-Phase wurde abgetrennt. Dazu tropfte man eine Suspension von 1 g (5,8 mmol) Thiolacton (**27**) in 20 ml Dichlormethan. Man

ließ über Nacht bei RT rühren. Nach Entfernen des Lösungsmittels i. Vak. erhielt man einen weißen Feststoff.

Das Produkt ließ sich nicht isolieren.

Aussehen: Weißer Feststoff

2-Acetylamino-3-methyl-2-en-butylsäure-[2-hydroxy-3-(naphthalyl-1-yloxy)-propyl]-isopropyl-amid (60)



MG: 398,50 g/mol (C₂₃H₃₀N₂O₄)

Darstellung: (siehe Darstellung Methode A von 2-Acetylamino-*N*-[1-hydroxy-2-(naphth-1-yloxy)-ethyl]-*N*-isopropyl-3-mercapto-3-methylbutylamid (**59**))

Aussehen: Weißer Feststoff

Ausbeute: 0,14 (7 % d. Th.)

Smp.: 47-58 °C

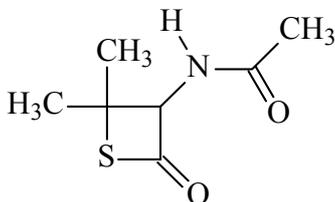
EA:	ber.: C=69,3%	H=7,6%	N=7,0%
	gef.: C=67,4%	H=7,5%	N=6,8%

¹H-NMR (DMSO-d₆, 500 MHz):

Verschiebung [ppm]	Multiplizität	H-Anzahl	H-Position/ Kopplungskonst. [Hz]
1,01	2×dd	6	CH(CH ₃)CH ₃ (² J=6,6)
1,74	s	3	C=C(CH ₃)CH ₃
1,89	s	3	NHCOCH ₃
1,94	s	3	C=C(CH ₃)CH ₃
2,77	m	1	CH(CH ₃)CH ₃
2,86	dd	2	NCH ₂ CH(OH)CH ₂ ² J _{α1-α2} / ³ J _{α1-CH} =12,3/4,2
2,95	dd		² J _{α2-α1} / ³ J _{α2-CH} =12,3/7,1
4,24	dd	2	NCH ₂ CH(OH)CH ₂ ² J _{β1-β2} / ³ J _{β1-CH} =10,4/3,2
4,34	dd		² J _{β2-β1} / ³ J _{β2-CH} =10,4/6,3
5,42	m	1	NCH ₂ CH(OH)CH ₂
6,96	d	1	aromat. H₄ (³ J _{4,3} =7,6)
7,40	dd	1	aromat. H₃ (³ J _{3,4} / ⁴ J _{3,2} =7,6/8,2)
7,46	d	1	aromat. H₂ (⁴ J _{2,3} =8,2)
7,46	d	1	aromat. H₇
7,50	d	1	aromat. H₆
7,85	d	1	aromat. H₅ (³ J _{5,6} =7,2)
8,10	d	1	aromat. H₈ (³ J _{8,7} =8,2)
9,24	s	1	CH ₃ CONH

¹³C-NMR (DMSO-d₆, 125 MHz):

Verschiebung [ppm]	C-Anzahl	C-Position	Verschiebung [ppm]	C-Anzahl	C-Position
20,24	1	C=C(CH ₃)CH ₃	123,19	1	1-CH-8
21,03	1	NHCOCH ₃	125,00	1	3
22,17	1	C=C(CH ₃)CH ₃	125,34	1	7
22,57	1	CH(CH ₃)CH ₃	126,30	1	6
22,76	1	CH(CH ₃)CH ₃	126,60	1	5
46,56	1	CH(CH ₃)CH ₃	127,56	1	4-CH-5
48,09	1	NCH ₂ CH(OH)	134,14	1	C=C(CH ₃)CH ₃
68,01	1	NCH ₂ CH(OH)	137,78	1	C=C(CH ₃)CH ₃
71,42	1	CH(OH)CH ₂ O	153,84	1	1
105,29	1	2	164,25	1	C=CCON
120,28	1	8	168,96	1	NHCOCH ₃
121,58	1	4			

***N*-(2,2-Dimethyl-4-oxo-thietan-3-yl)-acetamid (27)**

MG: 173,23 g/mol (C₇H₁₁NO₂S)

Darstellung⁵⁷: 16,1 g (156,0 mmol) Acetanhydrid wurden innerhalb von 30 min zu einer auf 0°C bis -5 °C gekühlten Suspension von 9,8 g (68,0 mmol) *DL*-Penicillamin und 40 ml getrocknetem Pyridin zugetropft. Die Mischung wurde 14 h bei RT gerührt. Man löste in 400 ml Dichlormethan, wusch dreimal mit 200 ml verdünnter Salzsäure und trocknete über Magnesiumsulfat. Nach Entfernen des Lösungsmittels i. Vak. erhielt man einen gelben Feststoff, der in Petrolether (ca. 10 ml) zur Pulverisierung gerieben wurde. Die Reinigung erfolgte durch Umkristallisieren aus Ethanol.

Aussehen: Weißer Kristall (Lit.⁵⁷ Hellgelb)

Ausbeute: 1,3 g (11,37 % d. Th.) (Lit.⁵⁷: 35 %)

Smp.: 122-125°C (Lit.⁵⁷: 128-130 °C)

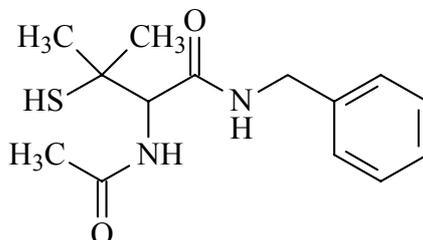
EA: ber.: C=48,53% H=6,40% N=8,09%
gef.: C=48,61% H=6,48% N=8,01%

¹H-NMR (CDCl₃, 500 MHz):

Verschiebung [ppm]	Multiplizität	H-Anzahl	H-Position/ Kopplungskonst. [Hz]
1,61	s	3	SCCH ₃ CH ₃
1,83	s	3	SCCH ₃ CH ₃
2,03	s	3	NHCOCH ₃
5,64	d	1	COCHNH(³ J=8,04)
6,51	br. d	1	COCHNH

¹³C-NMR (CDCl₃, 125 MHz):

Verschiebung [ppm]	C-Anzahl	C-Position	Verschiebung [ppm]	C-Anzahl	C-Position
22,7	1	NHCOCH ₃	76,4	1	COCHNH
26,3	1	SCCH ₃ CH ₃	169,7	1	H ₃ CCONH
30,3	1	SCCH ₃ CH ₃	192,4	1	SCOCH
51,3	1	SCCH ₃ CH ₃			

2-Acetylamino-N-benzyl-3-mercapto-3-methylbutylamid (62)

MG: 280.39 g/mol (C₁₄H₂₀N₂O₂S)

Darstellung: 1,3 g (7,5 mmol) Thiolaceton (**27**) in 15 ml Methanol und 0,80 g (7,5 mmol) Benzylamin wurden nach AAV 3 umgesetzt. Der weiße Rückstand wurde abfiltriert und mit wenig Methanol gewaschen. Das Lösungsmittel wurde i. Vak. entfernt.

Aussehen: Weißer Feststoff

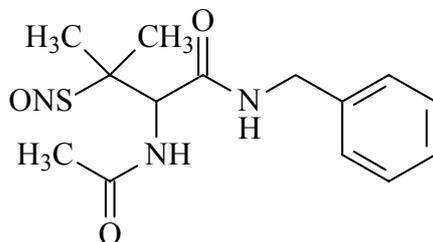
Ausbeute: 0,58 g (27,8 % d. Th.)

