

Synthese neuer, funktionalisierter BODIPY- Fluorophore zur Fluoreszenzmarkierung von Membranrezeptor-Liganden

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

Vorgelegt von
Fabian Heisig
aus
Leverkusen

Bonn 2007

Angefertigt mit der Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn.

1. Referent: Prof. Dr. Christa E. Müller
2. Refernet: Prof. Dr. Michael Gütschow

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit vom April 2003 bis August 2007 am Pharmazeutischen Institut der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn unter der Leitung von Frau Prof. Dr. Christa E. Müller durchgeführt.

Ich möchte mich an dieser Stelle bei Frau Prof. Dr. C. E. Müller für die Überlassung des interessanten Themas herzlich bedanken. Aber auch ihre stete Diskussionsbereitschaft und ihr offenes Ohr für sämtliche Fragen, sowie ihre hilfreichen Tipps haben zum guten Gelingen dieser Arbeit beigetragen. Zudem möchte ich ihr für das mir entgegengebrachte Vertrauen danken, das mir große Freiräume in meiner wissenschaftlichen Arbeit eröffnete.

Ebenso möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. M. Gütschow für die freundliche und schnelle Übernahme des Korreferats, aber auch für die sehr gute Zusammenarbeit im Rahmen der Praktikumsbetreuung des 3.Semesters, bedanken.

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	7
1. GRUNDLAGEN DER FLUORESZENZ	9
1.1. Einführung	9
1.2. Physikalische Grundlagen	9
1.3. Molekülstruktur und Fluoreszenz	11
1.4. Begriffe der Fluoreszenz	12
1.4.1. Fluoreszenzquantenausbeute	12
1.4.2. Quenchen	12
1.4.3. Photobleaching	12
1.4.4. Fluorophore	12
2. FLUOROPHORE IN DER MEDIZINISCHEN CHEMIE.....	13
2.1. Der Alexa-Fluorophor.....	13
2.1.1. Einführung	13
2.1.2. Entwicklung des Alexa-Fluorophors.....	13
2.1.3. Eigenschaften von Alexa-Fluorophoren	14
2.3. Cyanin-Farbstoffe	15
2.3.1. Einführung	15
2.3.2. Entwicklung von Cyanin-Farbstoffen	15
2.3.3. Eigenschaften von Cyanin-Farbstoffen.....	17
2.4. Rhodamin-Farbstoffe.....	18
2.4.1. Einführung	18
2.4.2. Entwicklung von Rhodamin-Farbstoffen.....	18
2.4.3. Eigenschaften von Rhodamin-Farbstoffen.....	19
2.5. Coumarin-Farbstoffe	21
2.5.1. Einführung	21
2.5.2. Entwicklung von Coumarin-Farbstoffen.....	21
2.5.3. Eigenschaften von Coumarin-Farbstoffen	23
2.6. Fluorescein-Farbstoffe	24
2.6.1. Einführung	24
2.6.2. Entwicklung von Fluorescein-Farbstoffen.....	24
2.6.3. Eigenschaften von Fluorescein-Farbstoffen.....	26
2.7. BODIPY-Fluorophore	27
2.7.1. Einleitung.....	27
2.7.2. Darstellung von BODIPY-Derivaten	27
2.7.2.1. Chemie der Dipyromethene	27
2.7.2.2. Synthese des BODIPY-Grundkörpers.....	29
2.7.3. Eigenschaften von BODIPY-Fluorophoren	32
3. FLUORESZENZMARKIERTE LIGANDEN	34

3.1. Einführung	34
3.2. Vorteile von fluoreszenzmarkierten Liganden	34
3.3. Nachteile von fluoreszenzmarkierten Liganden	35
3.4. Wahl des geeigneten Fluorophors	36
4. DARSTELLUNG NEUER BODIPY-FLUOROPHORE	37
4.1. Synthese des BODIPY-Grundkörpers	37
4.2. Funktionalisierung zum Amino-Derivat	39
4.3. Darstellung wasserlöslicher BODIPY-Derivate	41
5. FLUORESZENZMARKIERUNG VON ADENOSINREZEPTOR-LIGANDEN	44
5.1. Einleitung	44
5.1.1. Adenosinrezeptoren	44
5.1.2. Struktur der Adenosinrezeptoren	45
5.1.3. Adenosinrezeptoren: Verteilung und Signaltransduktionswege	46
5.2. Adenosin-A₁-Rezeptoren	48
5.2.1. Adenosin-A ₁ -Rezeptor-Agonisten.....	48
5.2.2. Fluoreszenzmarkierte Adenosin-A ₁ -Rezeptor-Agonisten.....	50
5.2.3. Problemstellung	52
5.2.4. Darstellung fluoreszenzmarkierter A ₁ -Liganden	52
5.2.5. Pharmakologische Eigenschaften.....	59
5.3. Adenosin A_{2A}-Rezeptoren	63
5.3.1. Strukturen von Adenosin-A _{2A} -Rezeptor-Agonisten.....	63
5.3.2. Problemstellung	65
5.3.3. Darstellung fluoreszenzmarkierter A _{2A} -Liganden.....	65
5.3.4. Pharmakologische Eigenschaften.....	70
5.4. Adenosin-A_{2B}-Rezeptoren	72
5.4.1. Adenosin-A _{2B} -Rezeptor-Antagonisten.....	72
5.4.2. Problemstellung	73
5.4.3. Darstellung fluoreszenzmarkierter A _{2B} -Liganden.....	74
5.4.4. Pharmakologische Eigenschaften.....	80
6. SYNTHESE EINES BODIPY-MARKIERTEN FLUORESZENZLIGANDEN FÜR P-GLYKOPROTEIN	83
6.1. Einleitung	83
6.1.1. Aufbau des P-Glykoproteins	83
6.1.2. Transport von Wirkstoffen durch P-Glykoprotein	85
6.1.3. Bindungsstellen am P-Glykoprotein	85
6.1.4. Hoechst-Derivate mit hoher Affinität zu P-Glykoprotein.....	86
6.2. Verknüpfung von Hoechst 33258 mit einem BODIPY-Derivat	89

6.2.1. Problemstellung	89
6.2.2. Direkte Verknüpfung von Hoechst 33258 mit BODIPY	89
6.2.3. Verknüpfung über einen Spacer.....	91
6.2.4. De-Novo-Synthese eines Hoechst-Derivates	92
6.2.5. Pharmakologische Eigenschaften.....	100
7. ZUSAMMENFASSUNG	101
8. AUSBLICK	106
9. EXPERIMENTELLER TEIL	107
9.1. Allgemeiner Teil	107
10. LITERATURVERZEICHNIS	222

Abkürzungsverzeichnis

AMP	Adenosinmonophosphat
ADP	Adenosindiphosphat
ATP	Adenosintriphosphat
AR	Adenosin-Rezeptor
BODIPY	Bordipyrrrol
CAIBE	Chlorameisensäureisobutylester
CCPA	N ⁶ -Cyclopentyl-2-chloradenosin
DCM	Dichlormethan
DIPEA	Diisopropylamin (Hünig-Base)
DMA	Dimethylacetamid
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDC	N-(Dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimid-HCl
FRAP	Fluorescence recovery after photobleaching
FRET	Fluorescence resonance energy transfer
FCS	Fluorescence correlation spectroscopy
HCTU	2-(7-Aza-1H-benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium
HOBT	1-Hydroxybenzotriazol
NMM	N-Methylmorpholin
NMR	magnetische Kernresonanz
M	Masse
MS	Massenspektrometrie
MSX-2	3-(3-Hydroxypropyl)-7-methyl-8-(<i>m</i> -methoxystyryl)-1-propargylxanthin
PgP	P-Glykoprotein
Ph-NO ₂	Nitrobenzol
PSB-11	2-Phenyl-8-ethyl-4-methyl-(8R)-4,5,7,8-tetrahydro-1H-imidazo[2,1- <i>f</i>]purin-5-on
PyBOP	Benzotriazol-1-yl-oxytripyyrolidino-phosphoniumhexafluorophosphat
Schmp.	Schmelzpunkt

TEA	Triethylamin
UV	Ultraviolett
Zers.	Zersetzung

1. Grundlagen der Fluoreszenz

1.1. Einführung

Das Phänomen der Fluoreszenz ist der Menschheit schon seit über tausend Jahren bekannt. Es war allerdings zunächst nicht kontrollierbar und die physikalischen Hintergründe wurden nicht verstanden. Über die Entdeckung der Fluoreszenz und mögliche Erklärungsversuche gibt es widersprüchliche Angaben. In chinesischen Büchern aus dem 15. Jh. a.D. wird über die Phänomene der Fluoreszenz und Phosphoreszenz berichtet. In vielen Quellen wird aber *Athanasius Kircher* als der Entdecker der Fluoreszenz genannt, der in seinem Buch „*Ars Magna Lucis et Umbrae*“ die Fluoreszenz eines Sandelholzextraktes in Wasser beschrieb.^{1,2} Der irische Naturwissenschaftler *Sir George Gabriel Stokes* konnte 1852 die Hintergründe der Fluoreszenz entschlüsseln. Er erkannte, dass das von fluoreszierenden Stoffen absorbierte Licht eine kleinere Wellenlänge besitzen muss als das emittierte Licht. Er fasste seine Erkenntnisse in der Stokeschen Regel zusammen.^{1,2,3} Der Name Fluoreszenz stammt von dem fluoreszierenden Mineral Fluorit (Flussspat, Calciumfluorid). Allerdings war die Fluoreszenz des Fluorits nicht auf das Calciumfluorid, sondern auf Verunreinigungen in dem Mineral zurückzuführen.

1.2. Physikalische Grundlagen

Die Boltzmann-Verteilung beschreibt die thermische Energie eines Moleküls bei Zimmertemperatur. Ein Molekül, das sich in einer Flüssigkeit befindet, ist ohne optische Anregung im untersten Schwingungsniveau ($v = 0$) des S_0 -Grundzustandes. Wird ein Molekül mit Licht bestrahlt, kommt es zu einer Energieaufnahme (Absorption) und diese Energie wird transformiert, d.h. in andere Energieformen umgewandelt. Wie diese Transformation abläuft, hängt von dem Energiegehalt der elektromagnetischen Strahlung ab, die das Molekül absorbiert hat. Elektromagnetische Strahlung niedriger Energie, wie z.B. Mikrowellen- oder Infrarotstrahlung wird in mechanische Energie in Form von Rotationsbewegungen und Schwingungen der Moleküle umgewandelt. Wird Strahlung mit einem höheren Energiegehalt verwendet (UV- und/oder VIS-Strahlung) so werden die Elektronen aus dem Grundzustand S_0 in elektronisch höher stehende, leere Energieniveaus S_n gehoben. Diese energiereicheren Zustände sind ungünstig und daher labil. Der Vorgang ist möglich, wenn die Energie des entsprechenden Photons so groß wie

oder größer als die Energiedifferenz zwischen dem S_0 -Grundzustand und dem nächsten angeregten Zustand S_1 ist. Besitzt das Photon viel Energie, kann das Molekül auch direkt in höhere Energieniveaus S_2 , S_3 usw. gelangen. Nach weniger als 0.1 ns verliert ein Molekül, das sich in einem höheren Energieniveau, z.B. S_2 , befindet durch Molekülstöße den Überschuss an Schwingungsenergie und fällt auf das niedrigste Energieniveau des angeregten Zustandes S_1 zurück. Dieser Vorgang erfolgt strahlungslos (Abb. 1 Jablonski Termschema).^{4,5,6,8}

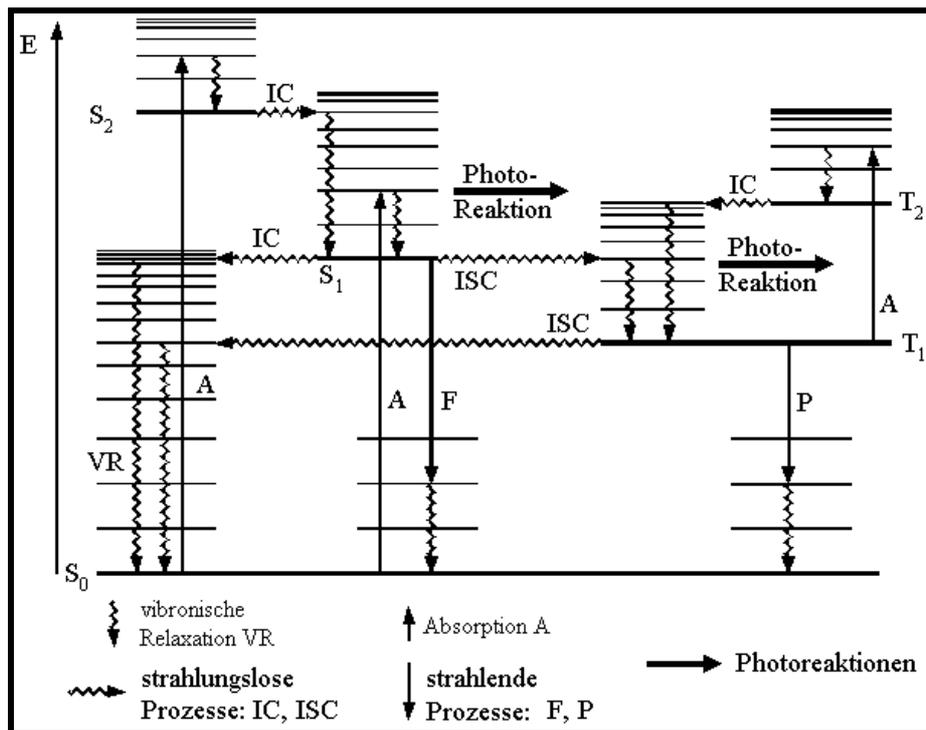


Abb. 1. Jablonski-Termschema⁷

Es bestehen mehrere Möglichkeiten, von diesem Zustand in den Grundzustand zu gelangen:^{6,7,8}

- ∅ Durch strahlungslose Übergänge, wobei die Moleküle durch Stöße die gesamte Energie an ihre Umgebung abgeben.
- ∅ Das Molekül kann strahlungslos durch Singulett-Triplett-Umwandlung (Intersystem crossing, IC) vom Singulett-Zustand (S-Zustand) in den Triplett-Zustand (T-Zustand) übergehen. Dieser Vorgang ist optisch verboten, da sich dabei der Elektronenspin umkehren muss. Von dort gelangt das Molekül durch Aussenden von Licht in Form von Phosphoreszenz (P) in den Grundzustand zurück. Die Dauer für diesen Vorgang beträgt in der Regel zwischen 10^{-4} und 10^2 s.

- ∅ Das Molekül kann direkt von dem angeregten Zustand in den Grundzustand zurückkehren. Dabei wird Licht einer charakteristischen Wellenlänge emittiert. Dieser Vorgang ist optisch erlaubt, da keine Spinumkehr stattfindet. Der Übergang erfolgt in der Regel in 10^{-9} bis 10^{-6} s und wird als Fluoreszenz (F) bezeichnet. Innerhalb dieser sehr kurzen Zeit finden Vorgänge statt, die für die Fluoreszenz von wesentlicher Bedeutung sind. Diese Vorgänge, die vom S_1 -Zustand aus stattfinden, sind physikalischer Art, wie Rotationsvorgänge, Komplexbildung, Protonenaustausch oder Energieübertragung. Sie bestimmen die Quantenausbeute und die Lebensdauer der Fluoreszenz.

1.3. Molekülstruktur und Fluoreszenz

Das fluoreszierende Molekül muss über große durchkonjugierte Doppelbindungssysteme verfügen und planar sein. Zudem müssen die folgenden Voraussetzungen in Abhängigkeit von der Art der Moleküle für das Auftreten von Fluoreszenz gegeben sein. Das längstwellige Absorptionsmaximum ist intensiv, d.h. die Struktur besitzt einen hohen Extinktionskoeffizienten (ϵ_{\max}). Bei niedrigen Extinktionskoeffizienten und Absorptionsmaxima führt das energiereiche kurzwellige UV-Licht zu photochemischen Zersetzungen. Der Energiebetrag zwischen Grundzustand und angeregtem Zustand muss möglichst klein sein, um Photodissoziation (Photobleaching) zu vermeiden. Die Strukturen sollten keine funktionellen Gruppen tragen, die strahlungslose Übergänge begünstigen. Dies geschieht vor allem durch Substituenten, die anregbare nicht bindende Elektronen besitzen.⁷ Eine Fluoreszenz kann auch durch „predissociation“ verhindert werden, bei der das Molekül zunächst durch Absorption den angeregten Zustand erreicht. Die Energie wird anschließend aber nicht in Form von Fluoreszenz frei, sondern zum Bruch von Bindungen verwendet. Dies ist eine Erklärung für die fehlende Fluoreszenz von aliphatischen Verbindungen, die Nitro- oder Brom-Substituenten tragen, und im relativ langwelligen Bereich absorbieren.⁴ Die meisten aromatischen Kohlenwasserstoffe zeigen intensive Fluoreszenz bei Anregung im UV- oder sichtbaren Bereich. Mit zunehmender Konjugation nimmt die Fluoreszenzintensität zu, die Absorptions- und Emissionsmaxima verschieben sich bathochrom. Aromatische Substituenten, die nach *meta* dirigieren, verringern die Fluoreszenz, wohingegen Substituenten die nach *ortho* oder *para* dirigieren sie erhöhen.⁷ Die Fluoreszenzeigenschaften werden stark von ihrer Umgebung beeinflusst. So spielen

Lösungsmittelleffekte, pH-Werte und die Anwesenheit sonstiger chemischer Spezies eine wichtige Rolle für die Entstehung von Fluoreszenz.

1.4. Begriffe der Fluoreszenz

1.4.1. Fluoreszenzquantenausbeute

Der Quotient aus der Anzahl absorbierter Photonen und der Anzahl emittierter Photonen ist die Fluoreszenzquantenausbeute ϕ . Die theoretische Obergrenze 1 wird nur von wenigen Molekülen erreicht. Je höher der Wert ϕ , desto geeigneter ist eine Substanz für fluoreszenzspektroskopische Bestimmungen.⁴

1.4.2. Quenchen

Quenchen sind Störvorgänge, die zu einer Fluoreszenzminderung führen. Ursachen für dieses Verhalten können Wechselwirkungen zwischen Fluorophor und anderen Substanzen sein, oder die Ausbildung von Aggregaten bei hohen Konzentrationen an Fluorophoren (Autoquenchen). Beim stoßbedingtem oder dynamischem Quenchen wird das angeregte Photon durch Energieaustausch mit einem Quencher in den S_0 -Grundzustand überführt. Der Quencher kann ein Lösungsmittelmolekül oder eine andere Substanz sein.⁵ Beim statischen Quenchen bildet der Fluorophor mit dem Quencher im nicht angeregten Zustand einen Komplex, der nach Absorption von Licht keine Fluoreszenz emittiert, sondern strahlungslos in den Grundzustand zurückkehrt.⁷ Ein häufig vorkommender Quencher ist molekularer Sauerstoff.¹⁰ Alle Formen der Fluoreszenzlöschung sind dynamisch und können sich teilweise überlagern.

1.4.3. Photobleaching

Unter Photobleaching versteht man die Zerstörung des Fluorophores durch einwirkendes Exzitationslicht. Untersuchungen haben gezeigt, dass die entstandenen Zersetzungsprodukte durch radikalische Reaktionen entstehen. Photobleaching ist stark lösungsmittelabhängig.^{9,10}

1.4.4. Fluorophore

Als Fluorophor wird eine Substanz bezeichnet, die auf Grund ihres strukturellen Aufbaus in der Lage ist, absorbiertes Licht in Form von Fluoreszenz wieder abzugeben. Im folgenden Kapitel werden die wichtigsten Fluorophore vorgestellt. Viele dieser Strukturen sind bei der Firma *Molecular Probes* (Eugene, Oregon, USA) käuflich zu erwerben.

2. Fluorophore in der medizinischen Chemie

2.1. Der Alexa-Fluorophor

2.1.1. Einführung

Für histologische Untersuchungen ist eine hohe Photostabilität erforderlich, um geringe Mengen an biologischen Strukturen mit hoher Selektivität und Sensitivität detektieren zu können¹¹. In verschiedenen Veröffentlichungen wurden die bekannten Probleme, wie geringe Photostabilität und pH-abhängige Emission des gängigen Fluorophors Fluorescein (Kapitel 2.6) angesprochen.^{11,12} Werden Proteine mit dem häufig angewendetem Fluorophor Tetramethylrhodamin (Kapitel 2.4) markiert, kann dies zu einem beträchtlichen Verlust an Fluoreszenz führen. Ursache für diesen unerwünschten Effekt sind Interaktionen zwischen den einzelnen Fluorophormolekülen und die Bildung von nicht fluoreszierenden Verbindungen mit Absorptionsmaxima bei etwa 520 nm.^{13,14} Auf Grund dieser Erkenntnisse bestand ein großer Bedarf an neuen Fluorophoren, die sich durch Photostabilität, geringere pH-Empfindlichkeit und eine deutlichere Emission nach Konjugation auszeichnen sollten.¹¹

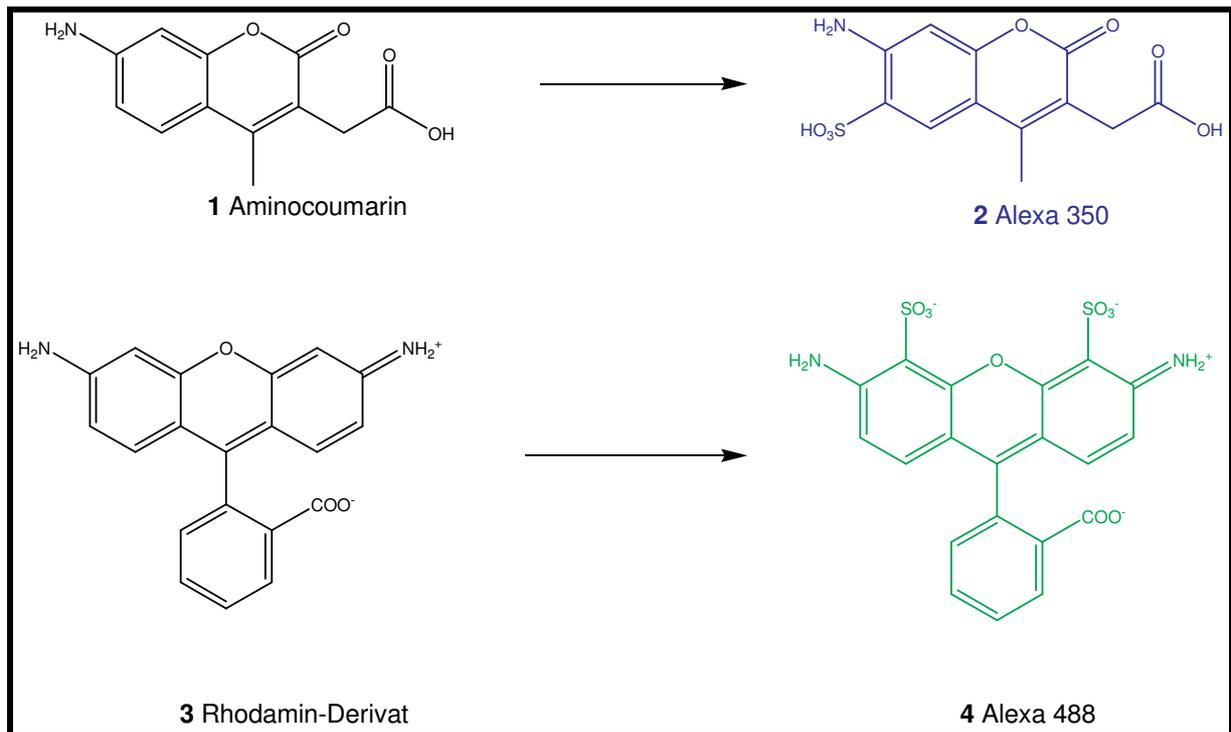
2.1.2. Entwicklung des Alexa-Fluorophors

1999 beschrieben *Haugland et al.* zum ersten Mal die Darstellung von Derivaten, die eine höhere Photostabilität und geringere pH-Abhängigkeit besitzen. Sie bezeichneten die neu dargestellten Fluorophore als Alexa-Farbstoffe.¹¹

Bei der Entwicklung von Cyanin-Farbstoffen führte eine Sulfonierung zu wichtigen Vorteilen gegenüber den entsprechend nicht sulfonierten Farbstoffen (s. Kapitel 2.3):

- ∅ Sie verringerte die typische Tendenz von Molekülen, sich zu Aggregaten zusammenzulagern, wahrscheinlich auf Grund der erhöhten Polarität der Moleküle.¹⁵ Dadurch kann der Verlust an Fluoreszenz reduziert werden, der durch Autobleaching entsteht.
- ∅ Sie erhöhte zudem die Intensität der Emission von vielen Fluorophoren in wässrigem Milieu, wodurch eine grössere Sensitivität gegeben ist.¹⁶

Aufgrund dieser Erkenntnisse wurden Aminocoumarin- oder Rhodamin-Derivate durch den elektrophilen Austausch eines Wasserstoffatoms durch Reaktion mit Chlorsulfonsäure oder einem Derivat der Chlorsulfonsäure, sulfoniert und man erhielt die entsprechenden Alexa-Farbstoffe **2** und **4** (Abb. 2).



Die Nummer hinter dem Namen eines Alexa-Farbstoffes kennzeichnet das jeweilige Absorptionsmaximum der Fluorophore.

2.1.3. Eigenschaften von Alexa-Fluorophoren

Alexa-Farbstoffe besitzen folgende Eigenschaften:

- ∅ Durch die Einführung der Sulfonsäuregruppen bekommen das neutrale Coumarinderivat bzw. das zwitterionische Rhodaminderivat eine negative Ladung, wodurch eine höhere Hydrophilie des Fluorophores erreicht wird.¹⁷
- ∅ Alle Alexa-Fluorophore weisen eine hohe pH-Stabilität über einen breiten pH-Bereich (pH 4.0 bis pH 9.0) auf.^{11,17}
- ∅ Durch die große Auswahl an verschiedenen Edukten in der Alexa-Synthese, gibt es für jede Absorptionswellenlänge ein passendes Alexa-Derivat:¹⁷
 - à Als blauer Fluorophor wurde ein Coumarin Derivat modifiziert (Alexa 350 (**2**)).
 - à Als grüner Fluorophor wurde ein Rhodamin/Fluorescein-Derivat verwendet (Alexa 488 (**4**), / Alexa 430).
 - à Als roter Fluorophor wurde ein entsprechendes Rhodamin-Derivat modifiziert (Alexa 532).

2.3. Cyanin-Farbstoffe

2.3.1. Einführung

Die ersten Hinweise auf Cyanin-Farbstoffe waren 1898 erschienene Publikationen von *John Waddell*. Dort wird von Cyanin-Farbstoffen berichtet, die als Indikatoren verwendet werden.¹⁸ 1930 erschienen von *Hamer* Publikationen, in denen die Vollsynthese von Cyanin-Farbstoffen beschrieben wurde.¹⁹ 1967 publizierte *Hammer* die Entwicklung von Cyanin-Farbstoffen und ihren Analoga.²⁰ Das Interesse an diesen Farbstoffen wurde größer, als die ersten Methoden entwickelt wurden, um fluoreszenzmarkierte Stoffe detektieren zu können. So stellt die „fluorescent analog chemistry“ eine Methode dar, mit deren Hilfe man spezielle Zellkomponenten in lebenden Zellen verfolgen kann. Bei dieser Technik wird ein Fluorophor kovalent an eine gereinigte, native Zellkomponente (z.B. an ein Protein) gebunden. Dieses fluoreszierende Protein wird *in vitro* charakterisiert und anschließend in die Zelle eingebracht und dort *in vivo* untersucht. Die meisten Fluorophore, die zu diesem Zeitpunkt verwendet wurden, sind Strukturen, die unterhalb von 500 nm ihr Absorptionsmaximum besitzen.²⁰ Die Entwicklung von Fluorophoren, die im höherwelligen Bereich absorbieren, erschien sinnvoll, um die störende Autofluoreszenz des Gewebes umgehen zu können. Ein weiterer Vorteil ist, dass mehrere Fluorophore eingesetzt werden können, die jeweils unterschiedliche Absorptionsmaxima haben, und damit getrennt detektiert werden können. So ist es möglich, mehrere Effekte gleichzeitig zu verfolgen.

2.3.2. Entwicklung von Cyanin-Farbstoffen

Cyanin-Farbstoffe (**5**) sind Strukturen, die sich aus zwei quartären heteroaromatischen Basen (A und A') zusammensetzen, die über eine Polymethinkette miteinander verknüpft sind.

Eine ähnliche Stoffklasse stellen die Merocyanine (**6**) dar, die aber keine praktische Bedeutung mehr besitzen, da ihre spektroskopischen Eigenschaften sehr von Veränderungen der Polarität der Lösungsmittel abhängen. Sie unterscheiden sich dahingehend von den Cyanin-Farbstoffen, als sie sich nicht aus zwei quartären heteroaromatischen Basen zusammensetzten, sondern nur aus einer (A) und einem Ketomethylen-Kern (B) (Abb. 3).

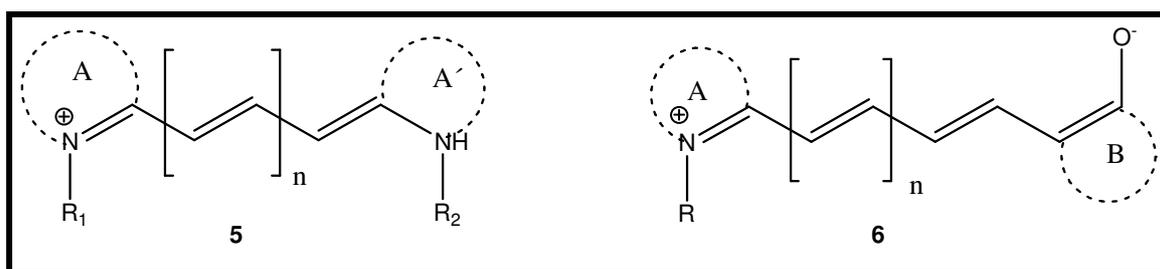


Abb. 3. Generelle Struktur von Cyanin- und Merocyanin-Farbstoffen nach *Ernst et al.* (1989)²⁰

Die Darstellung von Cyanin-Farbstoffen erfolgt nach Standardprotokollen.^{20,21} Gewöhnlicherweise kondensiert eine quartäre heteroaromatische Base (z.B. ein quartäres Indol), die eine reaktive Methylgruppe trägt, z.B. **7**, mit einem entsprechenden Dialdehyd-dianilid **8** zu einem Zwischenprodukt **9**, welches sich spontan zu dem entsprechenden Cyanin-Farbstoff **10** umsetzt (Abb. 4). Die spätere Entwicklung der sulfonierten Cyanine stellte eine deutlichere Verbesserung dar, denn die unsulfonierten Farbstoffe verloren um den Faktor 3 an Fluoreszenzintensität, wenn sie in Wasser suspendiert wurden.^{15,20} Dieses Phänomen konnte bei den sulfonierten Farbstoffen nicht beobachtet werden. Die Einführung der Sulfonyl-Gruppe führte zu keiner Veränderung des Absorptionsmaximums.²⁰

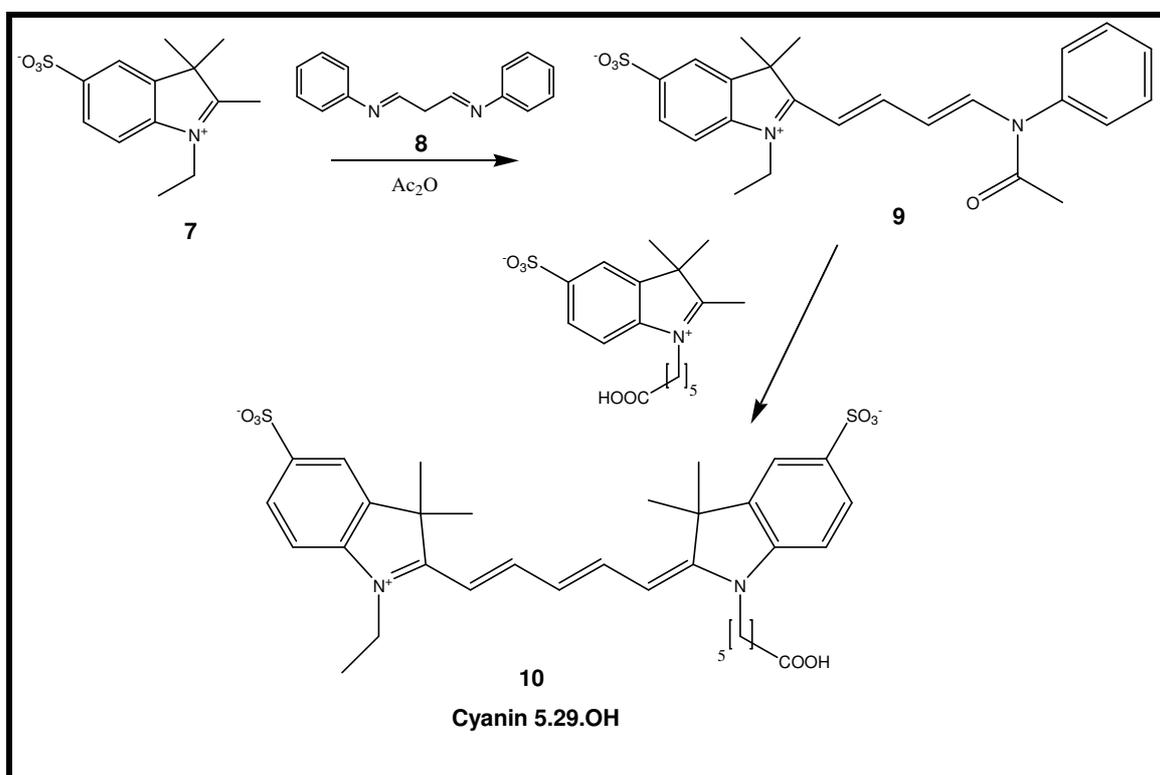


Abb. 4. Synthese des Cyanin-Farbstoffs 5.29.OH¹⁵

2.3.3. Eigenschaften von Cyanin-Farbstoffen

Cyanin-Farbstoffe besitzen folgende Eigenschaften:

- ∅ Sie zeigen scharfe, intensive Absorptionsbanden ($\epsilon > 100.000$).²¹
- ∅ Cyanin-Farbstoffe absorbieren in einem Bereich von 500 nm bis 750 nm, je nach Struktur der Farbstoffe.
- ∅ Wird die Polymethin-Kette um eine Vinyl-Einheit verlängert, verschiebt sich das Absorptionsmaximum bathochrom um 100 nm.¹⁵
- ∅ In wässrigem Medium konnte keine Aggregatbildung beobachtet werden.^{16,22}
- ∅ Sie verfügen über eine niedrige bis mittlere Fluoreszenzquantenausbeute ($\phi = 0.09_{\text{Ethanol}}$ bzw. $\phi = 0.52_{\text{Glycerol}}$), was durch eine thermo- und photoinduzierte cis-trans-Isomerisierung erklärt werden kann. Diese kann in viskoserer Lösungsmitteln unterdrückt werden, wodurch eine höhere Fluoreszenzquantenausbeute erreicht wird.^{21,22,23}
- ∅ Sie besitzen eine permanente positive oder negative Ladung.
- ∅ Entsprechend substituierte Cyanine (Benzindolenine) können als Nahinfrarot-Fluorophore verwendet werden.²⁴
- ∅ Sie sind in einem pH-Bereich von 4.0 bis 9.0 stabil, obwohl keine genauen Daten hierzu veröffentlicht wurden. In Publikationen wird eine befriedigende Stabilität beschrieben, ohne weitere Angaben.²⁰
- ∅ In Untersuchungen an Antikörpern, die mit verschiedenen Fluorophoren markierten wurden, wird das Cyanine Dye 3.18 als der Fluorophor mit der höchsten Helligkeit und Intensität beschrieben. Als Fluorophore wurden für die Markierung neben dem Cyanine Dye 3.18 (**10**), Fluorescein (**14**), Tetramethylrhodamin (**11**), Lissaminerhodamine (**12**) und Texas red (**13**) verwendet (s. Abb. 5 und Abb. 7).¹⁶

2.4. Rhodamin-Farbstoffe

2.4.1. Einführung

1888 veröffentlichte der Schweizer *Ceresole* im Dienste der BASF ein Patent, in dem er die Darstellung eines roten Farbstoffes beschrieb. Er gab diesem bis dahin unbekanntem Vertreter den Namen Tetramethylrhodamin und bezeichnete die Stoffklasse als Rhodamine.²⁵ Als ein charakteristisches Merkmal dieser Stoffe nannte er die intensive rote Farbe. In den folgenden Jahren veröffentlichten er und seine Mitarbeiter diverse neue Strukturen und meldeten 1894 die gesamte Stoffklasse dieser Farbstoffe zum Patent an.¹³ 1897 wurde in einem Patent von *Mueller* die Darstellung unsymmetrischer Rhodamin-Derivate beschrieben.²⁶ 1955 publizierten *Wollard* und *MacNulty* einen Review-Artikel, in dem die Rolle des Rhodamin B in der analytischen Chemie untersucht wurde.²⁷ Schon 1977 beschrieben *Ravdin* und *Axelrod* die Vorzüge des Rhodamins gegenüber dem zu diesem Zeitpunkt gebräuchlichen Fluorophor Fluorescein. So absorbieren Rhodamin-Derivate bei wesentlich höheren Wellenlängen als Fluorescein-Derivate, wodurch die störende Autofluoreszenz des Gewebes umgangen wird.²⁸ In den letzten Jahren verloren Rhodamin-Derivate an Bedeutung, da überlegene Fluorophore vom BODIPY- und Alexa-Typ entwickelt wurden, die ebenfalls ein Absorptionsmaximum um 520 nm besitzen.²⁹

2.4.2. Entwicklung von Rhodamin-Farbstoffen

In dem 1888 veröffentlichten Patent wurde beschrieben, dass die Umsetzung von Phthalsäure mit einem Überschuss an *meta*-Dimethylaminophenol bei 175°C zu einem roten, kristallinen Farbstoff, dem Tetramethylrhodamin führt. Rhodamine besitzen eine strukturelle Verwandtschaft mit dem Fluorescein. Das Grundgerüst des Rhodaminfluorophors besteht aus einem planaren Xanthengerüst, das an den Positionen C3 und C6 jeweils eine Aminogruppe trägt (Abb. 5). An Position 9 tragen Rhodaminderivate oft einen Benzoessäurerest, der nahezu rechtwinklig zum Xanthengerüst angeordnet ist. Dies konnte durch Röntgenkristallstrukturanalysen nachgewiesen werden.^{30,31}

Alkylierungen der beiden aromatischen Amine oder des Xanthengerüsts führten zu einer breiten strukturellen Variabilität bei den Rhodamin-Verbindungen. So wurde die Einführung reaktiver Gruppen wie z.B. Sulfonylchlorid, Maleinimid-, oder Haloacetamid am Phenylrest beschrieben.^{30,32,33,34} Die Erweiterung des

Xanthengrundgerüsten führt zu deutlich bathochromen Verschiebungen der Absorptionsmaxima (z.B. Texas-Red). Durch die unterschiedlichen Substituenten erhält man Rhodamin-Derivate, die ihr Absorptionsmaximum im Bereich von 485 bis 700 nm besitzen.

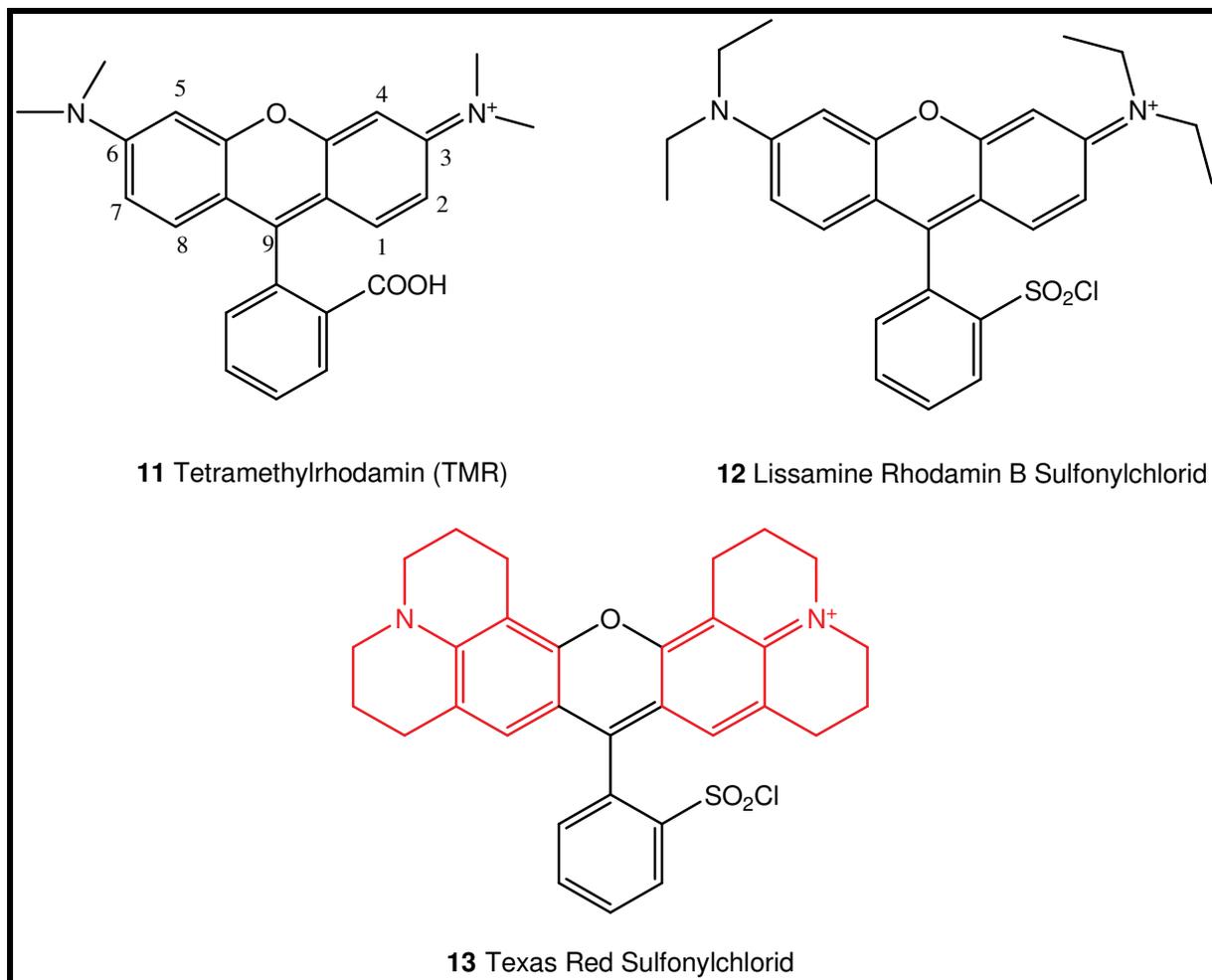


Abb. 5. Die gebräuchlichsten Rhodamin-Derivate³²

2.4.3. Eigenschaften von Rhodamin-Farbstoffen

Rhodamin-Farbstoffe verfügen über folgende Eigenschaften:

- ∅ Rhodamine besitzen ein breites Strukturspektrum und sind dadurch variabel in ihren Absorptionsmaxima. Die Einführung eines Julolidin-Ringes (rot, Abb.5), verhindert eine Rotation um den Stickstoff, was zu einem deutlich bathochromen Effekt führt (Texas-Red-Derivate). Solche Derivate werden bei Messungen eingesetzt, bei denen Licht mit höherer Wellenlänge eingestrahlt wird.²⁹
- ∅ Rhodamin-Derivate besitzen eine hohe Fluoreszenzquantenausbeute.
- ∅ Einige Rhodamin-Derivate bilden bei basischen pH-Werten ein nicht fluoreszierendes Spirolactam aus. Die Struktur konnte 2000 nachgewiesen

werden.³⁵ Durch Veränderungen an der Struktur, vor allem durch die Einführung reaktiver Gruppen wie z.B. Sulfonylchlorid, Maleinimid-, oder Haloacetamid an Pos. 2 des Phenylrestes, wird die Stabilität der Rhodamin-Derivate in einem pH-Bereich von 4.0 bis 10.0 deutlich verbessert.²⁹ Rhodamine besitzen generell eine bessere pH-Stabilität, als die entsprechenden Fluorescein-Analoga.

- ∅ Rhodamin-Derivate zeigen ein stark lösungsmittelabhängiges „Photobleaching“ (Siehe Kapitel 1.4.2). Die Zersetzungsprodukte absorbieren nicht bei höheren Wellenlängen als dem Absorptionsmaximum des unzersetzten Rhodamins.³⁶
- ∅ Rhodamin-Derivate neigen zur Aggregatbildung, was unter anderem eine Erklärung für die konzentrationsabhängige Fluoreszenzlöschung sein könnte, die bei diesen Derivaten beobachtet wird. Vor allem in Wasser konnte die Bildung von Aggregaten beobachtet werden (Siehe Kapitel 1.4.2).³⁷
- ∅ Generell sind Rhodamin-Derivate den Fluorescein-Derivaten in Bezug auf Photostabilität und Quenchen aber deutlich überlegen.^{28,29}

2.5. Coumarin-Farbstoffe

2.5.1. Einführung

Coumarine gehören zu der Gruppe der blauen Fluorophore, d.h. sie absorbieren und emittieren das Licht im nicht sichtbaren Bereich. Die Untersuchung der Coumarine begann vor über 200 Jahren. Der Name dieser Stoffklasse leitet sich von dem Namen *Coumarouna odorata* Aube (*Dipyteryx odorta*/Tonkabohne) ab, einer Pflanze, aus der der einfachste Vertreter dieser Stoffklasse erstmals isoliert werden konnte: das Coumarin.³⁸ Coumarin ist ein häufig vorkommender sekundärer Pflanzeninhaltsstoff, der in Pflanzen ubiquitär verbreitet ist. 1936 referierte *van Werder* über die therapeutische Verwendung von Coumarinen³⁹ und *Bose* fasste 1958 die wichtigsten biologischen Eigenschaften von natürlichen Coumarinen zusammen, wie z.B. antimikrobielle, antivirale und antioxidative Effekte sowie die Inhibition von Enzymen und die Wirkung als Antikoagulanzen.⁴⁰ 1940 erschienen Arbeiten von *Rangaswami*, der über den Einfluss verschiedener Substituenten auf die Fluoreszenz von Benzopyronen berichtete.⁴¹ Das Einsatzgebiet dieser Substanzklasse als Fluorophore ist begrenzt, da sie Absorptionsmaxima besitzen die im ultravioletten Bereich liegen. Durch das Einstrahlen von energiereichem Licht kann es bei vielen Biomolekülen zu photoinduzierten Zersetzungsreaktionen kommen. Zellen, die mit ultraviolettem Licht bestrahlt werden, können dieses absorbieren und zeigen eine Autofluoreszenz, die die Messungen stört.⁴²

2.5.2. Entwicklung von Coumarin-Farbstoffen

Für vielfarbige Fluoreszenzuntersuchungen, wie z.B. Immunfluoreszenz, Nucleinsäuren- oder Protein-Mikroassays, ist ein Fluorophor, welcher blaues Licht emittiert, interessant, da es leicht von grünem, gelbem oder rotem Licht unterschieden werden kann.⁴² Chemisch gesehen stellen Coumarine Benzo- α -pyrone dar.

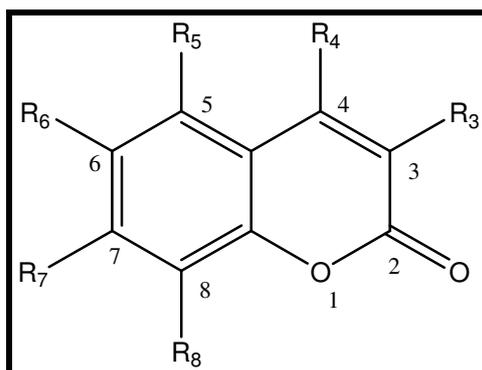


Abb. 6. Allgemeine Strukturformel von Coumarin-Derivaten

Die synthetische Darstellung des Coumarins gelang Mitte des 19. Jh. *Perkin* mit der nach ihm benannten Perkin-Reaktion.^{43,44} Dabei reagiert im Zuge einer Aldolkondensation ein aromatischer *ortho*-Hydroxybenzaldehyd mit Acetanhydrid. Eine weitere Möglichkeit stellt die Pechmann-Reaktion da, bei der Phenole mit β -Ketoestern kondensieren. Ein Überblick über mögliche Synthesewege, auch zu komplizierteren Coumarin-Derivaten, gibt ein 2005 erschienener Review-Artikel.⁴⁵ Die Substanz Coumarin (Abb. 6, R₃-R₈ = H) zeigt keine Fluoreszenz, erst durch Substitution kann es zu einer Fluoreszenz kommen. Erforderlich dafür ist die Generierung eines Push-Pull-Systems: An Position C6 des Grundgerüsts muss ein Substituent sitzen, der durch einen +M-Effekt Elektronen in das System schiebt (Elektronendonator) und an Position C2 oder C3 ein Substituent der diese Elektronen durch –M-Effekte oder –I-Effekte wieder entzieht (Elektronenakzeptor).^{41,47}

Folgende Änderungen des Substitutionsmusters besitzen Einflüsse auf den Fluorophor:^{47,48,49}

- ∅ Elektronenschiebende Substituenten in Pos. 6 und elektronenziehende Substituenten in Position 3 des Coumarins beeinflussen das Emissionsmaximum des Fluorophors.
- ∅ Elektronenschiebende Substituenten in Pos. 7 und elektronenziehende Substituenten in Pos. 2 verändern die Fluoreszenzintensität.
- ∅ Ein elektronenziehender Substituent in Position 4 führt zu einem Rotshift des Emissionsmaximums.

2.5.3. Eigenschaften von Coumarin-Farbstoffen

Coumarine besitzen folgende Eigenschaften, die sie für den Einsatz als Fluorophor wertvoll machen.