Smp.: 189-193 °C (Lit.⁵⁸: 193-194 °C aus Ethanol)

EA: ber.: C=59,97% H=7,19% N=9,99%
gef.: C=58,16% H=7,01% N=9,54%

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 500 MHz):

Verschiebung [ppm]	Multiplizität	H-Anzahl	H-Position/ Kopplungskonst. [Hz]
1,25	s	3	
1,45	s	3	$\text{C(SH)CH}_3\text{CH}_3$
1,92	s	3	NHCOCH_3
2,58	s	1	SH
4,28	dd	1	$\text{NHCH}_2\text{C}_6\text{H}_5$ ($^2\text{J}_{1-2}/^3\text{J}_{1-\text{NH}}=14,8/5,4$;
4,42	dd	1	$^2\text{J}_{2-1}/^3\text{J}_{2-\text{NH}}=14,8/5,4$)
4,55	d	1	$\text{COCHNH} (^3\text{J}=9,2)$
6,74	d	1	$\text{COCHNH} (^3\text{J}=9,2)$
7,21-7,29	m	5	aromat. H
7,35	t	1	$\text{NHCH}_2\text{C}_6\text{H}_5 (^3\text{J}=5,4)$

2-Acetylamino-N-benzyl-3-nitrosothiol-3-methylbutylamid (63)

MG: 309.38 g/mol (C₁₄H₁₉N₃O₃S)

Darstellung: 0,4 g (1,4 mmol) **62** wurden unter N₂-Schutzgasatmosphäre mit 8 ml Methanol, 1,5 ml 2N HCl, 0,4 ml konz. H₂SO₄ und 1,6 mmol NaNO₂ nach AAV 2 umgesetzt. Die dunkelrote Lösung ließt man über Nacht im Kühlschrank stehen. Es bildete sich ein grüner Niederschlag, der abgesaugt und i. Vak. getrocknet wurde.

Aussehen: Grüner Feststoff

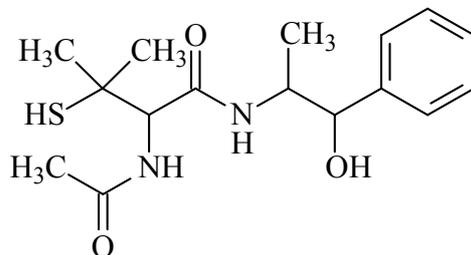
Ausbeute: 0,05 g (12 % d. Th.)

Smp.: 266°C

MS (FAB): 280 (54 %), 310 (32 %)

¹H-NMR (DMSO-d₆, 500 MHz):

Verschiebung [ppm]	Multiplizität	H-Anzahl	H-Position/ Kopplungskonst. [Hz]
1,85	s	3	C(SH)CH ₃ CH ₃
1,93	s	3	NHCOCH ₃
1,96	s	3	C(SH)CH ₃ CH ₃
4,29	dd	2	NHCH ₂ C ₆ H ₅
5,27	d	1	COCHNH(³ J=9,7)
7,23-7,36	m	5	aromat. H
8,46	d	1	COCHNH(³ J=9,7)
8,97-9,03	t	1	NHCH₂C₆H₅

2-Acetylamino-*N*-(2-hydroxy-1-methyl-2-phenyl-ethyl)-3-mercapto-3-methylbutylamid (65)

MG: 324.44 g/mol (C₁₆H₂₄N₂O₃S)

Darstellung: 1,3 g (8 mmol) **27**, 1,1 g (8 mmol) 1*R*, 2*S*-Norephedrin wurden nach AAV 3 umgesetzt und aufgearbeitet.

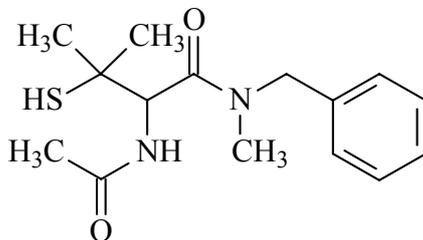
Aussehen: Weiße Kristalle (*R,S,R*-, *R,S,S*-Diastereomerengemisch)

Ausbeute: 2,4 g (99,5 % d. Th.) (Rohprodukt)

EA: ber.: C=59,2% H=7,5% N=8,6%
gef.: C=56,8% H=7,4% N=8,2%

¹H-NMR (CDCl₃, 500 MHz):

Verschiebung [ppm]	Multiplizität	H-Anzahl	H-Position/ Kopplungskonst. [Hz]
0,96-0,99	2×d	2×3	HNCH ₃ CHCHOH
1,26;1,29	2×s	2×3	C(SH)CH ₃ CH ₃
1,44;1,47	2×s	2×3	C(SH)CH ₃ CH ₃
2,02	s	2×3	HCNHCOCH ₃
2,56;2,57	2×s	2×1	C(SH)CH ₃ CH ₃
4,22-4,27	2×m	2×1	HNCH ₃ CHCHOH
4,42-4,47	2×d	2×1	HNCH ₃ CHCHOH
4,84-4,86	2×d	2×1	HCNHCOCH ₃
6,72;6,81	2×d	2×1	HCNHCOCH ₃
6,94;7,12	2×d	2×1	HNCH ₃ CHCHOH
7,21-7,31	2×m	2×5	aromat. H

2-Acetylamino-*N*-benzyl-3-mercapto-3,*N*-dimethylbutylamid (67)

MG: 294.41 g/mol (C₁₅H₂₂N₂O₂S)

Darstellung: 0,65 g (4 mmol) **27**, 0,49 g (4 mmol) *N*-Benzylmethylamin wurden nach AAV 4 umgesetzt und aufgearbeitet.

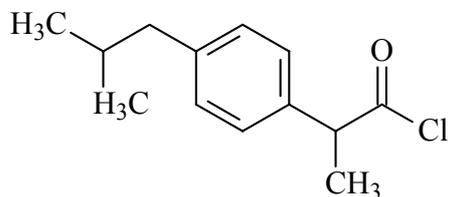
Aussehen: Weißer Feststoff (syn-anti-Isomerie)

Ausbeute: 1,0 g (95 % d. Th.) (Rohprodukt)

EA: ber.: C=61.2% H=7.5% N=9.5%
gef.: C=60,1% H=7,4% N=9,3%

¹H-NMR (CDCl₃, 500 MHz):

Verschiebung [ppm]	Multiplizität	H-Anzahl	H-Position/ Kopplungskonst. [Hz]
1,25; 1,35	2×s	2×3	C(SH)CH ₃ CH ₃
1,31; 1,42	2×s	2×3	C(SH)CH ₃ CH ₃
1,99; 2,02	2×s	2×3	NHCOCH ₃
2,14; 2,44	2×s	2×1	SH
2,92; 3,12	2×s	2×3	N(CH ₃)CH ₂
4,37	d	1	NHCH ₂ C ₆ H ₅
4,77	d	1	(² J ₁₋₂ =14,6; ² J ₂₋₁ =14,6)
4,72	d	1	(² J _{1'-2'} =16,2; ² J _{2'-1'} =16,2)
4,80	d	1	
5,04; 5,05	2×d	2×1	COCHNH(³ J=9,5)
6,64	2×d	2×1	COCHNH
7,20-7,42	2×m	2×5	aromat. H

2-(4-Isobutylphenyl)propansäurechlorid (70)

MG: 224.73 g/mol (C₁₃H₁₇ClO)

Darstellung: 10 g (48,5 mmol) *S*-(+)-Ibuprofen, 24 ml Chloroform und 5,8 ml Thionylchlorid wurden nach AAV 4 umgesetzt und aufgearbeitet.

Das Rohprodukt wurde noch dreimal mit 40 ml Dichlormethan gereinigt.

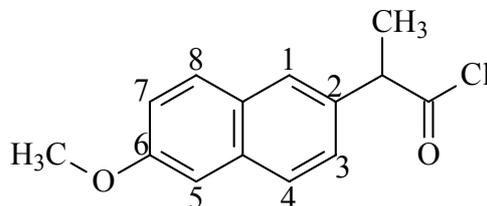
Aussehen: Gelbes Öl

Ausbeute: 10,5 g (96 % d. Th.)

EA: ber.: C=69,48% H=7,62%
gef.: C=65,22% H=7,32%

¹H-NMR (DMSO-d₆, 200 MHz):

Verschiebung [ppm]	Multiplizität	H-Anzahl	H-Position/ Kopplungskonst. [Hz]
0,67	d	6	CH ₂ CH(CH ₃) ₂ (³ J=6,6)
1,30	d	3	COCHCH ₃ (³ J=7,0)
1,75-1,85	m	1	CH ₂ CH(CH ₃) ₂
2,41	d	2	CH ₂ CH(CH ₃) ₂ (³ J=6,9)
3,60	q	1	COCHCH ₃ (³ J=7,0)
7,03-7,20	m	4	aromat. H

2-(6-Methoxy-2-naphthyl)propansäurechlorid (74)

MG: 248.71 g/mol (C₁₄H₁₃ClO₂)

Darstellung: 20 g (86,9 mmol) Naproxen, 43 ml Chloroform und 10,4 ml Thionylchlorid wurden nach AAV 4 umgesetzt und aufgearbeitet.

Das feste Rohprodukt wurde mit 150 ml CH₂Cl₂ gereinigt.

Aussehen: Weißer Feststoff

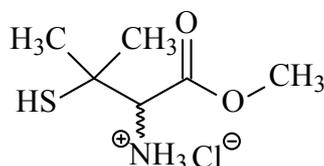
Ausbeute: 20,9 g (97 % d. Th.)

Smp.: 74-75°C

EA: ber.: C=67,61% H=5,27%
gef.: C=67,16% H=5,31%

¹H-NMR (DMSO-d₆, 500 MHz):

Verschiebung [ppm]	Multiplizität	H-Anzahl	H-Position/ Kopplungskonst. [Hz]
1,43	d	3	CHCH ₃ (³ J=6,9)
3,79	q	1	CHCH ₃ (³ J=6,9)
3,85	s	3	OCH ₃
7,15	dd	1	aromat. H ₇ (³ J ₇₋₈ / ³ J ₇₋₅ =9,0/2,5)
7,28	d	1	aromat. H ₅ (⁴ J ₅₋₇ =2,5)
7,36	dd	1	aromat. H ₃ (³ J ₃₋₄ / ⁴ J ₃₋₁ =8,5/1,9)
7,73	d	1	aromat. H ₁ (⁴ J ₁₋₃ =1,9)
7,76	d	1	aromat. H ₄ (³ J ₄₋₃ =8,5)
7,79	d	1	aromat. H ₈ (³ J ₈₋₇ =9,0)

2-Amino-3-mercapto-3-methyl-butansäuremethylesterhydrochlorid (32)

MG: 199,7 g/mol (C₆H₁₄ClNO₂S)

Darstellung: 20 g (134,2 mmol) (*S/R*)-Penicillamin wurden in 400 ml absolutem Methanol gelöst. Bei 0-10°C wurde HCl-Gas (ca. 100 g) bis zur Sättigung eingeleitet. Die Reaktionsmischung wurde 20 h unter Rückfluß erhitzt. Das Lösungsmittel wurde i. Vak. entfernt, das weiße Rohprodukt mit heißem *t*-BuOH gewaschen und bei RT abgesaugt. Die Reinigung erfolgte durch Umkristallisieren aus heißem *t*-BuOH.

Aussehen: Weiße Kristalle

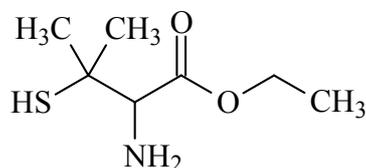
Ausbeute: 5,8 g (22 % d. Th.) (Lit.⁷⁰:40 %)

Smp.: 165 °C (Lit.⁷⁰ 168 °C aus AcOEt)

EA: ber.: C=36,09% H=7,07% N=7,01%
gef.: C=36,02% H=7,02% N=7,07%

¹H-NMR (DMSO-d₆, 200 MHz):

Verschiebung [ppm]	Multiplizität	H-Anzahl	H-Position/ Kopplungskonst. [Hz]
1,43	s	3	C(SH)CH ₃ CH ₃
1,48	s	3	C(SH)CH ₃ CH ₃
3,74	s	3	OCH ₃
4,08	s	1	COCHNH
8,62	s	1	COCHNH

2-Amino-3-mercapto-3-methyl-butansäureethylesterhydrochlorid (73)

MG: 177.26 g/mol (C₇H₁₅NO₂S)

Darstellung: 2 g (13,0 mmol) Penicillamin wurden mit 40 ml absoluten Ethanol und 1,4 ml konz. H₂SO₄ bei 5 °C umgesetzt. Danach wurde die Mischung 3 Tage unter Rühren und Rückfluß erhitzt. Nach dem Kühlen wurde die Mischung mit gesättigter Na₂CO₃-Lösung gewaschen und filtriert. Das Filtrat wurde mit Dichlormethan extrahiert und über MgSO₄ getrocknet. Das Lösungsmittel wurde i. Vak. entfernt.

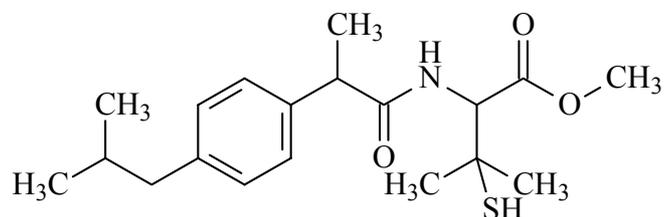
Aussehen: Graues Öl (roh)

Ausbeute: 0,1 g (7 % d. Th.)

¹H-NMR (DMSO-d₆, 90 MHz):

Verschiebung [ppm]	Multiplizität	H-Anzahl	H-Position/ Kopplungskonst. [Hz]
1,10-1,40	m	1	COCHNH
1,40	3×s	3×3	C(SH)CH ₃ CH ₃ CH ₂ CH ₃
3,25	s	1	C(SH)CH ₃ CH ₃
4,0-4,25	q	2	CH ₂ CH ₃

2-[2-(4-Isobutylphenyl)propionylamino]-3-mercapto-3-methylbutansäuremethylester (72)



MG: 351.5 g/mol (C₁₉H₂₉NO₃S)

Darstellung: Nach AAV 5 wurden 0,5 g (2,5 mmol) (*S*)-Penicillaminmethylesterhydrochlorid und 0,4 g (4,7 mmol) Natriumacetat in 6,3 ml Wasser gelöst, mit 10 ml Dichlormethan und 0,6 g (2,2 mmol) Ibuprofensäurechlorid in 5 ml Dichlormethan versetzt und 45 min gerührt. Die organische Phase wurde zweimal mit ca. 5,5 ml 1 N HCl und danach mit gesättigter Kaliumhydrogencarbonat-Lösung gewaschen.

Aussehen: Weiße Kristalle (Diastereomerenmischung)

Ausbeute: 0,4 g (45 % d. Th.)

Smp.: 105 °C

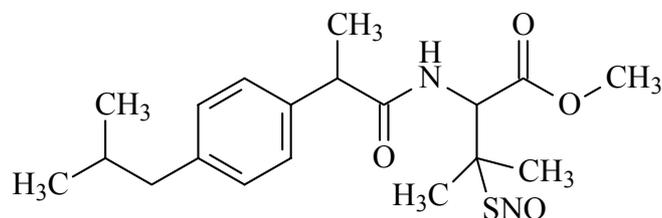
Rf-Wert: 0,61 (Ethylacetat:Hexan 4:9)

EA: ber.: C=64,92% H=8,32% N=3,98%
gef.: C=64,82% H=8,34% N=4,04%

¹H-NMR (DMSO-d₆, 500 MHz):

Verschiebung [ppm]	Multiplizität	H-Anzahl	H-Position/ Kopplungskonst. [Hz]
0,81;0,82;0,83;0,85	2×d	2×3	CH(CH ₃)CH ₃
1,16;1,19	2×s	2×3	C(SH)CH ₃ CH ₃
1,31-1,32	2×d	2×3	CH(CH ₃)CO
1,36;1,37	2×s	2×3	C(SH)CH ₃ CH ₃
1,76-1,83	m	2×1	CH(CH ₃)CH ₃
2,38-2,40	2×d	2×2	CHCH ₂ C ₆ H ₄
2,84	br. s	2×1	C(SH)CH ₃ CH ₃
3,55;3,66	2×s	2×3	OCH ₃
3,83-3,89	2×q	2×1	CH(CH ₃)CO
4,46;4,50	2×d	2×1	NHCHCO (³ J=9,1)
7,04-7,26	m	2×4	aromat. H
8,17-8,20	2×d	2×1	COCHNH (³ J=9,1)