- ∅ Coumarine sind ungeladene Fluorophore.
- ∅ Vergrößerung des Fluorophors z.B. durch annellierte Phenylringe führt zu einer bathochromen Verschiebung des Absorptions- und Emissionsmaximums.⁴⁷
- ∅ Die Fluoreszenzeigenschaften sind stark vom Substitutionsmuster des Grundgerüsts abhängig. Dadurch steht eine große Zahl von blauen Fluorophoren zur Verfügung, die spezifische Fluoreszenzeigenschaften besitzen.⁴⁷
- ∅ Häufig verwendete Fluorophore stellen das 7-Hydroxycoumarin und seine Analoga dar. Diese Fluorophore liegen bei pH 10 nicht vollständig deprotoniert vor und zeigen damit keine optimalen Fluoreszenzeigenschaften. Eine Verbesserung konnte durch die Einführung von Fluor-Substituenten an Pos. 6 und 8 erreicht werden. Diese Strukturen besitzen sehr gute Fluoreszenzeigenschaften, auch bei neutralem pH-Wert. Die so veränderten Coumarine sind deutlich photostabiler als die nicht-fluorierten Derivate.^{50,51}
- ∅ Bei der Firma *Molecular Probes* sind Derivate des Hydroxycoumarins unter den Namen Marina Blue und Pacific Blue mit einem Emissionsmaximum von 460 nm erhältlich.⁴⁷
- ∅ Derivate des Coumarins besitzen eine hohe Quantenausbeute, aber nur mittlere Absorptionskoeffizienten.⁴⁸
- ∅ Durch ihre Absorption im UV-Bereich kann es zu Störungen der Messungen durch Autofluoreszenz des Gewebes bzw. zu Schäden an nativem Gewebe durch das energiereiche Licht kommen.⁴²

2.6. Fluorescein-Farbstoffe

2.6.1. Einführung

1871 veröffentlichte *von Bayer* die Vollsynthese eines neuen Farbstoffes, des Fluoresceins. In der Folgezeit wurden von der Firma BASF einige Patente eingereicht, in denen Fluorescein-Derivate beschrieben wurden.⁵² Fluorescein (**14**) ist ein stark fluoreszierendes Molekül mit einem Absorptionsmaximum von 492 nm und einem Emissionsmaximum von 517 nm. Seit der Darstellung des Fluoresceins sind viele verschiedene Analoga synthetisiert worden, die ein vielfältiges Anwendungsprofil besitzen. So synthetisierten *Coons und Kaplan* 1950 mit dem Fluoresceinisocyanat das erste reaktive Fluorescein-Derivat.⁵³ 1958 publizierte *Riggs* das stabilere Fluoresceinisothiocyanat.⁵⁴ In der Zytologie und Immunohistochemie werden Fluorescein-Derivate am häufigsten verwendet.⁵⁵ Durch die großen Nachteile dieser Fluorophore (siehe Eigenschaften) wurden andere Fluorophore entwickelt, die das Fluorescein und seine Analoga immer mehr verdrängen.⁵⁶

2.6.2. Entwicklung von Fluorescein-Farbstoffen

Von Bayer beschrieb 1871 die Synthese von Fluorescein (**14**), bei der 2 Äquivalente Resorcin mit Phthalsäureanhydrid in Gegenwart von Zinkchlorid bei hohen Temperaturen (170°C) zur Reaktion gebracht werden.⁵⁷ Diese extremen Bedingungen sind bei Synthesen im Milligramm-Maßstab nicht anwendbar, da die Edukte durch Sublimation verloren gehen. Eine Verbesserung der Synthese gelang durch den Einsatz von Methansulfonsäure, die sowohl als Lösungsmittel als auch als Lewis-Säure fungiert. Bei der Weiterentwicklung wurden Wasserstoffatome durch Halogenatome wie Chlor, Brom oder Iod ausgetauscht. Man versprach sich durch diese Veränderungen höhere Photostabilität und eine bessere pH-Stabilität. Leider wiesen diese Substanzen, wie z.B. 2',4',5',7'-Tetrabromfluorescein (Eosin, **15**), 2',4',5',7'-Tetraiodfluorescein (Erythrosin, **16**) und 2',4',5',7'-Tetrabrom-4,5,6,7-tetrachlorfluorescein (Bengalrosa, **17**) eine deutlich geringere Fluoreszenzquantenausbeute auf als Fluorescein (Abb. 7).⁵⁸ Diskutiert wird ein signifikantes „intersystem crossing“ im Triplet-Zustand nach Absorption von Licht.⁵⁹ Der Austausch eines Wasserstoffes durch Fluor führt zu keiner Verminderung der Fluoreszenzquantenausbeute. Dieser Austausch führte z.B. beim 2',4,4',5,5',6,6',7,7'-Octafluorfluorescein zu einer Erniedrigung des pK_a-Wertes auf 3.3, so dass die pH-abhängige Fluoreszenzlöschung erst im Säuren beobachtet werden kann. Generell

weisen alle fluorierten Fluorescein-Derivate niedrigere pK_a -Werte auf und besitzen eine höhere Photostabilität, hohe Fluoreszenzquantenausbeuten und eine geringe Quenchrage. Ein käuflich erhältliches fluoriertes Fluorescein-Derivat von der Firma *Molecular Probes* ist Oregon Green (**18**).⁶⁰

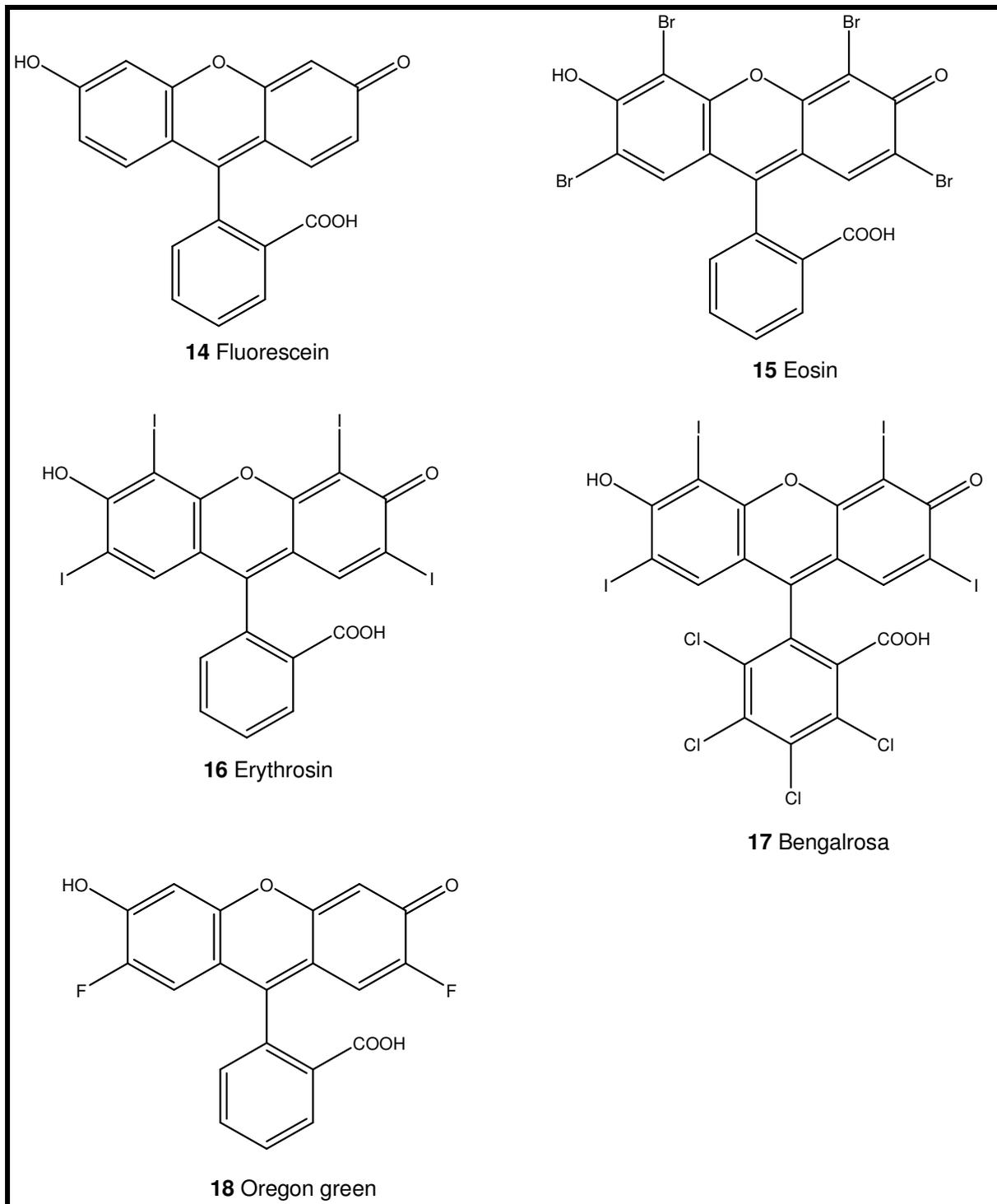


Abb. 7. Fluorescein und seine halogenierten Analoga

2.6.3. Eigenschaften von Fluorescein-Farbstoffen

Fluorescein-Farbstoffe besitzen folgende Eigenschaften:

- ∅ Fluorescein-Derivate besitzen hohe Fluoreszenzquantenausbeuten ($\phi = 0.92$) bei einem pH-Wert > 8 .⁵⁵
- ∅ Fluorescein kann in wässrigem Milieu je nach pH-Wert als Kation, neutral, als Anion, oder als Dianion vorliegen. Die verschiedenen geladenen Teilchen besitzen jeweils unterschiedliche spektroskopische Eigenschaften. Der pK_a -Wert von Fluorescein beträgt 6.4, daher liegt Fluorescein bei physiologischem pH-Wert zu einem großen Teil in der nicht fluoreszierenden Spirolactonform vor ($\phi = 0.37$ bei pH 5.4).^{35,55,60}
- ∅ Durch die geringe Photostabilität können Fluorescein-Derivate nicht für Untersuchungen verwendet werden, bei denen eine niedrige Detektionsschwelle benötigt wird. So sind Untersuchungen wie z.B. DNA-Sequenzierungen, Fluoreszenz-, In-situ-Hybridisierung oder die Detektion geringer Rezeptordichten mit Hilfe des Fluoresceins nicht möglich.⁵⁶
- ∅ Sie besitzen ein breites Emissionsspektrum, so dass ihr Einsatz in Untersuchungen limitiert ist, bei denen mehrere Fluorophore mit unterschiedlichen Emissionsmaxima eingesetzt werden.
- ∅ Die chlorierten, bromierten und iodierten Analoga des Fluoresceins besitzen nur sehr schwache bzw. gar keine Fluoreszenzeigenschaften.⁵⁸
- ∅ Eine Fluorierung führt zu einer deutlich verbesserten Photostabilität, die pK_a -Werte dieser Derivate sinken deutlich, so dass auch im schwach sauren Bereich keine Senkung der Fluoreszenzquantenausbeute erfolgt (z.B. Oregon Green (**18**) $\phi = 0.92$ (pH 9), $pK_a: 4.8$).⁶⁰

2.7. BODIPY-Fluorophore

2.7.1. Einleitung

Die Darstellung von BODIPY-Strukturen wurde 1968 das erste Mal von *Treibs und Kreuzer* beschrieben.⁶¹ Der Name BODIPY leitet sich von dem Grundgerüst aller BODIPY-Derivate ab: **Bordipyrrol** oder auch **Borate-Dipyrromethin** (Abb. 8).

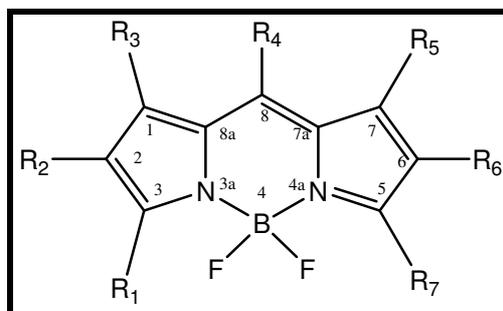


Abb. 8. Abbildung des BODIPY-Grundgerüsts mit Bezifferung

Die Autoren beschrieben schon damals die intensive gelbgrüne Fluoreszenz von Lösungen dieser Derivate in allen Lösungsmitteln. 1977 analysierten *Vos de Wael et al.* weitere Eigenschaften dieser Fluorophore und veröffentlichten spektroskopische Daten.⁶² Die fortschreitende Entwicklung neuer fluoreszenzbasierter Testsysteme stellte höhere Anforderungen an die verwendeten Fluorophore. So entwickelten *Wories et al.* 1985 ein wasserlösliches BODIPY-Derivat und beschrieben die spektroskopischen Eigenschaften dieser Struktur.⁶³ 1988 lies sich *Haugland* die Grundstruktur des BODIPY patentieren. Ziel war es, reaktive Fluorophore darzustellen, die eine hohe Absorption und hohe Fluoreszenzquantenausbeute besitzen und eine einfache Verknüpfung mit biologischen Molekülen ermöglichen. Der BODIPY-Grundkörper wurde so substituiert, dass freie funktionelle Gruppen, wie z.B. Amine, Carbonsäureester, Alkylbromide oder Succinimidylester für eine Kopplung mit dem gewünschten Target zur Verfügung stehen.⁶⁴ Die erste Verknüpfung eines BODIPY-Derivates mit einem Liganden gelang *Monsma et al.* 1989, indem sie Dopamin-Rezeptor-Agonisten sowohl mit Fluorescein und Rhodamin als auch mit einem BODIPY verknüpften.⁶⁵

2.7.2. Darstellung von BODIPY-Derivaten

2.7.2.1. Chemie der Dipyrromethine

1957 beschrieben *Treibs et al.* die Bildung von Dipyrromethinen und Tripyrromethinen bei der Umsetzung von Pyrrolaldehyden mit Pyrrolen und prägten

den Begriff der „Pyrrol-Austausch-Reaktion“. Sie beobachteten, dass die Umsetzung unsymmetrischer Pyrrol-Derivate unterschiedliche Dipyrromethine bildete und benannten die erwarteten unsymmetrische Dipyrromethine „Primär-Methine“ und die unerwarteten symmetrischen Dipyrromethene „Sekundär-Methine“ (Abb. 9).

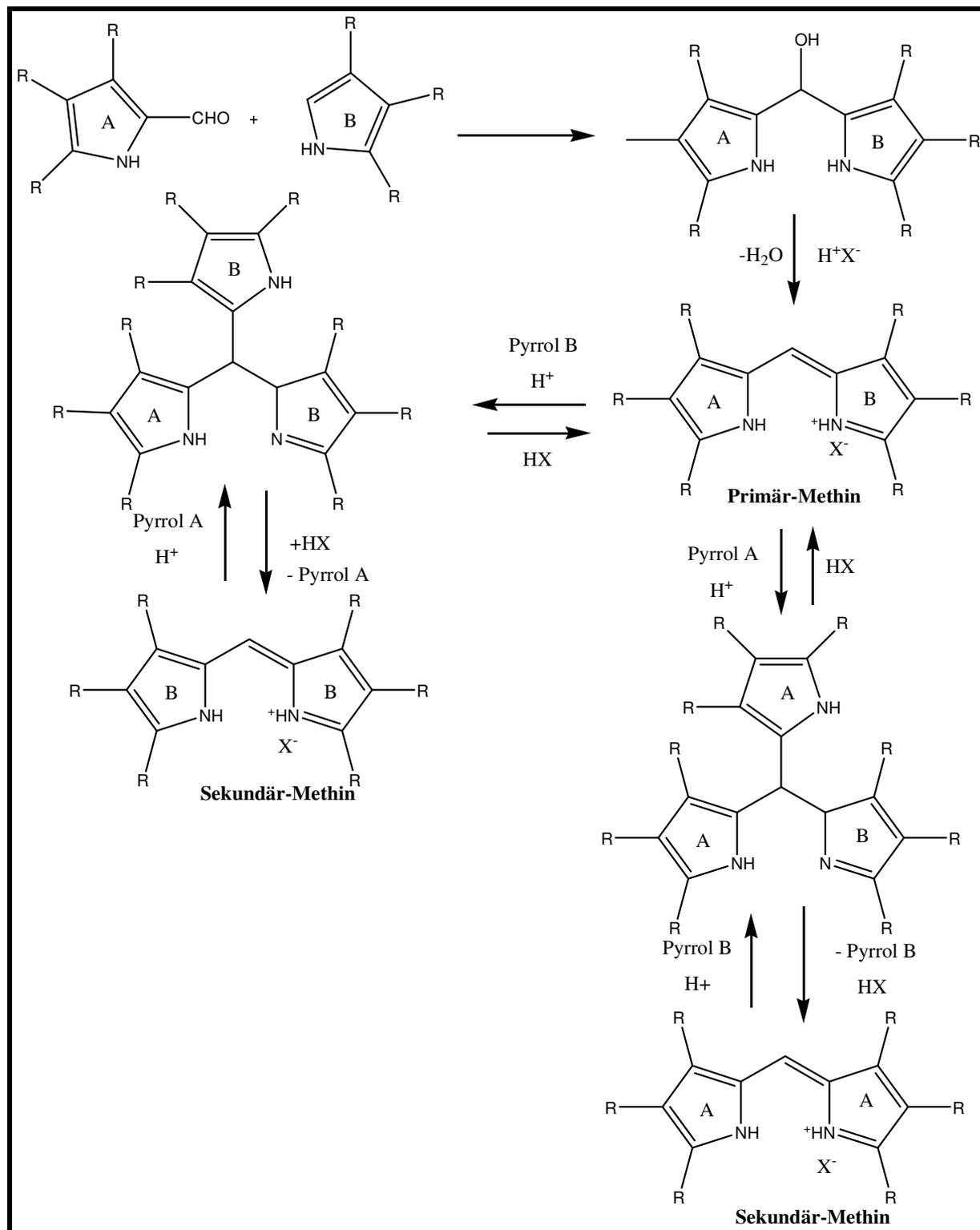


Abb. 9. Bildung von Dipyrromethinen nach Treibs⁶²

Als Erklärung führten sie die Bildung eines Tripyrromethinderivates durch den Angriff eines weiteren Pyrrols an ein primäres Diopyrromethin an. Durch anschließende saure Abspaltung eines Pyrrols entstehen zwei verschiedene symmetrische Dipyrrromethine. Voraussetzung für diese Austauschreaktion ist, dass sich während der Reaktion Methine unterschiedlicher Basizität ausbilden können und durch Zugabe von Säure die Bildung des unsymmetrischen Tripyrromethins ermöglicht wird. Die Autoren beschrieben, dass Substituenten am Pyrrolkern mit einem –I- und –M-Effekt die Bildung von Tripyrromethinen begünstigt, während bei einfachen Alkylpyrrolen die Bildung von Dipyrrromethinen bevorzugt ist. Bei der Umsetzung von Pyrrolen mit Carbonsäurechloriden konnte die Bildung von Tripyrromethinen nicht beobachtet werden, trotzdem kam es zu Austauschreaktionen, was die isolierten Produkte bestätigten.⁶⁶

2.7.2.2. Synthese des BODIPY-Grundkörpers

Mit der Umsetzung von Ethylendiamin mit Trimethylboran beschrieben *Goubeau et al.* 1955 die Darstellung eines Bor-Stickstoff-Chelatkomplexes.⁶⁷ 1958 erfolgten zahlreiche Publikationen, in denen die Synthese verschiedener Benzo-2,1,3-bor-diazoline beschrieben wurde. Bei diesen Chelatkomplexen ist die Elektronenpaarlücke des Bor-Atoms durch eine koordinative Bindung von einem Stickstoffatom abgesättigt.⁶⁸ 1968 publizierten *Treibs et al.* die Umsetzung von Dipyrrromethinen und Tripyrromethinen mit Bortrifluorid (Abb.10). Sie setzten 2,4-Dimethylpyrrol in siedendem Acetanhydrid mit Bortrifluorid-diethyletherat um, wobei sie stark fluoreszierende Lösungen erhielten. Sie identifizierten die Strukturen **19** und **20**, welche als rote Feststoffe in einer Ausbeute von 7% (**19**) und 9% (**20**) erhalten werden konnten. Als allgemeines Darstellungsverfahren beschrieben sie die Umsetzung von Dipyrrromethinen oder Tripyrromethinen in Benzol mit Bortrifluorid-diethyletherat und tertiären Basen.⁶¹

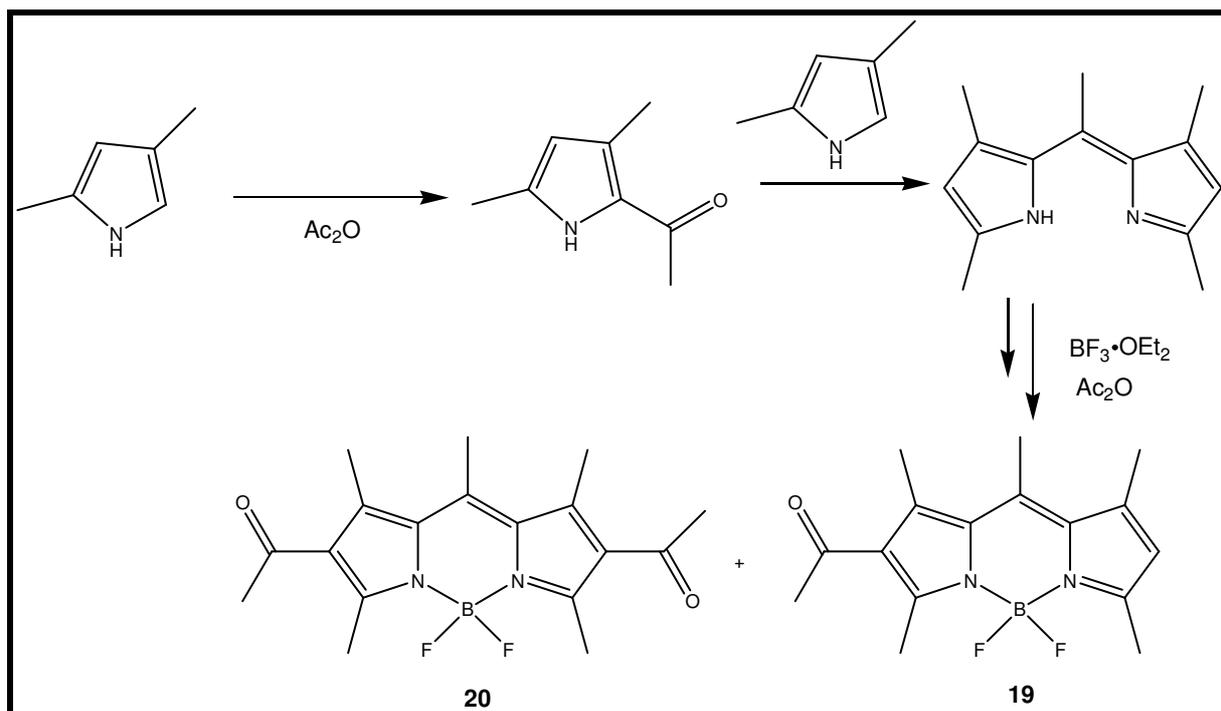


Abb. 10. Synthese des BODIPY-Grundkörpers (1968)

In den US-Patenten von 1988 und 1994 publizierte *Haugland* zwei generelle Methoden für die Darstellung von BODIPY-Grundkörpern (Abb. 11). Nach der ersten Methode (blau dargestellt) wird ein entsprechender Pyrrolaldehyd mit einem weiteren Pyrrol umgesetzt, nach der zweiten Methode (rot dargestellt) wird das entsprechende Pyrrol mit einem eine Carbonylgruppe tragenden aliphatischen oder aromatischen Rest umgesetzt (Abb. 10).^{64,69} Als Säure (HX) wird Bromwasserstoffsäure⁶⁹ oder Trifluoressigsäure⁷⁰ auf Grund ihrer hohen Acidität verwendet. Die Darstellung von BODIPY-Derivaten nach Methode 1 kann zu einem Gemisch verschiedener Dipyrromethine führen (siehe 2.7.2.1. Chemie von Dipyrromethinen) und damit eventuell nicht zu dem gewünschten Produkt. Die Synthese unsymmetrischer Derivate ist auf diesem Wege möglich. BODIPY-Derivate, die nach Methode 2 synthetisiert werden, liefern symmetrische Produkte.^{61,69}

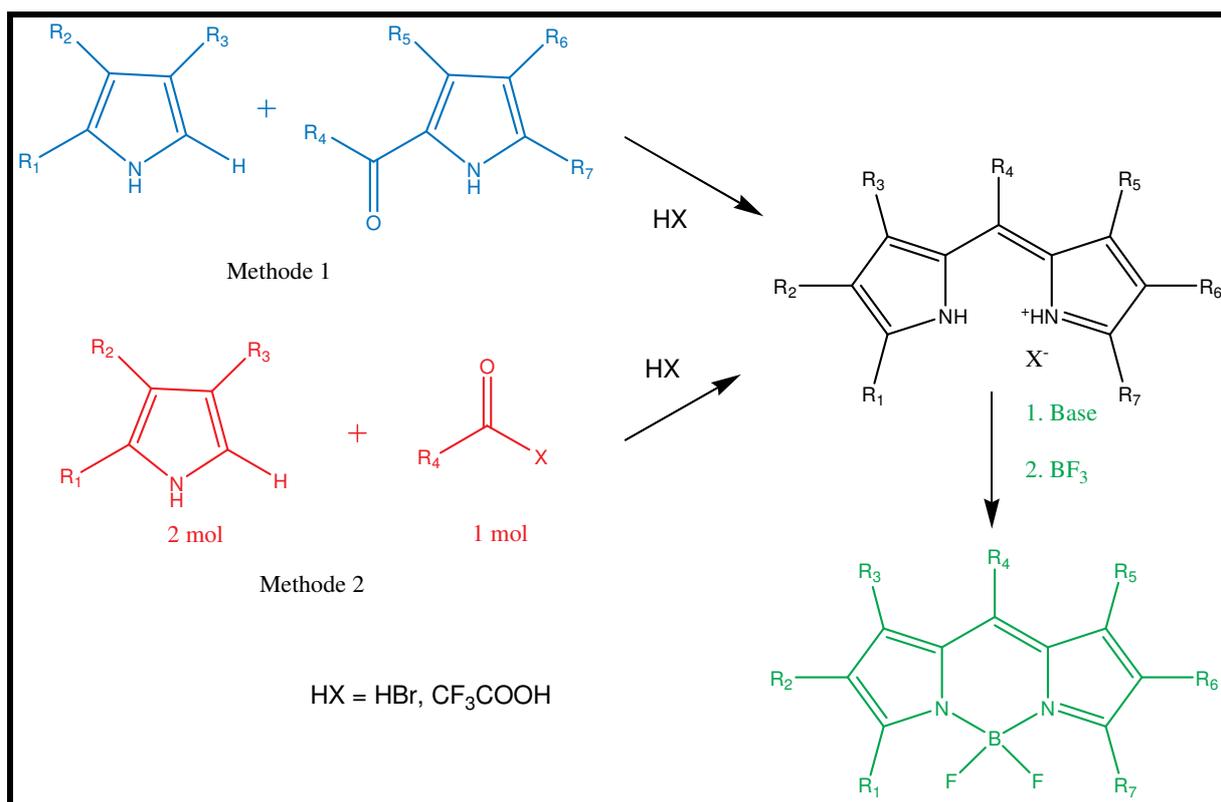


Abb.11. Darstellungsverfahren nach Haugland für BODIPY-Derivate

Durch die Einführung eines Sulfonsäurerestes ist es möglich, den lipophilen BODIPY in eine hydrophilere Struktur umzuwandeln. Die dafür erforderliche Funktionalisierung am Pyrrolkern kann erst nach der Bildung des BODIPY-Derivates eingeführt werden, da Substituenten mit –I-Effekten und –M-Effekten die Bildung von Dipyrrromethinen behindern.⁶⁶ Eine Chlorsulfonierung wird bereits in der Publikation von *Treibs* 1968 beschrieben, allerdings gelang es den Autoren nicht, das Produkt zu isolieren.⁶¹ Dies gelang 1985 *Wories et al.* mit der Darstellung eines an Position 2 oder Position 6 monosubstituierten BODIPY-Sulfonates.⁶³

Die Umsetzung von Dipyrrromethinen mit anderen Metallkationen wie Zn²⁺, Co³⁺, Cu²⁺, Ni³⁺, Pt⁺, Al³⁺, Mg²⁺ führte zu den entsprechenden Komplexen, die aber sofort wieder zerfielen und deshalb für einen Einsatz als Fluorophor nicht geeignet waren.^{61,70}

2.7.3. Eigenschaften von BODIPY-Fluorophoren

BODIPY-Derivate besitzen hervorragende Eigenschaften, die sie für eine Anwendung als Fluorophore prädestinieren. Im Folgenden werden die wichtigsten Eigenschaften vorgestellt.

- ∅ BODIPY-Derivate nehmen unter den Fluorophoren eine Sonderstellung ein, da sie relativ unpolar sind und der Chromophor keine Ladung trägt. Eine Ausnahme stellen die sulfonierten BODIPY-Derivate dar, die negativ geladen sind.
- ∅ Die Fluoreszenzintensität ist pH-Wert-unabhängig und wird wenig beeinflusst durch Änderungen der Polarität von Lösungsmitteln.⁷¹
- ∅ Durch Luftoxidation ausgelöstes Quenchen der Fluorophore beeinflusst die Fluoreszenzintensität weniger als 5%.⁷¹
- ∅ Sie besitzen eine hohe Fluoreszenzquantenausbeute $\phi > 0.8$, unabhängig vom Lösungsmittel.⁷¹
- ∅ Sie besitzen hohe Extinktionskoeffizienten ($\epsilon > 80000 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$).^{70, 72}
- ∅ Sie besitzen eine schmale, scharfe Emissionsbande, mit einer höheren Peakintensität als Fluorescein. Diese Eigenschaft macht BODIPY-Derivate zu wertvollen Werkzeugen für HPLC- und Elektrophorese-Untersuchungen.⁷²
- ∅ BODIPY-Fluorophore befinden sich lange im angeregten Zustand ($>4 \text{ ns}$), weshalb sie für Fluoreszenz-Polarisations-Assays geeignet sind.⁷²
- ∅ Das Emissionsmaximum überlagert sich kaum mit den Absorptionsbanden von roten Fluorophoren, wie z.B. Texas Red oder Tetramethylrhodamin, was sie besonders geeignet für Untersuchungen macht, die mit mehreren Fluorophoren durchgeführt werden.⁷²
- ∅ BODIPY-Derivate sind deutlich photostabiler als Fluorescein- und Rhodamin-Derivate.^{72,73}
- ∅ Durch Vergrößerung des Chromophors, z.B. durch Anellierung von Phenylresten, wird das Absorptionsmaximum bathochrom verschoben. *Chen et al.* beschrieben die Darstellung von BODIPY-Derivaten, die ein Emissionsmaximum bei 630 nm besitzen. Ein Nachteil solcher Strukturen stellt die große Lipophilie dar, weshalb sie in einigen Testsystemen nicht eingesetzt werden können (Abb. 12).⁷⁴

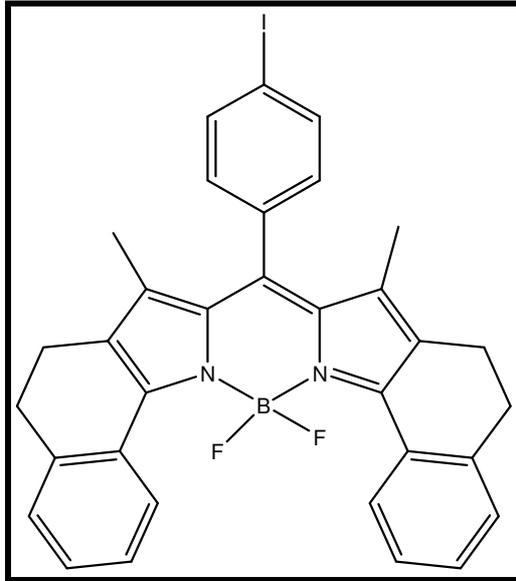


Abb. 12. Struktur eines BODIPY-Derivats mit Emissionsmaximum bei 619 nm⁷⁴

3. Fluoreszenzmarkierte Liganden

3.1. Einführung

Ziel bei der Entwicklung neuer fluoreszenzmarkierter Rezeptorliganden ist es, dass der neu dargestellte Fluoreszenzligand seine Fluoreszenz während der Interaktion mit dem Rezeptor beibehält und am Rezeptor gebunden bleibt, wenn ungebundene Liganden durch Waschen entfernt werden. Dies erfordert stabile Fluorophore und Fluoreszenzliganden, die eine hohe Affinität zu dem gewünschten Target besitzen. Historisch betrachtet, gab es große Schwierigkeiten bei der Entwicklung solcher Strukturen.

- ∅ In der frühen Phase der Entwicklung von fluoreszenzmarkierten Liganden wurden diese für histologische Anfärbungen verwendet. Sie banden irreversibel durch eine kovalente Bindung an die entsprechende Zielstruktur.
- ∅ Ein grosses Problem stellte die geringe Empfindlichkeit der verwendeten Detektoren dar.
- ∅ Es existierten keine geeigneten funktionalisierten Fluorophore, die für die Darstellung von und Untersuchungen mit fluoreszenzmarkierten Liganden geeignet waren.^{75,76}

Einer der ersten fluoreszenzmarkierten Liganden war das α -Bungarotoxin, das mit Fluoresceinisothiocyanat und Tetramethylrhodaminisocyanat markiert wurde. Getestet wurde die Substanz an Acetylcholinrezeptoren in den Muskelfasern von *Xenopus sartorius*.⁷⁷

3.2. Vorteile von fluoreszenzmarkierten Liganden

Im folgendem werden die Vorteile von fluoreszenzmarkierten Liganden vorgestellt.

- ∅ Fluoreszenzliganden sind ungefährlicher und deutlich preiswerter als die entsprechenden tritiierten oder iodierten Radioliganden⁷⁶
- ∅ Das räumliche Auflösungsvermögen von Fluoreszenzmessungen ist größer als bei radioaktiven Methoden, wie z.B. der Autoradiographie.⁷⁶
- ∅ Die Experimente können unter realen Gleichgewichtsbedingungen durchgeführt werden.⁷⁶
- ∅ Die fluoreszenzmarkierten Liganden können von nicht fluoreszierenden Liganden aus der Bindungstasche verdrängt werden. Dadurch ist es möglich mit Hilfe von bildgebenden Verfahren die Bindung in der Bindungstasche durch den nicht fluoreszierenden Liganden zu verfolgen.⁷⁶

- ∅ Das Ausbleichen („Bleaching“) von Fluorophoren, vor allem solcher die nur eine Fluoreszenz zeigen, wenn sie gebunden sind, kann für FRAP-Messungen genutzt werden (**F**luorescence **R**ecovery **A**fter **P**hotobleaching). Dabei wird ein Gebiet mit sehr energiereichem Licht bestrahlt, so dass die dort vorhandenen Fluorophore zerstört werden (Photobleaching). Anschließend wird beobachtet, ob dieses Gebiet von peripheren, nicht zerstörten Fluorophoren neu besetzt wird. Durch diese Technik können dynamische Prozesse in Zellen zurückverfolgt werden.^{76,78,79,80}
- ∅ Das Signal degeneriert nicht. Obwohl Fluorophore dem Photobleaching unterliegen, können noch intakte Fluorophore die Stelle des zerstörten Fluorophores einnehmen. Dies erlaubt ein Mitteln des Signals verglichen mit dem radioaktiven Zerfall der Radioliganden.⁷⁶
- ∅ Verschiedene Fluorophore sind erhältlich. Dies ermöglicht die Anwendung verschiedenfarbiger Fluorophore, um mehrere Prozesse gleichzeitig in biologischen Strukturen verfolgen zu können.⁷⁶
- ∅ Lebende Zellen können verwendet werden.
- ∅ Die Ergebnisse werden umgehend erhalten.

3.3. Nachteile von fluoreszenzmarkierten Liganden

Im folgendem werden die Nachteile von fluoreszenzmarkierten Liganden vorgestellt.

- ∅ Der relativ große Fluorophor kann die Affinität und/oder Selektivität der Liganden beeinflussen. So konnte z.B. bei der Markierung von α -Bungarotoxin eine Verringerung der Affinität des fluoreszenzmarkierten Produktes an nikotinischen Acetylcholin-Rezeptoren beobachtet werden.^{76,77}
- ∅ Der verwendete Fluorophor kann die Löslichkeit der Liganden beeinflussen. Eine extrem lipophile Verbindung würde sich an die Membran anlagern und nur durch Endozytose in die Zelle aufgenommen werden können.⁷⁶
- ∅ Die verschiedenen Fluorophore besitzen unterschiedliche Fluoreszenzquantenausbeuten. Dies kann die Berechnung von B_{\max} erschweren.⁷⁶
- ∅ Für die Messungen werden sehr empfindliche Detektoren benötigt.
- ∅ Photobleaching kann auftreten, vor allem wenn die Lichtquelle zu energiereich und die Konzentration an Fluorophor sehr gering ist.
- ∅ Die Autofluoreszenz von Zellen kann die Messungen stören. Vor allem die Verwendung von blauen Fluorophoren ist in dieser Hinsicht problematisch.

- Ø Durch zu hohe Konzentrationen an Fluorophoren kann es zum Quenchen der Fluoreszenz kommen.
- Ø Es ist essentiell, dass die pharmakologischen Eigenschaften (Affinität, Selektivität) des fluoreszenzmarkierten Liganden bekannt sind. Diese müssen vor der Verwendung z.B. mit Hilfe von Radioligandbindungsstudien bestimmt werden.⁷⁶

3.4. Wahl des geeigneten Fluorophors

Bei der Auswahl des Fluorophors müssen folgende Überlegungen angestellt werden:

1. Der Fluorophor muss in einer reaktiven Form vorliegen, d.h. er muss eine funktionelle Gruppe tragen, über die eine chemische Verknüpfung mit dem gewünschten Liganden erfolgen kann.
2. Das Emissionsmaximum des gewählten Fluorophors muss sich eindeutig von der Autofluoreszenz des Gewebes bzw. anderen eventuell vorhandenen farbigen Molekülen unterscheiden.
3. Der Fluorophor muss eine ausreichende Photostabilität besitzen, d.h. die gewählte Anregungswellenlänge darf nicht in einem erhöhten Maße zu einer Zersetzung (Photobleaching) des entsprechenden Fluorophors führen.
4. Der Fluorophor sollte eine möglichst hohe Fluoreszenzquantenausbeute (ϕ) besitzen.
5. Der Fluorophor sollte einen möglichst hohen Extinktionskoeffizienten besitzen.
6. Der Fluorophor sollte eine möglichst scharfe, langwellige Absorptionsbande und ein scharfes Emissionsmaximum besitzen, damit störende Einflüsse vermindert werden.
7. Eine ausreichende Löslichkeit, sowohl in wässrigem Milieu für die pharmakologischen Charakterisierungen, als auch in den gängigen organischen Lösungsmitteln, um die Darstellung zu erleichtern, muss vorhanden sein.
8. Der Fluorophor darf zu keiner Verminderung der Affinität oder Selektivität des zu markierenden Liganden führen.^{70,76,77}

Für die vorgesehene Fluoreszenzmarkierung wählten wir den BODIPY-Fluorophor, da er die meisten der oben beschriebenen Eigenschaften vereinigt. In Kapitel 4 werden die Ergebnisse der Entwicklung neuer BODIPY-Strukturen vorgestellt.

4. Darstellung neuer BODIPY-Fluorophore

4.1. Synthese des BODIPY-Grundkörpers

Für die Synthese von BODIPY-Grundstrukturen stehen wie beschrieben zwei Varianten zur Verfügung (Kapitel 2.7.2). Die Darstellung von unsymmetrischen Derivaten birgt durch die vorgestellte Pyrrol-Austausch-Reaktion größere Risiken. Für die von uns präferierten symmetrischen BODIPY-Derivate stellt Methode 2 (siehe Kapitel 2.7.2, Abb. 10) die interessantere Variante dar, da es sich um eine Eintopfsynthese handelt. Zudem können Carbonylverbindungen eingesetzt werden, die bereits eine zu derivatisierende funktionelle Gruppe tragen. Als Carbonylverbindung wählten wir die für diese Reaktion reaktivste Carbonylverbindung, eine Halogencarbonsäure, die in ω -Stellung mit einem Bromatom funktionalisiert ist. Durch diese Wahl lassen sich leicht BODIPY-Derivate mit unterschiedlichen Kettenlängen herstellen (Abb.13).

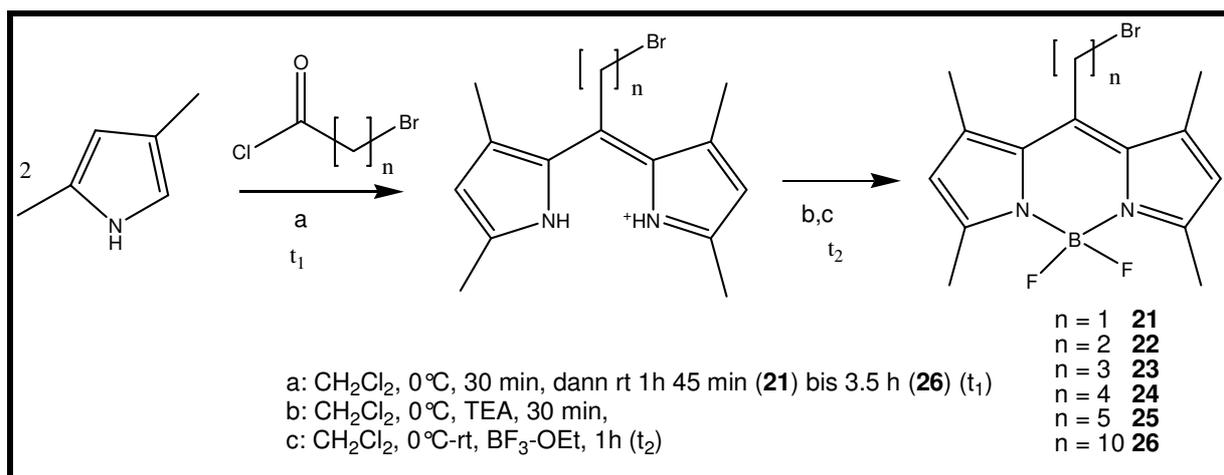


Abb. 13. Neue BODIPY-Derivate

Die Verwendung des unsubstituierten Pyrrols bei der Darstellung von BODIPY-Derivaten führte nicht zum gewünschten Produkt. Eine mögliche Erklärung für diese Beobachtung liegt in der Stabilität der intermediär gebildeten Dipyrromethine. Die Instabilität solcher unsubstituierter Dipyrromethine ist literaturbekannt.⁶² Durch die Verwendung von 2,4-Dimethylpyrrol konnten von *Sven Freudenthal* die BODIPY-Strukturen **21** bis **26** auf diese Art dargestellt werden.⁸¹ Er entwickelte eine Eintopfsynthese, bei der 1 Äquivalent 2,4-Dimethylpyrrol von einem Äquivalent ω -Brom-n-alkansäurechlorid elektrophil an der aktivierten Position 2 angegriffen wird. Die Zugabe eines Katalysators ist auf Grund der hohen Reaktivität des Pyrrols und seiner Derivate nicht erforderlich. Vielmehr erfolgt die Zugabe des 2,4-

Dimethylpyrrols unter Eiskühlung, um unerwünschte Nebenreaktionen zu vermeiden. Das sich intermediär bildende Keton wird erneut von einem Äquivalent 2,4-Dimethylpyrrol angegriffen und bildet unter Wasseraustritt ein Dipyrromethin. Durch Zugabe von Triethylamin wird eine Deprotonierung der Stickstoffatome erreicht; anschließend bildet sich durch Zugabe von Bortrifluorid-diethyletherat der fluoreszierende BODIPY-Komplex. Die Reaktionszeit variiert stark in Abhängigkeit von der Kettenlänge der eingesetzten ω -Brom-n-alkansäurechloride. *Sven Freudenthal* konnte Verbindung **27** als unerwünschtes Nebenprodukt isolieren und vollständig charakterisieren (Abb. 14). Diese Substanz wurde nach längeren Reaktionszeiten in Gegenwart von Wasser erhalten.⁸¹ Die Unterdrückung der Bildung dieses Nebenproduktes ist schwierig, da das bei der Reaktion freigesetzte Wasser ausreicht, um dessen Entstehung zu forcieren.

Bei der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Resynthese der Fluorophore konnte diese Vermutung bestätigt werden, da die Verwendung von sehr trockenen Reagenzien (Dichlormethan, Triethylamin) und die Durchführung unter einer Argonatmosphäre die Bildung nicht verhinderte. Das Nebenprodukt lässt sich jedoch leicht in der nachfolgenden chromatographischen Reinigung abtrennen. Bei der Umsetzung in einem Druckgefäß unter absolut wasserfreien Bedingungen konnte durch Erhöhung der Reaktionszeit t_2 und Erhöhung der Reaktionstemperatur (120 °C) **24** in 33 %iger Ausbeute erhalten werden. Damit wurde die Ausbeute von 19 % auf 33 % fast verdoppelt. Um höhere Reaktionstemperaturen zu ermöglichen, wurde anstelle des niedrig siedenden Dichlormethans das höher siedende Toluol als Lösungsmittel verwendet. Eine Übertragung auf die anderen BODIPY-Derivate **21,22,23,25,26** führte zu keiner nennenswerten Erhöhung der Ausbeute. Die Aufarbeitung sollte sofort erfolgen, da ein Lagern des Produktes in der Reaktionslösung zur Bildung des Nebenproduktes sowie zu Zersetzungsreaktionen führt. Lösungen, die über Nacht gelagert wurden, zeigten deutliche Braunfärbung und einen drastischen Verlust an Ausbeute. Überraschenderweise gab es bei der Darstellung von **21** zunächst einige Probleme; es konnte das unerwartete Produkt **28** in hohen Ausbeuten (30%) isoliert werden. Änderungen der Reaktionsbedingungen (Temperatur, Reaktionszeit) und Verwendung von frischem Acetylchlorid bzw Acetylbromid führten zu keinem anderen Ergebnis. Erst durch den Einsatz von frischem Bortrifluorid-diethyletherat konnte **21** in befriedigenden Ausbeuten (40%) isoliert werden. Verbindung **28** kann durch vorsichtige Säulenchromatographie

abgetrennt werden und fiel nur noch in sehr geringen Ausbeuten an (1,6%) (Abb. 14).

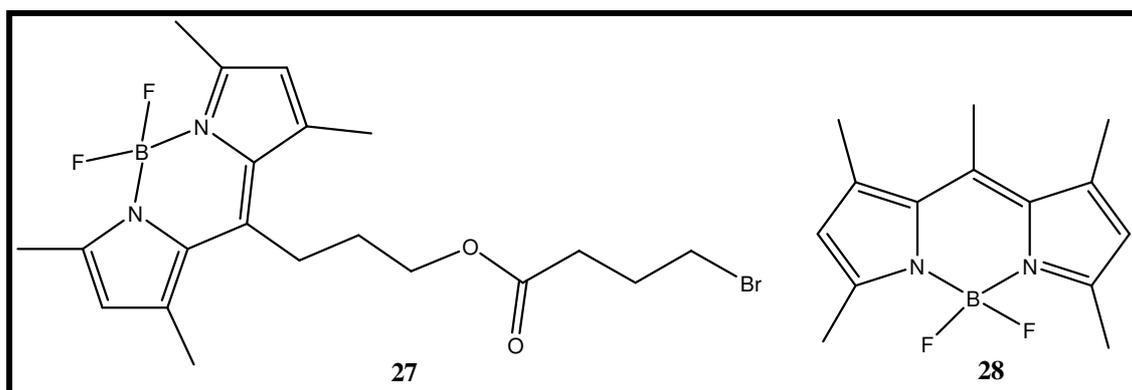


Abb. 14. Nebenprodukte der BODIPY-Darstellung

4.2. Funktionalisierung zum Amino-Derivat

Um eine breitere Variation für mögliche Kupplungsreaktionen mit Liganden zu ermöglichen, wurden Amino-funktionalisierte BODIPY-Derivate synthetisiert. In der organischen Chemie werden Alkylhalogenide mit Ammoniak zu primären Aminen umgesetzt. Ein großes Problem dieser Reaktion stellt die höhere Nukleophilie des gebildeten primären Amins im Vergleich zum Ammoniak dar. Bei äquimolaren Ansätzen reagieren die entstandenen primären Amine bevorzugt mit den Alkylhalogeniden zu den entsprechenden sekundären Aminen, die auf Grund ihrer hohen Nukleophilie weiter mit den Alkylhalogeniden zu den tertiären Aminen reagieren können. Im Zuge dieser Reaktion entstehen in hohen Ausbeuten die entsprechenden tertiären Amine.⁸² Die Entstehung der gewünschten primären Amine kann durch einen großen Überschuss an Ammoniak erreicht werden, zudem verhindern sterisch anspruchsvolle Substituenten die Weiterreaktion.⁸² Die Darstellung von **32** aus **25** mit wässriger Ammoniaklösung unter Reflux wurde beschrieben (Methode A).⁸¹ Die Übertragung dieser Reaktion auf die übrigen BODIPY-Derivate erwies sich als schwierig. Mögliche Ursachen liegen in der schlechten Löslichkeit der BODIPY-Derivate sowohl in wässriger Ammoniaklösung als auch in dem zugesetzten Methanol. Die drastischen Reaktionsbedingungen (4h, Reflux) könnten Zersetzungsreaktionen und die Bildung von Nebenprodukten (Methoxy-Derivate) forcieren. Eine mögliche Alternative bot sich durch mit Ammoniak gesättigte Lösungen organischer Lösungsmittel an. Versuche ergaben, dass die Sättigung von Ammoniak in Dichlormethan nicht ausreichte, um eine Umsetzung zu erreichen. Die Umsetzung in den kommerziell erhältlichen ammoniakalischen Methanol- bzw. Isopropanol-Lösungen war hingegen erfolgreich. Dabei führte die

Reaktion der Alkylbromide in 7N-ammoniaklicher Methanollösung unter Mikrowellen-Bestrahlung zu den besten Ergebnissen und es konnten praktisch keine Nebenprodukte nachgewiesen werden (Methode B). Die befürchtete Bildung sekundärer oder tertiärer Amine wurde nicht beobachtet. Vermutlich spielen neben dem hohen Überschuss an Ammoniak auch durch den voluminösen BODIPY-Grundkörper sterische Effekte eine entscheidende Rolle (Abb. 15).

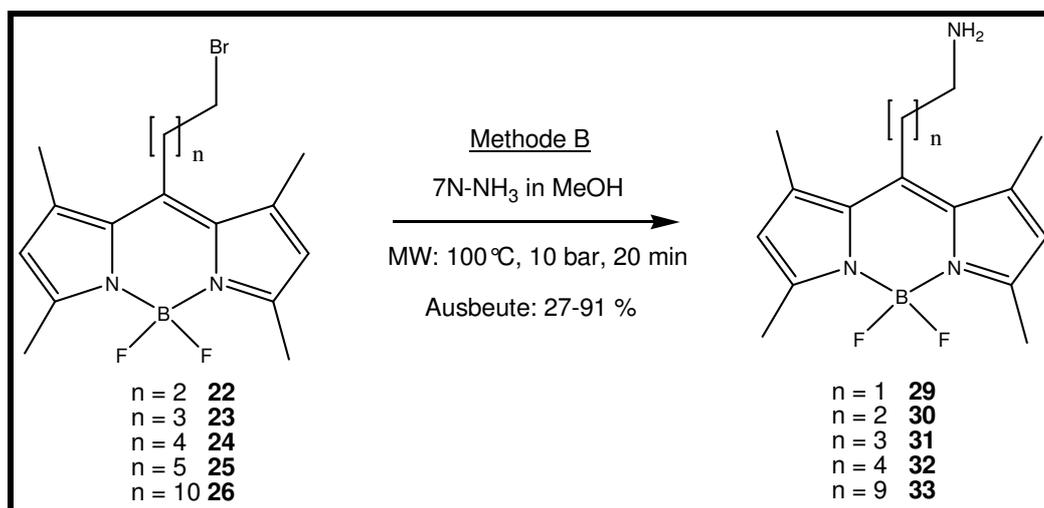


Abb. 15. Darstellung Amino-funktionalisierter BODIPY-Derivate

Die säulenchromatographische Aufreinigung mit dem Eluenten Dichlormethan : Methanol (40:1) erwies sich als sehr zeitaufwendig (Dauer bis zu 120 h). Versuche, die Elutionsgeschwindigkeit durch Flashchromatographie bzw. Änderung des Eluenten zu erhöhen, führten zu einer höheren Verunreinigung des Produktes. Eine deutliche Verbesserung der Auftrennung konnte durch eine einfache Fällungsreaktion erreicht werden. Das Rohprodukt wird in Dichlormethan angelöst, und durch Zugabe von Petrolether konnte das Amino-funktionalisierte BODIPY-Derivat in hohen Ausbeuten und mit hoher Reinheit isoliert werden (Abb. 16).

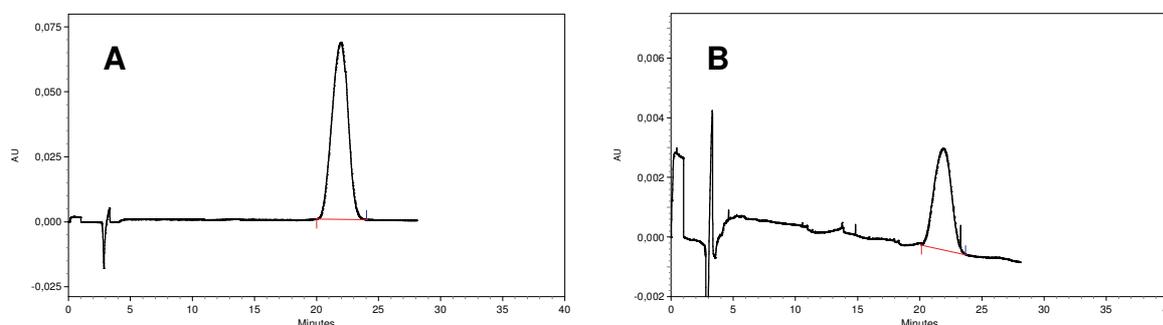


Abb. 16. Kapillarelektrophoretische Reinheitsbestimmung von 13 bei 478 nm (A) und 220 nm (B).

Bedingungen: Fused-silica-Kapillare (40 cm Länge, 30 cm zum Detektor), 40 mM Boratpuffer, 75 μ M I.D., 15 kV, UV-Messungen bei 495 und 220 nm, Temperatur: 25 °C.

In Tabelle 1 werden die Ergebnisse der Synthese von Amino-funktionalisierten BODIPY-Derivaten zusammengefasst.

Tabelle 1: Darstellung Amino-funktionalisierter BODIPY-Derivate

Verbindungsnummer	n	Methode ^a	Bedingungen	Ausbeute
29	2	B	80 °C, 20 min	27 %
30	3	B	100 °C, 20 min	72 %
31	4	B	100 °C, 20 min	56 %
32	5	A	4 h, 70 °C	55 %
		B	100 °C, 20 min	91 %
33	10	B	100 °C, 20 min	57 %

^aMethode A: wässrige Ammoniaklösung (37%), Methanol, 4h, 80 °C, Aufreinigung: Säulenchromatographie mit Kieselgel und dem Eluenten Dichlormethan : Methanol (40:1)⁸²

Methode B: 7N-ammoniakalische Methanollösung, MW: 100 °C, 10 bar, 20 min, Aufreinigung: Fällungsreaktion mit Petrolether

4.3. Darstellung wasserlöslicher BODIPY-Derivate

Es existieren viele zu markierende Liganden, die nur eine geringe Löslichkeit in organischen Lösungsmitteln besitzen. Für die Darstellung von fluoreszenzmarkiertem Adenosintriphosphat (ATP) beispielsweise ist es notwendig, wasserlösliche BODIPY-Strukturen zu verwenden, um Kopplungsreaktionen in wässrigem Medium zwischen ATP und Fluorophor zu ermöglichen. Da der BODIPY-Grundkörper ungeladen ist, sind die vorgestellten BODIPY-Derivate in wässrigem Medium praktisch unlöslich. Eine einfache Methode, die Hydrophilie aromatischer Strukturen zu erhöhen, stellt die Einführung einer Sulfonsäuregruppe dar. In der organischen Chemie sind solche Strukturelemente leicht durch die Umsetzung mit Chlorsulfonsäure oder Sulfurylchlorid zugänglich.⁸² Die Umsetzung eines BODIPY-Derivates mit Chlorsulfonsäure mit dem Ziel, wasserlösliche Strukturen darzustellen, wurde bereits 1985 von *Wories et al.* beschrieben.⁶³ Das Alkylbromid **25** wurde bei -20 °C in Dichlormethan gelöst und mit einem Überschuss an Chlorsulfonsäure versetzt. Durch Ausschütteln mit gesättigter Ammoniumcarbonatlösung konnte Produkt **34** nach Lyophilisation in hoher Ausbeute (86 %) isoliert werden (Abb. 17). Zur Verbesserung der Reinheit kann nach unvollständiger Lyophilisation eine

säulenchromatographische Trennung mit dem Eluenten Dichlormethan : Methanol 9:2, der mit 2% Triethylamin versetzt wurde, durchgeführt werden.

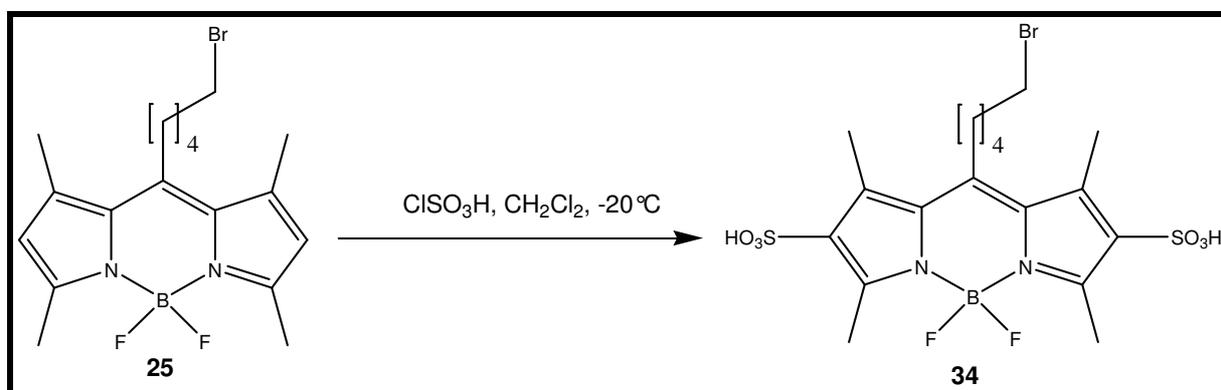


Abb. 17. Darstellung des wasserlöslichen BODIPY-Derivats **34**

Um eine breitere Variabilität an Kupplungsreaktionen mit wasserlöslichen BODIPY-Derivaten zu ermöglichen, sollten Amino-funktionalisierte wasserlösliche BODIPY-Derivate dargestellt werden. Die direkte Umsetzung eines Amino-substituierten-BODIPY-Derivats mit Chlorsulfonsäure wurde in Anbetracht der zu erwartenden Konkurrenzreaktion des primären Amines mit Chlorsulfonsäure nicht in Erwägung gezogen. Die sehr positiven Ergebnisse bei der Darstellung der lipophileren Amino-BODIPY-Derivaten aus den entsprechenden Alkylbromiden wurden auf die Synthese von **35** aus **34** übertragen. Unter Mikrowellenbestrahlung wurde **34** mit 7N-ammoniakalischem Methanol umgesetzt und anschließend mit Hilfe der Reversed-Phase-HPLC aufgereinigt. Ein angefertigtes ¹H-NMR-Spektrum zeigte interessanterweise ein Triplet bei 5.51 ppm, das für 1 H-Atom integrierte und es fehlte ein Signal für die 1'-Methylen-Gruppe (Abb. 18). Ein Massenspektrum ergab eine Masse von 492 g/mol und damit 1 g/mol weniger als für das Derivat **35** zu erwarten wäre. Mit Hilfe eines 2D-Spektrums konnte gezeigt werden, dass das Triplet mit einem für 2 H-Atome integrierenden Multipllett koppelt. Treibs und Kreuzer berichteten, dass negative Substituenten am Pyrrol-Kern durch ihre mesomeren und induktiven Effekte zu einer erhöhten CH-Acidität der Methen-Brücke führen. Durch den Borkomplex, der einen zusätzlichen elektronenziehenden Effekt ausübt, kann unter basischen Bedingungen ein farbloses Salz mit Ethylen-Struktur isoliert werden.⁶¹

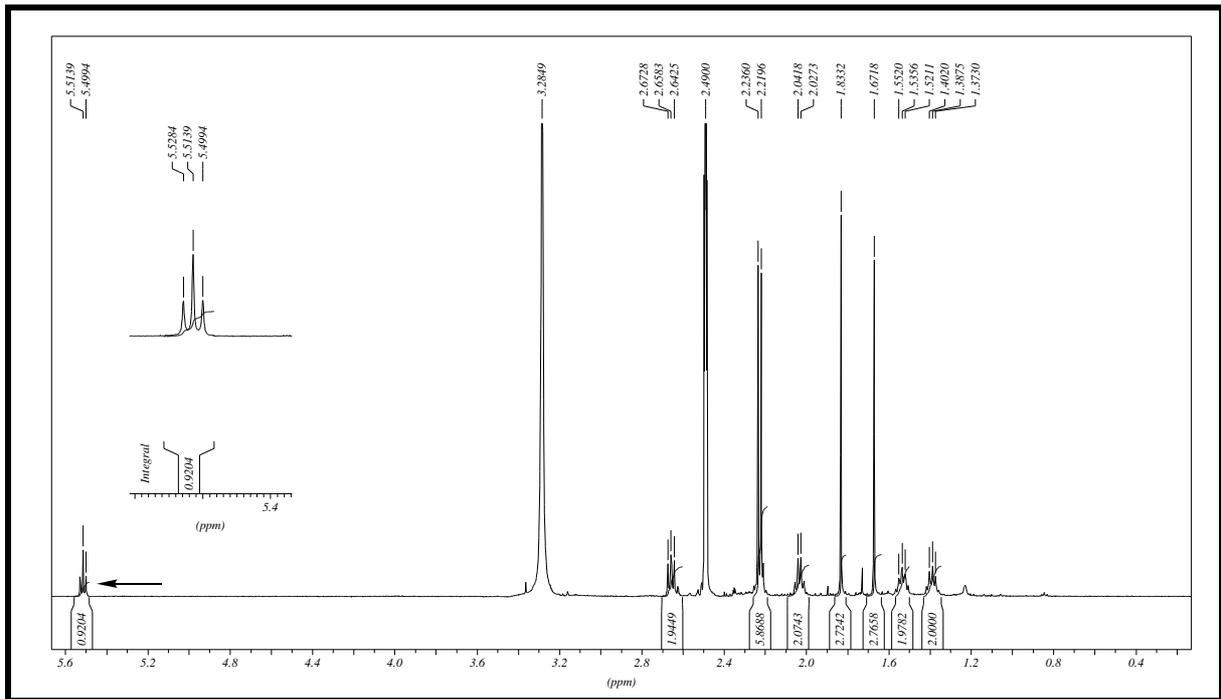


Abb. 18. $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von **36** mit Triplett bei 5.51 ppm

Die analytischen Ergebnisse verbunden mit diesen Erkenntnissen führten zur Identifizierung von Struktur **36**. Durch entsprechend saure Bedingungen lässt sich das gewünschte **35** aus **36** gewinnen (Abb. 19).⁶¹

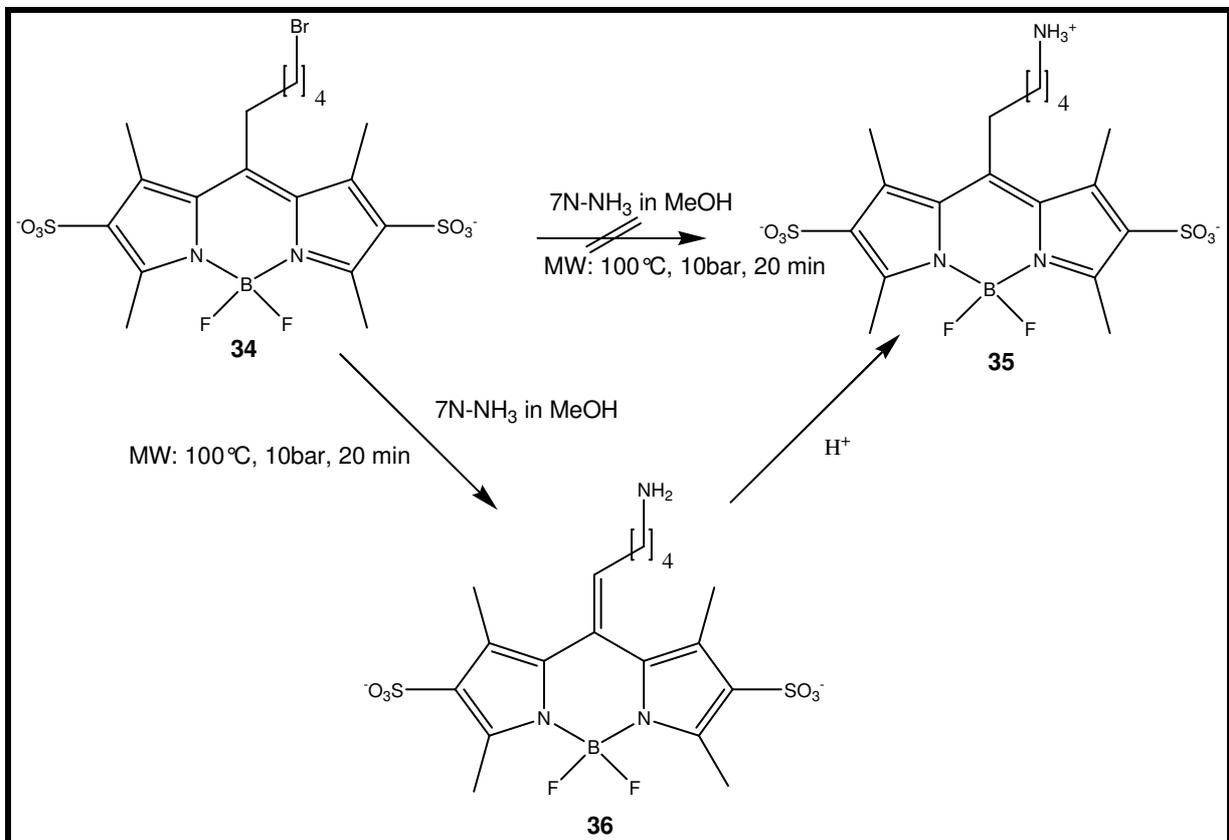


Abb. 19. Darstellung des wasserlöslichen BODIPY-Derivats **35**

5. Fluoreszenzmarkierung von Adenosinrezeptor-Liganden

5.1. Einleitung

Die Überlegung, dass im Körper spezifische Stellen existieren, die an Zelloberflächen sitzen, stammt von dem deutschen Forscher Paul Ehrlich aus dem 19. Jh. Er untersuchte die Interaktion von Stoffen mit solchen biologischen Strukturen.⁸³ Die spezifischen Stellen, auch Rezeptoren genannt, sind Proteine, die in der Lage sind, Liganden wie z.B. Hormone oder andere chemische Signalstoffe zu binden. Sie können in zwei große Gruppen unterteilt werden, die membranständigen und die nukleären Rezeptoren. Membranständige Rezeptoren sitzen an Zelloberflächen und leiten Informationen aus dem Zelläußeren in das Zellinnere. Bei den meisten membranständigen Rezeptoren führt die Interaktion zwischen dem Ligand und seinem Rezeptor zu einer Konformationsänderung des Rezeptors, wodurch es zu Interaktionen mit Effektorproteinen innerhalb der Zelle kommt. Bei den Ligand-gesteuerten Ionenkanälen bewirkt der Einstrom von Ionen das Signal. Bindet ein Stoff an einen Rezeptor und löst ein Signal aus, wird dieser Stoff als Agonist bezeichnet. Stoffe, die mit der Bindungstasche interagieren aber kein Signal auslösen, werden als Antagonisten bezeichnet. Durch diese Interaktion wird die Bindungstasche für Agonisten blockiert. Untersuchungen haben ergeben, dass für einen endogenen Liganden nicht nur ein spezifischer Rezeptor existiert, sondern zumeist mehrere.⁸⁴

5.1.1. Adenosinrezeptoren

1929 beschrieben *Drury und Szent-Györgyi*, dass Adenosin und Adenosin-5'-monophosphat biologische Effekte wie Herzstillstand, arterielle Gefäßverengung und Verringerung des Blutdruckes hervorrufen. Die beiden Stoffe konnten aus dem Herzmuskel isoliert werden.^{85,86} Damit gab es erste Hinweise auf die Existenz von Rezeptoren für Adenosin und seine Analoga. 1934 führte *Gillespie* erste Struktur-Wirkungsbeziehungsstudien von Adenosin-Derivaten durch. Er zeigte, dass eine Desaminierung von Adenosin zu einem massiven Wirkungsabfall führt.⁸⁷ In seiner Arbeit zeigte er erstmals die konträren Wirkungen von Adenosin und Adenosintriphosphat (ATP) im Herz-Kreislaufsystem von Kaninchen auf.⁸⁷ In den folgenden Jahrzehnten erfolgten viele Untersuchungen bzgl. der Wirkung von Adenosin in verschiedenen Zelltypen.^{85,88} Ein entscheidender Hinweis auf die biologische Bedeutung von Adenosin gelang 1963 *Berne und Gerlach et al.* mit

Studien, die zeigten, dass Adenosin im Herzen während einer Hypoxie freigesetzt wird und so eine wichtige Rolle in der reaktiven Hyperämie besitzen muss.^{89,90} Erste pharmakologische Hinweise auf die Existenz von Adenosinrezeptoren gab es 1970, indem *Sattin und Rall* den antagonistierenden Effekt von Methylxanthinen auf die Adenosin-vermittelte Freisetzung von 3',5'-Cycloadenosinmonophosphat (cAMP) beschrieben.⁹¹ Verschiedene Adenosinanaloga wurden 1974 synthetisiert und Untersuchungen zu deren dosisabhängiger Wirkung stützte die Hypothese von der Existenz der Adenosinrezeptoren.⁹² 1978 formulierte *Burnstock* die Hypothese zur Existenz von purinergen Rezeptoren, die er in zwei Klassen unterteilte: P1- und P2-Rezeptoren für Adenosin bzw. ATP.⁹³ Weitere Untersuchungen ergaben, dass zwei Adenosinrezeptorsubtypen existieren, A₁- und A₂-Rezeptoren. Die Unterscheidung basierte auf der Erkenntnis, dass Adenosin in Experimenten zum einen die Adenylatcyclase inhibierte (A₁) und zum anderen stimulierte (A₂).^{94,95} Nachfolgende Untersuchungen ergaben, dass der A₂-Rezeptor in zwei weitere Subtypen unterteilt werden muss: A_{2A} und A_{2B}.^{85,96} Die Entdeckung des vierten Adenosinrezeptors, des A₃-Adenosinrezeptors, gelang erst spät, als ihn *Meyerhoff* 1990 als Orphan-Rezeptor klonierte und *Zhou* ihn 1992 vollständig charakterisierte.^{85,97} Die Bezeichnung „Adenosinrezeptoren“ erhielten diese Rezeptoren nach ihrem endogenen Liganden, dem Adenosin.⁹⁷ Die Begriffe P1-Rezeptor und Adenosinrezeptor sind Synonyme.² Im folgenden wird der Begriff Adenosinrezeptor (AR) verwendet.

5.1.2. Struktur der Adenosinrezeptoren

Alle AR sind membranständige Rezeptoren, die zu der großen Familie der G-Proteingekoppelten Rezeptoren gehören. Wie andere Vertreter dieser Familie besitzen sie sieben transmembranäre Domänen, die aus hydrophoben Aminosäuren aufgebaut sind (Abb. 20).

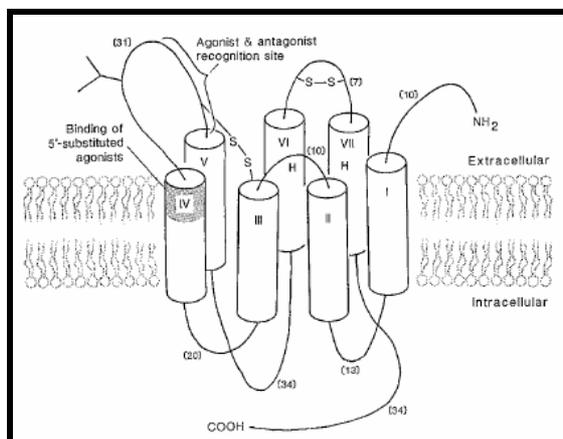


Abb. 20. Struktureller Aufbau von Adenosinrezeptoren⁸⁵

Davon bilden jeweils 21-28 Aminosäuren α -Helices.⁸⁵ Das N-terminale Ende liegt extrazellulär, das C-terminale Ende intrazellulär. Die Bindungstasche für Liganden wird durch die dreidimensionale Anordnung der α -Helices gebildet. Die transmembranären Domänen sind durch drei extrazelluläre und drei intrazelluläre Loops miteinander verknüpft (Abb. 20).

5.1.3. Adenosinrezeptoren: Verteilung und Signaltransduktionswege

AR werden in vielen verschiedenen Zellen im menschlichen Gewebe exprimiert. Dadurch bietet sich ein breites Potential dieser Rezeptoren als therapeutische Targets an. Tabelle 2 gibt einen Überblick über die Verteilung der verschiedenen Subtypen im menschlichen Gewebe.

Tabelle 2: Expression der Adenosinrezeptoren im menschlichen Gewebe^{85,98}

Expressionsdichte	A ₁	A _{2A}	A _{2B}	A ₃ ⁹⁹
Hoch	Gehirn (Cortex, Kleinhirn, Hippocampus), Rückenmark, Auge	Striatum, Milz, Thymus, Leukozyten, Blutplättchen, Bulbus olfactorius	Blinddarm, Darm, Blase	Lunge, Leber, Immunsystem
Mittel	Andere Regionen des Gehirns, Skelettmuskulatur, Herz, Leber, Fettzellen, Niere, Speiseröhre, Speicheldrüse, Dickdarm, Hoden	Herz, Lunge, Blutgefäße	Lunge, Auge, Blutgefäße, Mastzellen	Cerebellum, Hippocampus, Epiphyse
Niedrig	Bauchspeicheldrüse, Lunge	Andere Regionen des Gehirns	Fettzellen, Gehirn, Niere, Leber, Eierstock, Hypophyse	Schilddrüse, Gehirn, Milz, Niere, Herz, Darm, Hoden

Eine Aktivierung der Adenosinrezeptoren führt zu verschiedenen Reaktionen. Klassischerweise hat dies die Stimulation oder die Inhibierung der Adenylatcyclase zur Folge. Beim A₁AR verläuft ein Signaltransduktionsweg über die Aktivierung von Pertussis-Toxin-sensitiven G_i-Proteinen, die eine inhibitorische α-Untereinheit enthalten. Die Dissoziation der α-Untereinheit führt zu einer Hemmung der Adenylatcyclase, welche in der Folge weniger ATP in cAMP umwandelt, wodurch die intrazelluläre cAMP-Konzentration abnimmt. Dadurch wird die cAMP-abhängige Proteinkinase A beeinflusst, die verschiedene Substratproteine, wie Transkriptionsfaktoren, phosphoryliert.^{84,85,94,95} Ein weiterer Signaltransduktionsweg nach Aktivierung von A₁AR besteht in der Stimulation der Phospholipase C, wodurch die Konzentrationen der Second Messenger Inositoltrisphosphat (IP₃) und DAG erhöht werden. DAG aktiviert die Proteinkinase C und IP₃ führt durch Interaktionen mit spezifischen Rezeptoren am sarkoplasmatischen Retikulum zu einer Freisetzung von intrazellulärem Ca²⁺. Die freigesetzten Ca²⁺-Ionen können in vielfältiger Weise verschiedene Signalwege stimulieren.⁸⁵ Ferner wurde beschrieben, dass die Stimulation von A₁AR an Neuronen und Herzmuskelzellen zu einer Aktivierung von Pertussis-Toxin-sensitiven Kaliumkanälen und ATP-abhängigen Kaliumkanälen führt. In ähnlicher Weise verläuft der Signaltransduktionsweg der A₃AR, wobei bei diesem Rezeptorsubtyp die Beeinflussung von ATP-abhängigen Kaliumkanälen in Herzzellen nachgewiesen werden konnte.¹⁰⁰

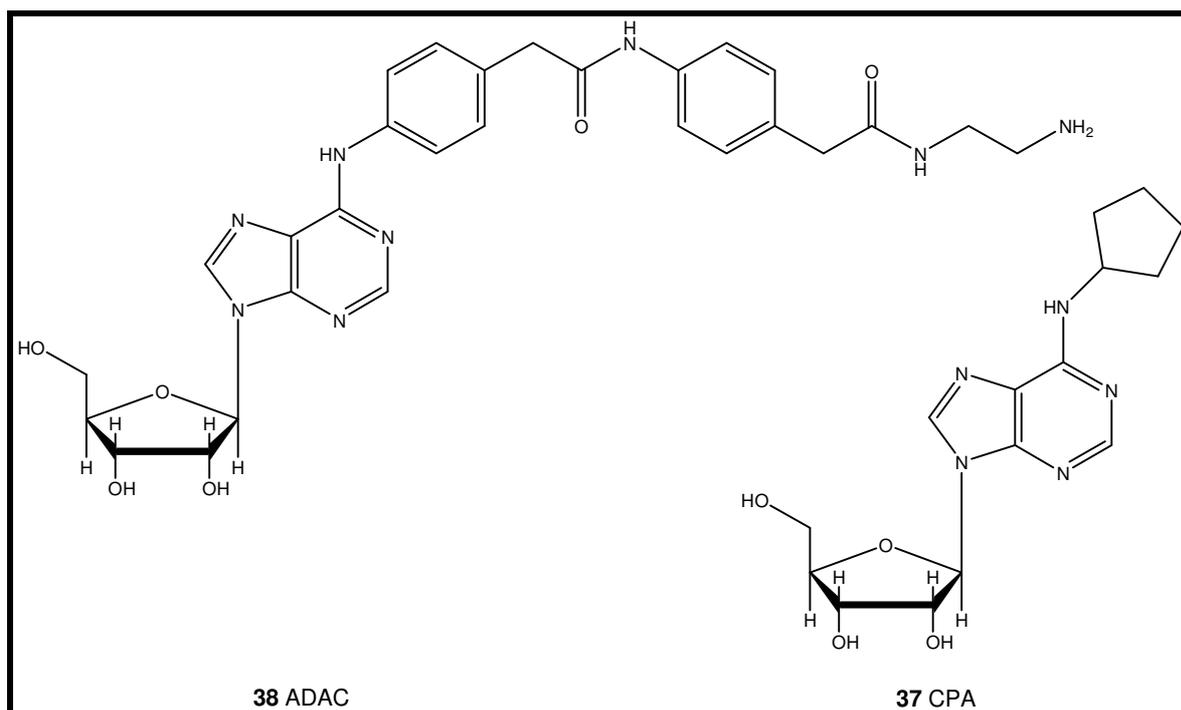
Die Aktivierung von A_{2A}AR verläuft über ein G_s-Protein, das über eine aktivierende α-Untereinheit verfügt. Diese dissoziiert vom G-Protein-Rezeptorkomplex und bindet an eine regulatorische Bindungsstelle der Adenylatcyclase, wodurch mehr ATP in cAMP umgewandelt wird. Die erhöhten cAMP-Konzentrationen führen zu einer Aktivierung der Proteinkinase A und zu Phosphorylierungen entsprechender Substratproteine (s.o.). Die Aktivierung von A_{2A}AR führt ebenfalls zu einer Stimulation der Phospholipase C (s.o.). Die wichtigsten Funktionen des A_{2B}AR werden über die Aktivierung der Phospholipase C vermittelt.^{101,102} AR stellen interessante Zielstrukturen bei der Entwicklung neuer Medikamente gegen diverse Krankheiten dar. Durch die Entwicklung neuer Agonisten bzw. Antagonisten kann das von den verschiedenen Rezeptorsubtypen ausgehende Signal entsprechend verstärkt bzw. inhibiert werden.

5.2. Adenosin-A₁-Rezeptoren

Der A₁AR ist der am besten untersuchte Subtyp der AR. Molekularbiologisch konnte er aus diversen Spezies durch Klonierung vollständig untersucht und charakterisiert werden. So gelang es 1989 *Libert et al.* den Rezeptor aus der Schilddrüse von Hunden zu klonieren und ihn 1991 zu charakterisieren.^{103,104} In den darauf folgenden Jahren gelang dies auch mit dem A₁AR aus Rind,¹⁰⁵ Ratte,¹⁰⁶ Maus,¹⁰⁷ Meerschweinchen¹⁰⁸ und Kaninchen¹⁰⁹ und mit dem humanen A₁-AR.¹¹⁰ Der humane A₁-AR besteht aus 326 Aminosäuren und besitzt zwischen den verschiedenen Spezies eine Sequenzhomologie von 90%.

5.2.1. Adenosin-A₁-Rezeptor-Agonisten

Generell zeigen Derivate des Adenosins höhere Affinitäten als die entsprechenden 1-Desazaadenosin- und 2'-Desoxyadenosin-Derivate.¹¹¹ Die Alkylierung der N⁶-Amino-Gruppe mit großen Substituenten wie z.B. Cycloalkyl- (CPA, **37**) und Phenylalkyl- oder substituierten Phenylresten, z. B. ADAC, (**38**) führt zu einer deutlichen Affinitätssteigerung am A₁AR, (K_i CPA 2,3 nM; K_i ADAC 0,85 nM), (Abb. 20).^{112, 113} Die Einführung einer polaren Hydroxyl-Gruppe in den Cyclopentylring von CPA wurde vom A₁AR gut toleriert (GR79236, **39**, K_i 3,1 nM).^{112,114} Der Austausch des Phenylringes durch einen Thiophenring führte zu RG14718 (**40**), einem potenten A₁AR-Agonisten mit einem IC₅₀-Wert von 5,7 nM in Gehirnzellen der Ratte (Abb. 21).



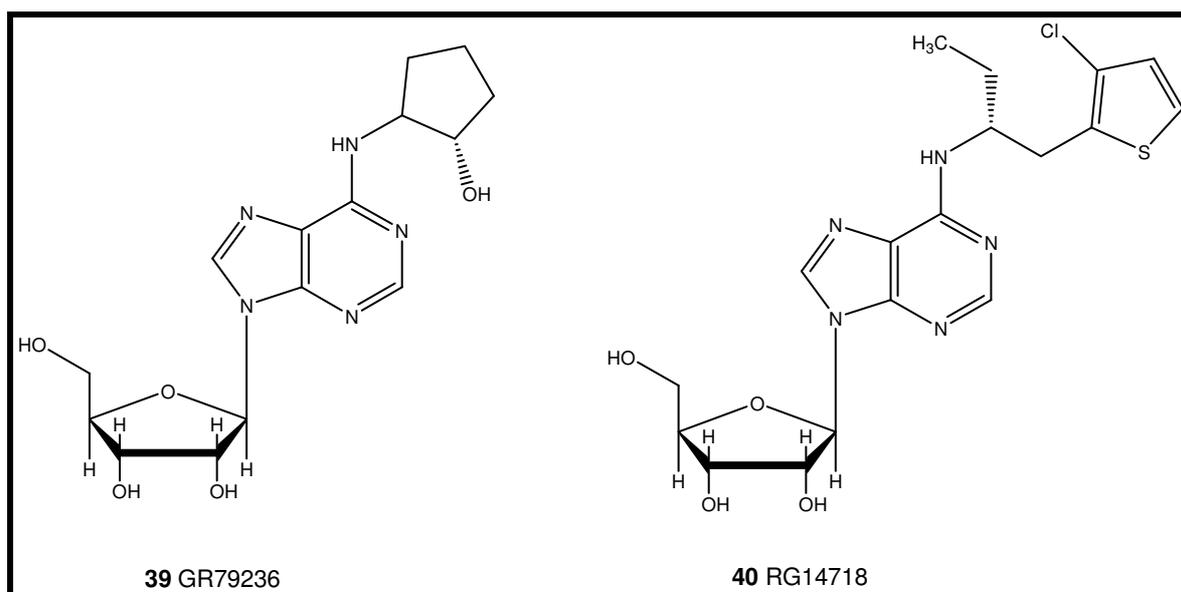


Abb. 21. A₁-Agonisten mit Modifikation an N⁶

Substitution des Wasserstoffatoms in Position 2 des Adenosins durch kleine polare Substituenten wie z.B. Chlor oder Iod werden vom A₁AR in der Regel toleriert. Das CPA-Derivat 2-Chlor-N⁶-cyclopentyladenosin (CCPA) besitzt eine höhere Affinität zum A₁-Rezeptor als CPA. Diese Beobachtung kann aber nicht generalisiert werden, da das Substitutionsmuster an N⁶ einen entscheidenden Einfluss auf die Affinität und Selektivität besitzt.¹¹² Modifizierungen am Riboserest des Adenosins führen bei der Substitution der 5'-Hydroxyl-Gruppe durch einen Ethylcarboxamidorest zu der literaturbekannten Struktur NECA, welche hohe Affinitäten zu allen Adenosinrezeptorsubtypen aufweist. Für die Entwicklung von A₁-Adenosinrezeptoragonisten kann folgendes Pharmakophor-Modell formuliert werden (Abb. 22).

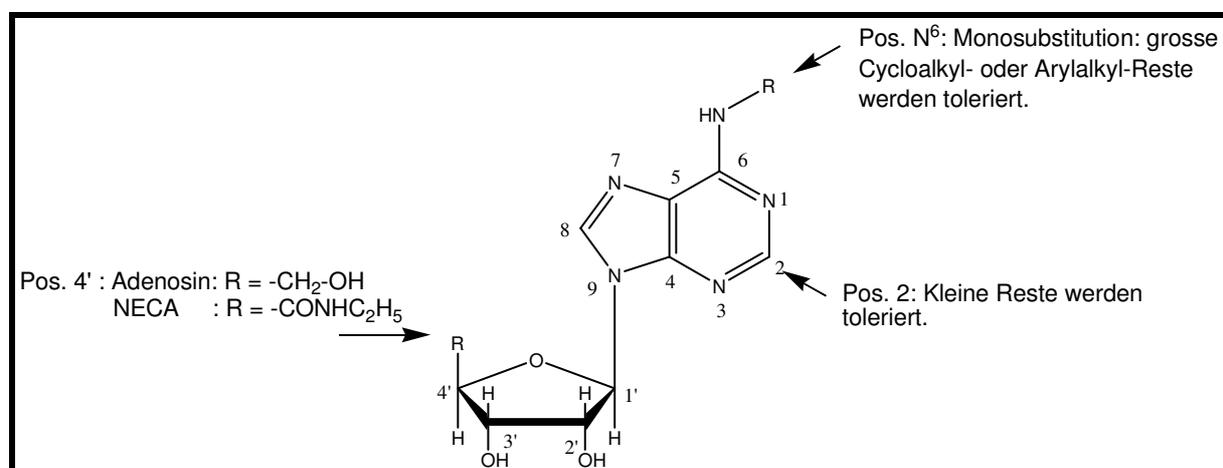


Abb. 22. Pharmakophor-Modell für Adenosin-A₁-Rezeptor-Agonisten¹¹²

5.2.2. Fluoreszenzmarkierte Adenosin-A₁-Rezeptor-Agonisten

Neue fluoreszenzmarkierte Liganden stellen wertvolle Werkzeuge für Untersuchungen der Rezeptor-Ligand-Interaktionen bzw. die Distribution von Liganden und Rezeptoren im Gewebe dar. Für den sehr gut untersuchten A₁AR wurden bereits 1998 fluoreszenzmarkierte A₁AR-Liganden beschrieben. Man erhielt die Verbindungen **41** - **46** durch Umsetzung von NECA mit einem Dansylfluorophor. Der Ligand und der Fluorophor sind durch einen Alkylspacer mit variabler Kettenlänge voneinander getrennt (Abb. 23). Es zeigte sich, dass Verbindung **43** die höchste Affinität (K_i 27 nM) und eine hohe Selektivität gegenüber den A₂AR und dem A₃AR besitzt. Interessanterweise zeigten die Derivate **45** und **46**, bei denen der Fluorophor über einen langen Alkylspacer mit NECA verknüpft ist, nur sehr geringe Affinitäten zu allen Rezeptorsubtypen.¹¹⁵ Ob die Verbindungen Vollagonisten oder partial Agonisten sind wurde nicht gezeigt.

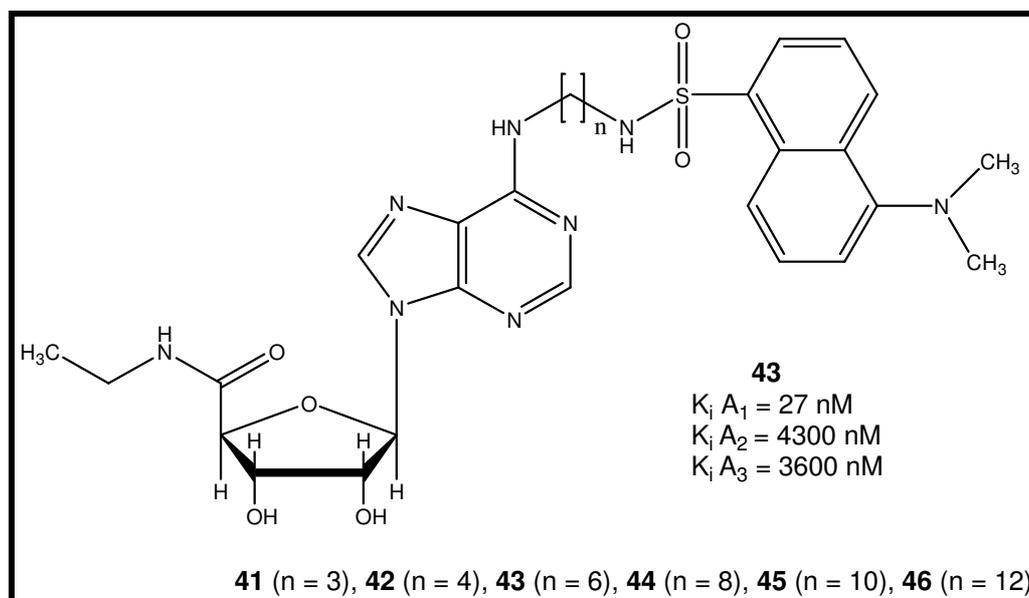


Abb. 23. Fluoreszenzmarkierte A₁AR-Agonisten mit einem Dansyl-Fluorophor

Dansyl ist wegen der geringen Fluoreszenzquantenausbeute in wässrigen Systemen (ϕ : 0.065) und einem geringen molaren Extinktionskoeffizienten (ϵ : 4.300 M⁻¹, cm⁻¹) nur bedingt als Fluorophor für biologische Untersuchungen geeignet.^{116,117} Es stellt zwar einen sehr kostengünstigen Fluorophor dar (Dansylchlorid: 22,30 € / 1 g), besitzt aber durch seine ungünstigen Fluoreszenzeigenschaften eine geringe Empfindlichkeit und kann daher in sensiblen biologischen Systemen, bei denen mit geringen Konzentrationen an Liganden gearbeitet wird, nur eingeschränkt eingesetzt werden. Das Absorptionsmaximum von Dansyl-Farbstoffen liegt bei 330 nm, sodass relativ energiereiches Licht eingestrahlt werden muss. Dies führte bereits bei der

Markierung eines Opioidrezeptors mit Dansyl-Enkephalin zu einer Zerstörung des Rezeptors.¹¹⁸

Die erste Verknüpfung eines Adenosinderivates mit einem BODIPY wurde 2004 in einem Patent beschrieben.¹¹⁹ 2007 wurden nähere Daten über die fluoreszenzmarkierten Liganden veröffentlicht. Dabei wurde als Fluorophor das kommerziell erhältliche BODIPY-Derivat 630/650-X-SE (325,40 € / 5 mg) verwendet. Als Adenosinderivate wurden sowohl NECA, als auch Adenosin eingesetzt, welche über die Position N⁶ durch Spacer verschiedener Kettenlänge mit dem Fluorophor verknüpft wurden (Abb. 24).¹²⁰

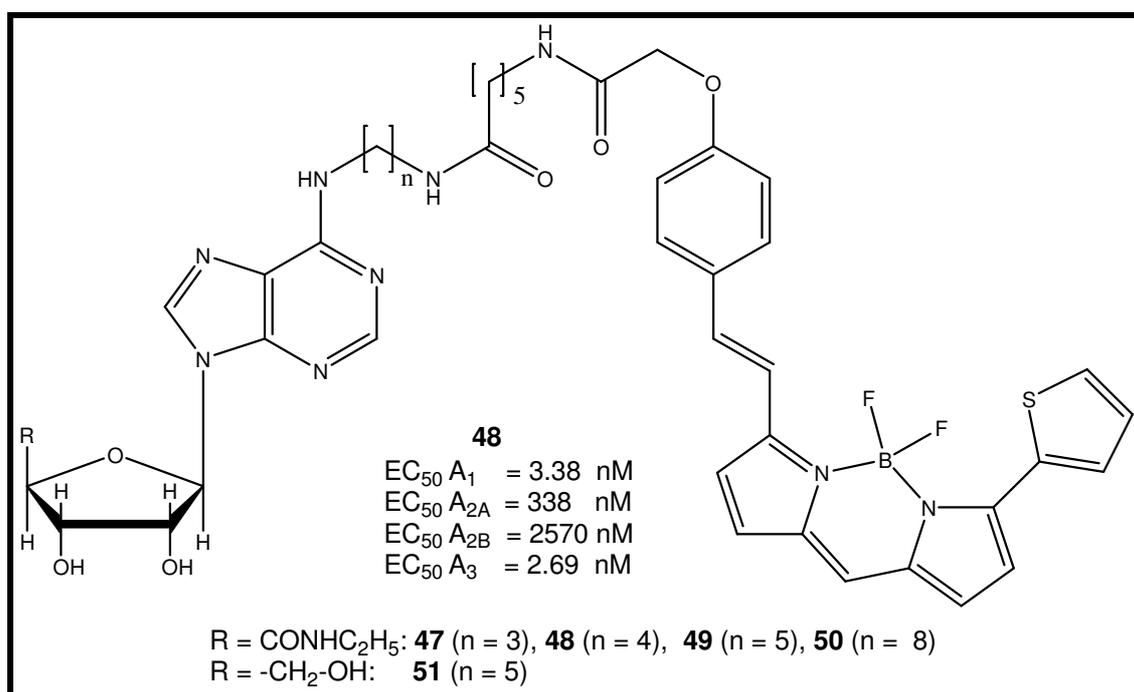


Abb. 24. BODIPY-markierte Adenosinrezeptor-Liganden

Funktionelle Assays an rekombinant in CHO-Zellen exprimierten humanen Adenosin-A₁-Rezeptoren haben ergeben, dass die Verbindungen **47** bis **49** sowie **51** die Forskolin-stimulierte Bildung von cAMP inhibierten. Alle Substanzen wurden in 10 µmolarer Konzentration eingesetzt. Sie erreichten dabei Werte von mehr als 90% Inhibition und lagen damit im Bereich der Referenzsubstanz NECA. Verbindung **50** zeigte mit einem Wert von 77 % unbefriedigende Ergebnisse. Substanz **48** besitzt eine EC₅₀-Wert von 3,38 nM und zeigt damit eine hohe Aktivität am A₁AR, ist aber unselektiv da sie ebenfalls hohe Affinitäten zum A₃AR besitzt (EC₅₀ : 2,56 nM). Die EC₅₀-Werte der Vergleichssubstanz NECA lagen in dem Testsystem bei 0,36 nM (A₁AR), 17,9 nM (A_{2A}AR), 3630 nM (A_{2B}AR) und 4.57 nM (A₃AR). In Radioligand-Bindungsstudien, die an ganzen Zellen durchgeführt wurden, konnte keine

vollständige Verdrängung des Antagonisten [³H]DPCPX an intakten Zellen nachgewiesen werden. Als mögliche Erklärung dieser Ergebnisse vermuteten die Autoren, dass die Verbindungen, im Gegensatz zum Radioliganden, die Biomembran nicht passieren und daher den Radioliganden von intrazellulären Bindungsstellen nicht verdrängen können. Warum keine Bindungsstudien an Membranpräparationen durchgeführt wurden, um diese Hypothese zu bestätigen ist nicht bekannt. Die vorgestellten Substanzen zeigten alle keine optimalen Eigenschaften für eine Anwendung als potentielle hochaffine, selektive fluoreszenzmarkierte A₁AR-Liganden.

5.2.3. Problemstellung

Die im vorherigen Kapitel diskutierten Ergebnisse zeigten, dass zurzeit keine selektiven, hochaffinen A₁AR-Agonisten existieren, die für weitere Charakterisierungen dieses Rezeptorsubtypes verwendet werden können. Indiskutabel ist auf Grund des exorbitant hohen Preises und der voluminösen, lipophilen Struktur die Verwendung des kommerziell erhältlichen BODIPY 630/650-X-SE. In Kapitel 4 wurde die Herstellung neuer BODIPY-Fluorophore vorgestellt, die als mögliche Verknüpfungsstelle ein Alkylbromid oder ein primäres Amin bieten. Das Hauptziel dieses Projektes ist die Darstellung eines Fluoreszenz-markierten selektiven, hochaffinen Vollagonisten am A₁AR.

5.2.4. Darstellung fluoreszenzmarkierter A₁-Liganden

Als Grundkörper für die Darstellung des A₁AR-Agonisten wählten wir Adenosin. Dabei griffen wir auf Erkenntnisse bei der Entwicklung selektiver, hochpotenter A₁AR-Agonisten zurück. Es hatte sich gezeigt, dass die potentesten, selektivsten Agonisten eine N⁶-Substitution des Adenosins benötigen und die Derivatisierung zu einem NECA-Derivat nicht zwingend erforderlich ist. Wie die Ergebnisse von *Hill et al.* zeigten, besitzen die fluoreszenzmarkierten NECA-Derivate keine Selektivität zwischen dem A₁AR und dem A₃AR. Die Darstellung von N⁶-substituierten Adenosin-Derivaten wird in der Literatur beschrieben.^{121,122,123,124} Für die Fluoreszenz-Markierung erschien es sinnvoll, ein N⁶-substituiertes Adenosin-Derivat zu synthetisieren, das eine funktionelle Gruppe enthält, über die es mit dem BODIPY-Fluorophor verknüpft werden kann. Bei der Darstellung von N⁶-alkylierten Adenosinderivaten wird im Allgemeinen als Ausgangsmaterial 6-Chloradenosin verwendet. Diese Verbindung ist zwar kommerziell erhältlich, für den präparativen

Maßstab allerdings zu teuer (5 g / 362 €). 6-Chloradenosin kann leicht aus Inosin (**52**, 25 g / 49.30 €) hergestellt werden. Für die Darstellung wurde eine modifizierte Synthese von *Buck et al.* angewendet.¹²² Dabei wurde ein als Triacetat geschütztes Inosin mit Phosphoroxychlorid zum 6-Chloradenosin umgesetzt. Diese Darstellung erfolgt in zwei Stufen. Zunächst wird gut getrocknetes Inosin in Acetonitril mit einer Base und Acetylchlorid umgesetzt. Als Base wurde abweichend von der vorliegenden Vorschrift Ethyldimethylamin (EDMA) anstelle des Pyridins eingesetzt. EDMA besitzt nur einen sehr geringen Siedpunkt (34-36 °C) und kann damit leicht durch Destillation quantitativ wieder entfernt werden. Das Acetylchlorid reagiert im Zuge einer Addition-Eliminierung mit den Hydroxyl-Gruppen des Zuckers zu den entsprechenden Acetylestern. Die Reaktion ist bereits nach wenigen Minuten beendet, als Indikator kann dabei das Aufklaren der Reaktionslösung dienen. Überschüssiges Acetylchlorid wird durch Zugabe von Methanol gebunden. Nach Umkristallisation aus Isopropanol wurde 2',3',5'-Triacetylinosin **53** in sehr guten Ausbeuten (94 %) erhalten (Abb. 25).

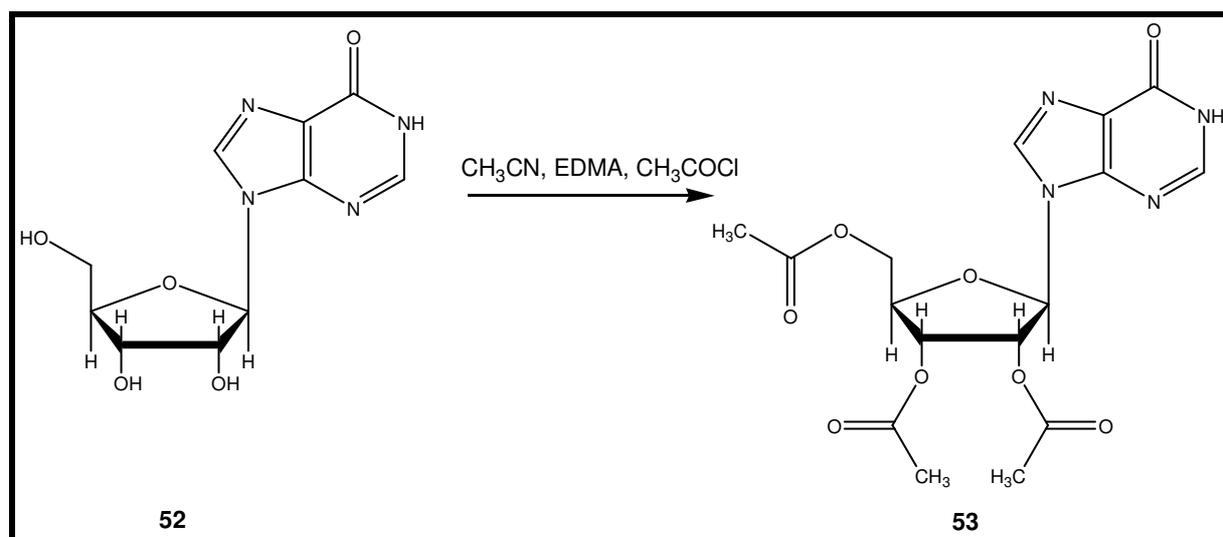


Abb. 25. Darstellung von 2',3',5'-Triacetylinosin

Für die anschließende Chlorierung ist es zwingend erforderlich, unter wasserfreien Bedingungen zu arbeiten. Am zweckmäßigsten ist dabei der Verzicht auf die Verwendung eines Lösungsmittels sowie die Trocknung von **53** für vier Stunden bei 140°C. Das Phosphoroxychlorid sollte frisch destilliert werden. **53** wurde in einem Überschuss an Phosphoroxychlorid mit N,N-Dimethylanilin versetzt und bis zum Auftreten einer klaren, orangefarbenen Lösung unter Rückfluss gekocht. Dieser Vorgang dauerte nur wenige Minuten. Die heiße Reaktionsmischung wurde abgekühlt und bei 40°C vom überschüssigen Phosphoroxychlorid befreit. Nach

erfolgter Hydrolyse mit Eis wurde die wässrige Phase mit Dichlormethan ausgeschüttelt. Bei der anschließenden Aufreinigung wurde mit verdünnter Salzsäure, Wasser und Natriumchloridlösung ausgeschüttelt, allerdings nicht mit Natriumhydrogencarbonatlösung, da dies zu einer Rückreaktion zu **52** führte. **54** wurde in guten Ausbeuten (50 %) erhalten (Abb. 26).