2-[2-(4-Isobutylphenyl)propionylamino]-3-nitrosothiol-3-methylbutansäuremethylester (35)



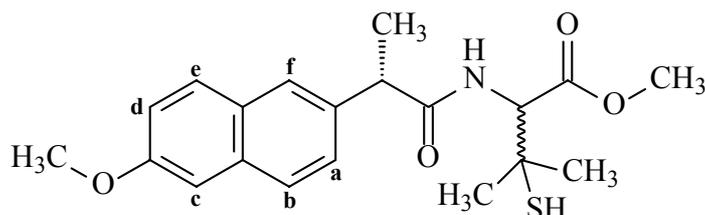
- MG: 380.5 g/mol (C₁₉H₂₈N₂O₄S)
- Darstellung: 0,1 g (0,3 mmol) 2-[2-(4-Isobutylphenyl)propionylamino]-3-mercapto-3-methylbutansäuremethylester (**72**) wurden mit 4 ml Methanol, 0,5 ml 2 N HCl und 0,2 ml konz. H₂SO₄ nach AVV 2 umgesetzt. Unter N₂-Schutzgasatmosphäre und Lichtschutz wurde eine Lösung von 0,04 g (0,6 mmol) NaNO₂ in 1,0 ml Wasser zugesetzt. Man ließ 30 Minuten bei Raumtemperatur rühren, kühlte danach auf 4°C und hielt über Nacht bei dieser Temperatur. Die ausgefallenen grünen, nadelförmigen Kristalle wurden abgesaugt und i. Vak. bei RT getrocknet
- Aussehen: Grüne Kristalle (Diastereomerenmischung)
- Ausbeute: 0,05 g (43 % d. Th.)
- Smp.: 60,9 °C
- Rf: 0,63 (Ethylacetat:Hexan 4:9)
- EA: ber.: C=59,98% H=7,42% N=7,36%
gef.: C=59,61% H=7,44% N=6,72%
- MS (FAB): 351 (9,7 %), 381 (5,0 %)

¹H-NMR (DMSO-d₆, 500 MHz):

Verschiebung [ppm]	Multiplizität	H-Anzahl	H-Position/ Kopplungskonst. [Hz]
0,82; 0,83; 0,84	4×d	2×6	CH(CH ₃)CH ₃
1,24; 1,28	2×d	2×3	CH(CH ₃)CO (³ J=6,9; 7,2)
1,74; 1,76	2×s	2×3	C(SNO)CH ₃ CH ₃
1,78	2×m	2×1	CH(CH ₃)CH ₃
1,94	2×s	2×3	C(SNO)CH ₃ CH ₃
2,38	2×d	2×2	CHCH ₂ C ₆ H ₄ (³ J=6,9)
3,56; 3,64	2×s	2×3	OCH ₃
3,78-3,85	2×q	2×1	CH(CH ₃)CO
5,22; 5,26	2×d	2×1	NHCHO (³ J=9,1; 9,5)
7,02-7,18	2×m	2×4	aromat. H
8,60; 8,66	2×d	2×1	NHCHO (³ J=9,1; 9,5)

**Methyl-(3*S*)-*N*-[2-(6-methoxy-2-naphthyl)-(2*S*)-propanoyl]-3-mercaptovalinat
(75a)**

**Methyl-(3*R/S*)-*N*-[2-(6-methoxy-2-naphthyl)-(2*S*)-propanoyl]-3-mercaptovalinat
(75b)**



MG: 375,48 g/mol (C₂₀H₂₅NO₄S)

Darstellung:

A:

Nach AAV 5 wurden 0,5 g (2,5 mmol) (*S*)-Penicillaminmethylesterhydrochlorid und 0,4 g (4,7 mmol) Natriumacetat in 6 ml Wasser gelöst. 6 ml Dichlormethan und 0,6 g (2,2 mmol) Naproxensäurechlorid (**74**) in 5 ml Dichlormethan wurden weiter umgesetzt und aufgearbeitet. Die organische Phase wurde zweimal mit ca. 5,5 ml 1 N HCl und danach mit gesättigter Kaliumhydrogencarbonat-Lösung gewaschen.

B:

Nach AAV 5 wurden 2,5 g (12,5 mmol) (*R/S*)-Penicillaminmethylesterhydrochlorid und 1,9 g (23,6 mmol) Natriumacetat in 10 ml Wasser gelöst. 20 ml Dichlormethan und 2,8 g (11,1 mmol) Naproxensäurechlorid (**74**) in 40 ml Dichlormethan wurden weiter umgesetzt und aufgearbeitet. Die organische Phase wurde zweimal mit ca. 15 ml 1 N HCl und danach mit gesättigter Kaliumhydrogencarbonat-Lösung gewaschen.

Aussehen: Weißes Pulver

Ausbeute: A: (**75a**)
0,4 g (45 % d. Th.)

B: (**75a/b**)
2,1 g (51% d. Th.) (Diastereomerenmischung)

Smp.: 107 °C

Rf-Wert: 0,76 (Ethylacetat:Hexan 1:1)

EA: ber.: C=63,98% H=6,71% N=3,73%
gef.: C=63,92% H=6,67% N=3,74%

¹H-NMR (DMSO-d₆, 500 MHz):

A:

Verschiebung [ppm]	Multiplizität	H-Anzahl	H-Position/ Kopplungskonst. [Hz]
1,18	s	3	C(SH)CH ₃ CH ₃
1,20	s	3	C(SH)CH ₃ CH ₃
1,39	d	3	CHCH ₃ (³ J=6,94)
2,78	s	1	SH
3,67	s	3	COOCH ₃
3,84	s	3	OCH ₃
4,01-4,05	q	1	CHCH ₃ (³ J=6,94)
4,50	d	1	COCHNH (³ J=9,15)
7,11; 7,13	dd	1	H _d
7,25	d	1	H _c
7,48; 7,49	dd	1	H _a
7,72	d	1	H _b
7,75	d	1	H _f
7,75	d	1	H _e
8,32	d	1	COCHNH (³ J=9,15)

B:

Verschiebung [ppm]	Multiplizität	H-Anzahl	H-Position/ Kopplungskonst. [Hz]
1,18; 1,21	2×s	2×3	C(SH)CH ₃ CH ₃
1,39	s (Überlagerung)	2×3	C(SH)CH ₃ CH ₃
1,39-1,42	2×d	2×3	CHCH ₃ (³ J=6,94)
2,78; 2,97	2×s	2×1	SH
3,53; 3,67	2×s	2×3	COOCH ₃
3,84; 3,85	2×s	2×3	OCH ₃
4,01-4,05	q (Überlagerung)	2×1	CHCH ₃ (³ J=6,94)
4,49-4,54	2×d	2×1	COCHNH (³ J=9,15)
7,11-7,14	2×dd	2×1	H _d
7,25; 7,26	2×d	2×1	H _c
7,43; 7,44; 7,48; 7,49	2×dd	2×1	H _a
7,70-7,71	2×d	2×1	H _b
7,73-7,78	4×d	2×2	H _f ; H _e
8,29-8,33	2×d	2×1	COCHNH (³ J=9,15)

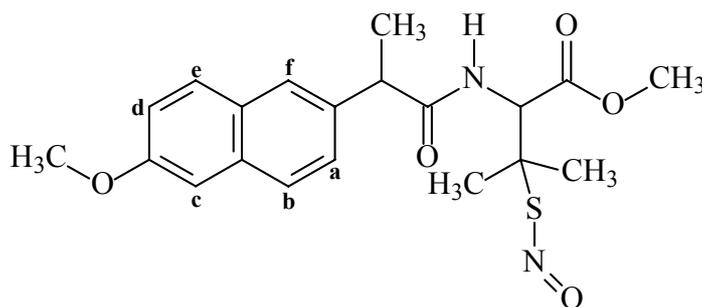
^{13}C -NMR (DMSO- d_6 , 125 MHz):