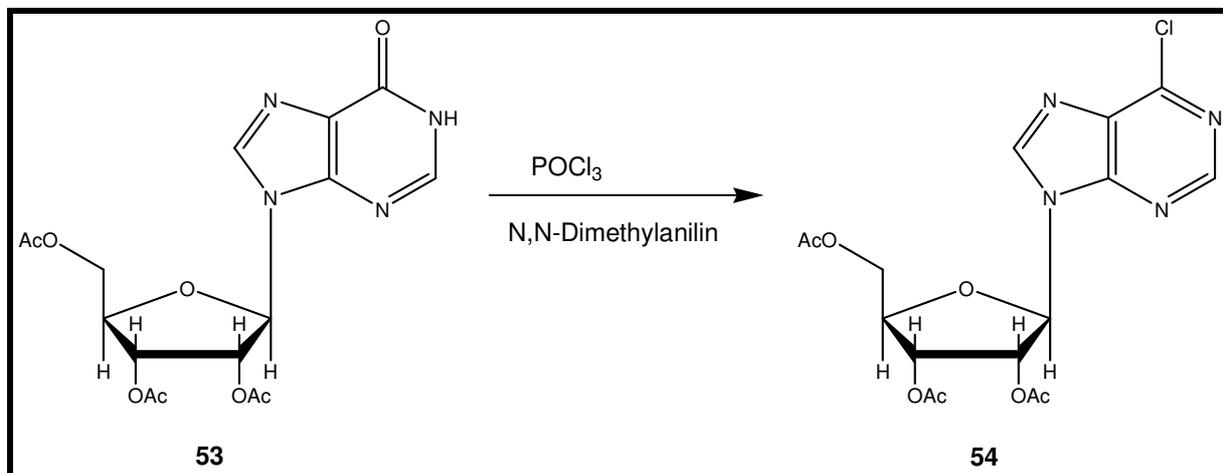


Abb. 26. Darstellung von 6-Chlor-2',3',5'-triacetyladenosin

Die direkte Umsetzung von **54** mit einem BODIPY-Derivat ist nicht sinnvoll, da in der Literatur beschrieben wird, dass die einzuführenden Amine in hohem Überschuss eingesetzt werden müssen, die BODIPY-Amine hierfür aber zu kostbar sind.¹²² Als mögliche Syntheserouten wurden drei Strategien entwickelt, um einen fluoreszenzmarkierten A₁AR-Agonisten zu erhalten. Route A sah vor, **54** mit einem Überschuss an Aminopropanol zu versetzen, um anschließend die Alkoholfunktion **55** zu einer Carbonsäure **56** zu oxidieren, die dann mit einem Amino-BODIPY-Derivat verknüpft werden kann (Abb. 27).

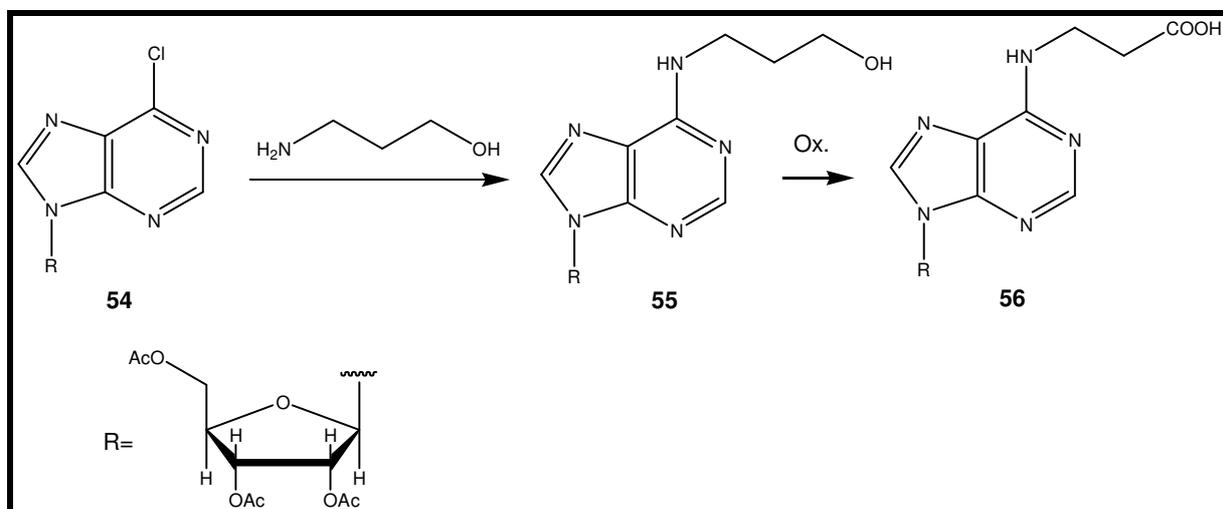


Abb. 27. Syntheseroute A zur Darstellung BODIPY-markierter Adenosinrezeptor-Agonisten

Die Zugabe des Aminopropanols erfolgte bei -20 °C, da bei höheren Temperaturen eine mit Rauchentwicklung verbundene Zersetzung von **54** zu beobachten war. Durch säulenchromatographische Auftrennung konnte ein Produkt in guten Ausbeuten isolieren. Die spektroskopische Identifizierung der isolierten Verbindung ergab allerdings, dass es sich um Struktur **57** handelte (Abb. 28). Aus den Versuchen kann geschlossen werden, dass selbst unter diesen extrem milden Bedingungen die Schutzgruppen komplett entfernt worden sind. Verbindung **57** konnte nicht wie vorgesehen zu einer Carbonsäure oxidiert werden, da durch die Abspaltung der Schutzgruppen die freien Hydroxyl-Gruppen des Riboserestes auch oxidiert werden würden. Aus diesem Grund wurde diese Syntheseroute verworfen.

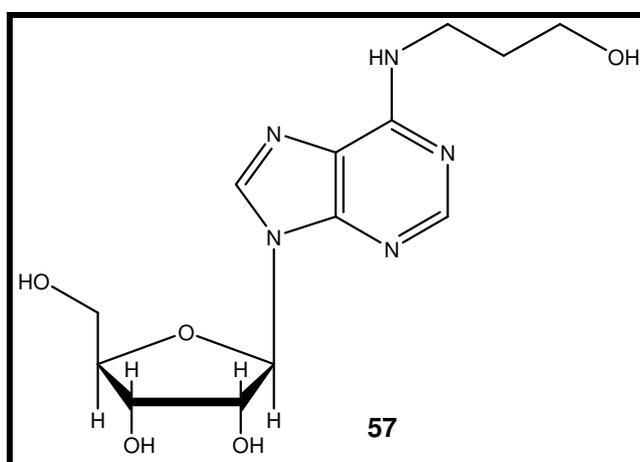


Abb. 28. Syntheseroute A: Endprodukt **57**

Eine weitere Möglichkeit bestand in der Umsetzung von **54** mit einer ω -Aminocarbonsäure, wodurch gleichzeitig eine funktionelle Gruppe eingeführt werden würde, die sofort eine Verknüpfung mit einem BODIPY ermöglichen sollte. Die Umsetzung von γ -Aminobuttersäure bei -20 °C mit **54** führte zu keiner Umsetzung. In der Literatur wird beschrieben, dass ähnliche Amine durch Zugabe einer Hilfsbase erfolgreich mit **54** umgesetzt werden konnten.¹²³ Sukzessive Erhöhung der Reaktionstemperatur führte unter den gegebenen Bedingungen zu einer Zersetzung der Reaktionspartner. Problematisch sind die unterschiedlichen Löslichkeiten von **54** und der γ -Aminobuttersäure. *Jacobsen et al.* beschrieben die Umsetzung von **54** mit ω -Aminoalkyl- bzw. -Arylcarbonsäuren.¹²⁵ Die Umsetzung erfolgt in einem Gemisch aus Ethanol/Triethylamin/Wasser über 72 h bei hohen Temperaturen. Unter diesen Bedingungen konnte **54** mit γ -Aminobuttersäure zu **58** umgesetzt werden. Die überschüssige γ -Aminobuttersäure konnte durch Fällungsreaktion aus Ethanol entfernt werden. Durch anschließende Umkristallisation aus einem Ethanol-

Diethylether-Petrolether-Gemisch konnte **58** in guten Ausbeuten in hoher Reinheit dargestellt werden. Auf analoge Art und Weise konnte **54** mit 6-Aminohexansäure zu **59** und mit 4-(Aminomethyl)benzoesäure zu **60** umgesetzt werden. Die Schutzgruppen wurden analog zu den Beobachtungen bei der Darstellung von **57** durch die Reaktionsbedingungen abgespalten. Mit diesen drei Carbonsäurederivaten stehen Adenosinderivate zur Verfügung, die mit einem BODIPY-Amin verknüpft werden können (Abb. 29).

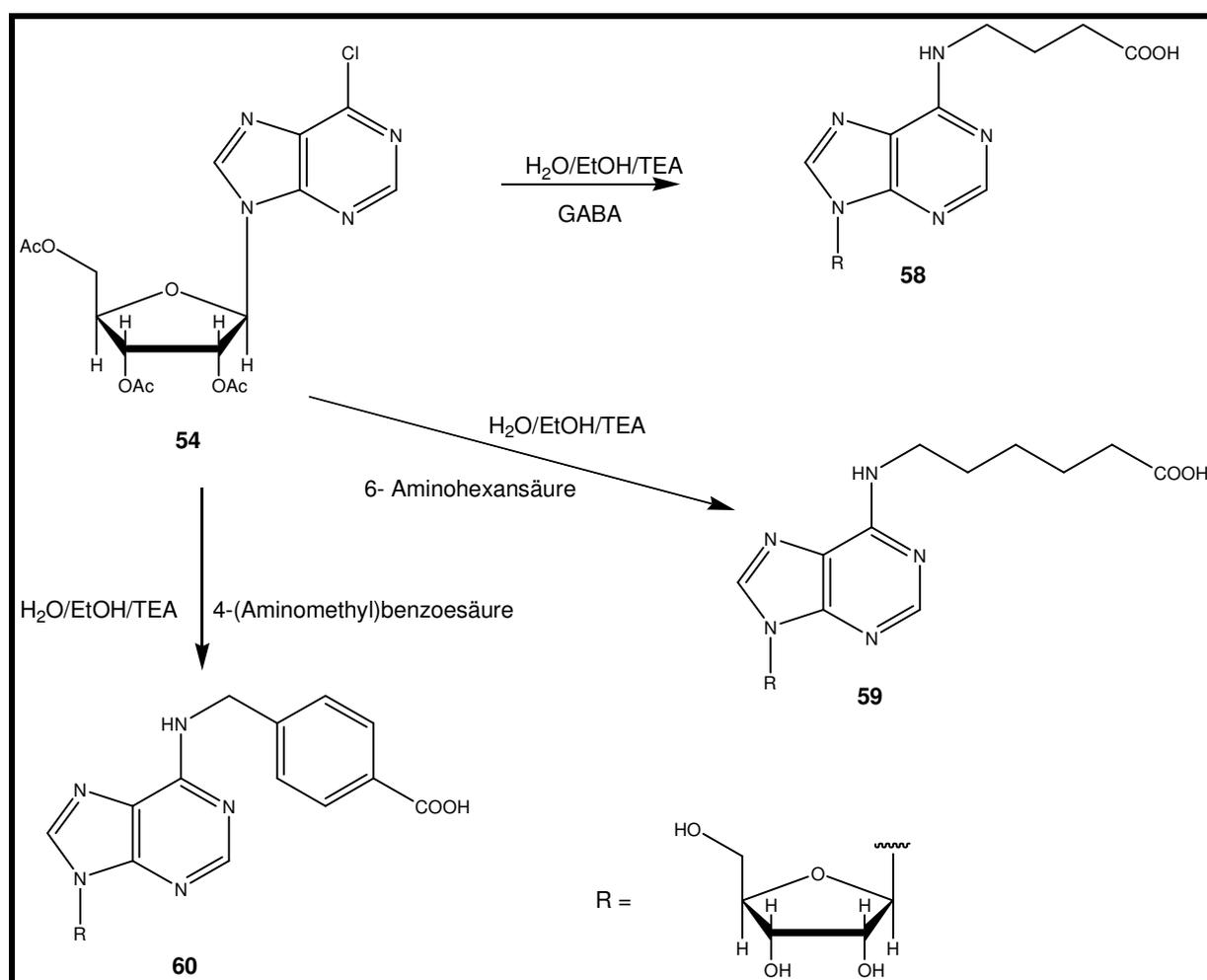


Abb. 29. Syntheseroute B: Darstellung von **58**, **59** und **60**

Syntheseroute C beinhaltet die Umsetzung von **54** mit Ethylendiamin zu **61** (Abb. 30). Die Reaktionstemperatur musste auf -20°C eingestellt werden, da es bei höheren Temperaturen analog zu Route 1 zu einer heftigen exothermen Reaktion kam, die zur Zersetzung der Reaktionspartner führte. Das überschüssige Ethylendiamin wurde durch Destillation im Hochvakuum entfernt. Als nächster Reaktionsschritt sollte das freie primäre Amin **61** so derivatisiert werden, dass

anschließend eine Umsetzung mit den BODIPY-Aminen möglich ist. Die direkte Umsetzung von primären Aminen mit Anhydriden führt nicht zu den entsprechenden Carbonsäuremonoamiden, sondern ergibt die entsprechenden Imide.⁸² Als Alternative bot sich die Darstellung eines Monoesters einer Dicarbonsäure an, um die zweite freie Säurefunktion mit dem primären Amin **61** zu verknüpfen. Eine geeignete Substanz schien Bernsteinsäuremonobenzylester (**62**) zu sein, da Benzylester anschließend leicht durch Reduktion zu spalten sind. Die literaturbekannte Verbindung war durch die Reaktion von Bernsteinsäure mit Benzylalkohol in Gegenwart von Dimethylaminopyridin zugänglich.¹⁶⁵ Die Verknüpfung von **61** mit dem Bernsteinsäuremonobenzylester (**62**) konnte durch Umsetzung mit 2-(7-Aza-1H-benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium (HCTU)/1-Hydroxybenzotriazol (HOBT) in Dimethylformamid durchgeführt werden. Nach säulenchromatographischer Aufreinigung konnte **63** erhalten werden (Abb. 28).

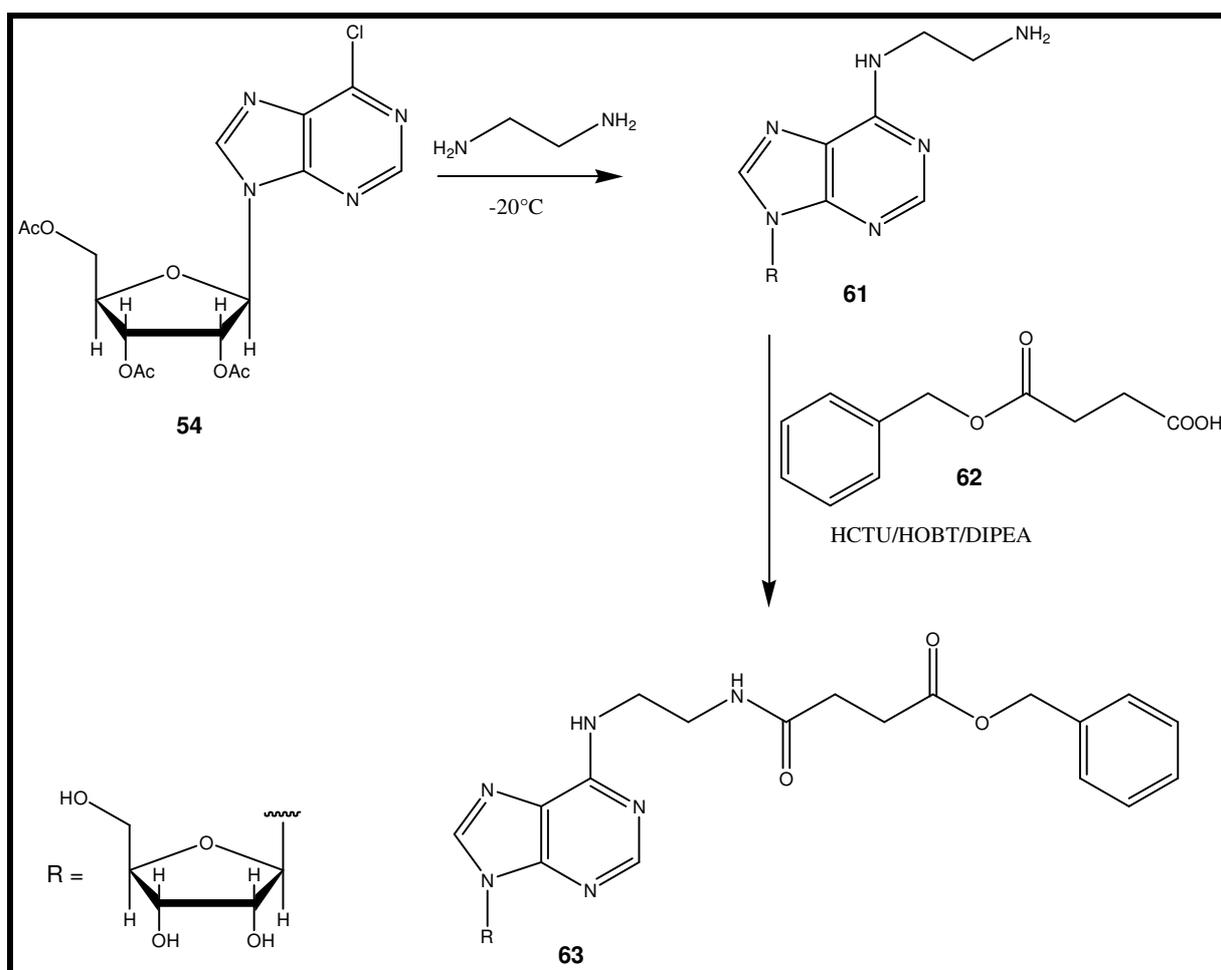


Abb. 30. Syntheseroute C: Darstellung von **61** und **62**

Die Umsetzung erfolgte mit nur mäßigen Ausbeuten (12%), so dass die Weiterentwicklung der Syntheseroute B präferiert wurde. Zunächst wurde **59** in einer

Modellreaktion mit Phenylbutylamin umgesetzt, um optimale Versuchsbedingungen für die Verknüpfung der Carbonsäure **59** mit einem BODIPY-Amin zu entwickeln. Die besten Ergebnisse lieferte die Reaktion mit den Kupplungsreagenzien HCTU/HOBT in Gegenwart von Hünig-Base in trockenem Dimethylformamid in einer Argonatmosphäre. Die Aufreinigung war mit Hilfe klassischer Säulenchromatographie erfolgreich. Produkt **64** konnte mit 19 %iger Ausbeute dargestellt werden (Abb. 31). Die Modellsubstanz zeigte in Radioligand-Bindungsstudien günstige pharmakologische Eigenschaften. Sie besitzt eine hohe Affinität zum A₁AR und hohe Selektivitäten gegenüber den anderen Adenosinrezeptorsubtypen (s. Kapitel 5.2.5.)

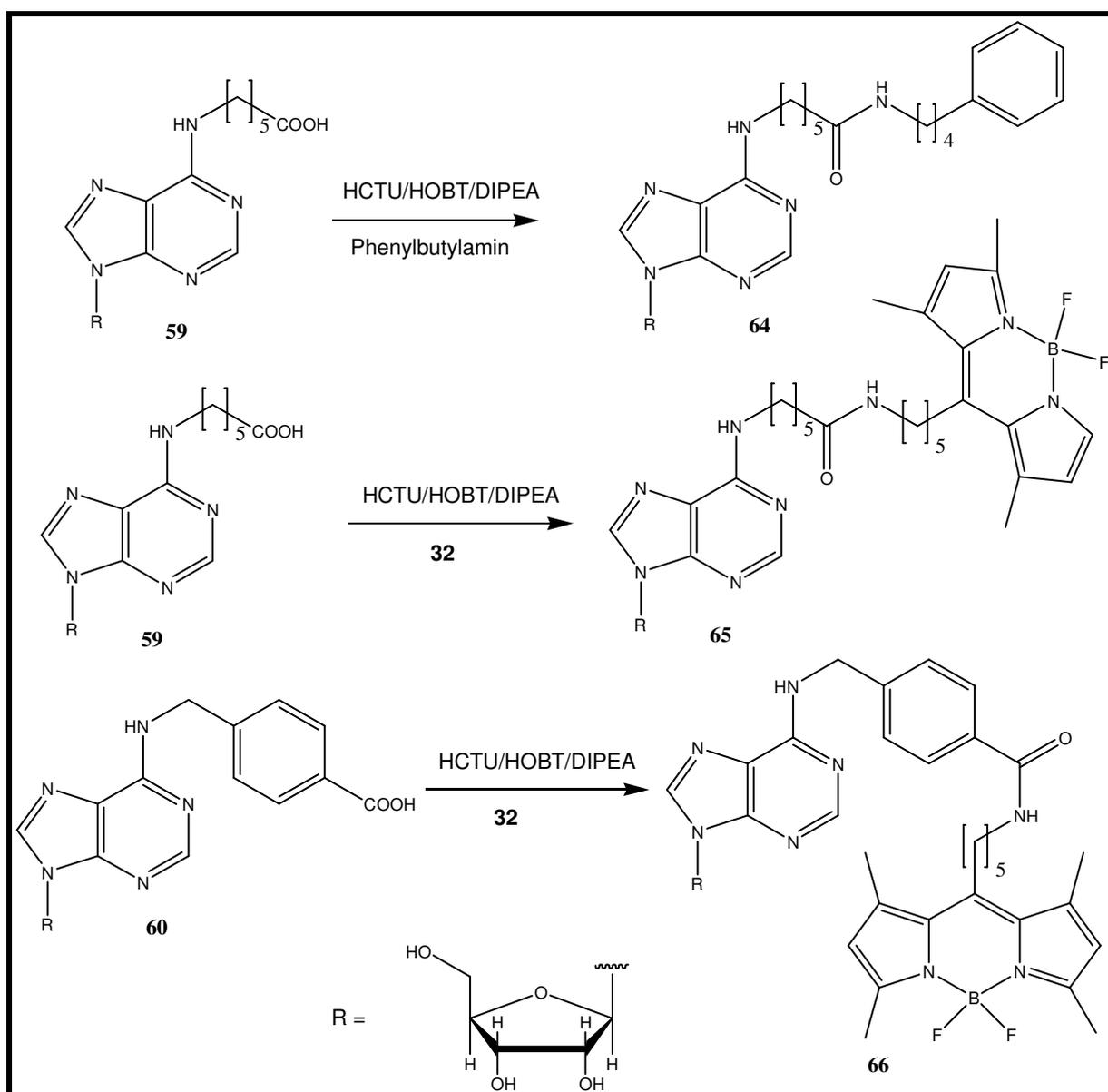


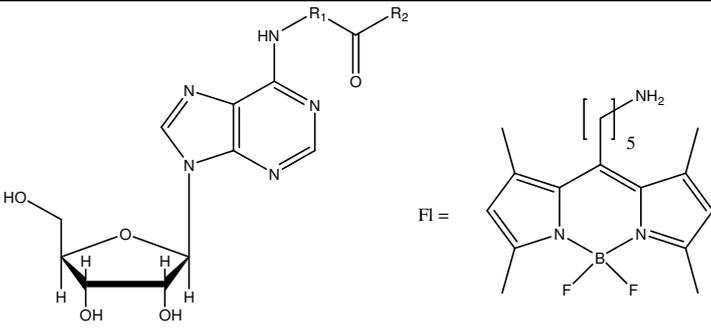
Abb. 31. Darstellung der Modellsubstanz **63** und der fluoreszenzmarkierten Adenosin-A₁-Rezeptor-Agonisten **64** und **65**

Die Reaktionsbedingungen ließen sich auf die Darstellung der BODIPY-gekuppelten Liganden übertragen. Die Umsetzung von **58** mit **32** konnte zwar mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie nachvollzogen werden, es war aber nicht möglich, das Produkt in reiner Form zu isolieren. Die Auftrennung durch klassische Säulenchromatographie war durch die sehr ähnlichen R_f-Werte von **32** und dem Produkt nicht möglich, so konnten nur Gemische isoliert werden. Die Trennung mittels Reversed-Phase-Chromatographie ist ebenfalls nicht möglich, da **32** in dem verwendeten Eluenten Wasser praktisch unlöslich ist. Die Aufreinigung von **65** und **66** konnte durch klassische Säulenchromatographie und anschließende Fällung aus Ethanol durch Zugabe von Petrolether und Diethylether erfolgen. Die Substanzen **65** und **66** konnten damit in hoher Reinheit und mit mäßigen Ausbeuten (10-15 %) dargestellt werden.

5.2.5. Pharmakologische Eigenschaften

Die neu entwickelten Verbindungen wurden in Radioligand-Bindungsstudien an Rattenhirn A₁- und A_{2A}- Adenosinrezeptoren mit [³H]-Cyclopentyladenosin (CPA) bzw. [³H]3-(3-Hydroxypropyl)-7-methyl-8-(*m*-methoxystyryl)-1-propagylxanthin (MSX-2) als Radioliganden getestet. Zusätzlich wurden alle Verbindungen an humanen rekombinanten A₃-Adenosinrezeptoren mit dem A₃-selektiven antagonistischen Radioliganden [³H]2-Phenyl-8-ethyl-4-methyl-(8R)-4,5,7,8-tetrahydro-1H-imidazo[2,1-*f*]purin-5-on (PSB-11) untersucht. In Tabelle 2 sind die Ergebnisse der Radioligandbindungsstudien aller neu synthetisierten Liganden zusammengefasst. Der Fluorophor wird vom A₁AR gut toleriert. Die Verbindungen **65** und **65** zeigen in Radioligand-Bindungsstudien hohe Affinitäten zum A₁AR. Die freien Carbonsäuren weisen deutlich geringere Affinitäten gegenüber dem A₁AR als die entsprechenden Amide auf. Die Einführung eines BODIPY-Restes erhöht die Affinität der Verbindungen um den Faktor 35 (vgl. **59** und **65** bzw. **60** und **66**). Die dargestellte Modellsubstanz **64** besitzt eine geringere Affinität als die mit einem BODIPY markierte Substanz **65**. Beide fluoreszenzmarkierten Derivate verfügen über eine ausreichende Selektivität gegenüber dem A_{2A}AR und dem A₃AR. Substanz **65** besitzt eine 50fache Selektivität gegenüber dem A_{2A}AR und eine 295fache Selektivität gegenüber dem A₃AR. Verbindung **66** ist mit 262facher Selektivität gegenüber dem A_{2A}AR und 177facher Selektivität gegenüber dem A₃AR noch selektiver

Tabelle 3. Rezeptor-Affinitäten der Edukte und der Fluoreszenz-Liganden

					
Verbindung	R ₁	R ₂	K _i + SEM [nM] (oder Inhibition in % bei Konzentration 10 μM, n = 3)		
			A ₁ Ratte [³ H]CCPA	A _{2A} Ratte [³ H]MSX-2	A ₃ Mensch [³ H]PSB11
58	-(CH ₂) ₃ -	-OH	671 ± 51	> 10000 (20 ± 14)	> 10000 (35 ± 7)
59	-(CH ₂) ₅ -	-OH	517 ± 68	> 10000 (29 ± 4)	> 10000 (27 ± 10)
60	-CH ₂ -C ₆ H ₅ -	-OH	1020 ± 110	> 10000 (30 ± 13)	> 10000 (12 ± 6)
65	-(CH ₂) ₅ -	-NH-(CH ₂) ₅ -FI	14.7 ± 2,2	710 ± 150	4320 ± 850
66	-CH ₂ -C ₆ H ₅ -	-NH-(CH ₂) ₅ -FI	28.3 ± 5,9	7420 ± 1430	5010 ± 120
64	-(CH ₂) ₅ -	-NH-(CH ₂) ₄ -C ₆ H ₅	56.7 ± 11,3	7540 ± 1610	3530 ± 270
63	-(CH ₂) ₂ -NH-	-(CH ₂) ₂ -CH ₂ -C ₆ H ₅	450 ± 24	> 10000 (16 ± 9)	> 10000 (26 ± 8)

Der Einsatz von [³⁵S]GTPγS-Radioligand-Bindungsstudien ist eine Methode, um die Funktionalität eines Liganden in einem Rezeptorsystem zu untersuchen. Rezeptor-Liganden können aufgrund ihrer intrinsischen Aktivität in Vollagonisten, Partial-Agonisten, neutrale Antagonisten und inverse Agonisten unterteilt werden. Vollagonisten führen konzentrationsabhängig zu einer maximalen Stimulierung der [³⁵S]GTPγS-Bindung. Partial-Agonisten vermitteln einen im Gegensatz zum Vollagonisten abgeschwächten stimulierenden Effekt. Neutrale Antagonisten zeigen keinen Effekt auf die [³⁵S]GTPγS-Bindung. Inverse Agonisten inhibieren konzentrationsabhängig die Radioligand-Bindung und senken diese unter den Basalwert ab (Abb. 32).^{126,127}

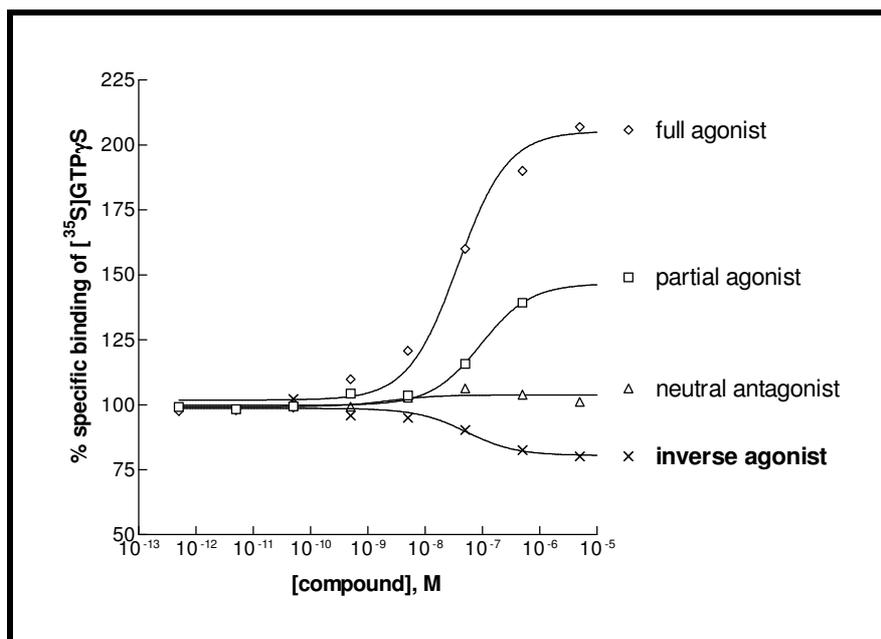


Abb. 32. Kurvenverläufe bei einer [³⁵S]GTPγS-Bindungsstudie

Die neu synthetisierten Substanzen wurden in [³⁵S]GTPγS-Radioligand-Bindungsstudien untersucht. Die Ergebnisse sind in Tabelle 4 wiedergegeben.

Tabelle 4. Ergebnisse der GTPγS-Experimente an humanen A₁-Rezeptoren

Substanz [10 μM]	Max. Effekt der spez. Bindung von [³⁵ S]GTPγS relativ zum Basalwert (=100 %) ± SEM [%]
66	455 ± 57
65	469 ± 35
64	398 ± 21
59	415 ± 36
60	262 ± 80
58	354 ± 97
63	319 ± 62
CPA (Voll-agonist)	416 ± 30
DPCPX (inverser Agonist)	46 ± 4

Die Ergebnisse zeigen, dass beide Verbindungen **65** und **66** Vollagonisten am A₁AR sind. Damit konnten hochpotente, selektive Vollagonisten am A₁AR dargestellt werden, die den bisher publizierten Fluoreszenzliganden überlegen sind. Erste Zellversuche mit einem Fluoreszenzmikroskop ergaben sehr gute Bilder von der Distribution der Rezeptoren auf Zellmembranen.

5.3. Adenosin A_{2A}-Rezeptoren

Der A_{2A}AR konnte aus verschiedenen Spezies kloniert werden. So wurde die Klonierung aus der Schilddrüse von Hunden,¹²⁸ aus Rattenhirn,¹²⁹ menschlichen Hippocampuszellen¹³⁰ und Meerschweinchenzellen¹³¹ beschrieben. Der humane A_{2A}AR besteht aus 410 Aminosäuren und hat dadurch mit 45 kDa eine höhere Molmasse, als die anderen Subtypen der Adenosinrezeptoren (36-37 kDa).⁸⁵ Der Rezeptor besitzt eine deutlich längere C-terminale Domäne, was jedoch keinen Einfluss auf die Interaktion mit dem G_s-Protein hat.¹³² Es besteht eine hohe Übereinstimmung in der Aminosäuresequenz zwischen den einzelnen Spezies. So zeigen die A_{2A}AR aus Rattenhirn und aus dem menschlichen Hippocampus eine Sequenzübereinstimmung von 84 %.⁸⁵

5.3.1. Strukturen von Adenosin-A_{2A}-Rezeptor-Agonisten

In Versuchsreihen zeigten Adenosinverbindungen, die einen 2-Aminoalkyl-, 2-Alkoxy-, 2-Alkylthio- oder 2-Alkynyl-Substituenten tragen, hohe Affinitäten und Selektivitäten zum A_{2A}AR. Generell gilt, dass Adenosinverbindungen, die über ein Heteroatom mit einer lipophilen Gruppe, wie z.B. Phenylethyl oder Cyclohexylethyl verknüpft sind, über hohe Affinitäten und Selektivitäten verfügen.¹³³ Verbindungen, die mit größeren funktionellen Gruppen substituiert werden, verzeichnen einen deutlichen Affinitätsabfall am A_{2A}AR. Wurde die Aminogruppe durch eine Hydrazin-Gruppe ersetzt, führte dies nicht zu einer deutlichen Veränderung der Selektivitäten und Affinitäten. Binodenoson (**67**) mit einem K_i-Wert von 270 nM ist eine Adenosinverbindung, die dem oben beschriebenen Substitutionsmuster entspricht (Abb.33).

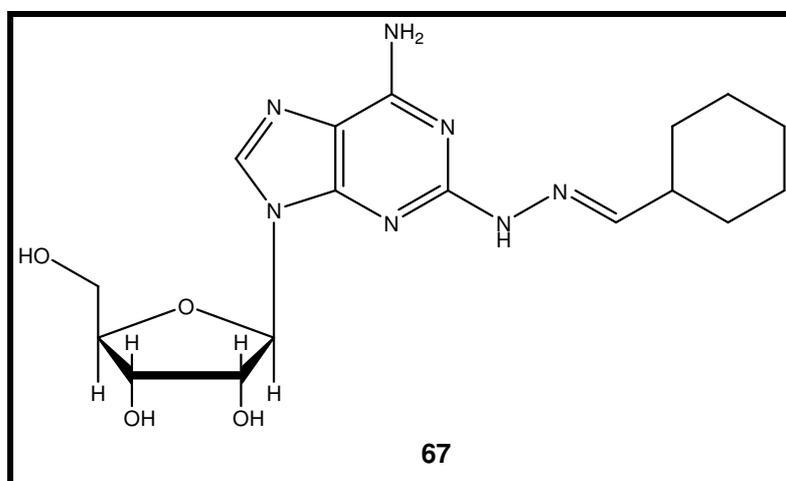


Abb. 33. Binodenoson, ein selektiver A_{2A}AR-Agonist

Viele der publizierten A_{2A}AR-Agonisten sind neben der Substitution in Position 2 zusätzlich in Position 4' mit einer Ethylcarboxamido-Gruppe (NECA-Derivate) substituiert. Die Einführung dieser Ethylcarboxamidogruppe erhöht die Affinität verglichen mit den entsprechenden Adenosinderivaten. CGS21680 (**68**, K_i 27 nM) ist ein moderat affiner A_{2A}AR-Agonist mit einer 140fachen Selektivität gegenüber dem A₁AR. Diese Verbindung wird als Standardagonist in Radioligandbindungsstudien verwendet. ATL-146e (**69**, K_i 0,5 nM) besitzt eine höhere Affinität als CGS21680, eine 125fache Selektivität gegenüber dem A₁AR und eine 90fache Selektivität gegenüber dem A₃AR. Die Substanz besitzt an allen AR Affinitäten im nanomolaren Bereich (Abb. 34).

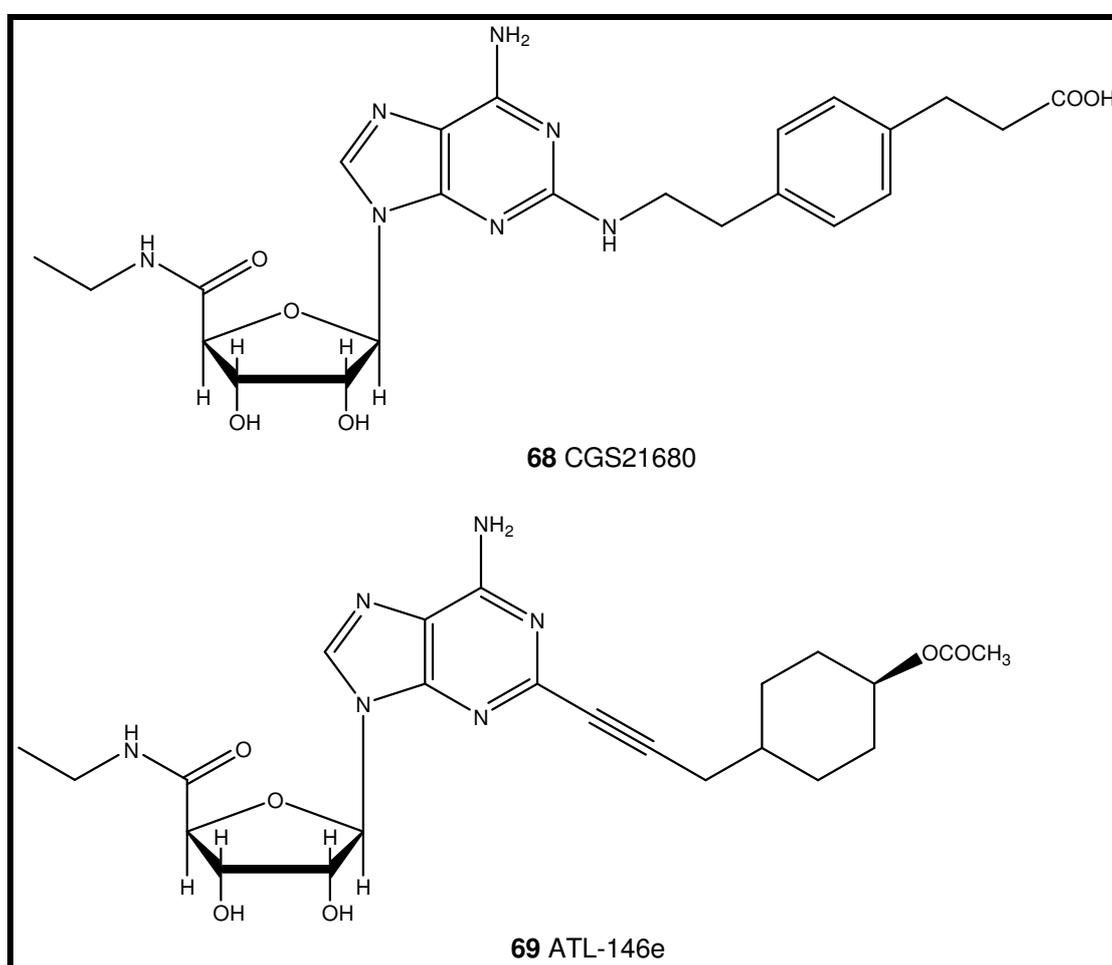


Abb. 34. A_{2A}AR-Agonisten mit Substitution in Position 2 und 4'

Eine Substitution in Position N⁶ führt in den meisten Fällen zu potenten A₁AR- und A₃AR-Agonisten. Die Substitution sowohl in Position 2 als auch in Position 6 führt zu keinen additiven Effekten.¹³³ In der Literatur sind viele A_{2A}AR-Agonisten beschrieben, es existieren zur Zeit jedoch keine Verbindungen, die gleichzeitig über eine hohe Affinität für den A_{2A}AR verfügen und eine sehr hohe Selektivität gegenüber den

übrigen AR-Subtypen besitzen. In Abb. 35 ist ein allgemeines Pharmakophor-Modell abgebildet.¹¹²

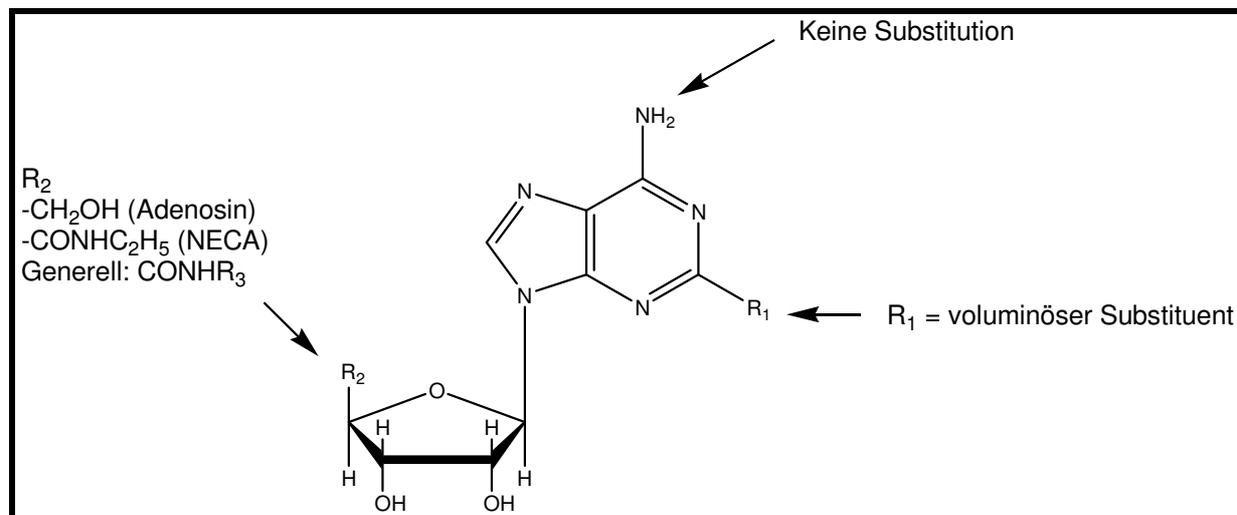


Abb. 35. Pharmakophor-Modell von A_{2A}AR-Agonisten

5.3.2. Problemstellung

Zurzeit existiert kein affiner, selektiver fluoreszenzmarkierter A_{2A}AR-Agonist. Ziel dieses Teilprojektes war die Verknüpfung eines Adenosinderivates mit einem BODIPY-Derivat, um einen fluoreszenzmarkierten A_{2A}-Agonisten zu erhalten.

5.3.3. Darstellung fluoreszenzmarkierter A_{2A}-Liganden

Bei der Planung der Syntheseroute für die Entwicklung des Liganden präferierten wir als Ausgangssubstanz Adenosin und nicht das 5'-funktionalisierte NECA-Derivat. Der Vorteil liegt in der Übertragung der ersten Schritte aus dem A₁AR-Liganden-Projekt. Für die Darstellung eines affinen, selektiven A_{2A}AR-Agonisten ist es dem Pharmakophor-Modell entsprechend notwendig, das Adenosin in Position 2 zu substituieren. Diese Substitution gelingt mit der Umsetzung eines in Position 2 mit einem Halogenatom substituierten Adenosin-Derivats mit einem entsprechenden Amino-funktionalisierten BODIPY-Derivat. Eine Synthese von 2-Iodadenosin **70** wurde in unserem Arbeitskreis entwickelt. Der Versuch 2-Iodadenosin **70** mit dem BODIPY-Derivat **29** zu verknüpfen führte jedoch nicht zu Produkt **71**. Eine mögliche Ursache liegt in der Tatsache, dass die Reaktion des 2-Iodadenosins mit einem Amino-funktionalisierten Derivat einen hohen Überschuss des Amins erfordert. Aus Praktikabilitätsgründen ist dies mit einem BODIPY-Derivat nicht möglich. Ein weiterer Grund liegt in dem Reaktionsmechanismus der durchgeführten Reaktion. Dabei wird das Iod durch einen nukleophilen aromatischen Angriff des Amins substituiert. Bei dieser Substitution sinkt die Abgangsgruppenqualität von Fluor zu Iod. Der Iod-

Substituent stellt demzufolge die schlechteste Abgangsgruppe bei dieser Reaktion dar. Zu einer Verbesserung sollte die Umsetzung mit dem entsprechenden 2-Chloradenosin (**72**) führen (Abb. 36).

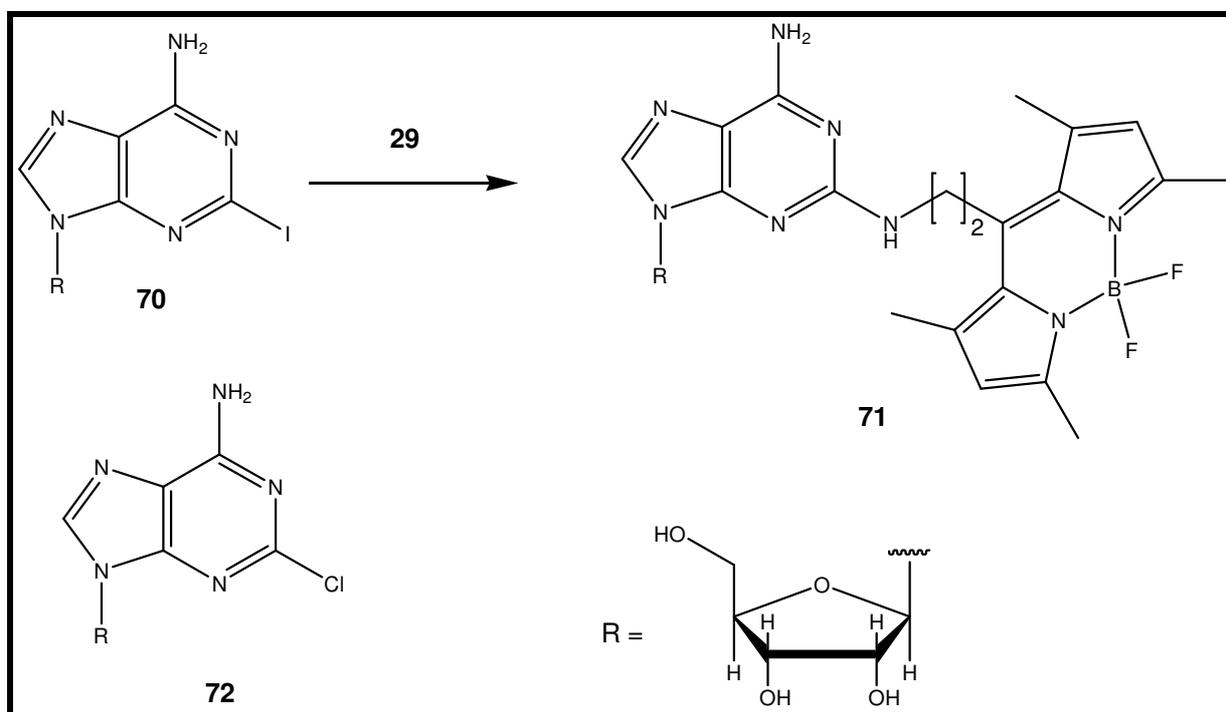


Abb. 36. 2-Iodadenosin und 2-Chloradenosin als mögliche Ausgangsverbindungen für die Fluoreszenzmarkierung

2-Chloradenosin ist kommerziell erhältlich, der Einsatz für den präparativen Maßstab verbietet sich aber auf Grund des hohen Preises (25 mg / 52.90 €). Zunächst wurde eine Syntheseroute entwickelt, um 2-Chloradenosin in hoher Reinheit darzustellen.

5.3.3.1. Darstellung von 2-Chloradenosin

Als Ausgangsmaterial wurde das kommerziell erhältliche Guanosin-Monohydrat (**73**) verwendet. Um das reine Guanosin zu erhalten, wird **73** für einige Stunden bei 120 °C getrocknet. Die getrocknete Substanz wird in trockenem Acetonitril suspendiert. Durch Zugabe von Acetylchlorid und Ethyldimethylamin werden die Hydroxyl-Gruppen der Ribose geschützt. Dabei kann **74** in hohen Ausbeuten (76 %) erhalten werden. Den nukleophilen Austausch des Sauerstoffatoms durch einen Chlor-Substituenten in Position 6 zu **75**, erfolgt durch Zugabe von Phosphoroxychlorid und Tetraethylammoniumchlorid. Für die erfolgreiche Durchführung dieser Reaktion ist es unbedingt erforderlich, **74** und Tetraethylammoniumchlorid vorher bei 140 °C zu trocknen, und frisch destilliertes Phosphoroxychlorid zu verwenden (Abb. 37).

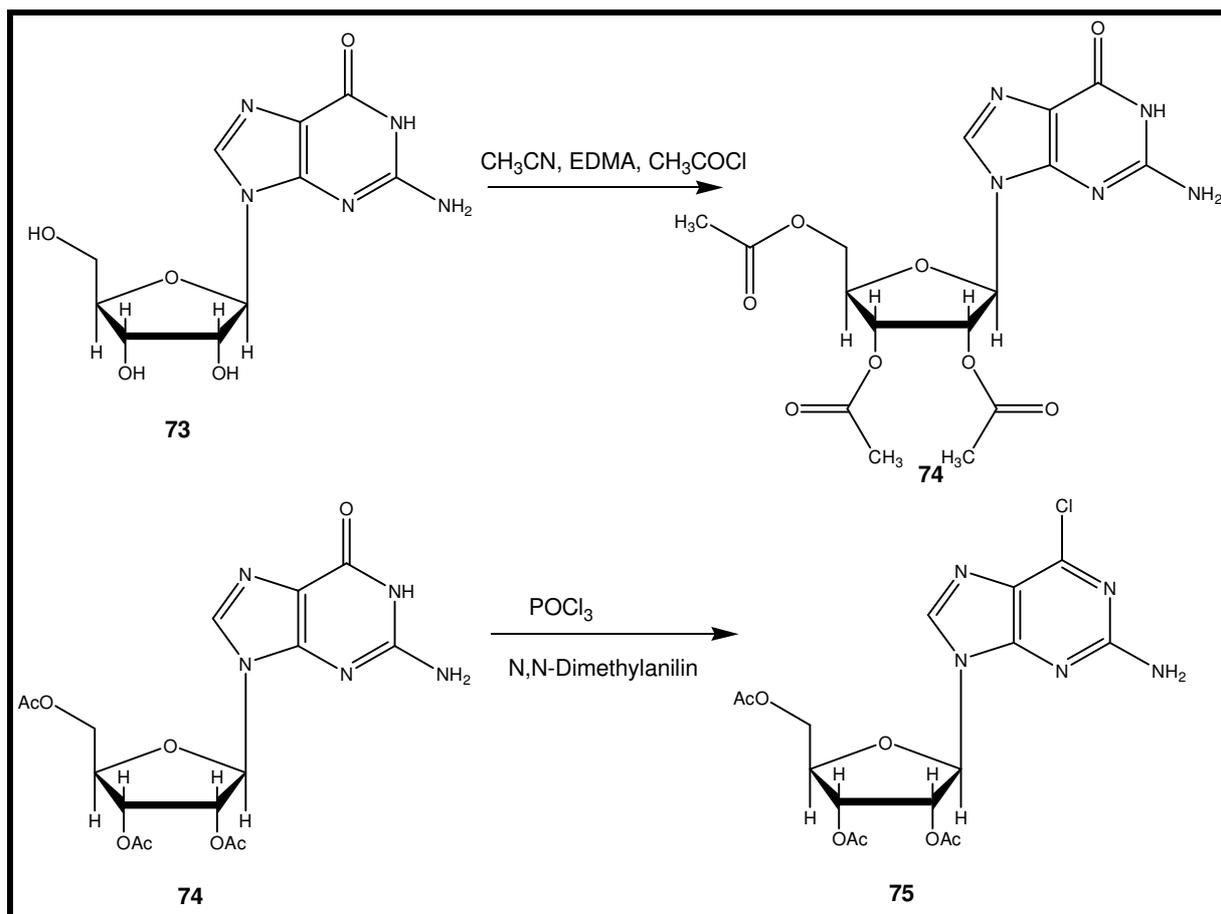


Abb. 37. Darstellung von 73 und 74: Einführung der Schutzgruppen und nukleophiler Austausch eines Sauerstoffatoms durch ein Chloratom

Die besten Ausbeuten (48%) konnten bei dieser Reaktion erreicht werden, indem auf ein Lösungsmittel verzichtet wurde und die Entfernung des Phosphoroxychlorids unter milden Bedingungen (40 °C, Vakuum) erfolgte. Bei der Darstellung von 2,6-Dichlor-2',3',5'-triacetylribofuranosylpurin (**76**) wird durch Zugabe eines Nitrits zu **75** intermediär ein Diazoniumion generiert, das durch Zugabe von Chlorid-Ionen zu dem entsprechenden Produkt **76** reagiert. Diese Reaktion ist unter dem Namen Sandmeyer-Reaktion bekannt, bei der durch Zugabe von Natriumnitrit und Kupferchlorid aromatische Amine in die entsprechenden Chloride überführt werden.⁸² Die Verwendung der käuflich erwerbaren Nitritsalze Natriumnitrit und Isopentenylnitrit mit verschiedenen Kupfersalzen führte nicht zu einer Umsetzung. *Robins et al.* publizierten die Synthese solcher Analoga durch Verwendung von Benzyltriethylammonium- (BTEA-) Nitrit in hohen Ausbeuten.¹³⁴ Das Reagenz ist kommerziell nicht erhältlich und musste hergestellt werden. Eine einfache Methode stellt die Verwendung eines Anionenaustauschers dar, bei dem das Chlorid-Ion des kommerziell erhältlichen BTEA-Chlorids durch ein Nitrit-Ion ausgetauscht wird. Wird

75 unter Eiskühlung und unter wasserfreien Bedingungen mit dem hergestellten BTEA-Nitrit umgesetzt und werden als Chloridquellen Acetylchlorid und Dichlormethan eingesetzt, so entsteht das 2,6-Dichlor-2',3',5'-triacetylribofuranosylpurin **76** in guten Ausbeuten (68%) (Abb. 38).