A:

Verschiebung [ppm]	C-Anzahl	C-Position	Verschiebung [ppm]	C-Anzahl	C-Position
18,07	1	CHCH₃	125,49	1	CH_b
28,98	1	C(SH)CH₃CH₃	126,62	1	CH_f
29,77	1	C(SH)CH₃CH₃	126,65	1	CH_a
44,21	1	C(SH)CH₃CH₃	128,49	1	CH_e
45,40	1	CHCH₃	129,23	1	C_{e-f}
51,89	1	COOCH₃	133,26	1	C_{c-b}
55,27	1	OCH₃	137,22	1	C_{a-f}
61,28	1	COCHNH	157,15	1	C_{c-d}
105,88	1	CH_c	170,42	1	COOCH₃
118,68	1	CH_d	173,82	1	CHCONH

Methyl-(3*S*)-*N*-[2-(6-methoxy-2-naphthyl)-(2*S*)-propanoyl]-3-(nitrosothio)valiant(36a)

Methyl-(3*R/S*)-*N*-[2-(6-methoxy-2-naphthyl)-(2*S*)-propanoyl]-3-(nitrosothio)valinat (36b)



MG: 404,48 g/mol (C₂₀H₂₄N₂O₅S)

Darstellung:

Methode A:

100 mg (0,3 mmol) Methyl-(3*S*)-*N*-[2-(6-methoxy-2-naphthyl)-(2*S*)-propanoyl]-3-mercaptovalinat (**75a**) wurden in 4 ml Methanol gelöst. Dazu gab man 0,5 ml 2 N HCl und danach 0,2 ml konz. H₂SO₄. Unter N₂-Schutzgasatmosphäre und Lichtschutz wurde eine Lösung von 36,7 mg (0,5 mmol) NaNO₂ in 1,5 ml Wasser zugesetzt. Man ließ 30 Minuten bei RT rühren, kühlte danach auf 4°C und hielt für 16 h bei dieser Temperatur. Die ausgefallenen grünen, nadelförmigen Kristalle wurden abgesaugt und i. Vak. bei RT getrocknet.

Methode B:

1 g (2,7 mmol) Methyl 3(*R/S*)-*N*-[2-(6-methoxy-2-naphthyl)-(2*S*)-propanoyl]-3-mercaptovalinat (**75a/b**) wurde in 10 ml Methanol gelöst. Zu dieser Lösung gab man unter Rühren 5 ml Methylenchlorid, 6 ml 1 N HCl und schließlich 0,5 ml konz. H₂SO₄. Unter N₂-Schutzgasatmosphäre und Lichtschutz wurde eine Lösung von 0,37 g (5,3 mmol) NaNO₂ in 1 ml Wasser zugesetzt und 40 min bei RT gerührt. Die organische Phase wurde abgetrennt, zweimal mit je 6 ml destilliertem Wasser gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wurde i. Vak. entfernt. Der Rückstand wurde i. Vak. bei RT getrocknet.

Aussehen:	Methode A: Grüne Kristalle Methode B: Grüner Feststoff
Ausbeute:	Methode A: 14 mg (13% d. Th.) Methode B: 0,67 g (62% d. Th.)
Smp.:	104 °C
MS (FAB):	375 (32 %), 405 (9 %)
Rf-Wert:	0,83 (Ethylacetat/Hexan 1:1)
EA:	ber.:C=59,39% H=5,98% N=6,93% gef.:C=58,93% H=5,94% N=6,54%

¹H-NMR (DMSO-d₆, 500 MHz):

36a

Verschiebung [ppm]	Multiplizität	H-Anzahl	H-Position/ Kopplungskonst. [Hz]
1,37	d	3	CHCH ₃ (³ J=6,94)
1,75	s	3	C(SNO)CH ₃ CH ₃
1,78	s	3	C(SNO)CH ₃ CH ₃
3,66	s	3	COOCH ₃
3,85	s	3	OCH ₃
3,99-4,02	q	1	CHCH ₃ (³ J=6,94)
5,27	d	1	COCHNH (³ J=9,14)
7,12; 7,14	dd	1	H _d
7,25	d	1	H _c
7,38; 7,39	dd	1	H _a
7,66	d	1	H _f
7,69	d	1	H _b
7,73	d	1	H _e
8,74	d	1	COCHNH (³ J=9,14)

36a /36b

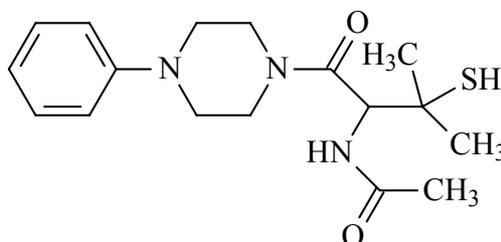
Verschiebung [ppm]	Multiplizität	H-Anzahl	H-Position/ Kopplungskonst. [Hz]
1,35; 1,39	2×d	2×3	CHCH ₃ (³ J=6,94)
1,76; 1,96	2×s	2×3	C(SNO)CH ₃ CH ₃
1,78; 1,96	2×s	2×3	C(SNO)CH ₃ CH ₃
3,54; 3,66	2×s	2×3	COOCH ₃
3,85	S (Überlagerung)	2×3	OCH ₃
3,97-4,04	2×q	2×1	CHCH ₃
5,28-5,32	2×d	2×1	COCHNH (³ J=9,14; 9,46)
7,12; 7,14	2×dd	2×1	H _d
7,25; 7,26	2×d	2×1	H _c
7,39; 7,41; 7,42; 7,43	2×dd	2×1	H _a
7,68; 7,70	2×d	2×1	H _f
7,71-7,77	4×d	2×2	H _b ; H _e
8,76; 8,78	2×d	2×1	COCHNH (³ J=9,14; 9,46)

^{13}C -NMR (DMSO- d_6 , 125 MHz):

36a

Verschiebung [ppm]	C-Anzahl	C-Position	Verschiebung g [ppm]	C-Anzahl	C-Position
18,01	1	CHCH₃	125,42	1	CH_b
25,31	1	C(SNO)CH ₃ CH ₃	126,51	1	CH_f
25,82	1	C(SNO)CH ₃ CH ₃	126,55	1	CH_a
44,13	1	C(SNO)CH₃CH₃	128,44	1	CH_e
52,28	1	CHCH₃	129,21	1	C_{e-f}
55,26	1	COOCH ₃	133,25	1	C_{c-b}
58,39	1	OCH ₃	136,98	1	C_{a-f}
59,09	1	COCHNH	157,15	1	C_{c-d}
105,87	1	CH_c	169,96	1	COOCH ₃
118,65	1	CH_d	174,01	1	CHCONH

***N*-[2-Mercapto-2-methyl-1-(4-phenyl-piperazin-1-carbonyl)-propyl]-acetamid
(77)**



MG: 335,46 g/mol (C₁₇H₂₅N₃O₂S)

Darstellung: 1,3 g (7,5 mmol) Thiolacton (**27**) wurden in 15 ml Methanol gelöst. Dazu wurden 1,4 g (7,5 mmol) Phenylpiperazin bei 5-10°C zugetropft. Die Mischung wurde über Nacht bei RT gerührt. Es fiel ein hellgelber Feststoff aus, der abgesaugt und i. Vak. bei RT getrocknet wurde. Zur Reinigung wurde das Rohprodukt in 3-5 ml siedendem Methanol suspendiert. Der Rückstand wurde abgesaugt und wieder i. Vak. getrocknet.

Aussehen: Weißer Feststoff

Ausbeute: 0,25 g (9,9% d. Th.)

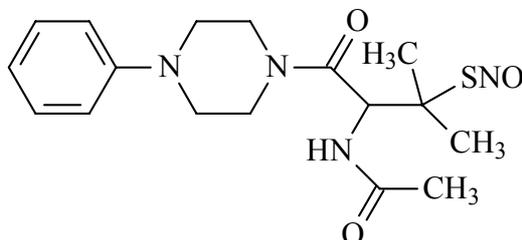
Smp.: 187-189°C

EA: ber.: C=60,87% H=7,51% N=12,53%

gef.: C=60,46% H=7,20% N=12,36%

¹H-NMR (DMSO-d₆, 500 MHz):

Verschiebung [ppm]	Multiplizität	H-Anzahl	H-Position/ Kopplungskonst. [Hz]
1,34	s	3	C(SH)CH ₃ CH ₃
1,38	s	3	C(SH)CH ₃ CH ₃
1,89	s	3	COCH ₃
2,93	s	1	SH
3,04-3,22	m	4	
3,59-3,80	2×m	4	
5,03	d	1	COCHNH (³ J=9,5)
6,78-7,23	m	5	aromat. H
8,16	d	1	COCHNH (³ J=9,5)

***N*-[2-Nitroso-2-methyl-1-(4-phenyl-piperazin-1-carbonyl)-propyl]-acetamid (78)**

MG: 364.46 g/mol (C₁₇H₂₄N₄O₃S)

Darstellung: 0,2 g (0,6 mmol) **77** wurden mit 8 ml Methanol, 5 ml 1N HCl und 0,5 ml konzentrierten H₂SO₄ nach AVV 2 umgesetzt. Bei 0-5 °C unter N₂-Schutzgasatmosphäre wurden 0,1 g (1,2 mmol) NaNO₂ in 1,2 ml Wasser zugetropft. Nach 30 minütigen Rühren bei RT wurde die Mischung mit 10 ml Dichlormethan extrahiert. Nach Entfernen des Lösungsmittels fiel ein dunkelgrüner Feststoff an.

Aussehen: Grüner Feststoff

Ausbeute: 0,2 g (85 % d. Th.)

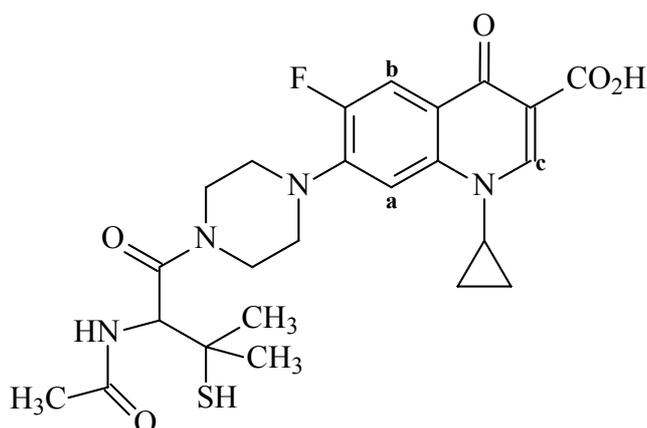
Smp.: 133 °C

MS (FAB): 335 (98 %), 365 (19 %)

¹H-NMR (DMSO-d₆, 500 MHz):

Verschiebung [ppm]	Multiplizität	H-Anzahl	H-Position/ Kopplungskonst. [Hz]
1,87	s	3	COCH ₃
1,94	s	3	C(SNO)CH ₃ CH ₃
2,03	s	3	C(SNO)CH ₃ CH ₃
3,12-3,17	m	4	
3,48-3,79	2×m	4	
5,72	d	1	COCHNH (³ J=9,5)
6,79-7,23	m	5	aromat. H
8,57	d	1	COCHNH (³ J=9,5)

7-[4-(2-Acetylamino-3-mercapto-3-methyl-butyryl)-piperazin-1-yl]-1-cyclopropyl-6-fluoro-4-oxo-1,4-dihydro-quinolin-3-carbonsäure (80)



MG: 504.58 g/mol (C₂₄H₂₉FN₄O₅S)

Darstellung: 0,7 g (2 mmol) Ciprofloxacin (**79**) wurden mit 400 ml DMF und 0,2 g (2 mmol) NaHCO₃ unter N₂-Schutzatmosphäre versetzt. Nach Zugabe einer Lösung von 2,1 mmol **27** in 10 ml DMF, wurde die Mischung bei R.T. über Nacht gerührt. Der Feststoff wurde abfiltriert und das Filtrat i. Vak. bei 70 °C eingedampft. Um DMF weitgehend zu entfernen, wurden 30 ml Dichlormethan zugegeben, erneut eingedampft und dieser Vorgang noch einmal wiederholt. Der verbleibende gelbe Feststoff wurde in einer Lösung von je 260 ml Dichlormethan und Ethylacetat gelöst, und die Lösung zweimal mit 15 ml 0,5 M HCl und dreimal mit 15 ml Wasser gewaschen. Die organische Phase wurde über MgSO₄ getrocknet, das Lösungsmittel i. Vak. entfernt und getrocknet.

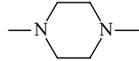
Aussehen: Gelber Feststoff

Ausbeute: 0,2 g (21 % d. Th.)

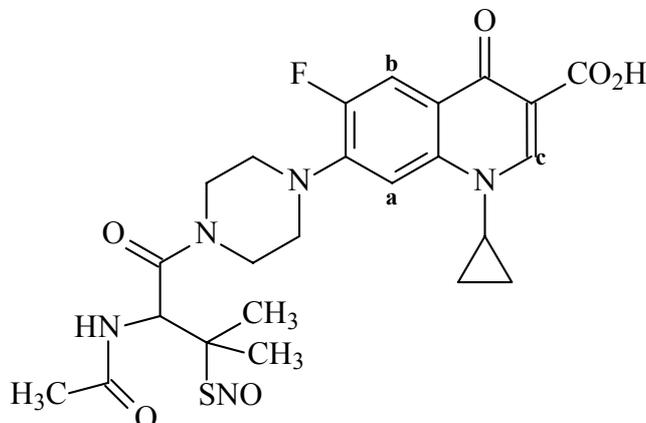
Smp.: 198 °C

EA: ber.: C=57,13% H=5,79% N=11,10%
gef.: C=56,39% H=5,62% N=10,69%

$^1\text{H-NMR}$ ($\text{D}_2\text{O}+\text{TMS}+\text{NaOD}$, 500 MHz):

Verschiebung [ppm]	Multiplizität	H-Anzahl	H-Position/ Kopplungskonst. [Hz]
1,06-1,09 1,32-1,35	2×m	4	$-\text{CH}-\begin{matrix} \text{CH}_2 \\ \\ \text{CH}_2 \end{matrix}$
1,39	s	3	$\text{C}(\text{SH})\text{CH}_3\text{CH}_3$
1,47	s	3	$\text{C}(\text{SH})\text{CH}_3\text{CH}_3$
2,09	s	3	COCH_3
3,19-3,52 3,65-4,18	m m	4 4	
3,55-3,57	m	1	$-\text{CH}-\begin{matrix} \text{CH}_2 \\ \\ \text{CH}_2 \end{matrix}$
4,84	d	1	COCHNH
7,50	d	1	aromat. H_a
7,83	d	1	aromat. H_b
8,48	s	1	H_c

7-[4-(2-Acetylamino-3-nitrosothiol-3-methyl-buteryl)-piperazin-1-yl]-1-cyclopropyl-6-fluoro-4-oxo-1,4-dihydro-quinolin-3-carbonsäure (37)



MG: 533.57 g/mol (C₂₄H₂₈FN₅O₆S)

Darstellung: 0,2 g (0,4 mmol) **80** wurden nach AVV 2 mit 9 ml Methanol, 7 ml 1N HCl, 1,0 ml konz H₂SO₄ und 2 ml Dichlormethan versetzt. Unter N₂-Schutzgasatmosphäre wurden 0,06 g (0,8 mmol) NaNO₂ in 1,0 ml Wasser zugetropft und nach AVV 2 aufgearbeitet. Die organische Phase wurde abgetrennt, das Lösungsmittel i. Vak entfernt. Nach Trocknung wurde ein grüner Feststoff erhalten.

Aussehen: Grüner Feststoff

Ausbeute: 0,2 g (81 % d. Th.)