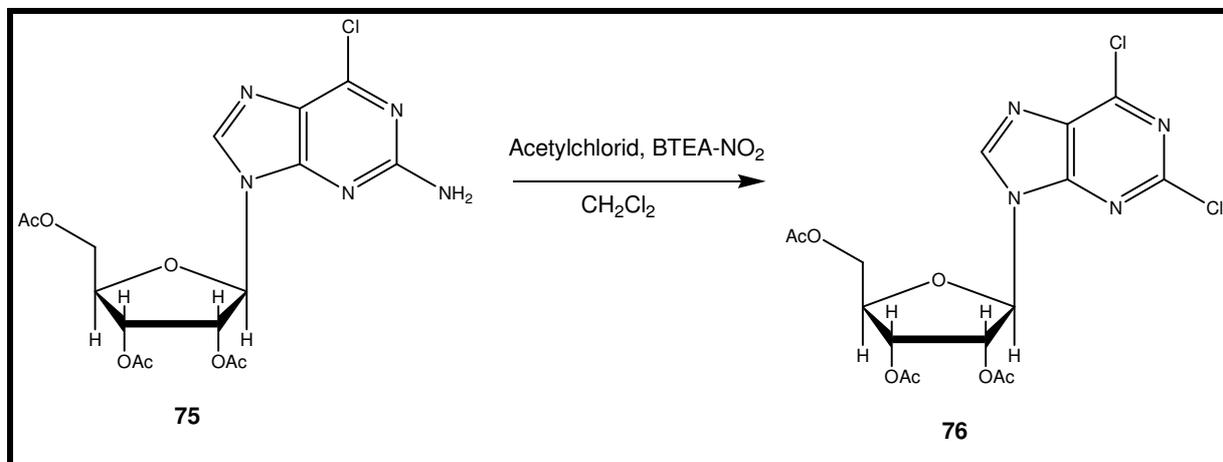


Abb. 38. Darstellung von 2,6-Dichlor-2',3',5'-triacetylribofuranosylpurin **75**

Die Synthese des 2-Chloradenosins erwies sich als schwieriger als erwartet. Die Umsetzung mit ammoniakalischer Methanol-Lösung führte nicht zu dem gewünschten Produkt, sondern zu einem Produktgemisch. Als Hauptprodukt konnte das Methoxyderivat **77** isoliert werden (Abb. 39).

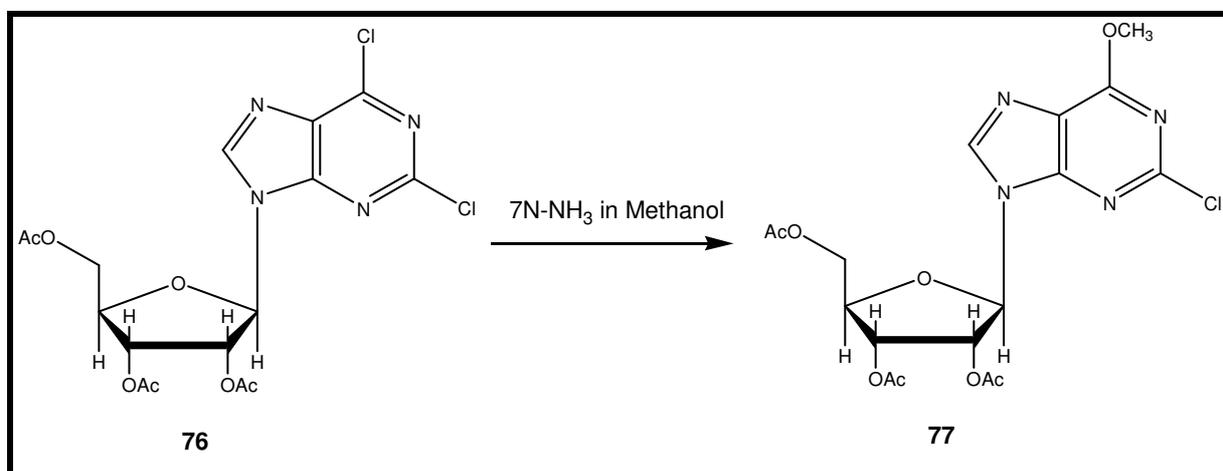


Abb. 39. Umsetzung von **75** mit 7N-NH₃ in Methanol

Den Durchbruch brachte die Umsetzung mit ammoniakalischer Ethanol-Lösung. Wurde mit einem großen Überschuss gearbeitet, so konnten gleichzeitig die Schutzgruppen abgespalten werden. Die säulenchromatographische Auftrennung lieferte Produkt **72**. Spektroskopische Untersuchungen zeigten eine Verunreinigung, die als das bei dieser Reaktion anfallendem Acetamid (**78**) identifiziert werden konnte. Dieses entsteht durch den nukleophilen Angriff des Ammoniaks auf die

Carbonylkohlenstoffatome der Schutzgruppen. Daraus resultieren das ungeschützte Adenosin-Derivat und drei Äquivalente Acetamid. Die anschließende Umsetzung mit dem BODIPY-Derivat **21** führte nicht zu dem gewünschten Produkt **79**, sondern zu einer Umamidierung und der Isolierung von **80** (Abb. 40).

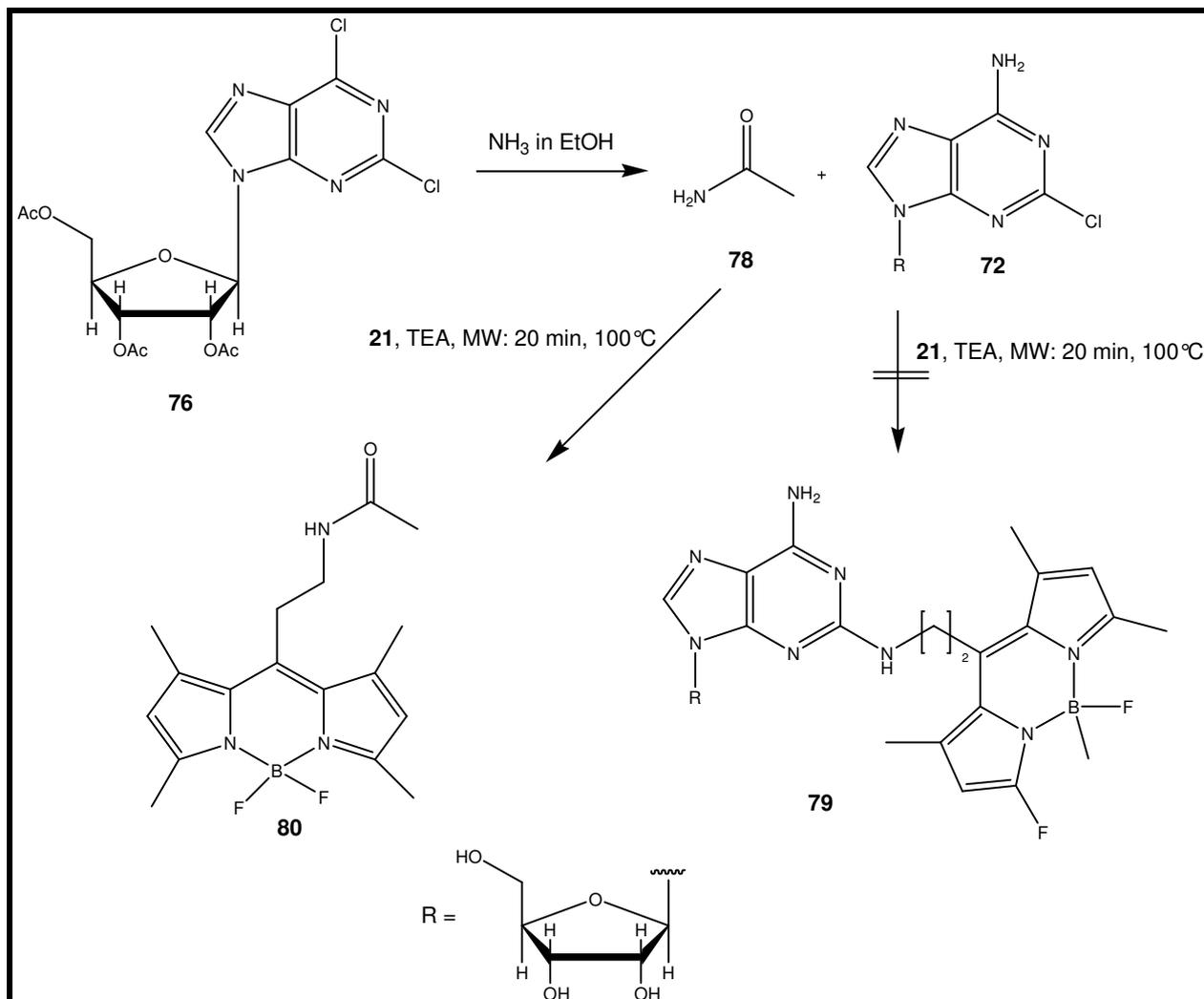


Abb. 40. Synthese eines fluoreszenzmarkierten potentiellen Adenosin- A_{2A}-Rezeptor-Agonisten

Da die Aminokomponente nicht wie üblich in einem hohen Überschuss eingesetzt werden konnte, da für den benötigten Überschuss 2 g BODIPY-Derivat notwendig wären, was aus Praktikabilitätsgründen nicht akzeptabel ist, zeigte sich die Notwendigkeit, 2-Chloradenosin in hoher Reinheit darzustellen. Die mehrmals durchgeführte säulenchromatographische Trennung führte zu einem hohen Substanzverlust, so dass diese Möglichkeit verworfen wurde. Als optimale Reinigungsmethode erwies sich zunächst eine säulenchromatographische Trennung an Normalphase mit dem Eluenten Dichlormethan : Methanol (9:1) und eine

anschließende HPLC-Trennung, wobei zunächst 20 min isokratisch mit Wasser : Methanol (90:10) gespült wurde, um das Acetamid zu entfernen. Anschließend wurde ein Gradient gefahren (innerhalb von 30 min von Wasser : Methanol (9:1) zu 100% Methanol), wodurch **72** in hoher Reinheit und mit mäßiger Ausbeute (12 %) erhalten werden konnte. Aus diesem Grund wurde auf die Umsetzung von **72** mit einem BODIPY-Derivat verzichtet und auf das verfügbare Thioadenosin zurückgegriffen, um das Adenosin-Derivat über einen Thioether mit dem BODIPY-Derivat zu verknüpfen.

5.3.3.2. Fluoreszenzmarkierung von 2-Thioadenosin

In unserem Arbeitskreis wurde die Synthese von 2-Thioadenosin beschrieben und durchgeführt.¹³⁵ Ein interessanter Ansatz war die Reaktion von 2-Thioadenosin mit dem BODIPY-Alkylbromid **22**, die zu einer Verknüpfung als Thioether führen sollte. Die Umsetzung erfolgte zunächst in einem Ethanol/Wasser-Gemisch unter Zugabe von Natriumhydroxid. Es konnte das gewünschte Produkt isoliert werden, allerdings in nur geringer Ausbeute (1,4 %). Eine Verbesserung ergab die Reaktion von **81** mit **22** in Dimethylformamid durch Zugabe von Natriummethanolat bei Raumtemperatur. Die säulenchromatographische Aufreinigung ergab Produkt **82** in guten Ausbeuten (48 %) (Abb. 41).

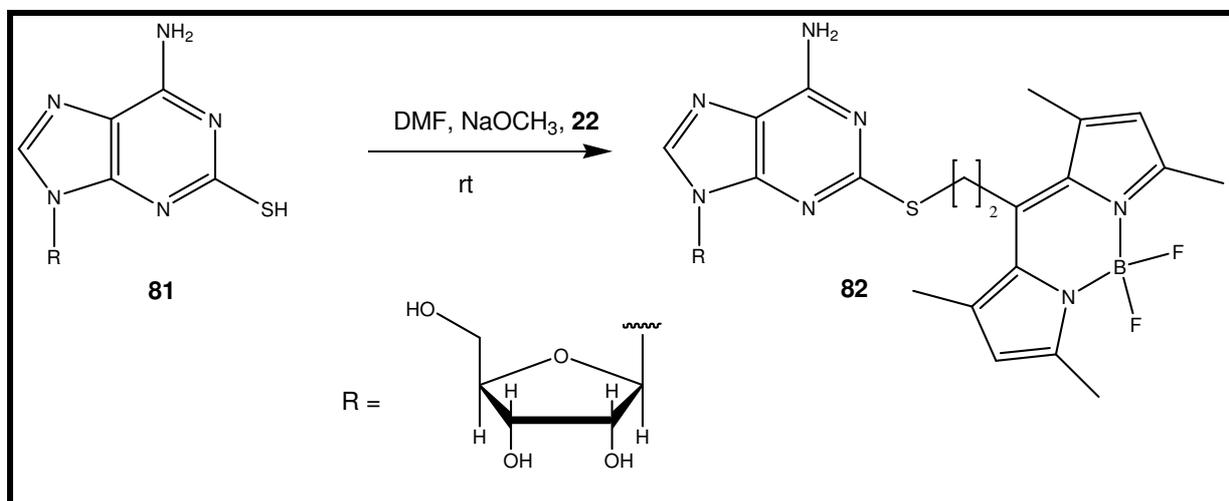


Abb. 41. Darstellung eines potentiellen fluoreszenzmarkierten Adenosin- A_{2A}-Rezeptor-Agonisten

5.3.4. Pharmakologische Eigenschaften

Das Produkt **82** zeigte in Radioligand-Bindungsstudien keine Affinität zu den Adenosinrezeptoren. Die Einführung des voluminösen BODIPY-Restes in Position 2 des Adenosins führte zu einem Verlust der Bindungsfähigkeit. Da die Verknüpfung von 2-Chloradenosin **72** mit dem BODIPY-Derivat **22** nur zu einer analogen

Verbindung mit NH- statt S-Verknüpfung geführt hätte und diese Veränderung keinen Einfluss auf die Aktivität haben dürfte, wurde von einer weiteren Bearbeitung abgesehen. Dieses Ergebnis zeigt die Schwierigkeiten bei der Darstellung und der pharmakologischen Anwendung von fluoreszenzmarkierten Liganden. Die Einführung eines BODIPY-Restes in einen Liganden kann zu einer Verbindung führen, die nicht mehr in Bindungstaschen von Rezeptoren oder aktive Zentren von Enzymen passt, da ein voluminöser Rest eingeführt wurde.

5.4. Adenosin-A_{2B}-Rezeptoren

Adenosin-A_{2B}-Rezeptoren wurden aus menschlichen Hippocampus-Zellen,¹³⁶ Zellen aus dem Rattenhirn¹³⁷ und aus Knochenmarkszellen der Maus¹³⁸ kloniert. Der Rezeptor besteht aus 328 Aminosäuren (Mensch) und 332 Aminosäuren (Ratte). Der A_{2B}AR besitzt eine hohe Übereinstimmung in der Aminosäuresequenz zwischen den einzelnen Spezies. So zeigen die A_{2B}AR aus Rattenhirn und aus dem menschlichen Hippocampus eine Sequenzübereinstimmung von 86 %.⁸⁵

5.4.1. Adenosin-A_{2B}-Rezeptor-Antagonisten

Alkylxanthine sind klassische Antagonisten an Adenosin-Rezeptoren. Die natürlich vorkommenden Xanthinderivate Theophyllin (**83**) und Coffein (**84**) besitzen antagonistische Wirkung an A_{2B}AR.¹³⁹ Der Austausch der Methylgruppen in Position 1 und Position 3 durch einen n-Propylsubstituenten führt zu einer 15fachen Affinitätssteigerung.¹⁴⁰ Die Präsenz von nur einer n-Propylgruppe erhöht die Affinität am A_{2B}AR gegenüber dem Theophyllin um den Faktor 2.¹⁴¹ Die Einführung eines Substituenten in Position 8 führt zu einer deutlichen Affinitätssteigerung der Substanzen. 1,3-Dialkyl-8-phenylxanthine besitzen einen K_i-Wert im nanomolaren Bereich, aber nur geringe Selektivität gegenüber dem A₁AR.¹⁴² Die Einführung eines polaren Substituenten in die *para*-Position des 8-Phenylringes verringert geringfügig die Affinität, erhöht aber deutlich die Selektivität der Substanzen. Die Verbindungen PSB-53 (**85**), PSB-1115 (**86**), und XCC (**87**) besitzen eine hohe Selektivität: (PSB-53: 20fach, PSB-1115: 41fach und XCC: 4fach) für A_{2B}AR gegenüber A₁AR (Abb. 42).^{139,143}

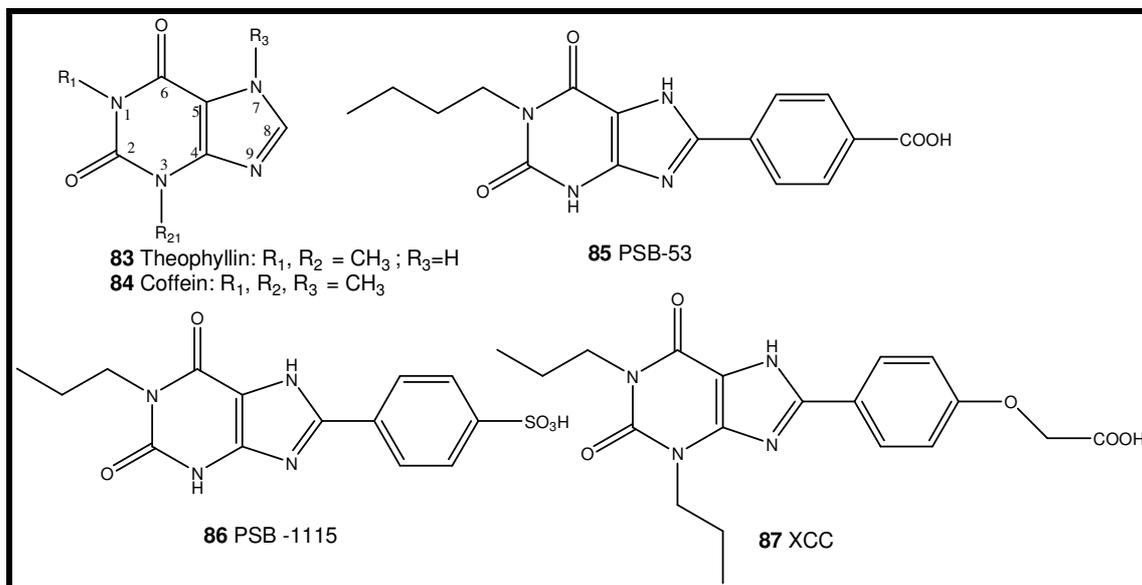


Abb. 42. A_{2B}-Rezeptorantagonisten

Im Jahre 2004 publizierten *Hill et al.* die Synthese des fluoreszenzmarkierten A₁AR-Antagonisten XAC-BY630 (**88**) aus den kommerziell erhältlichen A₁AR-Antagonisten XAC und dem von *Molecular Probes* erworbenen BODIPY 630/650-X-succinimidylester. Der fluoreszenzmarkierte Ligand zeigte sowohl in funktionellen Assays als auch in Radioligandbindungsstudien eine 10fach geringere Affinität als das unmarkierte XAC.¹⁴⁴ Sven Freudenthal veröffentlichte 2002 in seiner Dissertation die Synthese, die spektroskopischen und pharmakologischen Eigenschaften des fluoreszenzmarkierten A_{2B}AR-Antagonisten **89** (Abb. 43).⁸¹

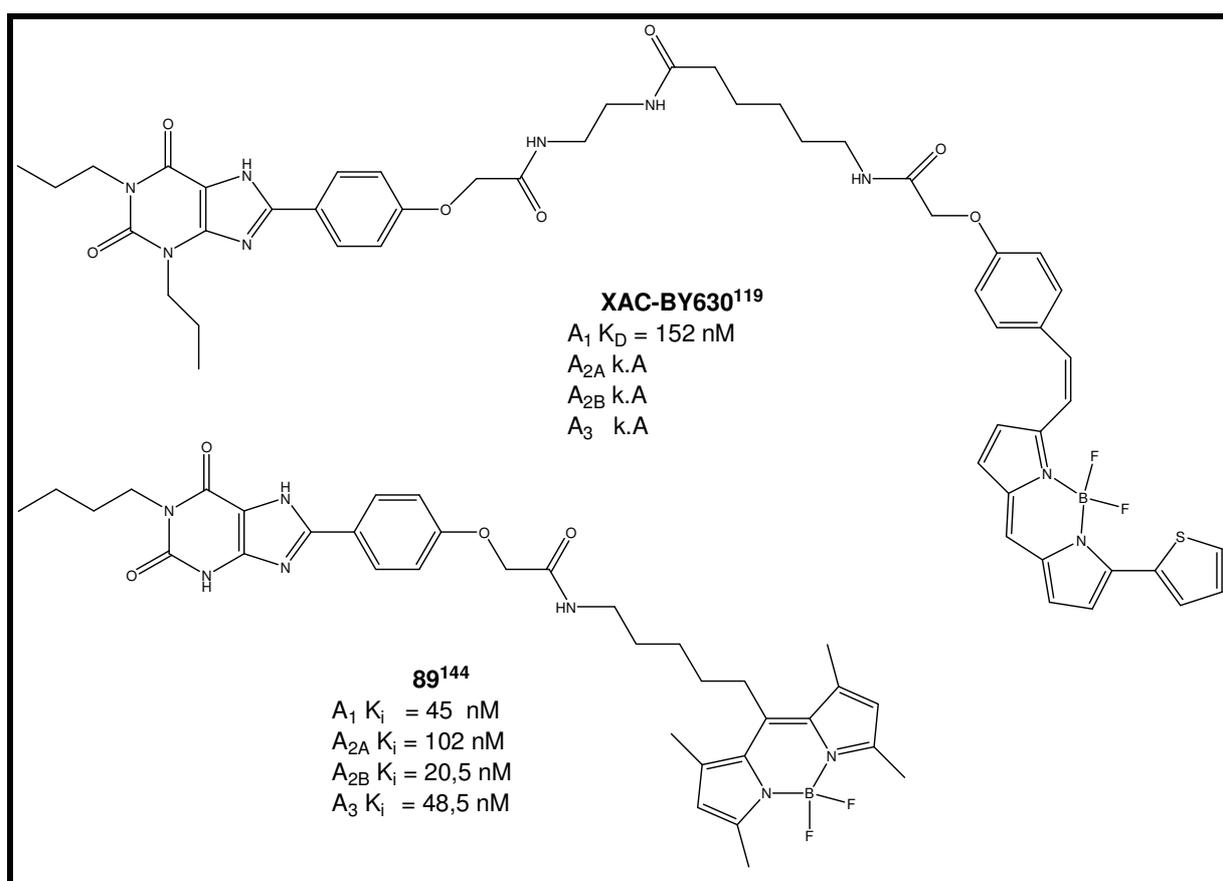


Abb. 43. BODIPY-markierte Adenosinrezeptor-Antagonisten

Der synthetisierte A_{2B}AR-Antagonist **89** besitzt mit einem K_i-Wert von 20,5 nM eine hohe Affinität für den A_{2B}AR.¹⁴⁴

5.4.2. Problemstellung

Sven Freudenthal entwickelte die Synthese eines fluoreszenzmarkierten A_{2B}AR-Antagonisten. Durch die unterschiedlichen Kettenlängen der Amino-BODIPY-Fluorophore (Kapitel 4.2.) sollen fluoreszenzmarkierte Liganden synthetisiert werden, um die optimale Kettenlänge in Bezug auf Affinität und Selektivität zu bestimmen. Als Liganden wurden die in unserem Arbeitskreis entwickelten selektiven A_{2B}AR-

Antagonisten **90** und **91** verwendet.^{143,145} Zusätzlich sollte XCC (**87**) fluoreszenzmarkiert werden (Abb. 44). Zunächst wurden in Modellreaktionen die Liganden **90** und **91** mit Aminoalkylphenolen umgesetzt, um Substanzen zu erhalten die ähnliche sterische Ansprüche besitzen wie die entsprechenden BODIPY-markierten Strukturen.

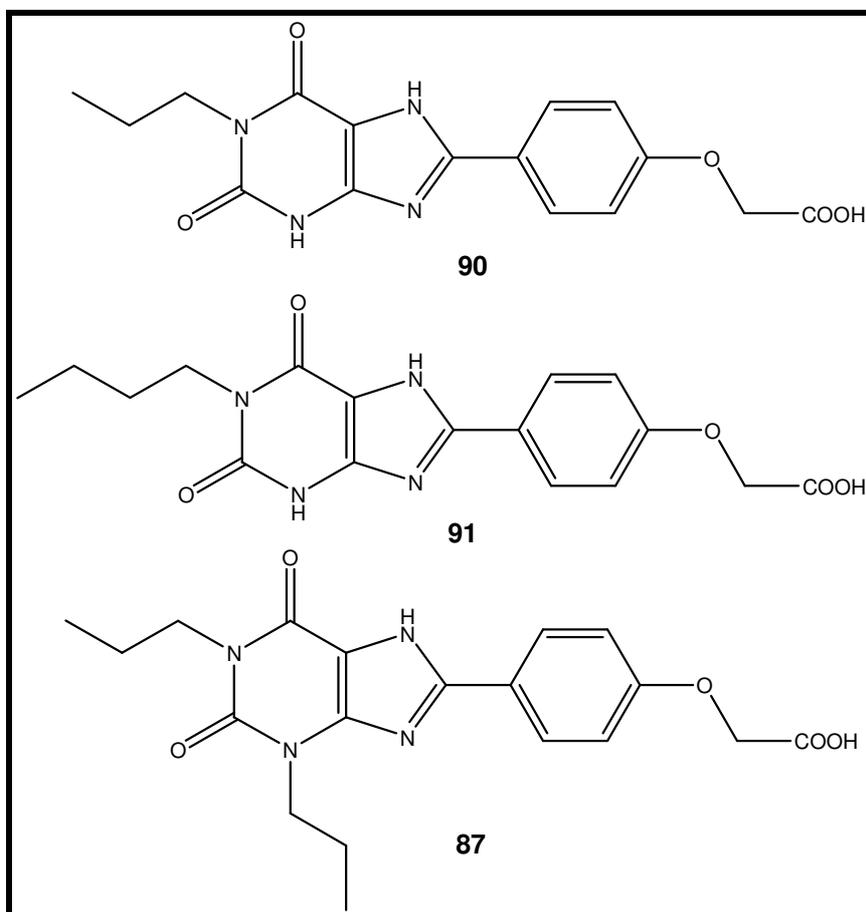


Abb. 44. A_{2B}AR-Antagonisten, die mit BODIPY-Derivaten fluoreszenzmarkiert werden sollen

5.4.3. Darstellung fluoreszenzmarkierter A_{2B}-Liganden

Die Darstellung der Modellsubstanzen **92-95** gelang durch die Umsetzung von **90** mit Aminoalkylphenolen unterschiedlicher Kettenlänge in Dimethylformamid unter Zusatz von Chlorameisensäureisobutylester und N-Methylmorpholin. Dabei wurde zunächst intermediär ein gemischtes Anhydrid gebildet, das in Reaktion mit dem zugesetzten Amin tritt (Abb. 45).

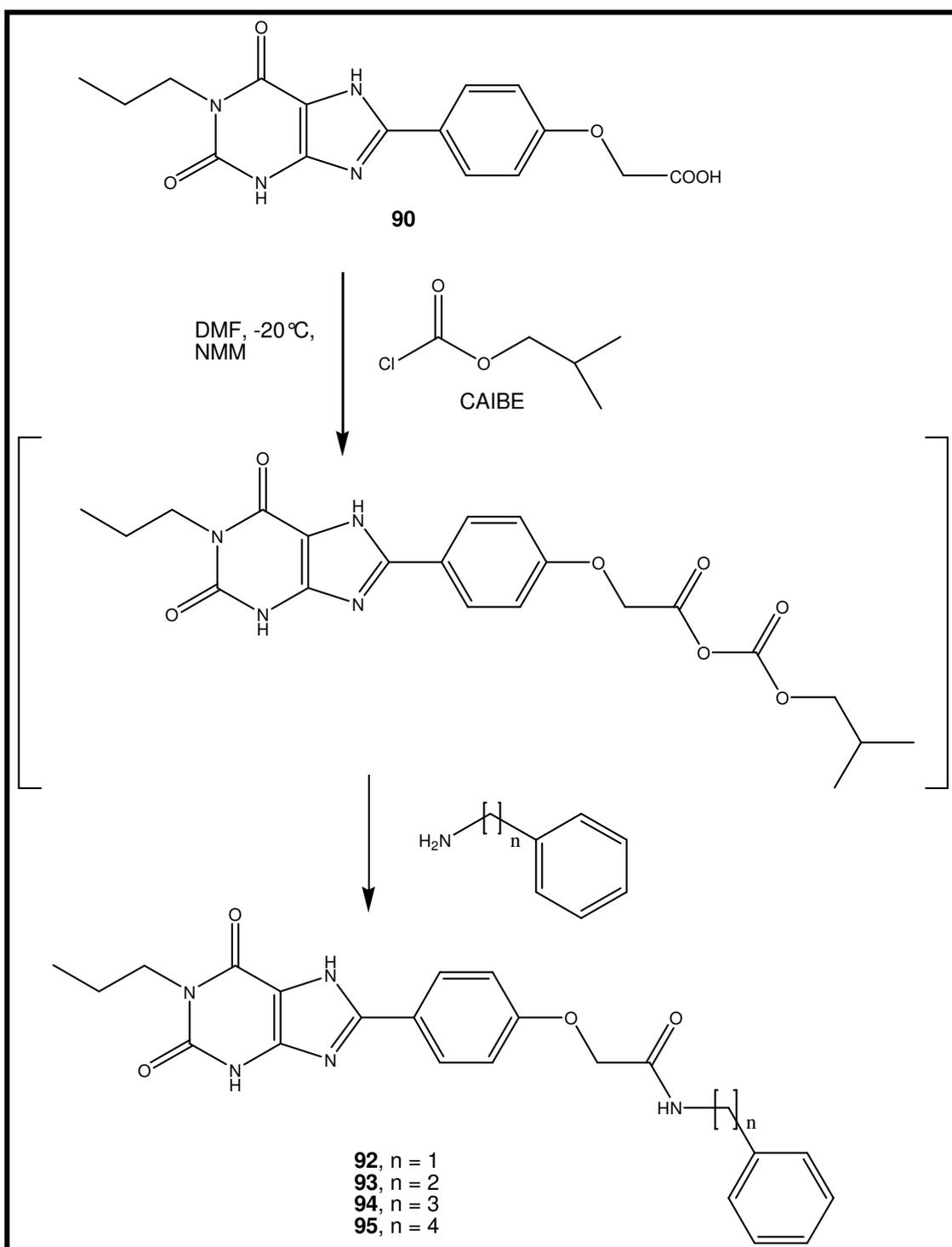
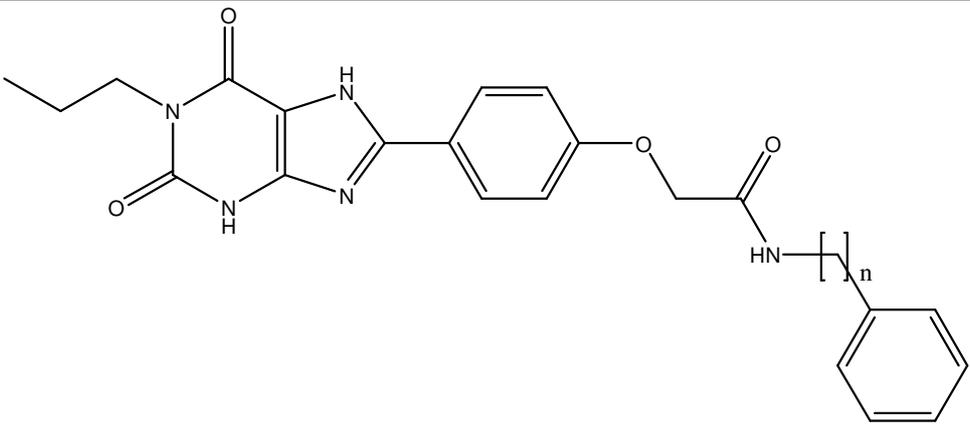


Abb. 45. Darstellung von Modellsubstanzen

Die gewünschten Modellverbindungen waren leicht in guten Ausbeuten erhältlich. Der Vorteil dieser Reaktion gegenüber dem ursprünglich verwendeten Kopplungsreagenz EDC⁸¹ liegt in höheren Ausbeuten und kürzeren Reaktionszeiten (3 h gegenüber 24 h). In Tabelle 5 werden die Ergebnisse aus den Radioligand-Bindungsstudien dieser Verbindungen zusammengefasst.

Tabelle 5. Ergebnisse der Radioligand-Bindungsstudien der Modellsubstanzen

				
Verbindung	n	K _i + SEM [nM] (oder Inhibition in % bei 10 μM, n=3)		
		A ₁ Ratte [³ H]CPA	A _{2A} Ratte [³ H]MSX-2	A ₃ Mensch [³ H]PSB-11
92	1	27,2 ± 4,1	≥ 10000 (46 ± 4)	266 ± 61
93	2	7,85 ± 2,46	≥ 10000 (33 ± 1)	≥ 10000 (46 ± 2)
94	3	35,3 ± 5,7	≥ 10000 (38 ± 3)	2990 ± 440
95	4	29,6 ± 4,0	498 ± 132	1410 ± 230

Die Substanzen zeigen wie erwartet nur moderate Affinitäten am A₃AR und keine Affinität zum A_{2A}AR. Die Werte am A₁AR liegen im niedrig nanomolaren Bereich. Die Daten für den A_{2B}AR fehlen noch, da zur Zeit ein neues Testsystem aufgebaut wird. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass ähnliche Strukturen hohe K_i-Werte am A_{2B}AR besitzen.⁸¹ Die Darstellung der fluoreszenzmarkierten Liganden **96** bis **101** konnte mit Hilfe der oben beschriebenen Methode mit zufrieden stellenden Ausbeuten durchgeführt werden (Abb. 46). Die Substanzen konnten mit Hilfe klassischer Säulenchromatographie mit dem Eluenten Dichlormethan : Methanol (40:1) in hoher Reinheit erhalten werden. Eine Erhöhung der Polarität des Eluenten führte zu stark verunreinigten Fraktionen, da unter diesen Bedingungen die BODIPY-Amine ebenfalls eluiert werden, so dass nur Stoffgemische erhalten wurden.

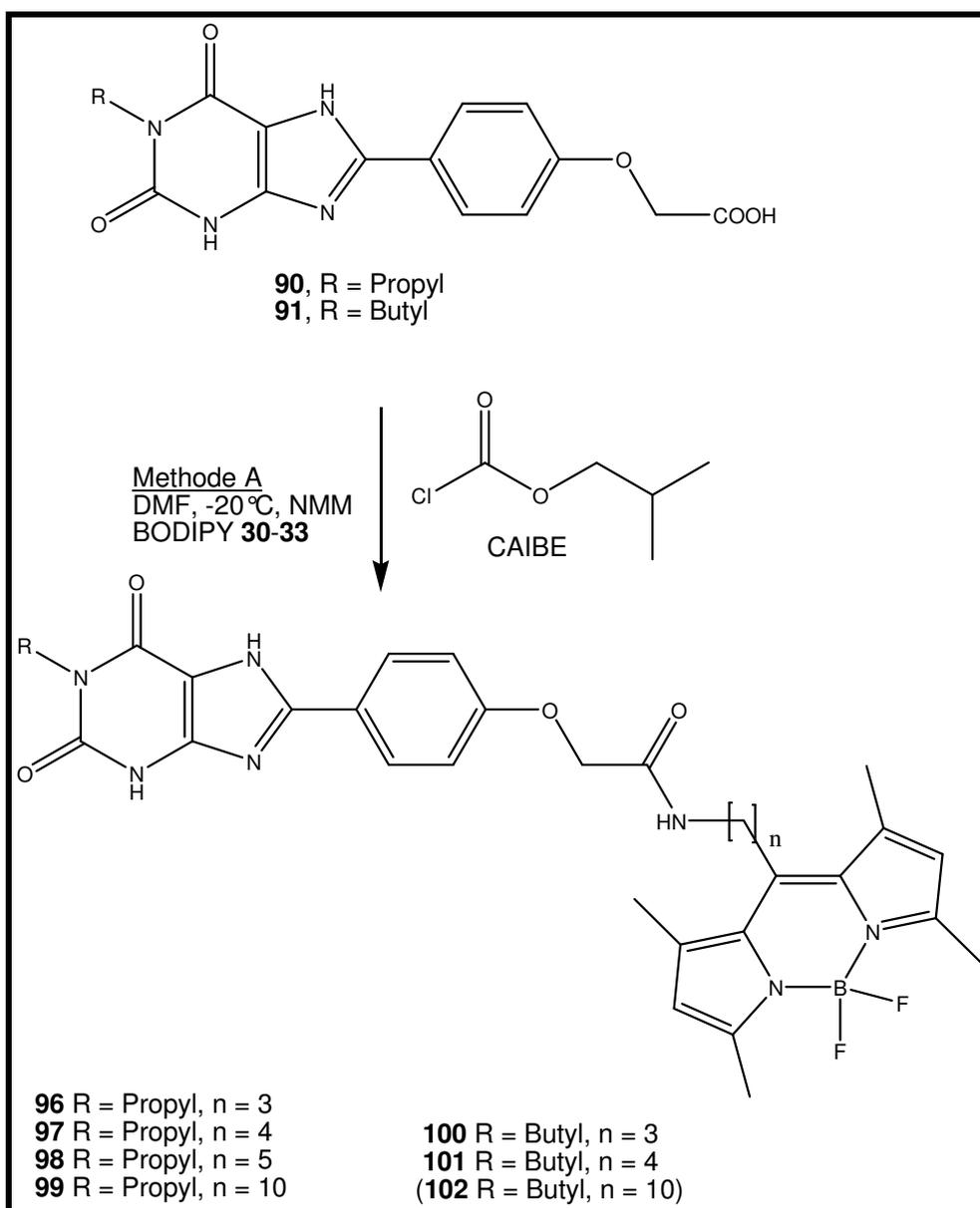


Abb. 46. Darstellung von fluoreszenzmarkierten A_{2B}AR-Antagonisten

Die Darstellung von **102** war mit Hilfe dieser Methode nicht möglich, es konnte keine Umsetzung beobachtet werden. Auch die Reaktion von **90** mit Chlorameisensäureisobutylester (CAIBE) und N-Methylmorpholin (NMM) mit dem BODIPY-Fluorophor **29** (n = 2) führte nicht zu dem gewünschten Produkt. Betrachtet man den Reaktionsmechanismus dieser Umsetzung, könnten zwei mögliche Produkte entstehen. Das intermediär gebildete Anhydrid **103** besitzt zwei Carbonylkohlenstoffatome, die beide von dem eingesetzten Amin angegriffen werden können. Der Angriff am Carbonylkohlenstoffatom A liefert das gewünschte Produkt und führte bei den oben beschriebenen Verbindungen zur Bildung der Hauptprodukte. Bei der Verwendung des BODIPY-Derivats **29** kann die kurze Alkylkette (n=2) zu einer

sterischen Behinderung dieses Angriff führen, wodurch der Angriff an Carbonylkohlenstoffatom B präferiert sein könnte. Dieser Angriff würde zu Produkt **104** führen. Die angefertigten ¹H und ¹³C Spektren konnten die Bildung von **104** bestätigen (Abb. 47).

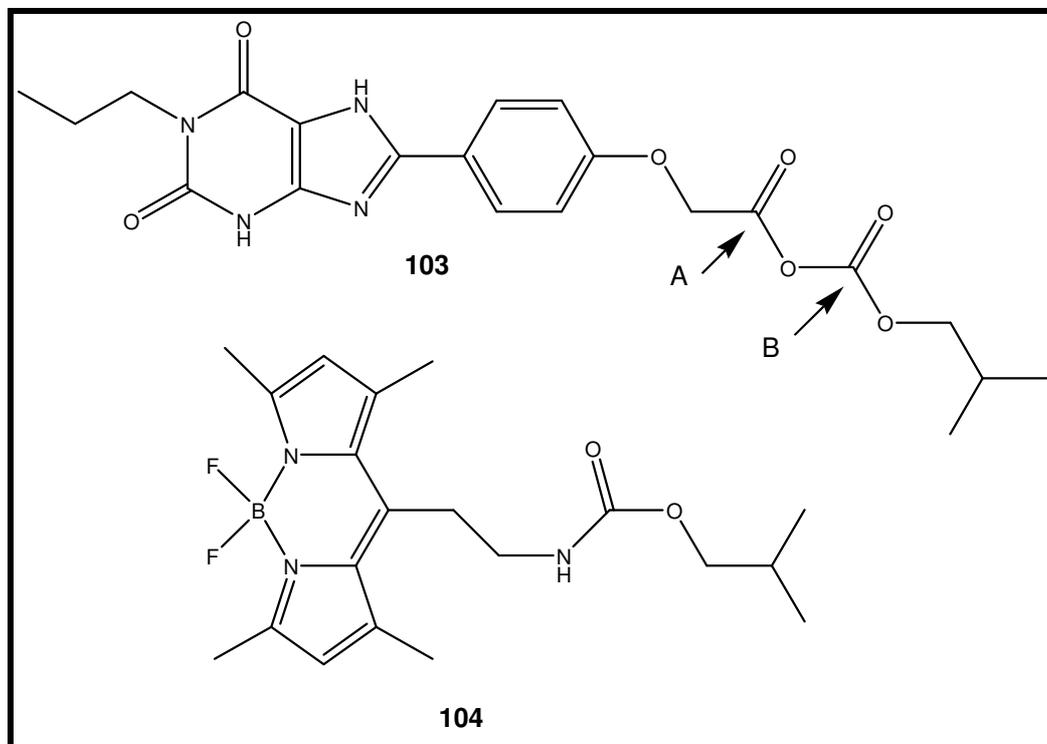


Abb. 47. Konkurrenzreaktion bei der Darstellung von **106**

Da unter den oben beschriebenen Reaktionsbedingungen die Darstellung der Derivate **102**, **105** und **106** (Abb. 48) nicht möglich war, wurde eine Alternative Darstellungsmethode verwendet. Die Umsetzung einer Carbonsäure mit den Kupplungsreagentien HOBt und HCTU unter Zusatz eines tert. Amins (z.B. Hünig-Base) mit einem primären Amin ist in der Literatur beschrieben. Die Reaktion wird unter wasserfreien Bedingungen in trockenem Dimethylformamid durchgeführt. Dabei wird zunächst durch Zugabe der Base die Carbonsäure deprotoniert, nach wenigen Minuten wird durch Zugabe von HCTU und HOBt die Aktivierung der Carbonsäure vollzogen. Nachdem die gewünschte Aminkomponente zugegeben wurde, konnten nach 16-stündigem Rühren und säulenchromatographischer Auftrennung mit dem Eluenten Dichlormethan : Methanol (40:1) die Derivate **102**, **105** und **106** isoliert werden. Mit Hilfe dieser Methode wurde ebenfalls Ligand **87** mit den BODIPY-Aminen **30** und **32** fluoreszenzmarkiert zu den Produkten **107** und **108** (Abb. 48). Es zeigte sich, dass diese Kupplungsreagentien zu höheren Ausbeuten führten als die beschriebene Methode mit Chlorameisensäureisobutylester und N-Methylmorpholin.

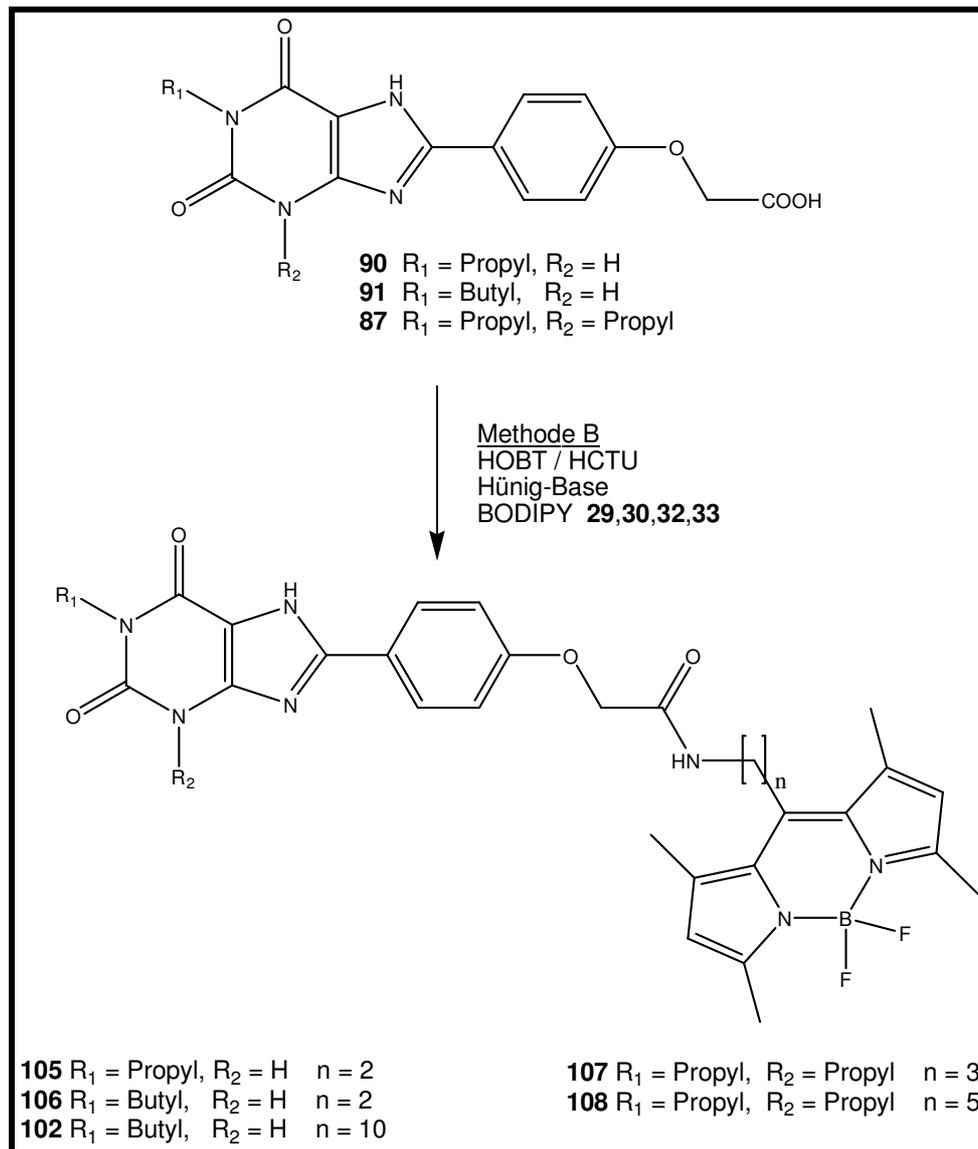


Abb. 48. Darstellung der fluoreszenzmarkierten A_{2B}AR-Antagonisten 102,105-108

Somit wurden drei verschiedene A_{2B}AR-Antagonisten mit BODIPY-Derivaten unterschiedlicher Kettenlänge gekoppelt. In Tabelle 6 werden die Ausbeuten der neu dargestellten fluoreszenzmarkierten Liganden zusammengefasst dargestellt.

Tabelle 6. Ausbeuten der fluorszenzmarkierten Adenosin-A_{2B}-Liganden

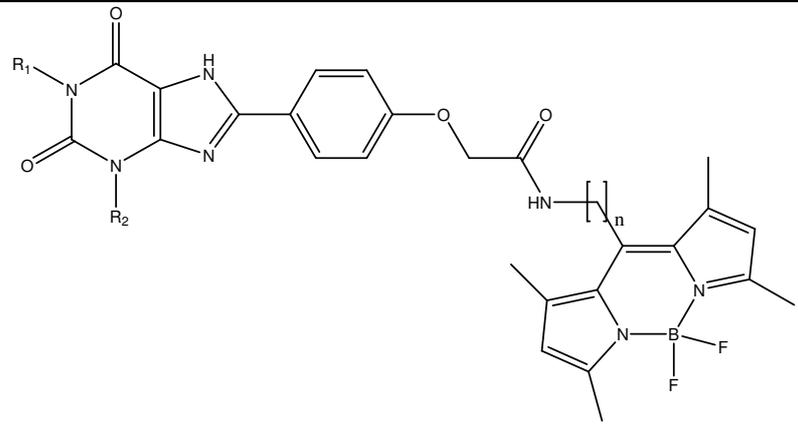
Verbindung	Methode	Ausbeute
96	A	22 %
97	A	17 %
98	B	30 %
99	A	11 %
100	A	30 %
101	A	14 %
102	A	0 %
	B	11 %
105	A	0 %*
	B	40 %
106	B	11 %
107	B	46 %
109	B	26 %

* Anstelle von Produkt **105** wurde **104** isoliert.

5.4.4. Pharmakologische Eigenschaften

Die neu entwickelten Verbindungen wurden in Radioligand-Bindungsstudien an Rattenhirn A₁- und A_{2A}-Adenosinrezeptoren mit [³H]Cyclopentyladenosin (CPA) bzw. [³H]3-(3-Hydroxypropyl)-7-methyl-8-(*m*-methoxystyryl)-1-propargylxanthin (MSX-2) als Radioliganden getestet. Zusätzlich wurden alle Verbindungen an humanen rekombinanten A₃-Adenosinrezeptoren mit dem A₃-selektiven antagonistischen Radioliganden [³H]2-Phenyl-8-ethyl-4-methyl-(8R)-4,5,7,8-tetrahydro-1H-imidazo[2,1-*f*]purin-5-on (PSB-11) untersucht. In Tabelle 7 sind die Ergebnisse dieser Untersuchungen aufgelistet. Die neu dargestellten Substanzen besitzen geringe bis moderate Affinitäten am A_{2A}-Rezeptor. Dabei scheint Verbindung **108** die höchste Affinität an diesem Rezeptorsubtyp zu besitzen. Der Großteil der Verbindungen zeigt bei einer Konzentration von 10 μM keinerlei Bindungsaffinität zu diesem Rezeptor. Die Verbindungen besitzen, bis auf Substanz **97**, nur sehr geringe bis keinerlei Bindungsaffinität zum A₃-Rezeptor. Die Affinitäten zum A₁-Rezeptor sind moderat bis gut, vor allem die Verbindungen **108** und **98** besitzen mit K_i-Werten von 88.1 nM bzw. 77.9 nM recht hohe Affinitäten zum A₁-Rezeptor.

Tabelle 7. Radioligand-Bindungsstudien von fluoreszenzmarkierten Adenosin-A_{2B}-Rezeptor-Antagonisten

							
Substanz	R ₁	R ₂	n	K _i + SEM [nM] (oder Inhibition in % bei 10 μM, n=3)			
				A ₁ Ratte [³ H]CPA	A _{2A} Ratte [³ H]MSX-2	A _{2B} Mensch [³ H]PSB-603	A ₃ Mensch [³ H]PSB-11
105	Propyl	H	2	422 ± 35	≥ 10000 (27 ± 5)	16.7 (n = 1)	≥ 10000 (45 ± 4)
96	Propyl	H	3	168 ± 13	2150 ± 390	10.6 ± 5.6 (n = 2)	988 ± 169
97	Propyl	H	4	178 ± 23	1570 ± 280	27.1 ± 10 (n = 2)	785 ± 126
98	Propyl	H	5	77.9 ± 12,8	477 ± 68	6.6 ± 3.4 (n = 2)	4550 ± 860
99	Propyl	H	10	227 ± 21	≥ 10000 (38 ± 3)	9.3 ± 1.9 (n = 2)	≥ 10000 (40 ± 4)
106	Butyl	H	2	275 ± 51	≥ 10000 (18 ± 1)	≥ 100	≥ 10000 (42 ± 2)
100	Butyl	H	3	382 ± 86	≥ 10000 (21 ± 6)	4.1 ± 0.7 (n = 2)	≥ 10000 (25 ± 9)
101	Butyl	H	4	431 ± 118	≥ 10000 (14 ± 5)	≥ 100	≥ 10000 (17 ± 1)
102	Butyl	H	10	1340 ± 287	≥ 10000 (28 ± 5)	≥ 100	≥ 10000 (24 ± 2)
107	Propyl	Propyl	3	428 ± 30	≥ 10000 (13 ± 4)	n.d.	≥ 10000 (17 ± 10)
108	Propyl	Propyl	5	88.1 ± 8,5	337 ± 8	≥ 1	7590 ± 1630
90	Propyl	H	-	145.1 ± 3 ¹⁴⁵	≥ 10000 (4 ± 3) ¹⁴⁵	372 ± 51 ¹⁴⁵	nd ¹⁴⁵
91	Butyl	H	-	81 ± 43 ¹⁴⁵	1887 ± 908 ¹⁴⁵	10.8 ± 8.3 ¹⁴⁵	1192 ± 147 ¹⁴⁵
87	Propyl	Propyl	-	58 ± 3 ¹⁷¹	nd	34 ± 13 ¹⁷¹	nd

Diese Verbindungen besitzen im Vergleich zu dem von *Hill et al.* publizierten XACBY630 eine höhere Affinität zu diesem Rezeptorsubtyp. Auf Grund der fehlenden Daten von XACBY630 bezüglich der A_{2A}-, A_{2B}- und A₃-Rezeptoren lassen sich keine Selektivitäten vergleichen. In ersten Untersuchungen an humanen A_{2B}AR zeigten die Substanzen hohe Affinitäten. Die Verbindungen **98** und **100** waren mit K_i-Werten von 6.6 bzw 4.1 nM sehr affin. Verbindung **100** besitzt eine 95fache Selektivität gegenüber dem A₁AR und hohe Selektivitäten gegenüber dem A₃AR und A_{2A}AR. Verbindung **98** ist mit 11facher Selektivität gegenüber dem A₁AR und 72facher Selektivität gegenüber dem A_{2A}AR nicht so selektiv, interessant ist die Affinitätssteigerung durch die Einführung des BODIPY-Restes: So konnte die Affinität zum A_{2B}AR von 372 nM (**90**) auf 6.6 nM (**98**) erhöht werden. Die Steigerung der Affinitäten konnte bei allen gelabelten Derivaten von **90** beobachtet werden. Die Kettenlänge scheint keinen Einfluss auf die Affinität zum A_{2B}AR auszuüben, da keine Änderung der K_i-Werte zu beobachten ist. Die pharmakologischen Ergebnisse zeigen, dass hochpotente fluoreszenzmarkierte A_{2B}AR-Antagonisten dargestellt werden konnten, die den bisher publizierten Verbindungen bezüglich Affinität und Selektivität überlegen sind.

6. Synthese eines BODIPY-markierten Fluoreszenzliganden für P-Glykoprotein

6.1. Einleitung

Ein grosses Hindernis bei der Behandlung von Tumorpatienten mit Hilfe der Chemotherapie stellt die **Multiple Drug Resistance (MDR)** gegenüber Zytostatika dar. Es sind diverse Wirkstoff-resistente Tumorarten bekannt, die eine Kreuz-Resistenz zwischen strukturell verschiedenen Zytostatika entwickelt haben. Untersuchungen haben gezeigt, dass MDR-Zellen einen energieabhängigen Ausstrom von Wirkstoffen besitzen und es dadurch zu verminderten Wirkstoffanreicherungen in der Zelle kommt. In Krebszellen wurde eine Überexpression eines 170 kDa großen Plasmamembranproteins, des P-Glykoproteins (PgP) beobachtet. Dieses Protein fungiert als ATP-abhängiger Transporter von hydrophoben Substanzen aus dem Zellinneren hinaus. P-Glykoproteine wurden auch in gesunden menschlichen Zellen gefunden; so konnte das Protein in vielen Epithelzellen und in verschiedenen Endothelzellen der Blut-Hirn-Schranke nachgewiesen werden. Obwohl die physiologische Bedeutung des P-Glykoproteins bisher noch nicht vollständig geklärt ist, wird vermutet, dass es die Zellen vor toxischen Stoffen schützen soll.¹⁴⁶

6.1.1. Aufbau des P-Glykoproteins

Durch eine Sequenzanalyse von PgP konnte es der Superfamilie der ABC-(**A**T**P**-**b**inding **c**assette) Proteine zugeordnet werden. Ein typischer Vertreter dieser Superfamilie besteht aus vier Untereinheiten, jede mit sechs transmembranären Segmenten (TM) und zwei Nucleotid-bindenden Domänen (NBDs), welche ATP binden und hydrolysieren. Die Sequenzanalyse zeigte, dass der einzelne Polypeptidrest sich in zwei Hälften, bestehend aus sechs α -Helix-TM-Segmenten und einer NBD anordnet (Abb. 49). PgP-Gene konnten aus Hamster, Maus und menschlichen Zellen kloniert und sequenziert werden.

Das Pgp ist ein atypischer Membrantransporter, da es unspezifisch gegenüber hydrophoben Verbindungen ist. Hunderte verschiedener Strukturen, wie z.B. Anthracycline (Daunorubicin), Vinca-Alkaloide (Vinblastin), Steroide (Dexamethason), Hoechst-33342 oder Rhodamine-123 konnten bereits als Substrate identifiziert werden (Abb. 50).

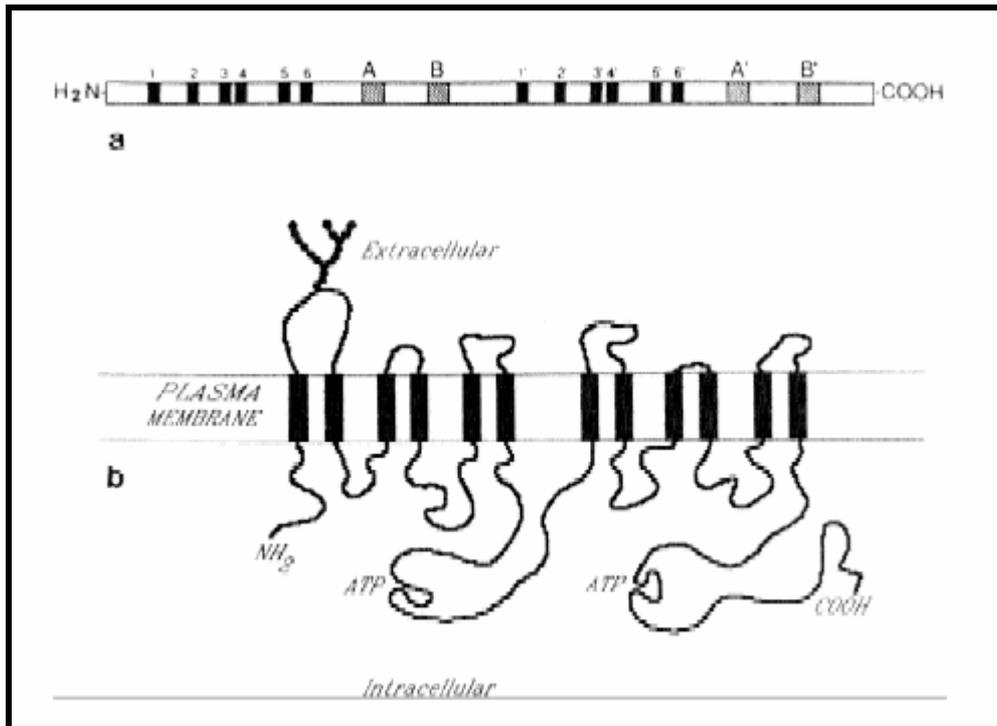


Abb. 49. Struktur und topologisches Modell des Pgp¹⁴⁶

Die Substrate interagieren sowohl mit dem Protein selber, als auch mit der Lipidschicht der Biomembran. Dadurch ist die Verteilung des Wirkstoffes in der Lipidschicht von besonderer Bedeutung.¹⁴⁶

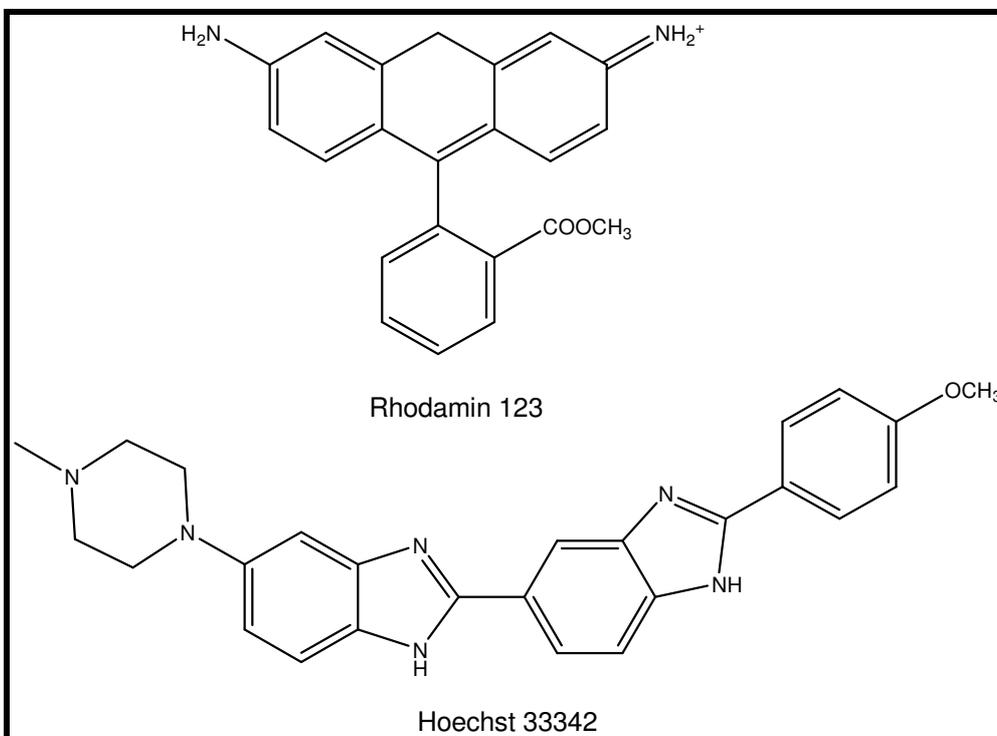


Abb. 50. Struktur der Pgp-Substrate Hoechst 33342 und Rhodamin 123

6.1.2. Transport von Wirkstoffen durch P-Glykoprotein

Das Pgp besitzt nur eine geringe Affinität gegenüber ATP jedoch eine hohe ATPase-Aktivität. Wahrscheinlich führt eine Aktivierung der Bindungsstelle zu einer Konformationsänderung des Proteins, welche an die katalytische Stelle der NBD weitergeleitet wird. Diese Änderung aktiviert vermutlich die ATPase, die durch Hydrolyse von ATP die für den Transport benötigte Energie liefert. Der Transporter interagiert direkt mit hydrophoben Substanzen und könnte als eine Art Wirkstoff-Flippase fungieren, die die Wirkstoffe von der inneren Seite der Membran zu der äußeren Seite der Membran transportiert (Flip-Flop-Modell). „Chemosensitizer“, wie z.B. Verapamil und Reserpin sind Stoffe, die Pgp blockieren und keine MDR ausbilden.¹⁴⁷ Eine Hypothese ist, dass sie als alternative Substrate dienen, und es durch eine hohe spontane Flip-Flop-Rate zu einem nutzlosen Kreislauf des Transporters kommt.¹⁴⁶

6.1.3. Bindungsstellen am P-Glykoprotein

Obwohl die Literatur widersprüchliche Daten hierzu enthält, hat sich herauskristallisiert, dass mehrere verschiedene Bindungsstellen am Pgp existieren müssen.² *Shapiro et al.* beschrieben 1997 die Existenz von zwei verschiedenen Bindungsstellen: Eine, die so genannte H-Bindungsstelle, steuert den Ausstrom von Hoechst-Derivaten, die andere, R-Bindungsstelle genannt, den von Rhodamin-Derivaten. Die Autoren zeigten, dass Substanzen die eine hohe Selektivität für die H-Bindungsstelle besitzen, den Ausstrom von Hoechst 33258 unterbinden und gleichzeitig den Ausstrom von Rhodamin erhöhen. Die analoge Beobachtung konnte auch im umgekehrten Fall gemacht werden. Substanzen die keine Selektivität zu diesen Bindungsstellen besitzen, hemmen sowohl den Ausstrom von Rhodamin als auch den von Hoechst.¹⁴⁹ 2000 beschrieben *Martins et al.* mit Hilfe von Radioligandbindungsstudien vier weitere Bindungsstellen. Wahrscheinlich existieren aber noch weitere unentdeckte Bindungsstellen am Pgp.¹⁵⁰ Alle Bindungsstellen stehen durch einen allosterischen Informationsfluss miteinander in Verbindung. Es wird vermutet, dass jede Bindungsstelle ein aktiven und einen nicht aktiven Status für seine Liganden besitzt und diese sich in einem Gleichgewicht befinden. Die allosterischen Wechselwirkungen zwischen den Bindungsstellen scheinen dieses Gleichgewicht zu beeinflussen.^{150, 151}

6.1.4. Hoechst-Derivate mit hoher Affinität zu P-Glykoprotein

Hoechst 33258 stellt chemisch betrachtet ein 2,6-Bis-benzimidazol-Derivat dar. Die erste beschriebene Vollsynthese wurde 1974 von *Loewe und Urbanietz* vorgestellt.¹⁵² Durch sein grosses chromophores System stellt Hoechst 33258 zudem einen Fluorophor dar, welcher ein Absorptionsmaximum bei 340 nm besitzt und mit UV-Licht angeregt werden kann (Abb. 51). Ziel bei der Entwicklung dieses Derivates war es damals, neue chemotherapeutisch nutzbare Wirkstoffe darzustellen. Die Struktur zeigte eine stark toxische Wirkung auf die Filarien der Baumwollratte. Filarien sind Fadenwürmer (Filarioidea) deren Körperlänge je nach Art zwischen 2 und 50 cm schwankt.¹⁵³ Die Autoren beschrieben, dass sich diese Substanz sehr fest an die DNA bindet und vermuteten in dieser Tatsache den Wirkungsmechanismus.¹⁵²

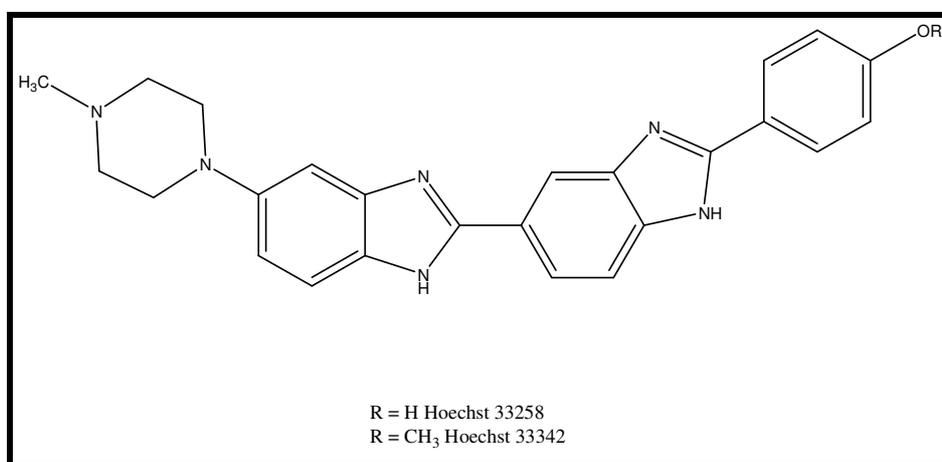


Abb. 51. Strukturen von Hoechst 33258 und 33342

Die Interaktion von Hoechst 33258 mit der DNA wurde ausführlich untersucht und beschrieben.¹⁵⁴ Hoechst 33258 stellt in der Tat ein Beispiel für einen kationischen DNA-Binder dar.^{154,155} Die Substanz wird sehr schnell in die Zellen aufgenommen und bindet dort sehr eng an den A-T-reichen Sequenzen der DNA. Dadurch inhibiert Hoechst 33258 die Transkription spezifischer Gene.¹⁵⁵ Abb. 52 zeigt die Bindung der Hoechst-Substanz an die kleine Furche der DNA, durch Bildung des Komplexes zwischen Hoechst 33258 und dem Dodecamer $d(\text{CGCGATATCGCG})_2$.¹⁵⁴

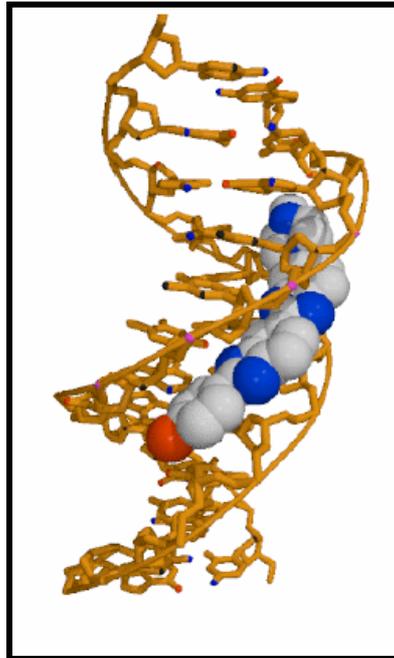


Abb. 52. Komplex zwischen Hoechst 33258 und d(CGCGATATCGCG)₂¹⁵⁴

Die starke Bindung von Hoechst 33258 an die DNA wird durch die räumliche Struktur der Substanz begünstigt und scheint durch Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Adenin-N³- bzw. Thymin-O²-Atomen der DNA-Bindungssequenz und den beiden NH-Gruppen der Bisbenzimidazole des Hoechst-Moleküls, sowie durch hydrophobe Wechselwirkungen und elektrostatische Anziehungskräfte stabilisiert zu werden.¹⁵⁵ Die Anwendung als Zytostatikum kommt auf Grund der hohen Toxizität nicht in Frage, zudem zeigte die Substanz in *In-Vivo*-Studien nur eine moderate Aktivität gegenüber L1210-Leukämiezellen.¹⁵⁵ 1997 beschrieben *Shapiro et al.* die Bindungsstelle von Hoechst 33342 am P-Glykoprotein und bezeichneten sie als H-Bindungsstelle.¹⁴⁹ Diese Bindungsstelle ist insofern einzigartig, als sie Transport und regulatorische Funktionen kombiniert.¹⁵⁰ Die H-Bindungsstelle besitzt allosterische Kommunikation mit den anderen Bindungsstellen. Die Hoechst-Substanz besitzt viele verschiedene funktionelle Gruppen, die alle in die Interaktion mit dem Protein involviert sein können. Wichtige Strukturelemente sind fünf hydrophobe Zentren (H₁, H₁¹, H₂, H₂¹ und H₃), vier Wasserstoffbrückenakzeptoren (A₁, A₂, A₃ und A₄) und drei Wasserstoffbrückendonatoren (D₁, D₂ und D₃).¹⁴⁸ Der genaue Pharmakophor der Hoechst-Substanz wurde 2004 von *Pajeva et al.* untersucht, und mit Hilfe von Modelling-Versuchen wurden die funktionellen Gruppen den entsprechenden Aminosäuren des P-Glykoproteins zugeordnet (Abb. 53).¹⁴⁸

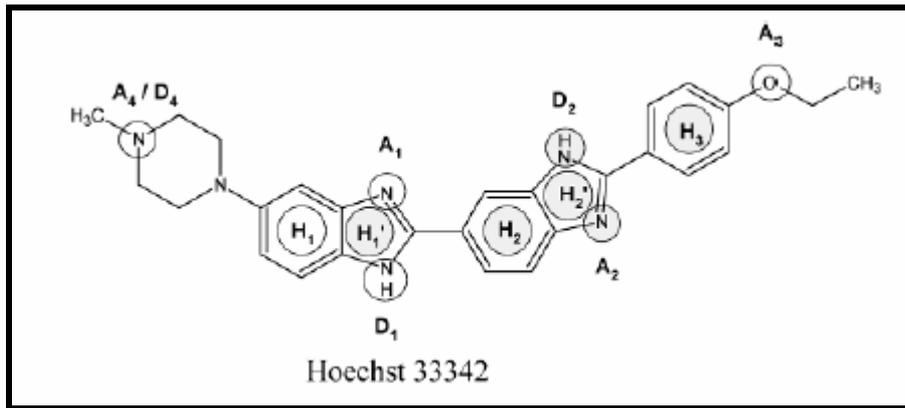


Abb. 53. Pharmakophor-Modell von Hoechst 33342 nach *Pajeva et al.*¹⁴⁸

6.2. Verknüpfung von Hoechst 33258 mit einem BODIPY-Derivat

6.2.1. Problemstellung

Hoechst 33258 (**109**) und seine Derivate sind, wie oben beschrieben, Fluorophore, die energiereiches UV-Licht absorbieren (Absorptionsmaximum: 345 nm) und blaues Fluoreszenzlicht emittieren (Emissionsmaximum: 478 nm).¹⁵⁶ Für Untersuchungen der Bindung von Hoechst-Derivaten an die Bindungstasche können fluoreszenzspektroskopische Methoden angewendet werden. Da die Hoechst-Substanz durch ihr niedriges Absorptionsmaximum UV-Licht absorbiert, kann es zu Störungen der Messungen durch die Autofluoreszenz des Gewebes kommen. Um dieses Problem zu umgehen, muss die Hoechst-Struktur so modifiziert werden, dass sich ihr Emissionsmaximum bathochrom auf Wellenlängenzahlen größer als 500 nm verschiebt. Eine dafür erforderliche Erweiterung des chromophoren Systems kommt nicht in Frage, da fünf hydrophobe Zentren für die Wechselwirkung mit dem Transporter erforderlich sind. Eine Vergrößerung würde, neben zusätzlichen hydrophoben Zentren, eine deutliche Erhöhung der Lipophilie bedeuten. Was diese Änderungen für die Affinität bedeuten würden, lässt sich nicht abschätzen. Eine einfache Alternative ist die Verknüpfung von Hoechst 33258 mit einem BODIPY-Derivat, wodurch die neu dargestellte Substanz die spektroskopischen Eigenschaften beider Fluorophore besitzen würde.

6.2.2. Direkte Verknüpfung von Hoechst 33258 mit BODIPY

Die direkte Verknüpfung von Hoechst 33258 mit einem BODIPY-Derivat könnte durch die Bildung eines Ethers erreicht werden. Ether lassen sich durch Reaktion von Alkoholen mit Basen und Alkylhalogeniden darstellen. Im ersten Schritt wird aus dem entsprechenden Alkohol mit Hilfe einer starken Base das Alkoholat hergestellt. Dieses greift im zweiten Schritt im Zuge einer nukleophilen Substitution das partiell positiv geladene Kohlenstoffatom des Alkylhalogenides an. Die direkte Umsetzung des Alkohols mit Alkylhalogeniden in Gegenwart von Caesiumcarbonat in Acetonitril oder Kaliumhydroxid in Dimethylsulfoxid wurde beschrieben.⁸²

Übertragen auf die darzustellende Substanz, wäre dies die Darstellung des Phenolates **110** mit Hilfe von elementarem Natrium, Caesiumcarbonat oder Kaliumcarbonat und die anschließende Verknüpfung mit einem BODIPY-Alkylbromid zu **111** (Abb. 54).

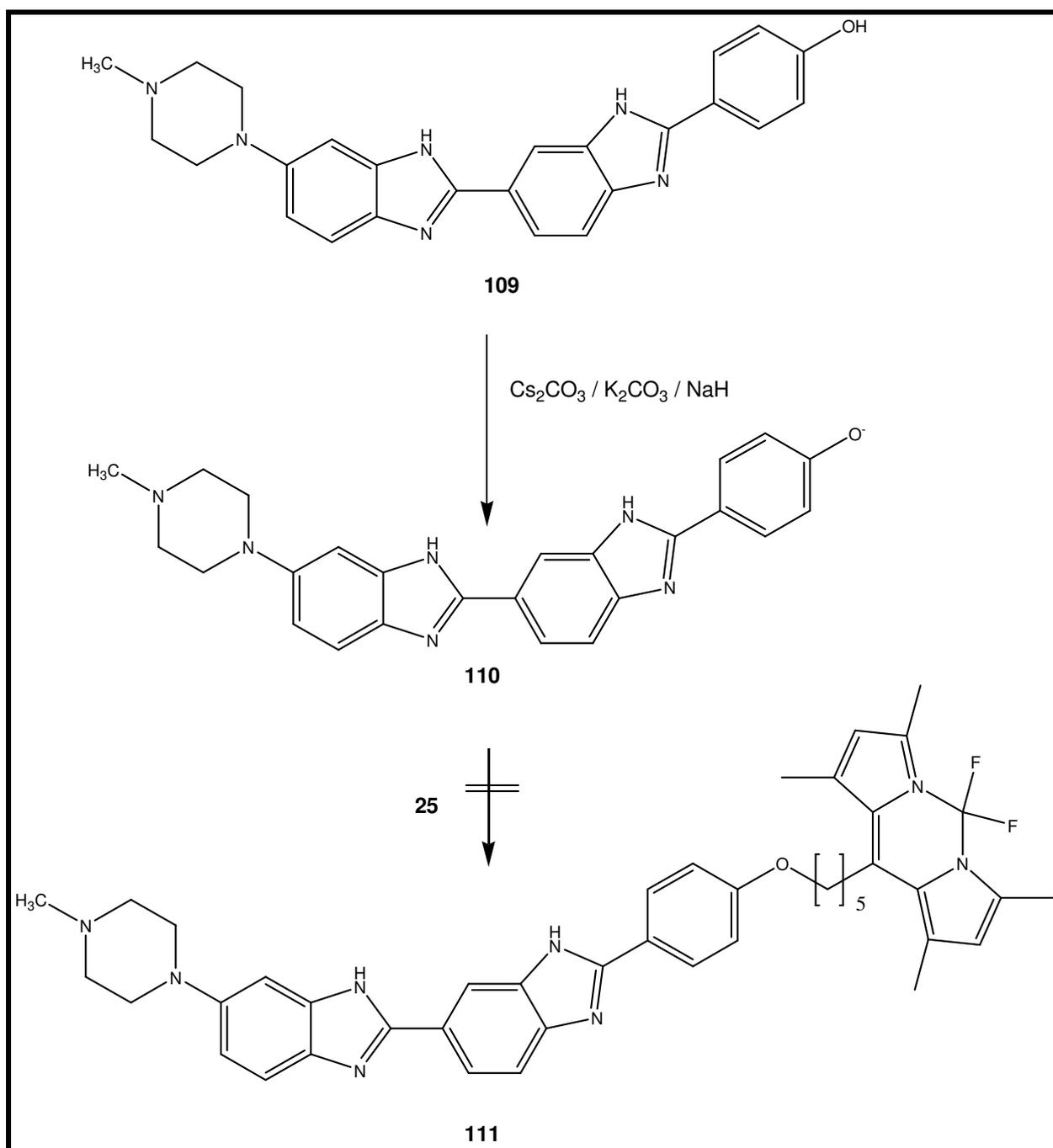


Abb. 54. Syntheschema der direkten Verknüpfung von Hoechst 33258 mit einem BODIPY-Derivat

Die direkte Umsetzung wurde in Anlehnung an die Literatur mit Caesiumcarbonat,⁸² Kaliumcarbonat¹⁵⁷, Natrium sowie Natriumhydrid in verschiedenen Lösungsmitteln (Dimethylformamid, Dimethylsulfoxid) durchgeführt. Es konnte keine Umsetzung beobachtet werden. Änderungen der Reaktionsparameter (Raumtemperatur bis Siedehitze, Mikrowellen-Bestrahlung) führten ebenfalls zu keinem zufriedenstellenden Resultat. Als ein großes Problem dieser Reaktionen stellte sich die unterschiedliche Löslichkeit der beiden Edukte heraus. Während **109** eine hydrophile

Substanz darstellt, die sehr gut in Alkoholen oder Wasser löslich und in Dichlormethan oder Chloroform praktisch unlöslich ist, handelt es sich bei **25** um eine lipophile Verbindung, die sich sehr gut in Dichlormethan löst, aber in Wasser praktisch unlöslich ist. Auch die Verwendung von Dimethylsulfoxid als Lösungsmittel führte zu keiner Verbesserung der Umsetzung. Drastische Bedingungen verboten sich, da **25** in basischem Milieu eine beginnende Zersetzung zeigt und nach einer Umsetzung mit **109** und Kaliumhydroxid in Wasser bei 100°C nicht mehr nachgewiesen werden konnte. Alkohole kommen auf Grund von Konkurrenzreaktionen als Lösungsmittel nicht in Frage.

6.2.3. Verknüpfung über einen Spacer

Su et al. veröffentlichten 2002 die Reaktion von Hoechst 33258 mit 4-Brombuttersäureethylester zu **112** und spalteten anschließend im Alkalischen die Esterfunktion zu **113**. Die daraus resultierende Carbonsäure konnte mit Hilfe von Triphenylphosphin und 2,2-Dithiopyridin in DMF mit einer eine Aminogruppe tragenden Struktur verknüpft werden.¹⁵⁷ Da Amino-funktionalisierte BODIPY-Strukturen zur Verfügung stehen, wurde diese Vorschrift aufgegriffen (Abb. 55). Als ein wesentlicher Vorteil ist die Tatsache anzusehen, dass die Darstellung eines Ethers harte Bedingungen erfordert und die empfindliche BODIPY-Struktur erst in den nächsten Schritten durch eine Verknüpfung mit der freien Carbonsäure **113** unter milden Reaktionsbedingungen eingeführt werden könnte (Abb. 55). Die beschriebene Reaktion führte jedoch unter den angegebenen Bedingungen zu keiner Umsetzung. Zwar konnten durch eine RP-Dünnschichtchromatographie zwei Substanzflecke nachgewiesen werden und dies durch analytische HPLC bestätigt werden, setzte man allerdings die Fluoreszenzintensität der beiden Substanzflecken in Relation zueinander, so wies der neu entstandene Substanzfleck nur eine geringe Fluoreszenz auf, was auf eine sehr geringe Umsetzung hindeutete. Auf eine Isolierung mit Hilfe der HPLC wurde auf Grund der geringen Ausbeute verzichtet. Eine verbesserte Umsetzung war auch durch Änderungen der Reaktionsparameter analog zu den oben beschriebenen Versuchen nicht von Erfolg gekrönt. Die Schwierigkeit bei der Veretherung von Phenolen liegt in der Basizität des Phenolates. Phenol besitzt mit einem pK_s -Wert von ungefähr 10 schwach saure Eigenschaften, wohingegen aliphatische Alkohole neutral reagieren (pK_s -Werte um 15).⁸² Demzufolge sind die korrespondierenden Basen der aliphatischen Alkohole

stärkere Basen und damit auch stärkere Nukleophile, als das Phenolat-Anion. Ether sind aus aliphatischen Alkoholen daher leichter zugänglich, als aus Phenolen.

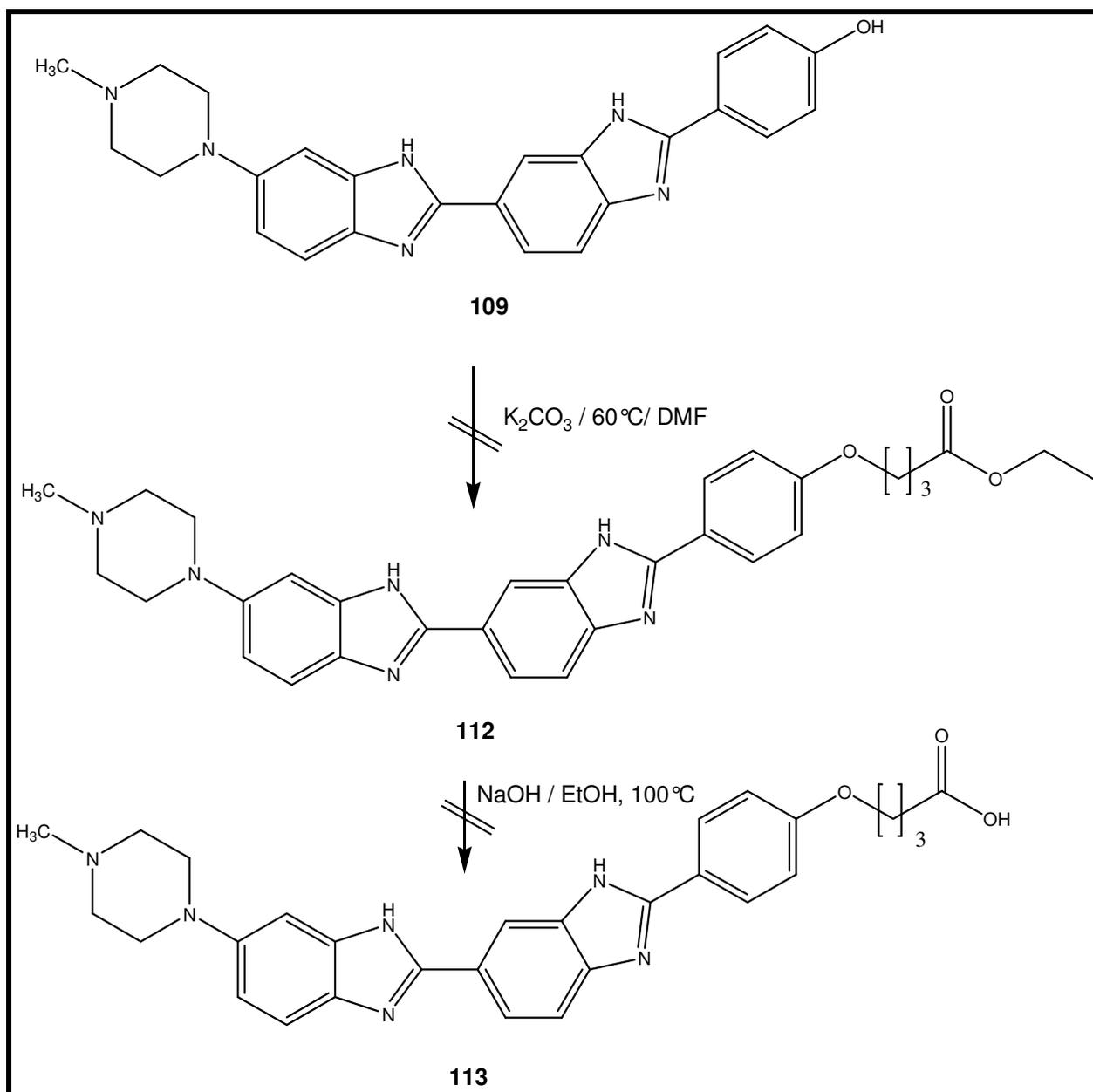


Abb. 55. Syntheschema zur Derivatisierung von Hoechst 33258

Die direkte Verknüpfung eines BODIPY-Derivates, sowie die Einführung eines Spacers an der phenolischen OH-Gruppe von **109** war nicht möglich.

6.2.4. De-Novo-Synthese eines Hoechst-Derivates

2004 publizierten *Reddy et al.* die Darstellung des Hoechst Derivates **113**. Sie verwiesen in den ersten Stufen der Synthese auf die von *Ebrahimi et al.* 1995 modifizierte Synthese von *Loewe et al.*^{152,158,159}

Im ersten Schritt wird die Tatsache ausgenutzt, dass Chlor an desaktivierten Aromaten leicht nukleophil substituierbar ist.¹⁵² 2-Chlor-5-nitroanilin (**114**) ist auf Grund der –M und –I- Effekte der Nitro- und Chlorsubstituenten ein desaktivierter Aromat und besitzt mit dem Chlor eine gute Abgangsgruppe. In der Tat führte die Umsetzung mit N-Methylpiperazin (**115**) bei hohen Temperaturen zu dem gewünschten 5-(4-Methyl-1-piperazinyl)-2-nitroanilin (**116**) in guten Ausbeuten (Abb. 56).

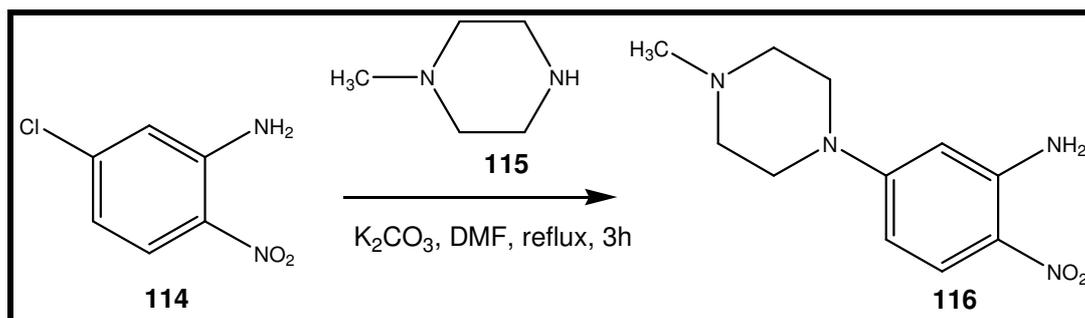


Abb. 56. Darstellung von 5-(4-Methyl-1-piperazinyl)-2-nitroanilin **116**

Die Nitro-Gruppe in **116** kann zu einer Amino-Gruppe reduziert werden. Eine elegante Methode in der organischen Synthese stellt die Reduktion mit Wasserstoff und Palladium auf Aktivkohle als Katalysator dar.⁸² **116** konnte bei Normaldruck und Raumtemperatur glatt zu **117** umgewandelt werden (Abb. 57). **117** ist oxidationsempfindlich und sollte sofort zu **120** umgesetzt werden.

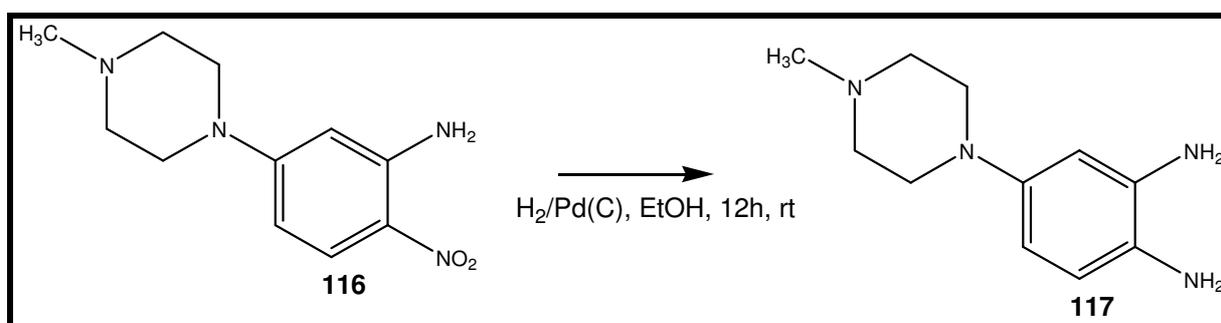


Abb. 57. Reduktion der Nitrogruppe von **117**

Die Bildung des Benzimidates ist auf vielfältige Weise möglich. Eine einfache Methode stellt die Reaktion des Diamin-Derivates **117** mit einem entsprechend substituierten Iminoether **119** dar.

Iminoether sind in der organischen Chemie durch die Reaktion eines Nitrils mit Chlorwasserstoff in wasserfreiem Medium unter Zusatz von Alkoholen präparativ zugänglich. Die Reaktion ist unter dem Namen Pinner-Reaktion bekannt (Abb. 58a).¹⁶⁰ Dabei erfolgt zunächst die Aktivierung des Nitrils für den nukleophilen

Angriff durch Protonierung mit Hilfe einer starken Säure, am zweckmäßigsten mit Chlorwasserstoff. Diese Reaktion muss unter wasserfreien Bedingungen ablaufen, um Konkurrenzreaktionen, wie z.B. die saure Hydrolyse des Nitrils, zu verhindern.^{160,161} Die Umsetzung von 3-Nitro-4-aminobenzonitril (**118**) in trockenem Diethylether führte unter Zugabe von äquimolaren Mengen sehr trockenen Ethanols und anschließender Begasung mit Chlorwasserstoff laut Vorschrift zu Ethyl-3-nitro-4-aminobenzimidat (**119**).¹⁵⁹ Die Reaktionsdurchführung erwies sich als schwierig, da die Begasung mit Chlorwasserstoff trotz Eiskühlung zu einem rapiden Temperaturanstieg (50 °C) führte, der eine Verdampfung des Lösungsmittels zur Folge hatte. Eine entscheidende Vereinfachung der Reaktion konnte durch die Verwendung von kommerziell erhältlichem Chlorwasserstoff-haltigem Dioxan (4M) anstelle des Diethylethers und gasförmigem Chlorwasserstoff erreicht werden. Diese Modifikation führte zu sehr guten Ausbeuten von **119** (Abb. 58b).

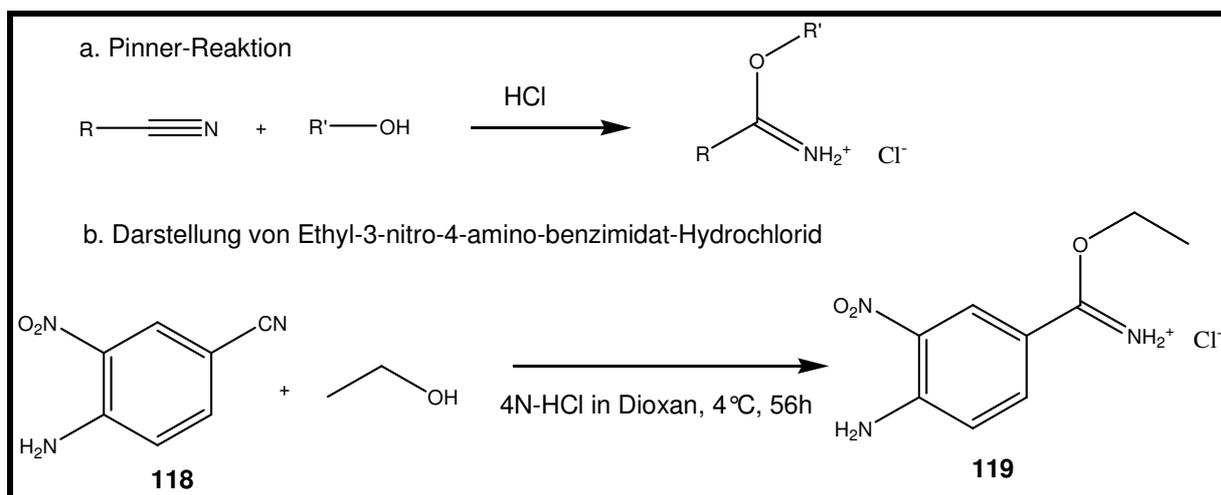


Abb. 58. Darstellung des Iminoethers **119**

Das partiell positiv geladene Carbonylkohlenstoffatom des Iminoethers kann von nukleophilen Reagentien wie z.B. Aminoderivaten angegriffen werden. Bei der Umsetzung mit Diaminen kann nach Abspaltung von Ethanol durch Eliminierung von Ammoniumacetat der Ringschluss erfolgen. **119** konnte durch Reaktion von **117** mit **119** in essigsaurem Milieu bei hohen Temperaturen erhalten werden. Durch anschließende Fällungsreaktionen mit Ammoniak war **120** in hohen Ausbeuten zugänglich (Abb. 59).

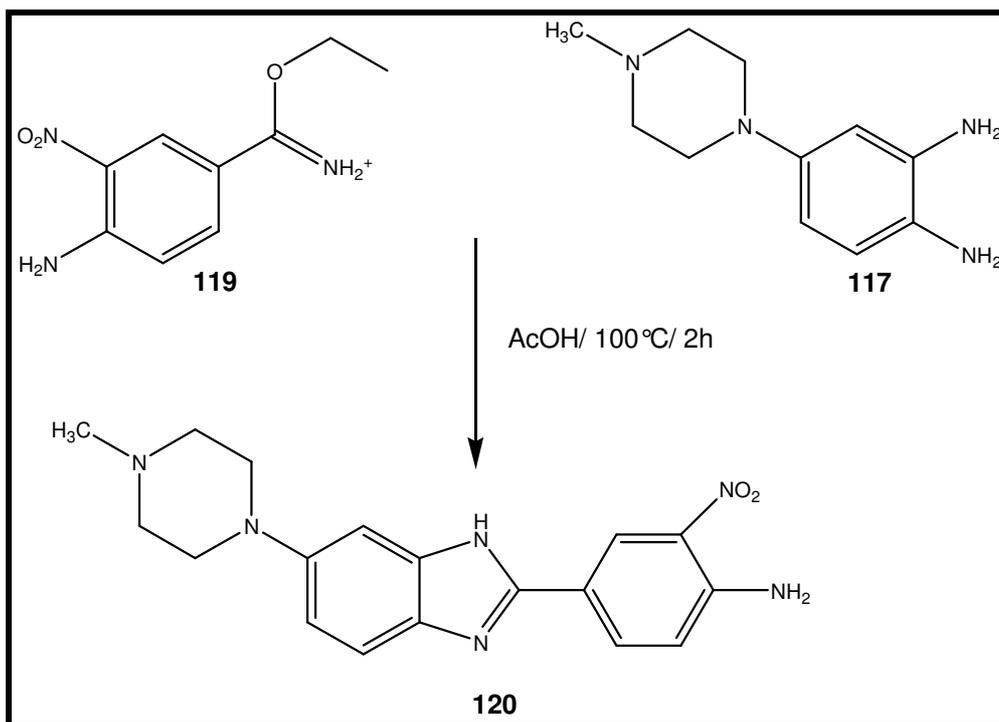


Abb. 59. Ringschluss zum Benzimidat 120

Im folgenden Schritt wird analog zu 117 die Nitrogruppe 120 zur Aminogruppe 121 reduziert. Dies gelang erneut mit Hilfe von $\text{H}_2/\text{Pd}(\text{C})$ in Ethanol. Die Reaktionszeit ist hier deutlich kürzer und das Produkt ist stabiler und kann gelagert werden, ohne Zersetzungserscheinungen zu zeigen (Abb. 60).

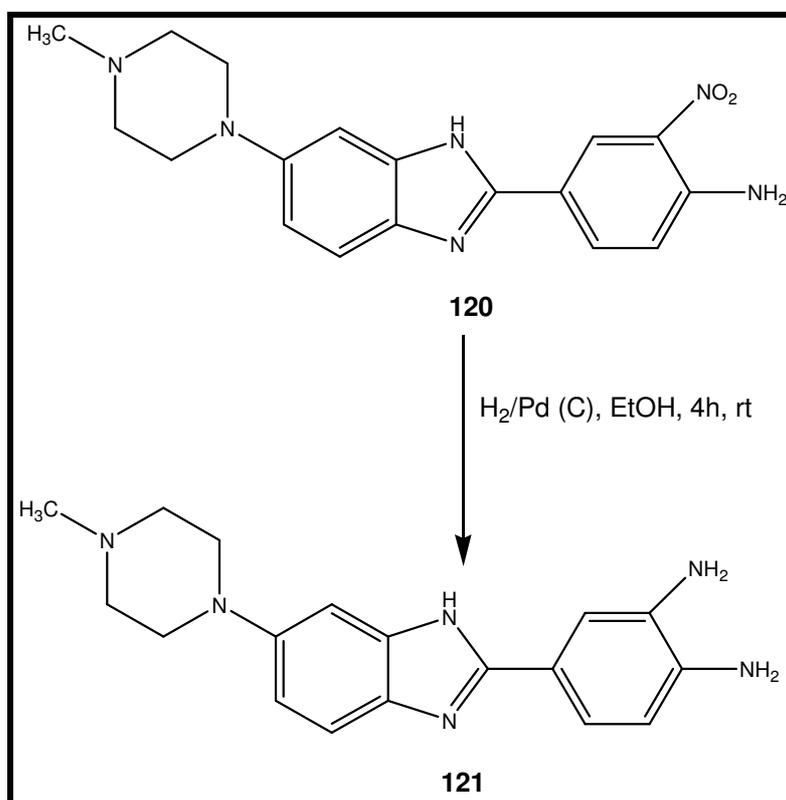


Abb. 60. Reduktion der Nitrogruppe zu 121

Die Umsetzung von Diaminen zu Benzimidaten kann wie oben beschrieben auf verschiedene Art und Weise erfolgen. Eine Methode wurde bei der Darstellung von **120** beschrieben. Da die Stabilität und die Verfügbarkeit von Iminoethern eingeschränkt ist, konnte dieses Verfahren für die Darstellung des Hoechst-Derivates nicht genutzt werden. Für die Verknüpfung mit einem BODIPY-Derivat ist es am günstigsten, das Hoechst-Derivat mit einer Carbonsäure zu funktionalisieren. Der Rest der mit **121** zu einem Hoechst-Derivat reagieren soll, muss entsprechend substituiert sein. Eine andere Methode für die Darstellung von Benzimidaten ist die Umsetzung von Diaminen mit entsprechend substituierten Aldehyden. Dieses Verfahren wurde von *Reddy et al.* angewendet. Dafür musste zunächst der dafür notwendige Aldehyd **126** hergestellt werden. Im ersten Schritt wurde das kommerziell erhältliche 4-Brombuttersäurechlorid (**122**) unter Eiskühlung mit Benzylalkohol (**123**) umgesetzt. Nach säulenchromatographischer Aufreinigung erhielt man **124** in guten Ausbeuten (Abb. 61).

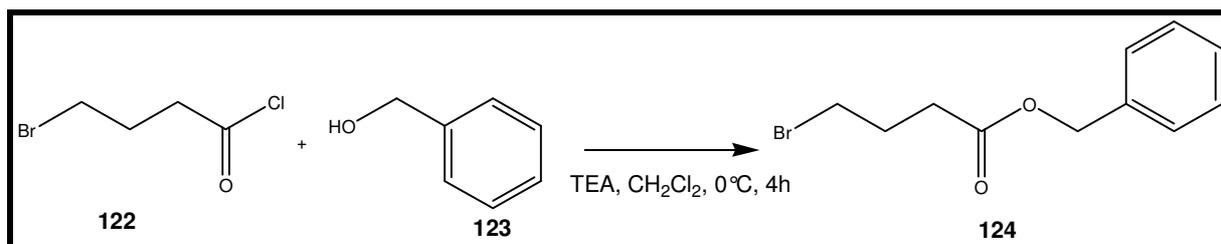


Abb. 61. Veresterung von Brombuttersäurechlorid

Verbindung **124** wurde mit Hilfe von Caesiumcarbonat in Dimethylacetamid unter hohen Temperaturen mit 4-Hydroxybenzaldehyd (**125**) umgesetzt. Der nach erfolgter Aufreinigung mit Hilfe klassischer Säulenchromatographie erhaltene Ether **126** wurde für die nachfolgende Ringschlussreaktion mit **121** eingesetzt (Abb. 62).