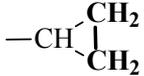
Smp.: 182 °C

MS(FAB): 504 (54 %), 534 (38 %)

EA: ber.: C=54,03% H=5,29% N=13,13%

gef.: C=51,40% H=5,52% N=11,32%

¹H-NMR (DMSO-d₆, 500 MHz):

Verschiebung [ppm]	Multiplizität	H-Anzahl	H-Position/ Kopplungskonst. [Hz]
1,16-1,69 1,29-1,34	2×m	4	
1,89	s	3	C(SNO)CH ₃ CH ₃
1,96	s	3	C(SNO)CH ₃ CH ₃
2,05	s	3	COCH ₃
3,32-3,36 3,72-3,83	m m	4 4	
3,76-3,84	m	1	
5,73	d	1	COCHNH (³ J=9,5)
7,55	d	1	aromat. H _a
7,90	d	1	aromat. H _b
8,60	d	1	COCHNH (³ J=9,5)
8,65	s	1	H _c

F **Literaturverzeichnis**

- ¹ Furchgott, R.F., Zawadzki, J. V., The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* (1980), 288, 373-376
- ² Palmer, R. M. J., Ferrige, A. G., Moncada, S., Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* (1987), 327, 524-526
- ³ Ignarro, L. J., Buga, G. M., Wood, K. S., Byrns, R. E., Chaudhuri, G., Endothelium derived relaxing factor produced and released from arteries and veins is nitric oxide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1987), 84, 9265-9269
- ⁴ edited by Ignarro, Louis J., NITRIC OXIDE, BIOLOGY AND PATHOBIOLOGY
- ⁵ Feelisch M., Noack E., Correlation between nitric oxide formation during degradation of organic nitrates and activation of guanylate cyclase. *Eur J Pharmacol* (1987), 139: 19-30
- ⁶ Rehse K., Schleifer K. J., Lüdtkke E., Böhme E., Chemical reactivity of nitrosoimines and its implications for their pharmacologic properties. *Arch Pharm Weinheim* (1994), 327:359-364
- ⁷ Lehmann, J., NO-Donoren-Übersicht und neuere Entwicklungen. *Pentaerithrityltetranitrat* (2000), 1-17
- ⁸ Murrel W., Nitro-glycerine as a remedy for angina pectoris. *Lancet* (1879), 1:80-81
- ⁹ Abrams J., The role of nitrates in coronary heart disease. *Arch Intern Med* (1995), 155: 357-364
- ¹⁰ Parker J. D., Parker J. O., Nitrate therapy for stable angina pectoris. *N Engl J Med* (1998), 338: 520-531
- ¹¹ Ahlner J., Andersson R. G. G., Torfgård K., Organic nitrate esters: Clinical use and mechanisms of actions. *Pharmacol Rev* (1991), 43:351-423
- ¹² Ignarro L. J., Lipton H., Edwards J. C., Barricos W. H., Mechanism of vascular smooth muscle relaxation by organic nitrosothiols as active intermediates. *J Pharmacol Exp Ther* (1981), 218: 739-749
- ¹³ Keefer L. K., Nims R., Davies K. M., "NONOates" (1-substituted diazen-1-ium-1,2-diolates) as nitric oxide donors: convenient nitric oxide dosage forms. *Methods Enzymol* (1996), 268:281-293

-
- ¹⁴ Bassenge E, Stuart D. J., Effects of nitrates in various vascular sections and regions. *Z Kardiol* (1986), 75 (Suool.3): 1-7
- ¹⁵ Schultz K. D., Schultz K., Schultz G., Sodium nitroprusside and other smooth muscle relaxants increase cyclic GMP levels in rat ductus deferens. *Nature* (1977), 265: 750-751
- ¹⁶ Mittal C. K., Murad F., Guanylate cyclase: Regulation of cyclic GMP metabolism. In: Nathanson JA, Keabian JW (eds) *Cyclic nucleotides I*. Springer, Berlin Heidelberg New York, (1982), 225-260
- ¹⁷ Brien J. F., McLaughlin B. E., Breedon T. H., Bennett B. M., Biotransformation of GTN occurs concurrently with relaxation of rabbit aorta. *J Pharmacol Exp Ther* (1986), 237: 608-614
- ¹⁸ Brien J. F., McLaughlin B. E., Kobus S. M., Mechanism of glyceryl trinitrate induced vasodilation. I. Relationship between drug biotransformation, tissue cGMP elevation and relaxation of rabbit aorta. *J Pharmacol Exp Ther* (1988), 244:322-327
- ¹⁹ Kawamoto J. H., McLaughlin B. E., Brien J. F., Biotransformation of glyceryl trinitrate and elevation of cGMP precede glyceryl trinitrate induced vasodilation. *J Cardiovasc Pharmacol* (1990), 15:714-719
- ²⁰ Noack E., Feelisch M., Molecular mechanism of nitrovasodilator bioactivation. In: Drexler H, Zeiher AM, Bassenge E, et al. (eds) *Endothelial mechanism of vasomotor control*. Steinkopf Verlag, Darmstadt, (1991). 37-50
- ²¹ Mutschler E., Geisslinger G., *Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie*. Mutschler Arzneimittelwirkungen. (2001), 8. Auflage, 558
- ²² Menzel L., *Infrarotspektroskopischer Nachweis von Stickstoffmonoxid aus biologischen Quellen*. Dissertation vom Institut für Angewandte Physik der Universität Bonn, (2000)
- ²³ Yonetani T., Tsuneshige A., Miki K., Treatment of hemoglobin containing erythrocytes with nitric oxide. FORYOU CORP.: WO9901146 (1999) *Chemical Abstracts* (1999), 8, 130: 100641f
- ²⁴ Stamler J. S., Gow A. J., NO-modified hemoglobins, therapeutic uses therefore, and methods for determination of NO in NO-hemoglobin. DUKE UNIV. MEDICAL CENTER: WO9834955 (1998) *Chemical Abstracts* (1998), 14, 129: 172133u
- ²⁵ Stamler J. S., Bonaventura J., Erythrocytes loaded with S-nitrosothiol and uses therefore. DUKE UNIV. MEDICAL CENTER: WO9709972 (1997) *Chemical Abstracts* (1997), 21, 126: 282775a

-
- ²⁶ Loscalzo J., Inbal A., Polypeptide derived from von Willebrand's factor, nitrosylated form, and use as antiplatelet agent. BOSTON UNIV.: WO9842753 (1998) Chemical Abstracts (1998), 21, 129: 270620v
- ²⁷ Lipton S. A., Troy C. M., Nitrosylation to inactivate apoptotic enzymes, and therapeutic caspase-like peptide. CHILDREN'S MEDICAL CENTER CORP.: WO9843621 Chemical Abstracts (1998), 23, 129: 298408f
- ²⁸ Perichini T., Colasanti M., Lauro GM., Ascenzi P., Cysteine nitrosylation inactivates the HIV-1 protease. Biochem. Biophys. Res. Commun. (1998), 250:575-576
- ²⁹ Mannick J. B., Stamler J. S., Modification of nitric oxide activity to treat Fasinduced pathologies. Brigham & Womens Hosp., INC,: WO9903462(1999) Chemical Abstracts (1999), 10, 130: 119621w
- ³⁰ Castro C., Ruiz F. A., Perez-Mato I et al., Creation of a functional S-nitrosylation site in vitro by single point mutation. FEBS Lett. (1999), 459:319-322
- ³¹ Palmer R. M. J., Ferrige AG, Moncada S., Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. Nature (1987), 327:524-526
- ³² Khan F., Greig I. R., Newton D. J., Butler A. R., Belch J. J. F., The effect of exogenous nitric oxide on thermal blood flow. The Lancet (1997), 350:410-411
- ³³ Butler A. R., Greig I. R., Megson I. L., Preparation of nitric oxide donor drugs. UNIV. OF ST. ANDREWS: WO9820015 (1998) Chemical Abstracts (1998) 2, 129: 16342f
- ³⁴ Garvey D. S., Schroeder J. D., Saenz De T., Inigo, Nitrosated and nitrosylated α -adrenergic receptor antagonist compounds, preparation thereof, compositions containing them, and use in treatment of human impotence or erectile dysfunction. NITROMED; INC.: WO9727749 (1997) Chemical Abstracts 15, 127: 200050u
- ³⁵ Garvey D. S., Saenz De T., Inigo, Nitrosated and nitrosylated phosphodiesterase inhibitor compounds compositions and their uses. NITROMED; INC.: WO9819672 (1998) Chemical Abstracts (1998), 2, 129: 16134q
- ³⁶ Garvey D. S., Letts L. G., Renfroe H. B., Richardson S. K., Preparation of nitrosated and nitrosylated compounds and their use for treating respiratory disorders. NITROMED; INC.: WO9734871 (1997) Chemical Abstracts (1997), 23, 127: 318553p
- ³⁷ Jia L., Young X., Guo W., Physicochemistry, pharmacokinetics and pharmacodynamics of S-nitrosocaptopril crystals, a new nitric oxide donor. J. Pharm. Sci. (1999), 88:981-986