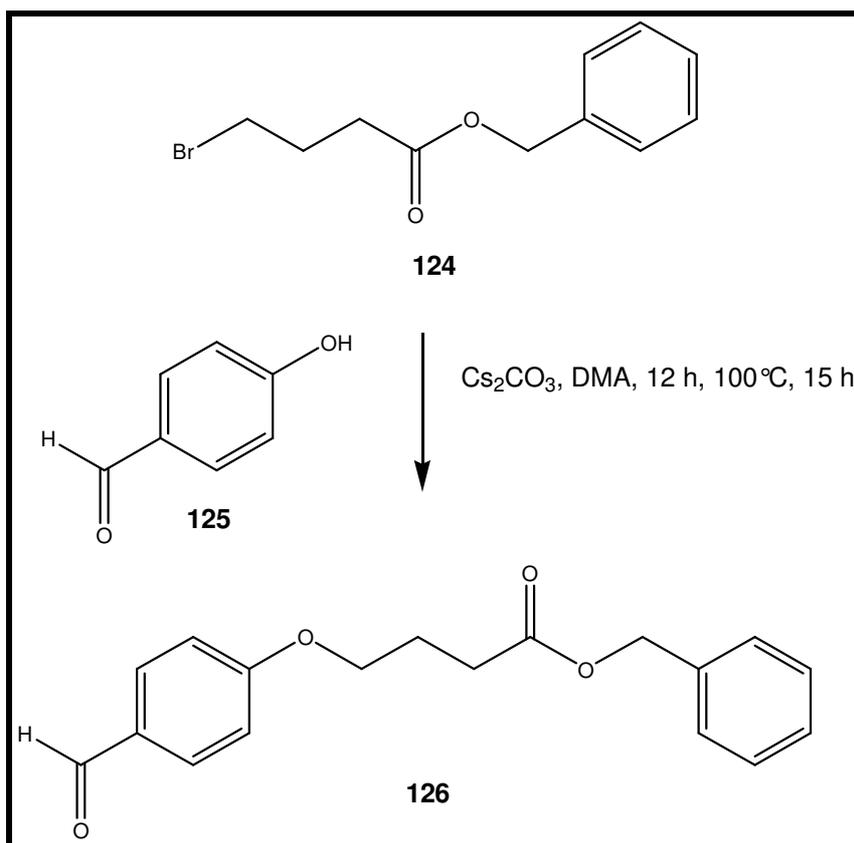


Abb. 62. Darstellung des Aldehyds **126**

Die Ringschlussreaktion von **121** mit **126** erfolgt in einer zweistufigen Reaktion. Zunächst kondensiert ein Amin mit dem Aldehyd unter Ausbildung eines Imins. Das Imin kann mit dem zweiten Amin eine oxidative Ringschlussreaktion eingehen. In der Literatur sind diverse Wege beschrieben, diese Oxidation durchzuführen.^{159,82,162,163}

In der von *Reddy et al.* publizierten Synthese erfolgt die Ringschlussreaktion in Nitrobenzen, das sowohl als Lösungsmittel als auch als Oxidationsmittel fungiert. **127** konnte durch Erhitzen von **121** und **126** in Nitrobenzen mit anschließender Fällung mit n-Hexan und säulenchromatographischer Aufarbeitung in befriedigenden Ausbeuten (30%) dargestellt werden. Die Synthese erwies sich als schwierig, da als Fällungsprodukt zunächst eine schwarze, teerige Masse anfiel, die auf Kieselgel aufgezogen werden musste, da sie sich nicht in dem angegebenen Laufmittel löste. Das Rohprodukt war stark verunreinigt, so dass eine langsame säulenchromatographische Auftrennung notwendig war. Durch die hohe Polarität der Verbindung dauerte die Trennung trotz Flashchromatographie bis zu 14 h. Da Hoechst-Verbindungen photosensibel sind und leicht zu Zersetzungsreaktionen neigen, ist es möglich, dass die lange Verweildauer auf der Chromatographiesäule

zu Zersetzungsreaktionen führte, die die im Vergleich zu dem publizierten Wert (87 %) geringere Ausbeute erklären würde.

Als eine Alternative bot sich die in unserem Arbeitskreis etablierte Cyclisierungsreaktion von Diaminouracilen mit den entsprechenden Aldehyden an. (s. Kapitel 5.2.4.).¹⁴³ Die Umsetzung von **121** mit **126** in Ethanol in der Siedehitze, führte zu einer bei 355 nm hellblau fluoreszierenden Lösung. Die Fluoreszenz kann als Indikator für eine erfolgreiche Verknüpfung angesehen werden, da erst diese Verlängerung des chromophoren Systems zur Fluoreszenz führt. Überraschenderweise entsprach das ausgefällte Produkt nicht dem zu erwartenden Imin, sondern dem bereits cyclisierten Produkt **127**. In der Tat wird in Publikationen die Umsetzung von Diaminen mit Aldehyden in Alkoholen direkt zu cyclisierten Benzimidatsystemen beschrieben. Vermutlich reichen die relativ drastischen Bedingungen (7h, Reflux) aus, um mit Hilfe von Luftsauerstoff die notwendigen oxidativen Bedingungen zu schaffen (Abb. 63).^{162,163}

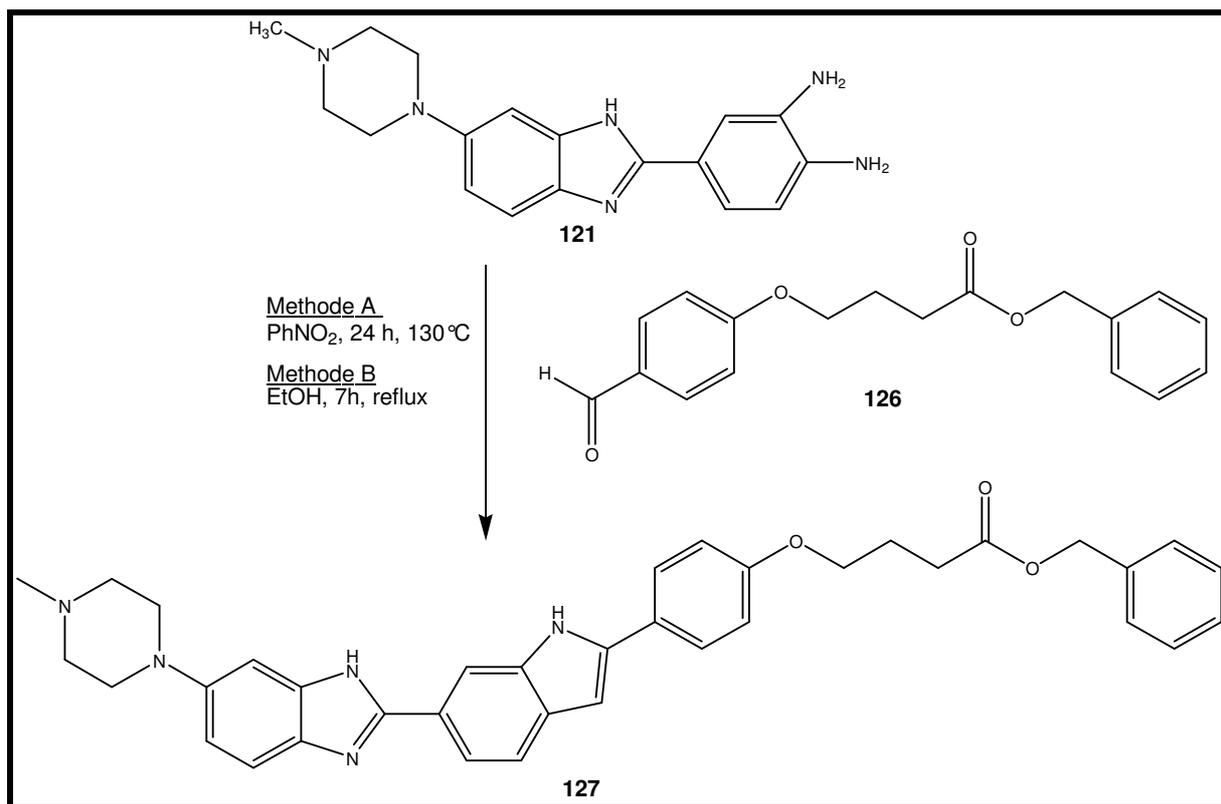


Abb. 63. Hoechst-Derivat **127**

Die alkalische Spaltung des Benzylesters **127** konnte in Methanol durch Zugabe von Natriumhydroxid erreicht werden (Abb. 64). Die hydrogenolytische Spaltung führte zu einem Produktgemisch und wurde daher nicht weiter verfolgt.

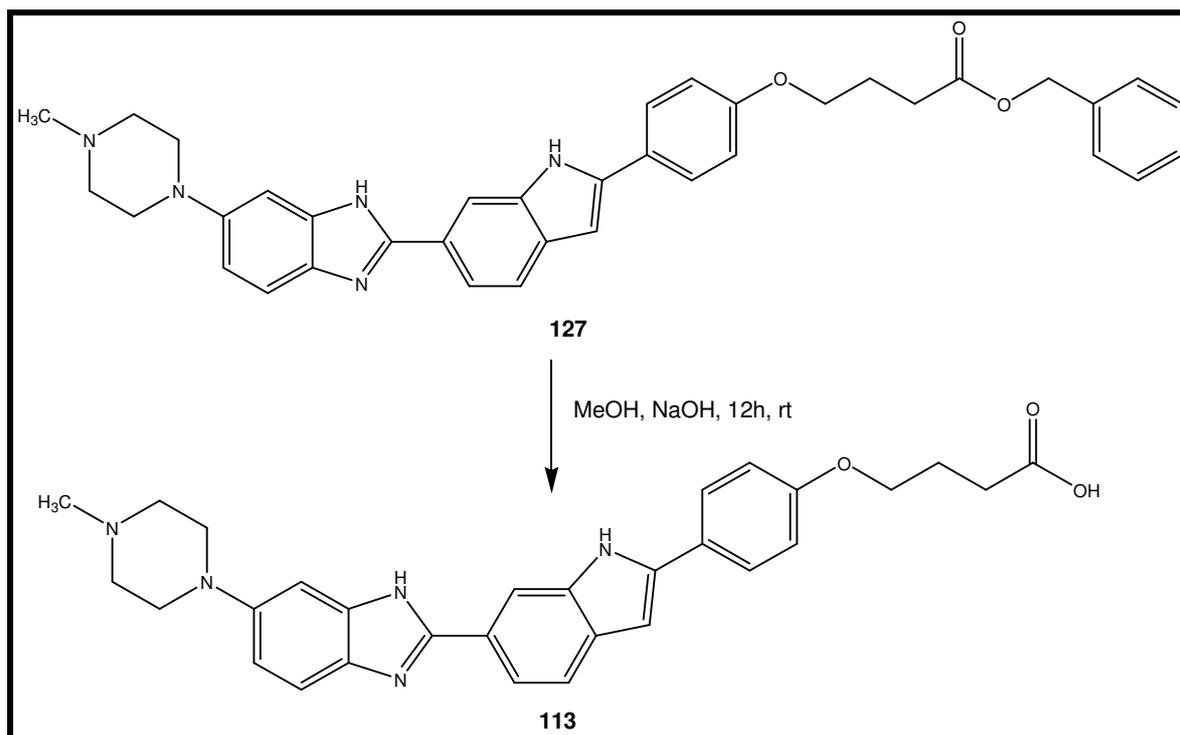


Abb. 64. Spaltung des Benzylesters **127**

Zur Darstellung eines grün fluoreszierenden Hoechst-Derivates wurde **113** mit BODIPY **31** umgesetzt. Als Kupplungsreagenz wurde der bereits vorher erfolgreiche verwendete Chlorameisensäureisobutylester (CAIBE) verwendet. Die Aufreinigung ist diffizil, da sich die R_f -Werte des Eduktes **31** und des Produktes **113** in den gängigen Lösungsmittelgemischen nicht genügend unterscheiden. Für eine Normalphasentrennung ist die Zugabe von Triethylamin entscheidend, da dadurch der R_f -Wert von **128** stark erhöht wird. Eine Auftrennung mit Hilfe der HPLC brachte keine befriedigende Trennung. Mit Hilfe des Lösungsmittelgemisches Dichlormethan : Methanol (9:1) unter Zusatz von 1% Triethylamin zu dem Eluenten konnte Produkt **128** in reiner Form durch Kieselgel-Chromatographie erhalten werden. Die Umsetzung mit 7% Ausbeute war nicht zufriedenstellend, so dass mit anderen Kupplungsreagentien und einem anderen BODIPY-Derivat **32** eine erneute Umsetzung mit der Carbonsäure versucht wurde. Bei der Darstellung der fluoreszierenden AR-Antagonisten (Kapitel 5.2.4.) zeigte sich, dass die Kopplung mit Hilfe von HCTU/HOBT die höchsten Ausbeuten lieferte. Diese Beobachtung konnte bei der Kopplung von **113** mit **32** bestätigt werden, wobei **129** in 12%iger Ausbeute erhalten werden konnte und vollständig charakterisiert wurde (Abb. 65).

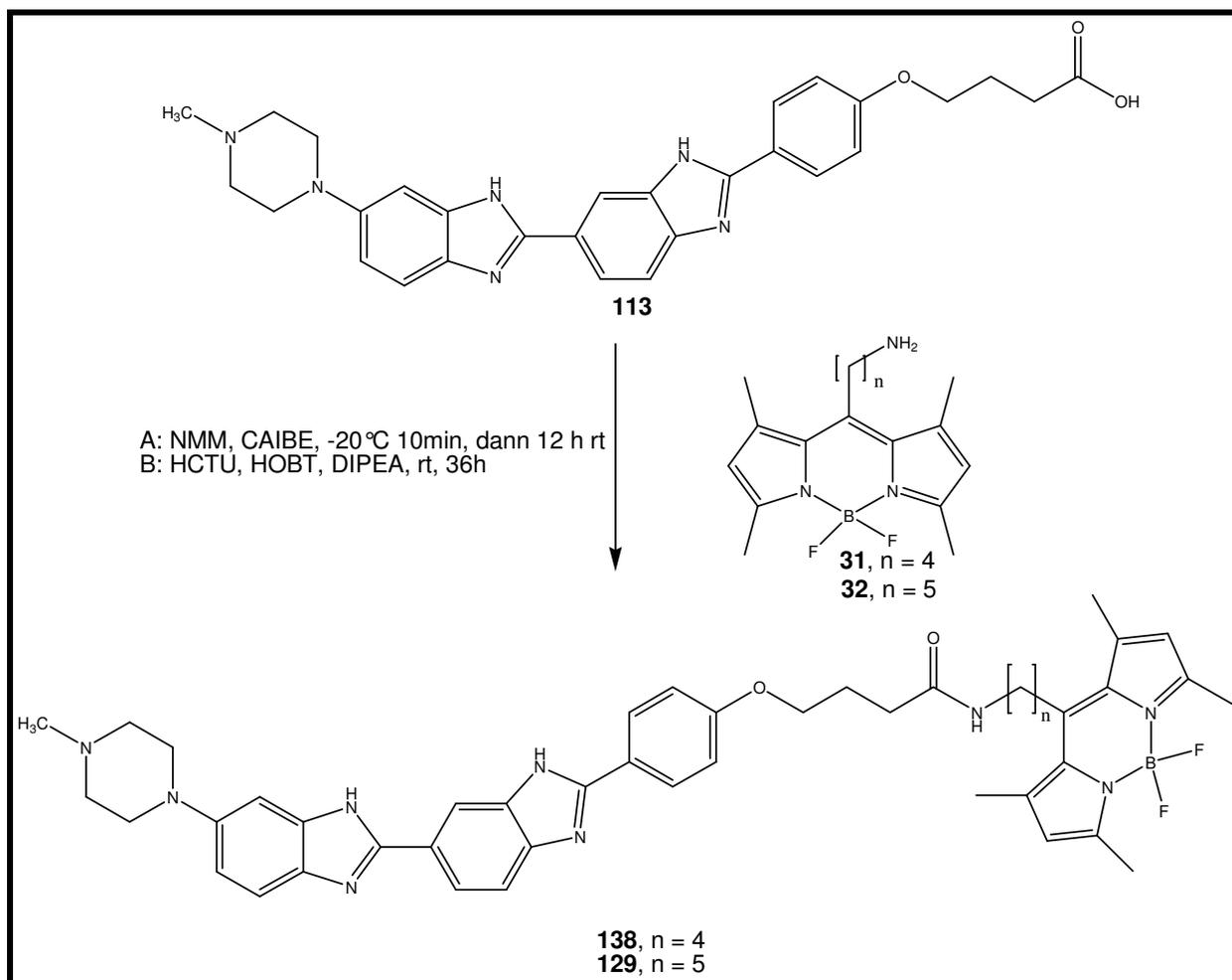


Abb. 65. Verknüpfung der Hoechst-Carbonsäure 113 mit BODIPY-Aminen 31 und 32

6.2.5. Pharmakologische Eigenschaften

Kerstin Breitbach zeigte in ihrer Dissertation, dass das neu dargestellte Hoechst-BODIPY-Derivat **128** als Substrat für das P-Glykoprotein verwendet werden konnte. In Experimenten zeigte sich, dass die Fluoreszenz innerhalb der Zelle bei MDR-Zellen im Vergleich mit nicht MDR-Zellen deutlich geringer ist. Dies lässt darauf schließen, dass der aktive Transport der Verbindung durch das PgP-Enzym aus der Zelle hinaus stärker als der passive Einstrom des Hoechst-BODIPY-Derivates in die Zelle hinein ist. In weiteren Untersuchungen soll verifiziert werden, wie stark der Ausstrom ist. Verbindung **129** konnte ebenfalls als Substrat verwendet werden, zeigte in den Untersuchungen aber deutlich schwächere Eigenschaften. Es wurde zudem bewiesen, dass das BODIPY-Fluorophor kein Substrat für das Enzym darstellt.¹⁶⁴

7. Zusammenfassung

Die Verwendung von fluoreszenzmarkierten Strukturen bei der Untersuchung von biologischen Zielmolekülen stellt eine wertvolle Alternative zu Radioligand-bindungsstudien dar. Um diese Methoden anwenden zu können, bedarf es neben der nötigen technischen Ausrüstung der entsprechenden fluoreszenzmarkierten Verbindungen. In der vorliegenden Arbeit wurden BODIPY-Fluorophore verwendet, da diese vielen anderen Fluorophoren hinsichtlich pH- und Photostabilität deutlich überlegen sind. BODIPY-Derivate sind kommerziell von der Firma *Molecular Probes* erhältlich. Ihr präparativer Einsatz verbietet sich aber auf Grund des hohen Preises. Die im Rahmen dieser Arbeit dargestellten BODIPY-Derivate sind deutlich kleiner als die kommerziell erhältlichen BODIPY-Derivate (s. Verbindung **48**) und durch die gute Abgangsgruppe leicht derivatisierbar. Die mittels Eintopfsynthese erhältlichen 8-(ω -Bromalkyl)-4,4-difluor-1,3,5,7-tetramethyl-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacen- (BODIPY-) Derivate **21-26** konnten erfolgreich dargestellt werden. Die Ausbeute von **24** konnte durch die Durchführung der Reaktion in einem Druckgefäß bei hohen Temperaturen deutlich erhöht werden. Diese Bedingungen ließen sich jedoch nicht auf die Verbindungen **21-23** und **25-26** übertragen. Die Darstellung der präparativ wichtigen 8-(ω -Aminoalkyl)-4,4-difluor-1,3,5,7-tetramethyl-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene **29-33** konnte erheblich verbessert werden. Die Umsetzung der BODIPY-Derivate **22-26** mit 7N-ammoniakalischer Methanol-Lösung führte unter Mikrowellenbestrahlung in hohen Ausbeuten (91-57 %) bzw. befriedigenden Ausbeuten (27 %) zu den Derivaten **29-33** (Abb. 66). Die rot markierten Verbindungen sind neu und wurden im Rahmen dieser Arbeit erstmals beschrieben.

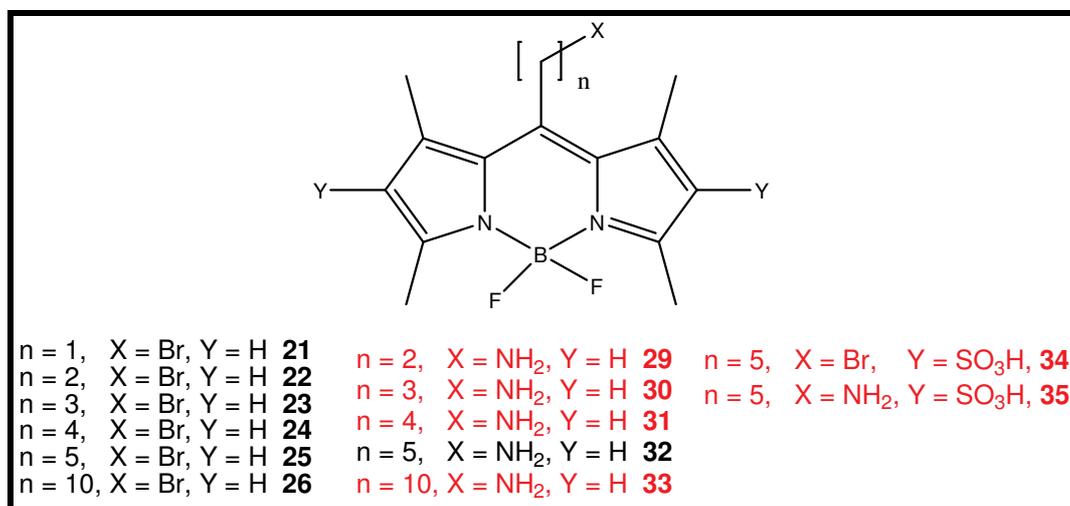


Abb. 66. Dargestellte BODIPY-Derivate

Die Reaktionszeit konnte erheblich verkürzt (20 min) und die Aufarbeitung deutlich vereinfacht werden. Durch kapillarelektrophoretische Reinheitsuntersuchungen konnte die hohe Reinheit der neu dargestellten Amino-BODIPY-Derivate nachgewiesen werden. In einigen Fällen ist es möglich, dass die Einführung der BODIPY-Fluorophore, durch ihre hohe Lipophilie zu einer geringen Löslichkeit der Liganden in den gängigen Pufferlösungen der Testsysteme führt. Daher wurden die BODIPY-Derivate **34** und **35** entwickelt, die durch die Sulfonsäuregruppen wasserlöslich sind (Abb. 66). Verbindung **35** lag auf Grund der CH-Acidität der exocyclischen Methylengruppe zunächst in einer nicht fluoreszierenden Form vor. Analog zu den publizierten Ergebnissen, ließ sich die fluoreszierende Form durch Erniedrigung des pH-Wertes zurückgewinnen.

Die neu dargestellten BODIPY-Derivate wurden für die Markierung von Adenosinrezeptorliganden verwendet. Bei der Entwicklung eines fluoreszenzmarkierten A_1 -Agonisten musste das Adenosin zunächst so modifiziert werden, dass neben der Bindungsfähigkeit zum A_1 -Rezeptor auch eine passende Verknüpfungsstelle für die Kupplung mit einem BODIPY-Fluorophor vorhanden war. Für diesen Zweck wurden die Adenosinderivate **59** und **60** dargestellt, indem 6-Chlor-2',3',5'-triacetylribofuranosylpurin mit 6-Aminohexansäure bzw. 4-(Aminomethyl)benzoesäure verknüpft wurden. Beide Verbindungen konnten in sehr guten (**59**, 92%) bzw. guten (**60**, 50%) Ausbeuten und in hoher Reinheit dargestellt werden. Die Umsetzung der Carbonsäurefunktion mit den Aminogruppen des BODIPY-Derivates **33** führte zu den fluoreszenzmarkierten A_1 -Agonisten **65** und **66** (Abb. 67). Beide Verbindungen zeigen in Radioligandbindungsstudien hohe Affinitäten zum A_1 -Rezeptor und ausreichende Selektivitäten gegenüber den A_{2A} -, A_{2B} - und A_3 -AR. In GTP γ S-Experimenten konnte gezeigt werden, dass beide Verbindungen Vollagonisten sind.

Bei der Entwicklung eines fluoreszenzmarkierten A_{2A} -AR-Agonisten wurde zunächst eine Methode entwickelt, um Chloradenosin in hoher Reinheit darzustellen. Auf die zunächst vorgesehene Verknüpfung von Chloradenosin mit einem BODIPY-Derivat wurde verzichtet, da alternativ Verbindung **82** durch Umsetzung von Thioadenosin mit **22** in Dimethylformamid unter Zusatz von Natriumethanolat dargestellt werden konnte. Die Verbindung besitzt keine Affinität zu den Adenosinrezeptoren und daher ist zu vermuten, dass der BODIPY-Fluorophor zu voluminös für die Bindungstasche ist (Abb. 67). **82** zeigt die Schwierigkeiten bei der Entwicklung fluoreszenzmarkierter

Liganden, da durch die Einführung eines Fluorophors die Bindungseigenschaften der Liganden beeinflusst werden können.

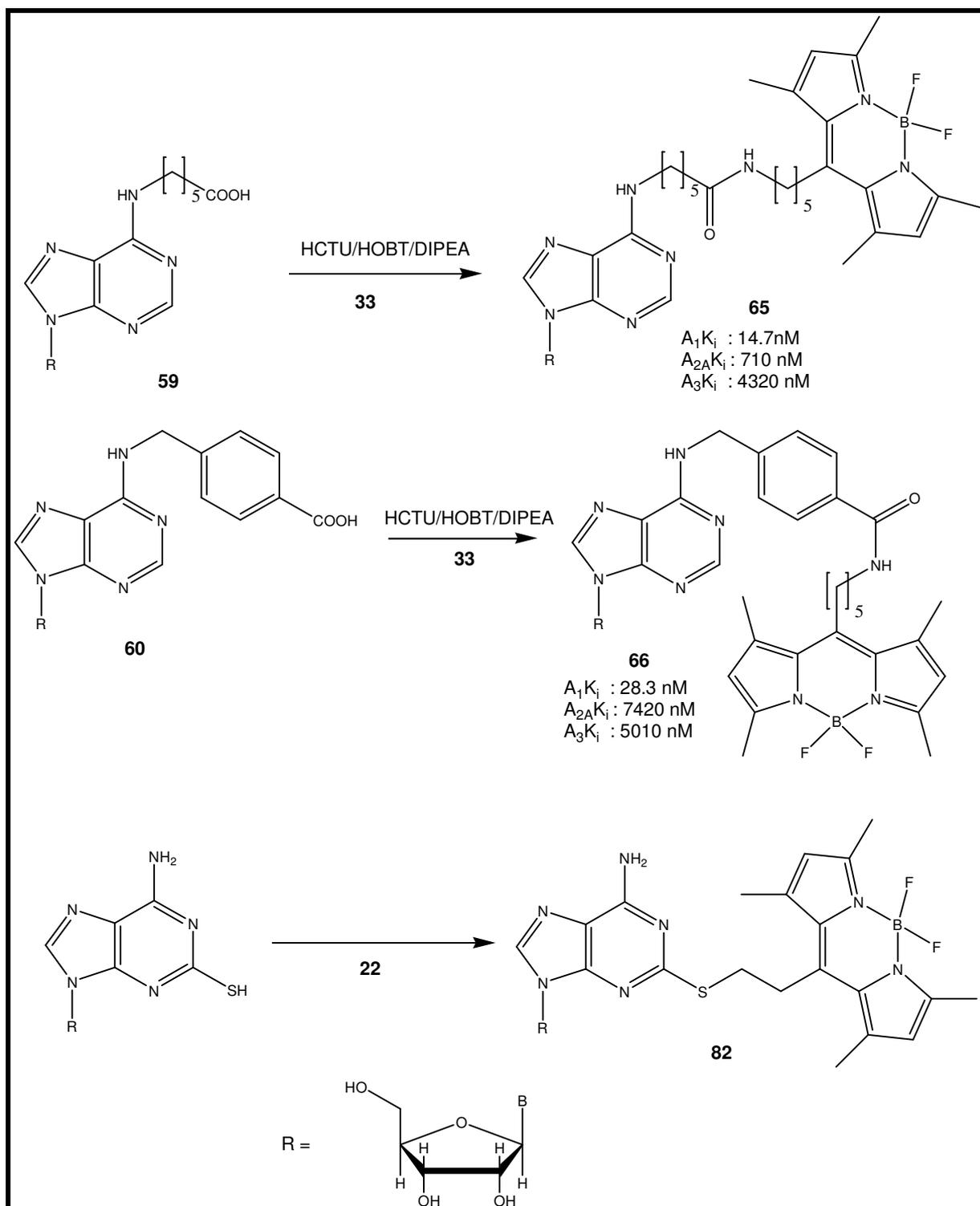


Abb. 67. Fluoreszenzmarkierte Adenosinrezeptor-Agonisten

Die Entwicklung fluoreszenzmarkierter A_{2B} -Antagonisten gelang durch die Umsetzung der A_{2B} -Antagonisten **87**, **90** und **91** mit verschiedenen BODIPY-Fluorophoren. Die Verbindungen zeigen z.T. gute Affinitäten zum A_1 -Rezeptor

(**94**, **96**, **106**) und besitzen keine oder nur geringe Affinitäten zum A_{2A} -AR und zum A_3 -AR. Erste Versuche an humanen A_{2B} AR zeigen hohe Affinitäten der neu dargestellten Verbindungen. So besitzt Verbindung **100** mit einem K_i -Wert von 4.1 nM eine hohe Affinität zum A_{2B} AR und ausreichende Selektivitäten zum A_1 (95fach) und hohe Selektivitäten zum A_{2A} AR und A_3 AR (>250fach) (Abb.68).

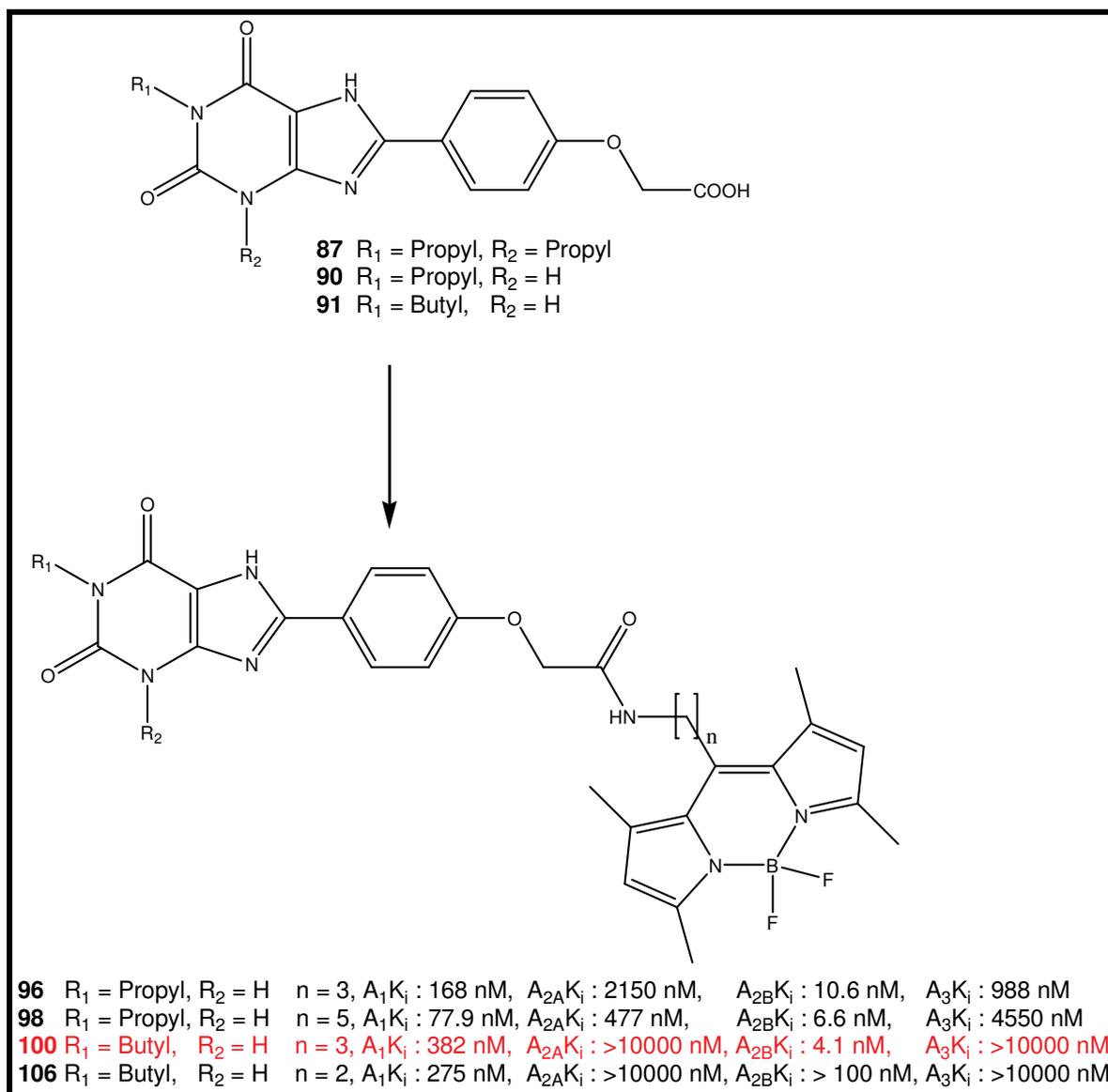


Abb. 68. Fluoreszenzmarkierte A_{2B} -Adenosinrezeptorantagonisten

In spektroskopischen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass die Fluoreszenzeigenschaften aller fluoreszenzmarkierten AR-Liganden denen der reinen BODIPY-Derivate entsprechen. Die hohe Reinheit der neu dargestellten fluoreszenzmarkierten Liganden konnte mit Hilfe der Kapillarelektrophorese mit Messungen bei 260 nm und 495 nm bewiesen werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde des Weiteren die Verknüpfung des P-Glykoprotein-Liganden Hoechst 33258 mit einem BODIPY-Derivat durchgeführt. Die direkte Verknüpfung der beiden Substanzen war nicht möglich, so dass eine De-Novo-Synthese der Hoechst-Verbindung erforderlich war, um eine Verknüpfungsstelle in die Struktur einzubauen (**113**). Die von *Ebrahimi et al.* und *Reddy et al.* publizierte De-novo-Synthese der Verbindung konnte deutlich vereinfacht werden.^{158,159} Die Kupplung der Hoechst-Verbindung **113** mit den BODIPY-Derivaten **31** und **32** führte zu den Verbindungen **128** und **129**. Verbindung **128** zeigte in ersten Untersuchungen das gleiche pharmakologische Profil wie Hoechst 33258 während Verbindung **129** schwächer aktiv war (Abb. 69).¹⁶⁴

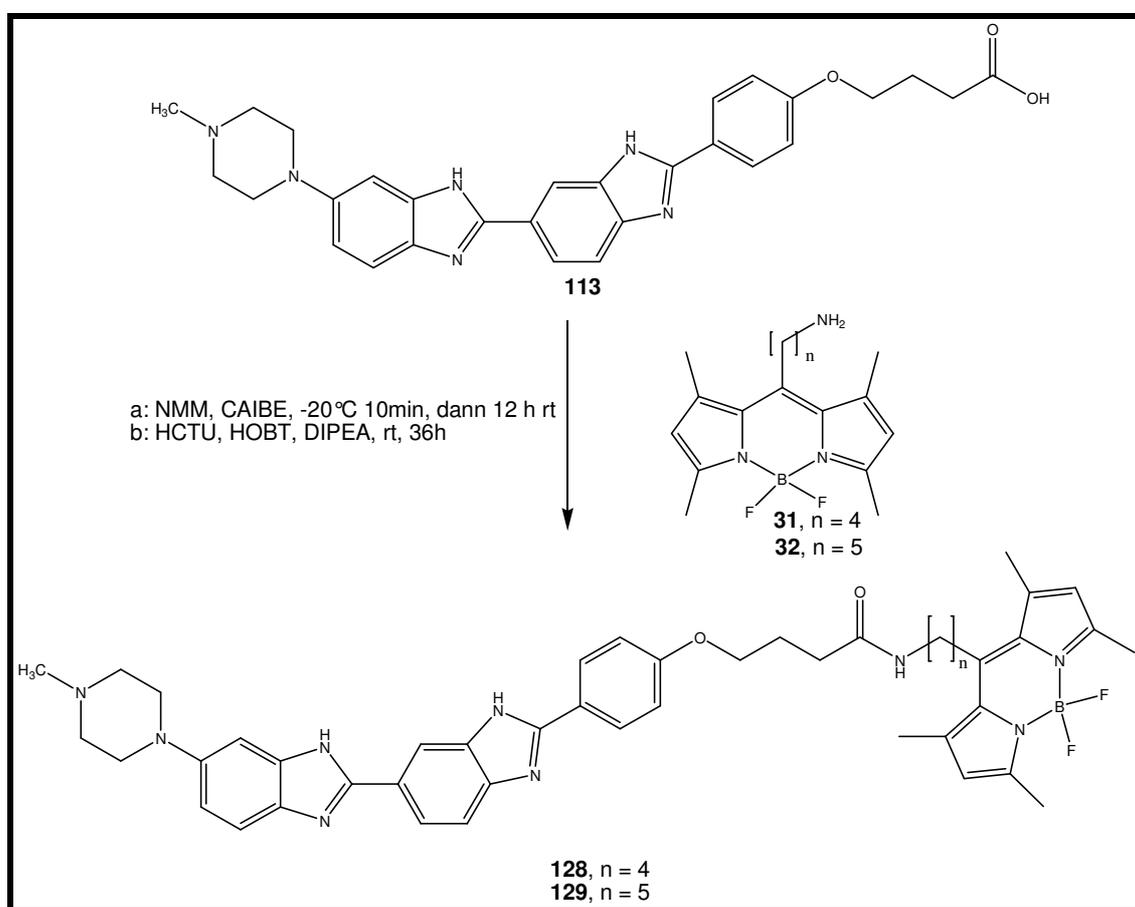


Abb. 69. Verknüpfung eines Hoechst-Derivates mit den BODIPY-Fluorophoren **31** und

8. Ausblick

Mit Hilfe der neu synthetisierten fluoreszenzmarkierten Liganden sollte es in Zukunft möglich sein, Rezeptorfunktionen in lebenden Zellen zu untersuchen. Die neu dargestellten wasserlöslichen BODIPY-Derivate sollten mit den A_{2B} -Antagonisten **90**, **91**, **92** verknüpft werden, da die beschriebenen Verbindungen eine schlechte Löslichkeit in dem verwendeten Puffersystem aufwiesen. Erste Versuche mit dem Amino-Derivat **35** waren nicht viel versprechend, so dass eine Kupplung mit dem Brom-Derivat **34** erfolversprechender sein sollte. Bei der Darstellung des fluoreszenzmarkierten A_{2A} -Agonisten wäre es interessant, als Grundgerüst ein NECA-Derivat zu wählen und dieses an Position 2 über den Thioether mit dem BODIPY zu verknüpfen. Dieses Produkt könnte am A_{2A} -Rezeptor affin sein.

Das neu beschriebene Derivat **82** könnte phosphoryliert werden und auf Affinitäten an P2Y-Rezeptoren getestet werden.

Erste Versuche bei der Fluoreszenzmarkierung des selektiven A_{2A} -Antagonisten MSX-2 scheiterten an der Umsetzung der Alkoholfunktion mit einem BODIPY-Derivat. Die Alkylierung des N3 von MSX-2 ist auf Grund der geringen Reaktivität dieser Position schwierig. Es konnte allerdings Verbindung **130** dargestellt werden, welche mit 3-Iodpropansäure an Position 3 zu **131** alkyliert werden könnte (Abb. 70).

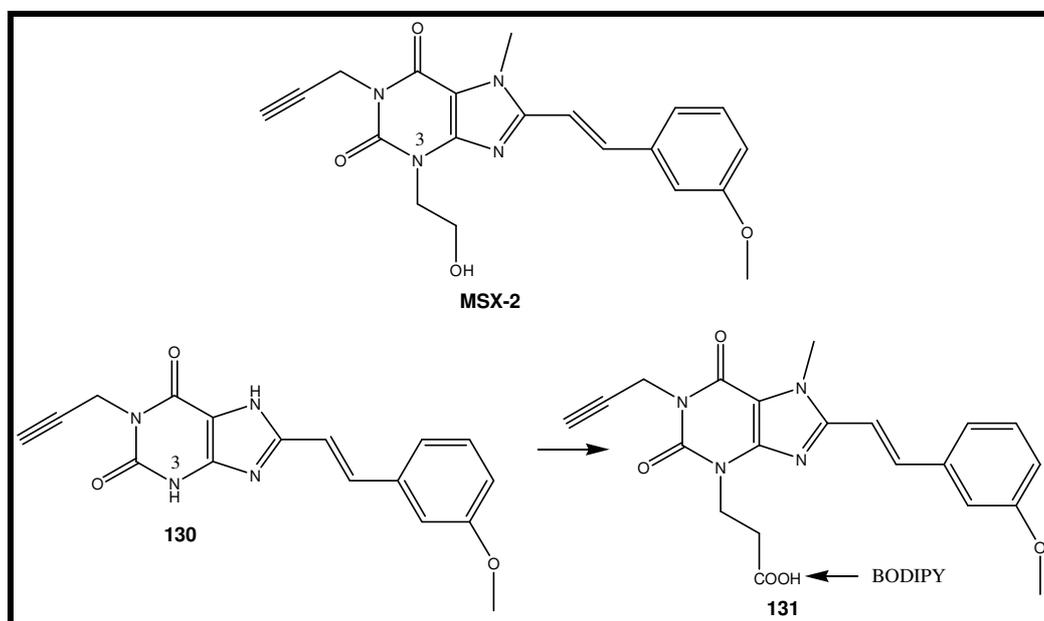


Abb. 70. Möglicher Syntheseweg für die Darstellung eines fluoreszenzmarkierten A_{2A} -Antagonisten

Die freie Carbonsäure könnte mit BODIPY-Derivaten aus der Aminoserie (**29-33**) gekoppelt werden.

9. Experimenteller Teil

9.1. Allgemeiner Teil

Für die Darstellung und Charakterisierung der Verbindungen wurden die im folgenden aufgeführten Materialien und Geräte verwendet.

Chemikalien

Alle verwendeten Chemikalien wurden von den Firmen *Acros Organics* (über VWR, Siegburg), *Fluka* (Buchs, Schweiz), *Merck* (Darmstadt), *Novabiochem* (Läufelfingen, Schweiz) oder *Sigma-Aldrich* (Steinheim) bezogen.

Lösungsmittel

Dichlormethan zur Säulenchromatographie und zur Synthese wurde über Calciumhydrid destilliert. Triethylamin wurde über Calciumhydrid getrocknet, destilliert und über Molekularsieb 2 Å gelagert. Der absolut trockene Ethanol wurde durch Trocknung über Natrium und Phthalsäurediethylester und anschließender Destillation erhalten. Die Lagerung erfolgte über Molekularsiebe 2 Å. Alle anderen Lösungsmittel wurden in der vom Hersteller gelieferten Qualität verwendet. Trockene Lösungsmittel, z.B. DMF, Pyridin, THF und Acetonitril von der Firma *Fluka* (Buchs, Schweiz), wurden in Gebinden mit Septum eingesetzt.

Dünnschichtchromatographie

Zur Reaktionskontrolle wurden Kieselgel-beschichtete Aluminiumplatten 60 F₂₅₄ (*Merck*, Darmstadt), sowie mit RP-Kieselgel-beschichtete Aluminiumplatten RP-18 F_{254s} (*Merck* Darmstadt) verwendet.

Säulenchromatographie

Säulenchromatographie wurde als Flash-Chromatographie mit einem System der Firma *Büchi* (Essen), bestehend aus Pumpe C-601, Pumpensteuergerät C-610 und Fraktionssammler C-660 auf Kieselgel 60, Korngröße 0,040 – 0,063 mm (*Merck*, Darmstadt), durchgeführt.

Präparative Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie (HPLC)

Die Aufreinigung der Endprodukte wurde mit einer HPLC, die folgende Systemkomponenten enthielt, durchgeführt: Pumpe Wellchrome K-1800 (*Knauer GmbH*, Berlin), Probenauftragsschleife mit 7 Milliliter Fassungsvermögen (*Knauer GmbH*, Berlin), Spectrophotometer WellChrome K-2600 (*Knauer GmbH*, Berlin), Fraktionssammelventil (*Knauer GmbH*, Berlin) und Eurospher 100-Säule, Abmessungen 250 x 20 mm (innerer Durchmesser), gefüllt mit RP-Kieselgel C-18, Korngröße 10 µm (*Knauer GmbH*, Berlin). Als mobile Phase wurde ein Gradient aus Methanol (HPLC-Grade, *Merck*, Darmstadt) und deionisiertem Wasser, in einigen Fällen unter Zusatz von je 0,1 % Triethylamin (> 99 % pur., *Merck*, Darmstadt) verwendet, die Flußrate betrug 20 ml/min.

Gefriertrocknung

Die schonende Isolierung von Produkten aus wäßrigen Lösungsmitteln wurde mit der Gefriertrocknungsanlage Alpha 1-4 LSC (*Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH*, Osterode) vorgenommen.

Hydrierapparat

Katalytische Hydrierungen wurden mit dem Wasserstoffgenerator Hogen[®] GC Hydrogen Generator der Firma *Proton Energy Systems* (Wallingford, CT, USA) durchgeführt. Dieser war über ein Reduzierventil mit einem Reaktionsgefäß, dem „Micro Vial, 5 ml“ der Firma *Kimble & Kontes* (Owens, IL, USA) verbunden.

NMR-Spektroskopie

NMR-Spektren wurden mit einem *Bruker* 500 Spektrometer (¹H: 500 MHz, ¹³C: 125 MHz, ³¹P: 202 MHz) aufgenommen. Die Kopplungskonstanten werden in Hertz [Hz] und die chemischen Verschiebungen in parts per million [ppm] angegeben. Die verwendeten Lösungsmittel DMSO-d₆, D₂O und CDCl₃ dienen jeweils als interner Standard: ¹H: δ [ppm] DMSO-d₆: 2,49; MeOD: 3,35; D₂O: 4,65; CDCl₃: 7,24. ¹³C: δ [ppm] DMSO-d₆: 37,7; MeOD: 49,3; D₂O: TMS wurde als interner Standard verwendet; CDCl₃: 77,0. Signalaufspaltungen werden mit folgenden Abkürzungen wiedergegeben: s = Singulett, d = Duplett, t = Triplett, q = Quartett, m = Multiplett, br = breit, p = pseudo.

HPLC-MS

Reinheit und Identität der Endprodukte wurden mit einer Hochdruckflüssigkeitschromatographie gekoppelt mit einer Massenspektrometrie bestimmt. Ein Milligramm der zu prüfenden Substanz wurde in einem Milliliter eines Gemischs aus 75 % 2 mM-Natriumacetat-Puffer und 25 % Acetonitril gelöst. Davon wurden 10 µl in eine HPLC-Anlage (*Agilent 1100*) mit Phenomenex Luna C-18-Säule, Korngröße 3 µm injiziert und nach Gradientenelution (kontinuierlicher Gradient von Acetonitril 25 % nach 100 % über 15 min) mit einem API 2000 Massenspektrometer (*Applied Biosystems, Darmstadt*) gemessen. Der Analyt wurde per ESI (Electron Spray Ionisation) ionisiert.

Reinheitsbestimmung per HPLC

In Fällen, in denen eine Elementaranalyse nicht möglich war (BODIPY-Fluorophore), wurde eine Reinheitsbestimmung per HPLC mit folgendem System vorgenommen: 1 mg Substanz wurde in einer Mischung aus 1 ml wäßriger 2 mM Ammoniumacetat-Lösung und MeOH (9:1) gelöst. Von dieser Lösung wurden 10 µl in ein HPLC-System (*Agilent 1100*) mit Phenomenex Luna 3µ C18 Säule injiziert. Der Analyt wurde mit einem Gradienten aus wäßriger 2 mM Ammoniumacetat-Lösung und Methanol von 9:1 nach 0:10 über 15 min bei einer Flußrate von 250 µl/min eluiert. Die Detektion erfolgte durch Messung der UV-Absorption, wenn nicht anders angegeben, bei einer Wellenlänge von 254 nm.

Reinheitsbestimmung per Kapillarelektrophorese

Die Reinheitsuntersuchungen der BODIPY-Derivate wurden außerdem in einem P/ACE MDQ-System (*Beckman Coulter Instruments, Fullerton, CA, USA*) mit einem DAD Detektor durchgeführt. Dabei wurden 1 mmol der BODIPY-Derivate in einem Wasser : DMSO Gemisch (1:1) gelöst. Folgende Bedingungen wurden für die Untersuchungen gewählt: 40 mM Boratpuffer, pH 9.1, Fused-silica Kapillare von 40 cm Länge (30 cm zum Detektor), 75 µM I.D., 15 kV, UV-Messungen bei 495 nm und 260 nm, normale Polarität. Die Auswertung erfolgte an einem PC mit Hilfe der Software 32 KARAT, die von *Beckman Coulter* erhalten wurde. Die Temperatur wurde während der Untersuchung in der Kapillare konstant auf 25 °C gehalten.

Schmelzpunktbestimmung

Schmelzpunkte wurden mit einem *Büchi* B 545 Schmelzpunktmeßgerät bestimmt und sind unkorrigiert wiedergegeben.

Spektroskopische Untersuchungen

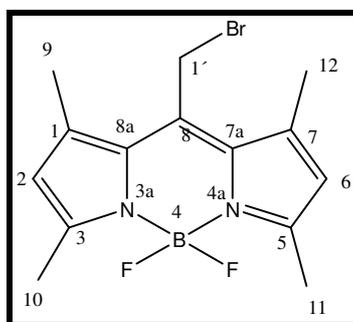
Die fluoreszierenden Verbindungen wurde an einem Luminescence spectrometer LS 55 der Firma *Perkin-Elmer* vermessen. Die Auswertung erfolgte an einem PC mit Hilfe der Software FI-Winlab, die von der Firma *Perkin-elmer* erhalten wurde. Um Quencheffekte zu vermeiden, wurde eine Spatelspitze der Substanzen in 2 ml DMSO gelöst. Von dieser Lösung wurden 20 µl entnommen und auf 100 ml mit DMSO oder Methanol verdünnt.

Allgemeine Versuchsvorschrift für die Darstellung der 8- Bromalkyl-4,4-difluor-1,3,5,7-tetramethyl-4-bora-3a,4a-s-indacen-Derivate (21-23 und 25-26)

Das entsprechende ω -Bromalkylchlorid (5 mmol) wird in 50 ml trockenem Dichlormethan gelöst und auf 0°C gekühlt. Innerhalb von 30 min werden 0.95 g (10 mmol) 2,4-Dimethylpyrrol, gelöst in 20 ml trockenem Dichlormethan, hinzu gegeben. Nachdem die Reaktionsmischung auf Raumtemperatur erwärmt wurde, wird für weitere 2.5 h (**21**), 105 min (**22**), 1.5 h (**23**) oder 3.5 h (**25**, **26**) gerührt. Die Mischung wird auf 0°C gekühlt und 2,8 ml (20 mmol) Triethylamin werden hinzu gegeben. Nach 30 min wird mit 2.5 ml (10 mmol) Bortrifluorid-diethyletherat versetzt und die Mischung bei Raumtemperatur eine weitere Stunde gerührt. Das Lösungsmittel wird unter vermindertem Druck abgezogen und das Rohprodukt auf Kieselgel aufgetragen. Die stark fluoreszierenden Fraktionen werden mit den Eluenten Dichlormethan: Petrolether (1:1) (**21-23**) bzw. Dichlormethan: Petrolether (2:1) (**25**, **26**) eluiert.