-
- ³⁸ Lehmann J., Nitric oxide donors – current trends in therapeutic applications. *Exp. Opin. Ther. Patents* (2000), 10(5):559-574
- ³⁹ Feelisch M., Ostrowski J., Noack E., On the Mechanism of NO Release from Sydnonimines. *J. Cardiovascular Pharmacol*, (1989), 14:13-22
- ⁴⁰ Williams D. L. H., Nitric oxide release from *S*-nitrosothiols (RSNO) – The role of copper ions. *Transition Met. Chem.* (1996), 21, 189-191
- ⁴¹ Dicks A. P., Swift H. R., Williams, Identification of Cu^+ as the effective reagent in nitric oxide formation from *S*-nitrosothiols (RSNO). *J. Chem. Soc., Perkin Trans. II* (1996), 481-487
- ⁴² Kowa Co., Ltd., HYPADIL[®] KOWA Ophthalmic Solution. Revised: June 2000
- ⁴³ Bandarage U. K., Chen L., Fang X., Garvey D. S., Nitrosothiol Esters of Diclofenac: Synthesis and Pharmacological Characterization as Gastrointestinal-Sparing Prodrugs. *J. Med. Chem.* (2000), 43 (21), 4005 -4016
- ⁴⁴ Umezawa K., Akaike T., Fujii S., Suga M., Induction of nitric oxide synthesis and xanthine oxidase and their roles in the antimicrobial mechanism against *Salmonella typhimurium* infection in mice. *Infect. Immun.* (1997), Jul, 65(7), 2932-40
- ⁴⁵ Field L., Dilts R. V., Ravichandran R., An Unusually Stable Thionitrite from *N*-Acetyl-D,L-penicillamine; X-Ray Crystal and Molecular Structure of 2-(Acetylamino)-2-carboxy-1,1-dimethylethyl Thionitrite. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* (1978), 249-250
- ⁴⁶ Miyahara Mi., Sueyoshi S., Kamiya S., Reactions of 1-(2-Chloroethyl)-1-nitroso-3-(3-pyridylmethyl)urea N_{arom} -Oxide with Several Biological Model Compounds. *Chem. Pharm. Bull.* (1985), 33, 12, 5557-5561.
- ⁴⁷ Vila Casas A., Julia Arechaga S., Process for the preparation of *N*-acyl-3-morpholinonydnone imines. *Span. ES 547,310*, *Chemical Abstracts* (1987), Vol.107-666, 7201c
- ⁴⁸ Del Sol Moreno G., Galiano Ramos D. A., G. R., Process for the preparation of *N*-ethoxycarbonyl-3-morpholinonydnone imine. *Span. ES 545,007*, *Chemical Abstracts* (1987), Vol.107-705, 39834c
- ⁴⁹ Wang P. G., Xian M., Tang X., Wu X., Nitric Oxide Donors: Chemical Activities and Biological Applications. *Chem. Rev.* (2002), 102, 1091-1134
- ⁵⁰ Williams D. Lyn H., The mechanism of nitric oxide formation from *S*-nitrosothiols. *Chem. Commun.*, (1996), 1085-1091
- ⁵¹ Mason, J. B. Trifluoromethyl Thionitrite. *J. Chem. Soc. A.* (1969), 1587

-
- ⁵² Bartberger M. D., Houk K. N., Powell S., Mannion J., Lo, K. Y., Stamler J. S., Toone E. J., Theory, spectroscopy, and crystallographic analysis of S-Nitrosothiols: Conformational Distribution Dictates Spectroscopic Behavior. *J. Am. Chem. Soc.* (2000), 122, 5889.
- ⁵³ Smith K., Lindsay C. M., Pritchard G. J., Directed Lithiation of Arenethiols. *J. Am. Chem. Soc.* (1989), 111, 667
- ⁵⁴ Arulsamy N., Bohle D. S., Butt J. A., Irvine G. J., Jordan P. A., Sagan E., Interrelationships between Conformational Dynamics and the Redox Chemistry of S-Nitrosothiols. *J. Am. Chem. Soc.* (1999), 121, 7115-7123
- ⁵⁵ Tomita H., Nakazawa T., Sugano E., Abe T., Tamai M., Nipradilol Inhibits Apoptosis by Preventing the Activation of Caspase-3 via S-Nitrosylation and the cGMP-Dependent Pathway. *Eur J Pharmacol* (2002) Oct, 11, 452(3): 263-8
- ⁵⁶ Al-Sa'doni H. H., Khan I. Y., Poston L., Fisher I., A Novel Family of S-Nitrosothiols: Chemical Synthesis and Biological Actions. *NITRIC OXIDE: Biology and Chemistry* (2000), 4, 6, 550-560
- ⁵⁷ Moynihan H. A., Roberts S. M., Preparation of Some Novel S-Nitroso Compounds as Potential Slow-release Agents of Nitric Oxide *in vivo*. *J. Chem. Soc. Perkin Trans I* (1994), 797-805
- ⁵⁸ Entnommen aus Beilstein Crossfire. Dort zitiert: Book Review / Secondary Ref.; Cornforth; *Chem. Penicillin*, <Princeton 1949>, S. 688,842
- ⁵⁹ Pieper G. M., Siebeneich W., Olds C. L., Felix C. C., Vascular protective actions of a nitric oxide aspirin analog in both in vitro and in vivo models of diabetes mellitus. *Free Radic Biol Med* (2002), Jun 1; 32(11): 1143-56
- ⁶⁰ Kartasmita R. E., Zur Synthese, Biotransformation und biologischen Aktivität neuartiger NO-freisetzender, nichtsteroidaler Entzündungshemmer. Dissertation in der Mathematische-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität Bonn, (2002)
- ⁶¹ Sheehan J. C., Tishler M., Thiazolidinylglycine derivative. U. S. Patent 2,491,523, Dec. 20, 1949. *Chemical Abstracts* (1950), 44, p3034h
- ⁶² Szabó, Csaba, Pathophysiological Roles of Nitric Oxide in Inflammation. in: Ignarro, Louis J., (Hrsg.), *Nitric Oxide. Biology and Pathobiology*, San Diego et al. (2000), 857
- ⁶³ Marczin N., Riedel B., Royston D., Yacoub M., Intravenous nitrate vasodilators and exhaled nitric oxide. *Lancet*, (1997), 349, 1742

-
- ⁶⁴ Feelisch M., The use of nitric oxide donors in pharmacological studies. Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol (1998), 358, 113-122
- ⁶⁵ Kartasmita, Naveen, Kulkarni und Lehmann, in Vorbereitung
- ⁶⁶ in der Abteilung für Pharmazeutische Mikrobiologie des Institutes für Mikrobiologie und Biotechnologie in der Universität Bonn
- ⁶⁷ Die bei den FAB-Spektren erhaltenen Fragmente verstehen sich als $(M+H)^+$, da es zur Übertragung eines Protons aus der Matrix kommt.
- ⁶⁸ Masuda K., Imashiro Y., Kaneko T., Studies on Mesoionic Compounds. I. Synthesis of 3-Dialkylaminosydnonimines. Chem. Pharm. Bull. (1970), 18, 1, 128-132
- ⁶⁹ Gilman H., Arntzen C. E., Webb F. J., J. Org. Chem., (1945), 10, 374-379
- ⁷⁰ Merck & Co., Penicillamine esters and ester hydrochlorides. Chemical Abstracts (1949), 43, p7039f