8-Bromomethyl-4,4-difluor-1,3,5,7-tetramethyl-4-bora-3a,4a-s-indacen (21)⁸¹

Struktur



Substanzeigenschaften

Violetter Feststoff, gut löslich in Dichlormethan und Petrolether, schlecht löslich in Wasser.

Ansatz

2,4-Dimethylpyrrol	0.95 g (10 mmol)
Bromacetylchlorid	1.0 g (5 mmol)
Triethylamin	2.8 ml (20 mmol)
Bortrifluorid-diethyletherat	2.5 ml (10 mmol)

Ausbeute: 680 mg (40%)

Analytische Daten

Schmp.: 221 °C

Berechnete Masse: 341.002 g/mol für C₁₄H₁₆BBrF₂N₂

¹H-NMR (CDCl₃, 500 MHz): δ = 2.51 (s, 6H, 9-CH₃ and 12-CH₃), 2.52 (s, 6H, 10-CH₃ and 11-CH₃), 4.65 (s, 2H, 1'-CH₃), 6.06 (s, 2H, 6-CH and 2-CH).

¹³C-NMR (CDCl₃, 125 MHz): δ = 14.65 (10-CH₃ and 11-CH₃), 15.86 (9-CH₃ and 12-CH₃), 24.49 (1'-CH₃), 122.28 (2-CH and 6-CH), 130.99 (7a-C and 8a-C), 137.24 (8-C), 140.85 (1-C und 7-C), 156.45 (3-C und 5-C).

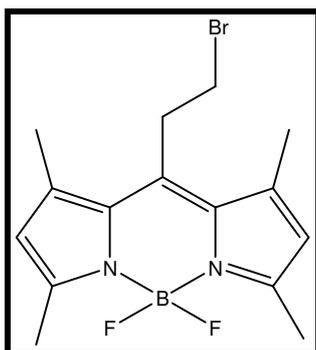
Spektroskopische Daten

UV-Absorption λ_{max}: 498 nm

Fluoreszenzemission: λ_{max}: 509 nm

8-(2-Bromethyl)-4,4-difluor-1,3,5,7-tetramethyl-4-bora-3a,4a-s-indacen (22)⁸¹

Struktur



Substanzeigenschaften

Roter Feststoff, gut löslich in Dichlormethan und Petrolether, schlecht löslich in Wasser, Methanol und Ethanol.

Ansatz

2,4-Dimethylpyrrol	0.95 g (10 mmol)
3-Brompropionylbromid	0.85 g (5 mmol)
Triethylamin	2.8 ml (20 mmol)
Bortrifluorid-diethyletherat	2.5 ml (10 mmol)

Ausbeute: 200 mg (12%)

Analytische Daten

Schmp.: 159 °C

Berechnete Masse: 355.029 g/mol für C₁₅H₁₈BBrF₂N₂

¹H-NMR (CDCl₃, 500 MHz): δ = 2.42 (s, 6H, 9-CH₃ and 12-CH₃), 2.50 (s, 6H, 10-CH₃ and 11-CH₃), 3.45 (m, 4H, 1'-CH₂- and 2H, 2'-CH₂), 6.07 (s, 2H, 2-CH and 6-CH).

¹³C-NMR (CDCl₃, 125 MHz): δ = 14.9 (s, 2C, 10-CH₃ und 11-CH₃), 16.5 (s, 2C, 9-CH₃ und 12-CH₃), 30.1 (s, 1C, 2'-CH₂), 31.9 (s, 1C, 1'-CH₂), 122.6 (s, 2C, 2-CH und 6-CH), 131.8 (s, 2C, 7a-C und 8a-C), 140.3 (s, 1C, 8-C), 140.9 (s, 2C, 1-C und 7-C), 155.6 (s, 2C, 3-C und 5-C).

Spektroskopische Daten

UV-Absorption λ_{max}: 505 nm

Fluoreszenzemission λ_{max}: 516 nm

Reinheit

Kapillarelektrophorese

Puffer : Boratpuffer, pH 9.1

Injektion : 5 s mit 0.5 ps

Stromstärke : 15 kV

Messzeit : 14 min

Kapillare : Fused-silica Kapillare, 40 cm (30 cm), 75 μm ID

Detektor : LIF (495 nm)

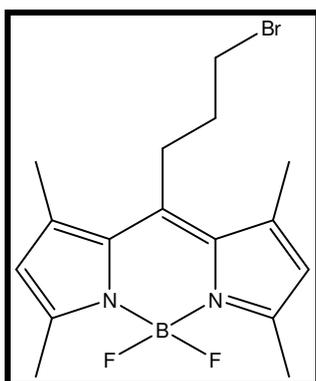
Retentionszeit : 6.23 min

Reinheit : 100 %

Kapillarelektrophorese

Puffer	: Boratpuffer, pH 9.1
Injektion	: 5 s mit 0.5 ps
Stromstärke	: 15 kV
Messzeit	: 14 min
Kapillare	: Fused-silica Kapillare, 40 cm (30 cm), 75 µm ID
Detektor	: LIF (495 nm)
Retentionszeit	: 6.23 min
Reinheit	: 100 %

8-(3-Brompropyl)-4,4-difluor-1,3,5,7-tetramethyl-4-bora-3a,4a-s-indacen (23)⁸¹

StrukturSubstanzeigenschaften

Orange-roter Feststoff, gut löslich in Dichlormethan und Petrolether, schlecht löslich in Wasser, Methanol und Ethanol.

Ansatz

2,4-Dimethylpyrrol	0.95 g (10 mmol)
4-Brombutyrylchlorid	0.93 g (5 mmol)
Triethylamin	2.8 ml (20 mmol)
Bortrifluorid-diethyletherat	2.5 ml (10 mmol)

Ausbeute: 553 mg (30%)

Analytische Daten

Schmp.: 155 °C

Berechnete Masse: 369.055 g/mol für $C_{16}H_{20}BBrF_2N_2$

1H -NMR ($CDCl_3$, 500 MHz): δ = 2.15 (m, 2H, 2'-CH₂), 2.43 (s, 6H, 9-CH₃ und 12-CH₃), 2.50 (s, 6H, 10-CH₃ und 11-CH₃), 3.11 (m, 2H, 1'-CH₂), 3.54 (t, 2H, 3'-CH₂), 6.04 (s, 2H, 2-CH und 6-CH).

^{13}C -NMR ($CDCl_3$, 125 MHz): δ = 14.5 (s, 2C, 10-CH₃ und 11-CH₃), 16.7 (s, 2C, 9-CH₃ und 12-CH₃), 27.2 (s, 1C, 2'-CH₂), 32.9 (s, 1C, 1'-CH₂), 34.0 (s, 1C, 3'-CH₂), 121.9 (s, 2C, 2-CH und 6-CH), 131.0 (s, 2C, 7a-C und 8a-C), 140.3 (s, 2C, 1-C und 7-C), 144.2 (s, 1C, 8-C), 154.4 (s, 2C, 3-C und 5-C).

Spektroskopische Daten

UV-Absorption λ_{max} : 505 nm

Fluoreszenzemission λ_{max} : 516 nm

Reinheit

Kapillarelektrophorese

Puffer : Boratpuffer, pH 9.1

Injektion : 5 s mit 0.5 ps

Stromstärke : 15 kV

Messzeit : 30 min

Kapillare : Fused-silica Kapillare, 40 cm (30 cm), 75 μ m ID

Detektor : UV (260 nm)

Retentionszeit : 24.96 min

Reinheit : 100 %

Kapillarelektrophorese

Puffer : Boratpuffer, pH 9.1

Injektion : 5 s mit 0.5 ps

Stromstärke : 15 kV

Messzeit : 14 min

Kapillare : Fused-silica Kapillare, 40 cm (30 cm), 75 μ m ID

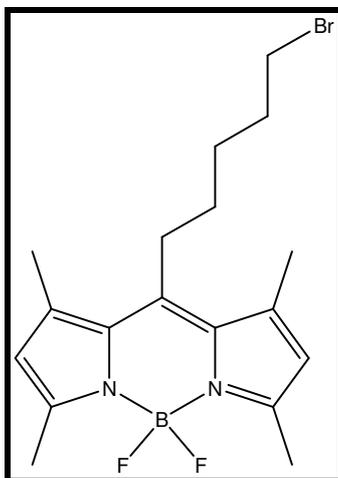
Detektor : LIF (495 nm)

Retentionszeit : 6.01 min

Reinheit : 100 %

8-(5-Brompentyl)-4,4-difluor-1,3,5,7-tetramethyl-4-bora-3a,4a-s-indacen (25)⁸¹

Struktur



Substanzeigenschaften

Orange-roter Feststoff, gut löslich in Dichlormethan und Petrolether, schlecht löslich in Wasser, Methanol und Ethanol.

Ansatz

2,4-Dimethylpyrrol	0.95 g (10 mmol)
6-Bromhexansäurechlorid	1.0 g (5 mmol)
Triethylamin	2.8 ml (20 mmol)
Bortrifluorid-diethyletherat	2.5 ml (10 mmol)

Ausbeute: 650 mg (33%)

Analytische Daten

Schmp.: 135 °C

Berechnete Masse: 396.13 g/mol für C₁₇H₂₂BBrF₂N₂

¹H-NMR (CDCl₃, 500 MHz): δ = 1.6 (m, 4H, 3'-CH₂- and 4'-CH₂-), 1.91 (m, 2H, 2'-CH₂-), 2.40 (s, 6H, 9-CH₃ and 12-CH₃), 2.49 (s, 6H, 10-CH₃ and 11-CH₃), 2.94 (m, 2H, 1'-CH₂-), 3.41 (t, 2H, 5'-CH₂-), 6.03 (s, 2H, 2-CH and 6-CH).

¹³C-NMR (CDCl₃, 125 MHz): δ = 14.4 (s, 2C, 10-CH₃ und 11-CH₃), 16.3 (s, 2C, 9-CH₃ und 12-CH₃), 28.1 (s, 1C, 1'-CH₂-), 28.5 (s, 1C, 3'-CH₂-), 30.9 (s, 1C, 4'-CH₂-), 32.2

(s, 1C, 2'-CH₂-), 33.5 (s, 1C, 5'-CH₂-), 121.6 (s, 2C, 2-CH und 6-CH), 131,4 (s, 2C, 7a-C und 8a-C), 140.2 (s, 2C, 1-C und 7-C), 145.3 (s, 1C, 8-C), 153.9 (s, 2C, 3-C und 5-C).

Spektroskopische Daten

UV-Absorption λ_{\max} : 505 nm

Fluoreszenzemission λ_{\max} : 516 nm

Reinheit

Kapillarelektrophorese

Puffer : Boratpuffer, pH 9.1

Injektion : 5 s mit 0.5 ps

Stromstärke : 15 kV

Messzeit : 40 min

Kapillare : Fused-silica Kapillare, 40 cm (30 cm), 75 μ m ID

Detektor : UV (260 nm)

Retentionszeit : 26.0 min

Reinheit : 100 %

Kapillarelektrophorese

Puffer : Boratpuffer, pH 9.1

Injektion : 5 s mit 0.5 ps

Stromstärke : 15 kV

Messzeit : 14 min

Kapillare : Fused-silica Kapillare, 40 cm (30 cm), 75 μ m ID

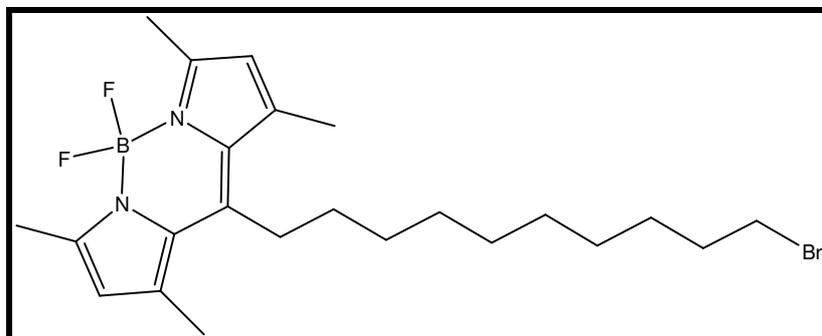
Detektor : LIF (495 nm)

Retentionszeit : 8.42 min

Reinheit : 100 %

8-(10-Bromdecanyl)-4,4-difluor-1,3,5,7-tetramethyl-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacen (26)⁸¹

Struktur



Substanzeigenschaften

Orange-roter Feststoff, gut löslich in Dichlormethan und Petrolether, schlecht löslich in Wasser, Methanol und Ethanol.

Ansatz

2,4-Dimethylpyrrol	0.95 g (10 mmol)
10-Bromundecansäurechlorid	1.42 g (5 mmol)
Triethylamin	2.8 ml (20 mmol)
Bortrifluorid-diethyletherat	2.5 ml (10 mmol)

Versuchsvorschrift

5.3 g (0.02 mol) Bromundecansäure wird mit 3.4 ml (0.04 mol) Oxalylchlorid versetzt. Nachdem die Reaktion abgeklungen ist, wird der Ansatz kurz erhitzt. Das entstandene Säurechlorid wird ohne weitere Aufarbeitung verwendet und nach der oben beschriebenen Standardprozedur verarbeitet.

Ausbeute: 261 mg (11%)

Analytische Daten

Schmp.: 155 °C

Berechnete Masse: 466.19 g/mol für C₂₃H₃₄BBrF₂N₂

¹H-NMR (CDCl₃, 500 MHz): δ = 1.31 – 1.47 (m, 12H, 3'-CH₂- bis , 8'-CH₂-) 1.60 (m, 2H, 9'-CH₂-), 1.83 (m, 2H, 2'-CH₂-), 2.39 (s, 6H, 9-CH₃ und 12-CH₃), 2.49 (s, 6H, 10-

CH₃ und 11-CH₃), 2.90 (m, 2H, 1'-CH₂-), 3.39 (t, 2H, 10'-CH₂-), 6.02 (s, 2H, 2-CH und 6-CH).

¹³C-NMR (CDCl₃, 125 MHz): δ = 14.42 (s, 2C, 10-CH₃ und 11-CH₃), 16.36 (s, 2C, 9-CH₃ und 12-CH₃), 28.1-32.76 (9s, 9C, 1'-CH₂- bis 9'-CH₂-), 33.9 (s, 1C, 10'-CH₂), 121.54 (s, 2C, 2-CH und 6-CH), 131.43 (s, 2C, 7a-C und 8a-C), 140.26 (s, 2C, 1-C und 7-C), 146.65 (s, 1C, 8-C), 153.71 (s, 2C, 3-C und 5-C).

Spektroskopische Daten

UV-Absorption λ_{max}: 505 nm

Fluoreszenzemission λ_{max}: 516 nm

Reinheit

Kapillarelektrophorese

Puffer : Boratpuffer, pH 9.1

Injektion : 5 s mit 0.5 ps

Stromstärke : 15 kV

Messzeit : 14 min

Kapillare : Fused-silica Kapillare, 40 cm (30 cm), 75 μm ID

Detektor : UV (260 nm)

Retentionszeit : 7.70 min

Reinheit : 100 %

Kapillarelektrophorese

Puffer : Boratpuffer, pH 9.1

Injektion : 5 s mit 0.5 ps

Stromstärke : 15 kV

Messzeit : 14 min

Kapillare : Fused-silica Kapillare, 40 cm (30 cm), 75 μm ID

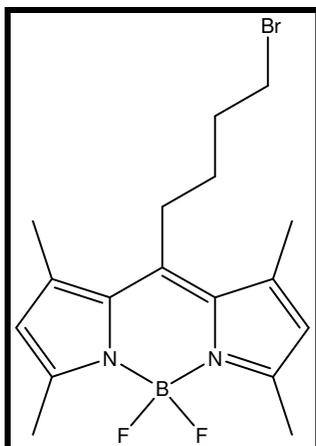
Detektor : LIF (495 nm)

Retentionszeit : 7.95 min

Reinheit : 100 %

8-(4-Brombutyl)-4,4-difluoro-1,3,5,7-tetramethyl-4-bora-3a,4a-s-indacen (24)⁸¹

Struktur



Substanzeigenschaften

Orange-roter Feststoff, gut löslich in Dichlormethan und Petrolether, schlecht löslich in Wasser, Methanol und Ethanol.

Ansatz

2,4-Dimethylpyrrol	0.95 g (10 mmol)
5-Bromvalerylchlorid	1.00 g (5 mmol)
Triethylamin	2.8 ml (20 mmol)
Bortrifluorid-diethyletherat	2.5 ml (10 mmol)

Versuchsvorschrift

Unter Argonatmosphäre werden 0.95 g (10 mmol) 2,4-Dimethylpyrrol in 10 ml trockenem Toluol in einem Druckgefäß gelöst. 1 g (5 mmol) 4-Bromvalerylchlorid, gelöst in 5 ml trockenem Toluol, werden langsam unter Argon in das Druckgefäß gegeben. Die Mischung wird für 2.5 h in dem geschlossenen Gefäß bei 90 °C erhitzt. Anschließend wird die Mischung auf Raumtemperatur abgekühlt und mit 2.8 ml (20 mmol) Triethylamin versetzt. Nachdem die Mischung 30 min bei Raumtemperatur gerührt wurde gibt man 2.5 ml (10 mmol) Bortrifluorid-diethyletherat hinzu und erhitzt 12 h lang bei 80 °C. Das Lösungsmittel wird unter vermindertem Druck abgezogen und das Rohprodukt auf Kieselgel aufgetragen. Die stark fluoreszierenden Fraktionen werden mit Dichlormethan : Petrolether (2:1) eluiert.

Ausbeute: 650 mg (33%)

Analytische Daten

Schmp.: 164 °C

Berechnete Masse: 383.10 g/mol für C₁₇H₂₂BBrF₂N₂

¹H-NMR (CDCl₃, 500 MHz): δ = 1.78 (m, 2H, 3'-CH₂), 2.04 (m, 2H, 2'-CH₂), 2.40 (s, 6H 9-CH₃ und 12-CH₃), 2.49 (s, 6H, 10-CH₃ und 11-CH₃), 2.95 (m, 2H, 1'-CH₂), 3.43 (t, 2H, 4'-CH₂), 6.04 (s, 2H, 2-CH und 6-CH).

¹³C-NMR (CDCl₃, 125 MHz): δ = 14.5 (s, 2C, 10-CH₃ und 11-CH₃), 16.4 (s, 2C, 9-CH₃ und 12-CH₃), 27.5 (s, 1C, 2'-CH₂), 30.2 (s, 1C, 3'-CH₂), 32.7 (s, 1C, 1'-CH₂), 33.1 (s, 1C, 4'-CH₂), 121.8 (s, 2C, 2-CH und 6-CH), 131.4 (s, 2C, 7a-C und 8a-C), 140.2 (s, 2C, 1-C und 7-C), 145.3 (s, 1C, 8-C), 154.1 (s, 2C, 3-C und 5-C).

Spektroskopische Daten

UV-Absorption λ_{max}: 505 nm

Fluoreszenzemission λ_{max}: 516 nm

Reinheit

Kapillarelektrophorese

Puffer : Boratpuffer, pH 9.1

Injektion : 5 s mit 0.5 ps

Stromstärke : 15 kV

Messzeit : 14 min

Kapillare : Fused-silica Kapillare, 40 cm (30 cm), 75 μm ID

Detektor : UV (260 nm)

Retentionszeit : 8.15 min

Reinheit : 100 %

Kapillarelektrophorese

Puffer : Boratpuffer, pH 9.1

Injektion : 5 s mit 0.5 ps

Stromstärke : 15 kV

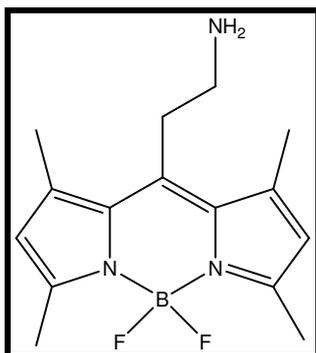
Messzeit	: 14 min
Kapillare	: Fused-silica Kapillare, 40 cm (30 cm), 75 µm ID
Detektor	: LIF (495 nm)
Retentionszeit	: 7.76 min
Reinheit	: 100 %

Allgemeine Versuchsvorschrift für die Darstellung der 8-Aminoalkyl-4,4-difluor-1,3,5,7-tetramethyl-4-bora-3a,4a-s-indacen-Derivate (29-33)

0.4 mmol des entsprechenden 8-Bromalkyl-4,4-difluor-1,3,5,7-tetramethyl-4-bora-3a,4a-s-indacen-Derivates werden in 12 ml 7N-ammoniakalischem Methanol suspendiert. Die Reaktionen werden unter Mikrowellen-Bestrahlung mit folgenden Bedingungen durchgeführt: 100 °C, 10 bar, 20 min (ausgenommen **29** 80 °C, 10 bar, 20 min). Das Lösungsmittel wird unter vermindertem Druck abgezogen und das Rohprodukt in Dichlormethan gelöst. Nach Zugabe von Petrolether fällt das Produkt aus, wird abfiltriert, mit etwas Wasser und Petrolether gewaschen und getrocknet.

8-(2-Aminoethyl)-4,4-difluor-1,3,5,7-tetramethyl-4-bora-3a,4a-s-indacen (29)

Struktur



Substanzeigenschaften

Roter Feststoff, gut löslich in Methanol und Ethanol, unlöslich in Petrolether und Wasser.

Ausbeute: 31,4 mg (27 %)

Analytische Daten

Schmp.: 190 °C

Berechnete Masse: 291.14 g/mol

MS (ESI): 292 [M+H]⁺, 272 [M-F]⁻ für C₁₅H₂₀BF₂N₃

¹H-NMR (CDCl₃, 500 MHz): δ = 2.39 (s, 6H, 9-CH₃ und 12-CH₃), 2.41 (s, 6H, 10-CH₃ und 11-CH₃), 3.00 (t, 2H, 1'-CH₂-), 6.25 (s, 2H, 2-CH und 6-CH).

¹³C-NMR (CDCl₃, 125 MHz): δ = 14.2 (10-CH₃ und 11-CH₃), 16.5 (9-CH₃ und 12-CH₃), 26.3 (2'-CH₂), 40.0 (1'-CH₂), 122.2 (2-CH und 6-CH), 131.1 (7a-C und 8a-C), 140.3 (8-C), 141.5 (1-C und 7-C), 152.6 (3-C), 154.2 (5-C).

Spektroskopische DatenUV-Absorption λ_{max}: 497 nmFluoreszenzemission λ_{max}: 499 nmReinheit

Kapillarelektrophorese

Puffer : Boratpuffer, pH 9.1

Injektion : 5 s mit 0.5 ps

Stromstärke : 15 kV

Messzeit : 14 min

Kapillare : Fused-silica Kapillare, 40 cm (30 cm), 75 μm ID

Detektor : UV (260 nm)

Retentionszeit : 8.59 min

Reinheit : 100 %

Reinheit

Kapillarelektrophorese

Puffer : Boratpuffer, pH 9.1

Injektion : 5 s mit 0.5 ps

Stromstärke : 15 kV

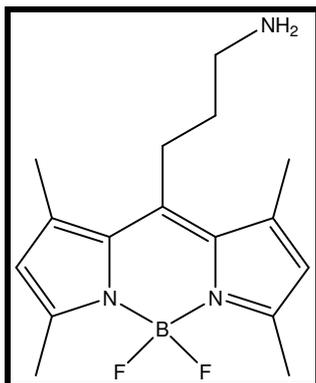
Messzeit : 14 min

Kapillare : Fused-silica Kapillare, 40 cm (30 cm), 75 μm ID

Detektor : LIF (495 nm)
Retentionszeit : 8.06 min
Reinheit : 100 %

8-(3-Aminopropyl)-4,4-difluor-1,3,5,7-tetramethyl-4-bora-3a,4a-s-indacen (30)

Struktur



Substanzeigenschaften

Orange-roter Feststoff, gut löslich in Methanol und Ethanol, unlöslich in Petrolether und Wasser.

Ausbeute: 87,8 mg (72 %)

Analytische Daten

Schmp.: 195 °C

Berechnete Masse: 305.17 g/mol für C₁₆H₂₂BF₂N₃

MS (ESI): 306.4 [m + H]⁺, 286 [m - F]⁻

¹H-NMR (DMSO-d₆, 500 MHz): δ = 1.64 (m, 2H, 2'-CH₂), 2.39 (s, 6H 9-CH₃ und 12-CH₃), 2.43 (s, 6H, 10-CH₃ und 11-CH₃), 2.74 (t, 2H, 3'-CH₂), 2.97 (m, 2H, 1'-CH₂), 6.22 (s, 2H, 6-CH und 2-CH).

¹³C-NMR (DMSO-d₆, 125 MHz): δ = 14.18 (10-CH₃ und 11-CH₃), 16.12 (9-CH₃ und 12-CH₃), 25.68 (2'-CH₂), 34.53 (1'-CH₂), 41.65 (3'-CH₂), 121.75 (2-CH und 6-CH), 130.86 (7a-C und 8a-C), 140.98 (8-C), 147.15 (1-C und 7-C), 153.12 (3-C und 5-C).

Spektroskopische DatenUV-Absorption λ_{\max} : 498 nmFluoreszenzemission λ_{\max} : 500 nmReinheit

Kapillarelektrophorese

Puffer : Boratpuffer, pH 9.1

Injektion : 5 s mit 0.5 ps

Stromstärke : 15 kV

Messzeit : 14 min

Kapillare : Fused-silica Kapillare, 40 cm (30 cm), 75 μm ID

Detektor : UV (260 nm)

Retentionszeit : 8.46 min

Reinheit : 100 %

Kapillarelektrophorese

Puffer : Boratpuffer, pH 9.1

Injektion : 5 s mit 0.5 ps

Stromstärke : 15 kV

Messzeit : 14 min

Kapillare : Fused-silica Kapillare, 40 cm (30 cm), 75 μm ID

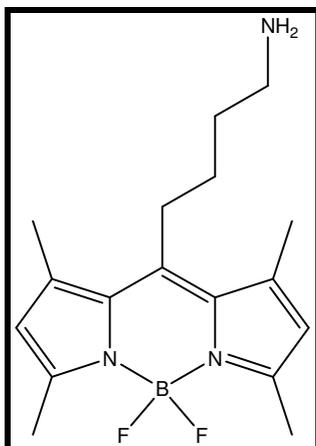
Detektor : LIF (495 nm)

Retentionszeit : 8.50 min

Reinheit : 100 %

8-(3-Aminopropyl)-4,4-difluor-1,3,5,7-tetramethyl-4-bora-3a,4a-s-indacen (31)

Struktur



Substanzeigenschaften

Orange-roter Feststoff, gut löslich in Methanol und Ethanol, unlöslich in Petrolether und Wasser.

Ausbeute: 71,5 mg (56 %)

Analytische Daten

Schmp.: 190 °C

Berechnete Masse: 319.2 für C₁₇H₂₄BF₂N₃

MS (ESI): 320.0 [M+ H]⁺

¹H-NMR (DMSO-d₆, 500 MHz): δ = 1.60 (m, 2H, 3'-CH₂), 1.79 (m, 2H 2'-CH₂), 2.32 (s, 6H 9-CH₃ und 12-CH₃) 2.39 (s, 6H, 10-CH₃ und 11-CH₃), 2.86 (t, 2H, 4'-CH₂), 2.91 (m, 2H, 1'-CH₂), 5.97 (s, 2H, 6-CH und 2-CH).

¹³C-NMR (DMSO-d₆, 125 MHz): δ = 14.13 (10-CH₃ und 11-CH₃), 16.18 (9-CH₃ und 12-CH₃), 27.30 (2'-CH₂), 28.53 (3'-CH₂), 34.84 (1'-CH₂), 39.25 (4'-CH₂), 122.73 (2-CH und 6-CH), 131.21 (7a-C und 8a-C), 140.30 (8-C), 144.78 (1-C und 7-C), 154.05 (3-C und 5-C).

Spektroskopische Daten

UV-Absorption λ_{max}:497 nm

Fluoreszenzemission λ_{max}:500 nm

Reinheit

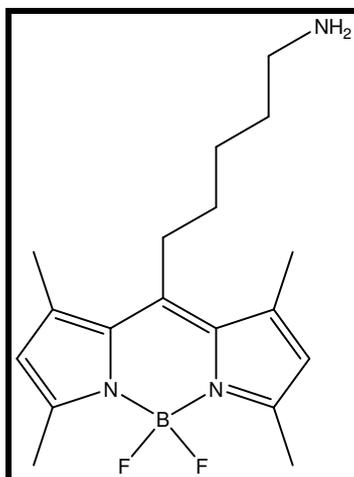
Kapillarelektrophorese

Puffer	: Boratpuffer, pH 9.1
Injektion	: 5 s mit 0.5 ps
Stromstärke	: 15 kV
Messzeit	: 14 min
Kapillare	: Fused-silica Kapillare, 40 cm (30 cm), 75 µm ID
Detektor	: UV (260 nm)
Retentionszeit	: 8.12 min
Reinheit	: 100 %

Kapillarelektrophorese

Puffer	: Boratpuffer, pH 9.1
Injektion	: 5 s mit 0.5 ps
Stromstärke	: 15 kV
Messzeit	: 14 min
Kapillare	: Fused-silica Kapillare, 40 cm (30 cm), 75 µm ID
Detektor	: LIF (495 nm)
Retentionszeit	: 8.33 min
Reinheit	: 100 %

Darstellung von 8-(5-Aminopentyl)-4,4-difluor-1,3,5,7-tetramethyl-4-bora-3a,4a-s-indacen (32)⁸¹

Struktur

Substanzeigenschaften

Oranger Feststoff, gut löslich in Methanol und Ethanol, unlöslich in Petrolether und Wasser.

Ausbeute: 121,3 mg (91 %)

Analytische Daten

Schmp.: 212 °C

Berechnete Masse: 333.2 für $C_{18}H_{26}BF_2N_3$

MS (ESI): 334 $[M+H]^+$

1H -NMR ($CDCl_3$, 500 MHz): δ = 1.56-1.09 (m, 6H, 2'-CH₂- bis 4'-CH₂-), 2.35 (s, 6H, 9-CH₃ und 12-CH₃), 2.47 (s, 6H, 10-CH₃ und 11-CH₃), 2.90 (t, 2H, 5'-CH₂-), 3.01 (m, 2H, 1'-CH₂-), 6,00 (s, 2H, 2-CH und 6-CH).

^{13}C -NMR ($CDCl_3$, 125 MHz): δ = 14.43 (1-CH₃ und 11-CH₃), 16.59 (9-CH₃ und 12-CH₃), 27.03 (3'-CH₂), 27.91 (1'-CH₂-), 31.17 (4'-CH₂-), 39.96 (5'-CH₂-), 121.77 (2-CH und 6-CH), 131.34 (7a-C und 8a-C), 140.16 (1-C und 7-C), 145.40 (8-C), 154.09 (3-C und 5C).

Spektroskopische Daten

UV-Absorption λ_{max} : 495 nm

Fluoreszenzemission λ_{max} : 500 nm

Reinheit

Kapillarelektrophorese

Puffer : Boratpuffer, pH 9.1

Injektion : 5 s mit 0.5 ps

Stromstärke : 15 kV

Messzeit : 14 min

Kapillare : Fused-silica Kapillare, 40 cm (30 cm), 75 μ m ID

Detektor : UV (260 nm)

Retentionszeit : 8.17 min

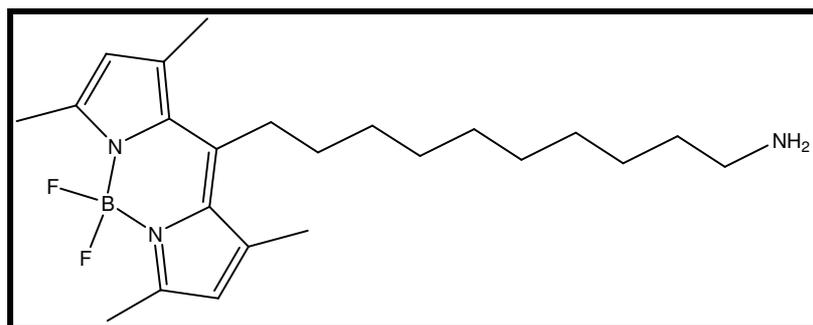
Reinheit : 100 %

Reinheit

Kapillarelektrophorese

Puffer	: Boratpuffer, pH 9.1
Injektion	: 5 s mit 0.5 ps
Stromstärke	: 15 kV
Messzeit	: 14 min
Kapillare	: Fused-silica Kapillare, 40 cm (30 cm), 75 µm ID
Detektor	: LIF (495 nm)
Retentionszeit	: 8.57 min
Reinheit	: 100 %

8-(10-Aminodecyl)-4,4-difluoro-1,3,5,7-tetramethyl-4-bora-3a,4a-s-indacen (33)

StrukturSubstanzeigenschaften

Oranger Feststoff, gut löslich in Methanol und Ethanol, unlöslich in Petrolether und Wasser.

Ausbeute: 92 mg (57 %)

Analytische Daten

Schmp.: 128 °C

Berechnete Masse: 403.35 für C₂₃H₃₆BF₂N₃

MS (ESI): 404.4 [M+H]⁺

¹H-NMR (DMSO-d₆, 500 MHz): δ = 1.41 (m, 14H, 2'-CH₂- bis 9'-CH₂-), 2.38 (s, 12H, 9-CH₃, 10-CH₃, 11-CH₃, 12-CH₃), 2.75 (t, 2H, 10'-CH₂-), 2.92 (m, 2H, 1'-CH₂-), 6.22 (s, 2H, 2-CH- und 6-CH-), 7.64 (s, 2H, -NH₂).

^{13}C -NMR (DMSO- d_6 , 125 MHz): δ = 14.2 (s, 2C, 10- CH_3 und 11- CH_3), 15.9 (9- CH_3 und 12- CH_3), 25.9 bis 31.2 (1'- CH_2 - bis 9'- CH_2 -), 39.2 (10'- CH_2 -), 121.8 (2-CH und 6-CH), 130.8 (7a-C und 8a-C), 140.8 (1-C und 7-C), 147.0 (8-C), 153.1 (3-C und 5-C).

Spektroskopische Daten

UV-Absorption λ_{max} : 497 nm

Fluoreszenzemission λ_{max} : 499 nm

Reinheit

Kapillarelektrophorese

Puffer : Boratpuffer, pH 9.1

Injektion : 5 s mit 0.5 ps

Stromstärke : 15 kV

Messzeit : 14 min

Kapillare : Fused-silica Kapillare, 40 cm (30 cm), 75 μm ID

Detektor : UV (260 nm)

Retentionszeit : 8.38 min

Reinheit : 100 %

Kapillarelektrophorese

Puffer : Boratpuffer, pH 9.1

Injektion : 5 s mit 0.5 ps

Stromstärke : 15 kV

Messzeit : 14 min

Kapillare : Fused-silica Kapillare, 40 cm (30 cm), 75 μm ID

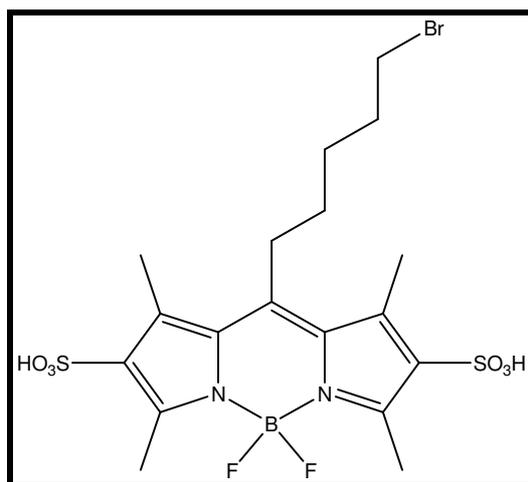
Detektor : LIF (495 nm)

Retentionszeit : 8.84 min

Reinheit : 100 %

8-(5-Brompentyl)-4,4-difluor-1,3,5,7-tetramethyl-4-bora-3a,4a-diazas-indacene-2,6-disulfonat (34)

Struktur



Substanzeigenschaften

Oranger Feststoff, gut löslich in Wasser und Methanol

Ansatz

25	0.166 g (0.42 mmol)
Chlorsulfonsäure	0.097 g (0.84 mmol)

Versuchsvorschrift

166 mg (0.42 mmol 8-(5-Brompentyl)-4,4-difluor-1,3,5,7-tetramethyl-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacen (**25**)) werden in 4 ml Dichlormethan gelöst. Die Lösung wird auf -20°C gekühlt und langsam mit 0.07 g (0.84 mmol) Chlorsulfonsäure, die in 2 ml Dichlormethan gelöst wurde, versetzt. Die Mischung wird eine weitere halbe Stunde bei -20°C gerührt und anschließend dreimal mit gesättigter Ammoniumhydrogencarbonat-Lösung ausgeschüttelt. Die wässrigen Phasen werden vereinigt und durch Lyophilisation vom Lösungsmittel befreit. Das Rohprodukt wird durch eine Säulenchromatographie mit Kieselgel 60 und dem Eluenten Dichlormethan : Methanol (9:2 mit 2% Triethylamin) aufgetrennt.

Ausbeute: 202 mg (86 %)

Analytische Daten

Schmp.: 245 °C

Berechnete Masse: 556.03 für $\text{C}_{18}\text{H}_{24}\text{BBF}_2\text{N}_2\text{O}_6\text{S}_2$

MS (ESI): 557.2 $[\text{M} + \text{H}]^+$

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6 , 500 MHz): $\delta = 1.6$ (m, 4H, 3'-CH $_2$ - and 4'-CH $_2$ -), 1.88 (m, 2H, 2'-CH $_2$ -), 2.59 (s, 6H, 9-CH $_3$ and 12-CH $_3$), 2.65 (s, 6H, 10-CH $_3$ and 11-CH $_3$), 3.57 (t, 2H, 5'-CH $_2$ -).

$^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- d_6 , 125 MHz): $\delta = 13.9$ (10-CH $_3$ und 11-CH $_3$), 14.1 (9-CH $_3$ und 12-CH $_3$), 27.7 (1'-CH $_2$ -), 28.0 (3'-CH $_2$), 30.4 (4'-CH $_2$), 31.8 (2'-CH $_2$), 35.0 (5'-CH $_2$), 129.8 (2-CH und 6-CH), 137,7.2 (1-C und 7-C), 148.6 (8-C), 152.6 (3-C und 5-C).

Spektroskopische Daten

UV-Absorption λ_{max} : 505 nm

Fluoreszenzemission λ_{max} : 540 nm

Reinheit

LC-MS

Säule Luna RP-C $_{18}$, 3 μm , Firma *Phenomenex*[®]

Puffer 2 mmol Ammoniumacetat

Eluent Gradient von Wasser: Methanol 9:1 auf 100% Methanol
innerhalb von 20 min

Detektion UV (254 nm)

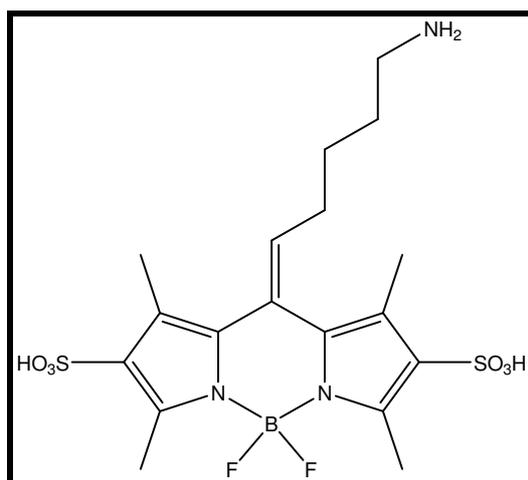
Injektion 1 mg /1 ml

Retentionzeit 9.86 min

Reinheit 97 %

8-(5-Aminopentyl)-4,4-difluor-1,3,5,7-tetramethyl-4-bora-3a,4a-diazas-indacen-2,6-disulfonat (35)

Struktur



Substanzeigenschaften

Roter Feststoff, gut löslich in Wasser und Methanol; stark hygroskopisch.

Ansatz

34	0.3 g (0.54 mmol)
7N-ammoniakalischer Methanol-Lösung	24 ml

Versuchsvorschrift

300 mg (0.54 mmol) 8-(5-Bromopentyl)-4,4-difluoro-1,3,5,7-tetramethyl-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacen-2,6-disulfonat (**34**) wird in 24 ml 7N-ammoniakalischer Methanol-Lösung gelöst. Die Reaktion wird unter Mikrowellenbestrahlung (100 °C, 10 bar, 20 min) durchgeführt. Das Lösungsmittel wird unter vermindertem Druck entfernt und das Rohprodukt mit Hilfe der HPLC aufgetrennt (Eluent: steigender Gradient von Methanol in Wasser, beginnend von 10:90 bis zu 50:50 innerhalb einer halben Stunde).

Ausbeute: 90 mg (34 %).

Analytische Daten

Schmp.: > 300 °C

Berechnete Masse: 492.23 für C₁₈H₂₅BF₂N₃O₆S₂

MS (ESI): 493.3 [m + H]⁺

$^1\text{H-NMR}$ (D_2O , 500 MHz): $\delta = 1.51$ (m, 2H, 3'- CH_2 -), 1.65 (m, 2H, 4'- CH_2 -), 1,98 and 2,00 (2s, 6H, 9- CH_3 and 12- CH_3), 2.19 (m, 2H, 2'- CH_2 -), 2.32 and 2.36 (s, 6H, 10- CH_3 and 11- CH_3), 2.87 (t, 2H, 5'- CH_2 -); 5,83 (t, 1H 1'- CH -).

$^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO, 125 MHz): $\delta = 12.7, 13.0, 14.35, 14.43$ (9- $\text{CH}_3, 12\text{-CH}_3$ and 10- $\text{CH}_3, 11\text{-CH}_3$), 28.87 (3'- CH_2 -), 30.94 (4'- CH_2 -), 35.01 (2'- CH_2 -), 41.92 (5'- CH_2 -), 116.97, 117.50, 118.76, 122.433, 123.38, 126.04, 126.95, 130.08, 131.92, 132.25, 133,84.

Spektroskopische Daten

UV-Absorption (DMSO) λ_{max} : 495 nm

Fluoreszenzemission (DMSO) λ_{max} : 545 nm

Reinheit

Kapillarelektrophorese

Puffer : Boratpuffer, pH 9.1

Injektion : 5 s mit 0.5 ps

Stromstärke : 15 kV

Messzeit : 14 min

Kapillare : Fused-silica Kapillare, 40 cm (30 cm), 75 μm ID

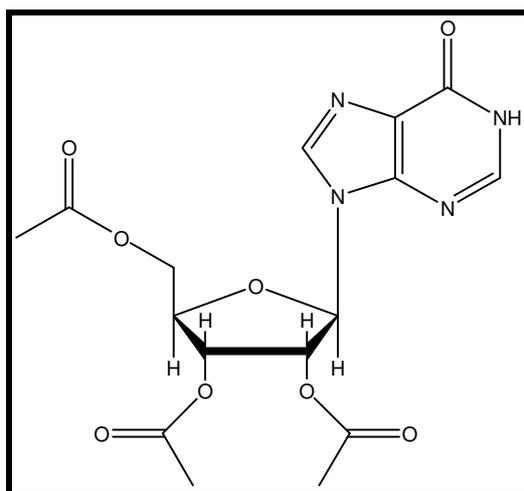
Detektor : UV (260 nm)

Retentionszeit : 1.95 min

Reinheit : 100 %

2',3',5'-Triacetylinosin (53)¹²²

Struktur



Substanzeigenschaften

Weißes Pulver

Ansatz

Inosin	7.97 g (29.7mmol)
Dimethylaminopyridin (DMAP)	0.2 g
Ethyldimethylamin (EDMA)	8.8 g (120 mmol)
Acetanhydrid	10.2 g (100 mmol)

Versuchsvorschrift

7.97 g (29.7 mmol) Inosin und 0.2 g Dimethylaminopyridin werden zu einer Mischung aus 8.8 g (120 mmol) Ethyldimethylamin und 10.2 g (100 mmol) Acetanhydrid in 100 ml Acetanhydrid gegeben. Der Ansatz wird bei Raumtemperatur gerührt bis eine klare Lösung entstanden ist. Durch Zugabe von etwas Methanol wird das überschüssige Acetanhydrid abgefangen. Die flüchtigen Reagenzien werden unter vermindertem Druck abgezogen. Der Rückstand wird aus Isopropanol umkristallisiert.

Ausbeute: 10,99 g (94 %)

Analytische Daten

Schmp.: 239-241 °C

Berechnete Masse: 394.11 für $C_{16}H_{18}N_4O_8$

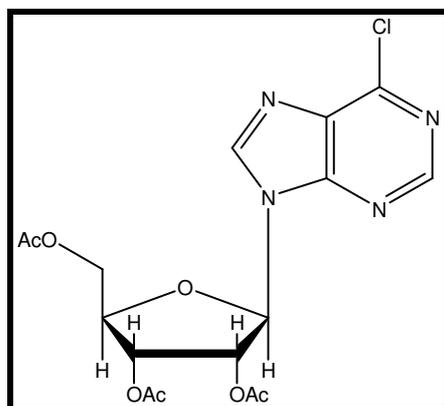
$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 500 MHz): δ = 2.01 (s, 3H, OCOCH_3), 2.03 (s, 3H, OCOCH_3), 2.10 (s, 3H, OCOCH_3), 4.25 (d, 2H, $5'\text{-CH}_2\text{-}$), 4.38 (t, 1H, $4'\text{-CH-}$), 5.53 (d, 1H, $2'\text{-CH}_2\text{-}$), 5.89 (d, 1H, $3'\text{-CH}_2\text{-}$), 6.17 (d, 1H, $1'\text{-CH}_2\text{-}$), 8.08 (s, 1H, 2-C), 8.29 (s, 1H, 8-C).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 125 MHz): δ = 20.3, 20.5 (2s, 2C, $\text{CH}_3\text{-CO}$) 20.7 (s, 1C, $\text{CH}_3\text{C-5'-C}$), 62.6 (s, 1C, $5'\text{-C}$), 70.5 (s, 1C, $2'\text{-C}$), 73.2 (s, 1C, $3'\text{-C}$), 80.8 (s, 1C, $4'\text{-C}$), 86.5 (s, 1C, $1'\text{-C}$), 130.90 (s, 1C, 5-C), 142.2 (s, 1C, 8-C), 143.9 (s, 1C, 4-C), 160.0 (s, 1C, 2-C), 153.45 (s, 1C, 6-C), 169.35; 169.6; 170.17; (3s, 3C, OCOCH_3).

Die Daten entsprechen den Literaturwerten.¹³⁴

6-Chlor-2',3',5'-triacetylribofuranosylpurin (54)¹²²

Struktur



Substanzeigenschaften

Hellgelbes Öl, löslich in Dichlormethan.

Ansatz

2',3',5'-Triacetylinosin (53)	6 g	(0.0152mol)
Phosphoroxchlorid	20 ml	(0.0152mol)
N,N-Dimethylanilin	2 ml	(0.0152 mol)

Versuchsvorschrift

6 g (15.2 mmol) Triacetylinosin werden bei 140 °C im Ofen getrocknet. Die Substanz wird langsam in eine Mischung aus 2 ml (15.2 mmol) Dimethylanilin und 20 ml (15.2 mmol) frisch destilliertem Phosphoroxchlorid gegeben. Die Lösung wird auf

100°C erhitzt. Die Reaktion ist beendet, wenn eine klare orangefarbene Lösung entstanden ist. Das Phosphoroxychlorid wird bei 40°C abdestilliert und der Rückstand wird unter Eiskühlung mit Eis hydrolysiert. Die Suspension wird 1h unter Eiskühlung gerührt. Die wässrige Lösung wird dreimal mit Dichlormethan ausgeschüttelt. Die vereinigten organischen Phasen werden dreimal mit 100 ml 1N-Salzsäure, dreimal mit 100 ml Wasser und einmal mit 100 ml gesättigter Natriumchloridlösung ausgeschüttelt und über Magnesiumsulfat getrocknet. Das Dichlormethan wird unter vermindertem Druck abgezogen und man erhält die Substanz als hellgelbes Öl.

Ausbeute: 3.1 g (50%)

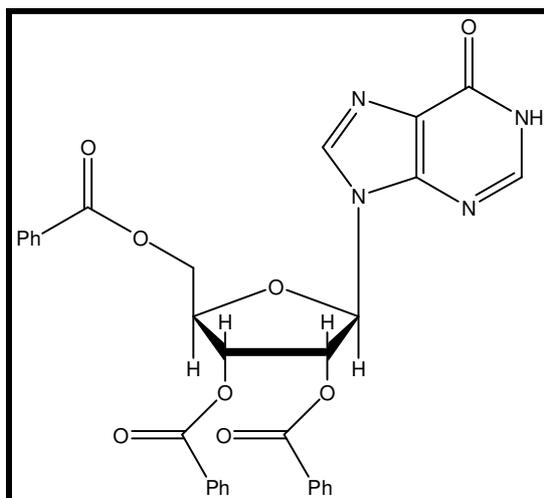
Analytische Daten

Berechnete Masse: 412.78 für $C_{16}H_{17}ClN_4O_7$

1H -NMR ($CDCl_3$, 500 MHz): δ = 1.99 (s, 3H, $OCOCH_3$), 2.03 (s, 3H, $OCOCH_3$), 2.11 (s, 3H, $OCOCH_3$), 4.25 (d, 2H, $5'-CH_2-$), 4.38 (t, 1H, $4'-CH-$), 5.65 (d, 1H, $2'-CH_2-$), 6.01 (d, 1H, $3'-CH_2-$), 6.36 (d, 1H, $1'-CH_2-$), 8.83 (s, 1H, 2-C), 8.88 (s, 1H, 8-C).

^{13}C -NMR ($CDCl_3$, 125 MHz): δ = 20.5, 20.3 (2s, 2C, CH_3-CO), 20.5 (s, 1C, $CH_3C-5'-C$), 62.6 (s, 1C, $5'-C$), 70.5 (s, 1C, $2'-C$), 72.2 (s, 1C, $3'-C$), 79.8 (s, 1C, $4'-C$), 86.5 (s, 1C, $1'-C$), 131.70 (s, 1C, 5-C), 146.4 (s, 1C, 8-C), 149.9 (s, 1C, 4-C), 151.45 (s, 1C, 6-C), 152.0 (s, 1C, 2-C), 169.35, 169.6, 170.17 (4s, 4C, $OCOCH_3$).

Die Daten entsprechen den Literaturwerten.¹³⁴

2',3',5'-Tribenzoylinosin (131)StrukturSubstanzeigenschaften

Weißes Pulver

Ansatz

Inosin	7.97 g (29.7mmol)
Dimethylaminopyridin (DMAP)	0.2 g
Ethyl dimethylamin (EDMA)	8.8 g (120 mmol)
Benzoylchlorid	14 g (100 mmol)

Versuchsvorschrift

7.97 g (29.7 mmol) Inosin und 0.2 g Dimethylaminopyridin werden zu einer Mischung aus 8.8 g (120 mmol) Ethyl dimethylamin und 14 g (100 mmol) Benzoylchlorid in 100 ml Acetanhydrid gegeben. Der Ansatz wird bei Raumtemperatur gerührt bis eine klare Lösung entstanden ist. Durch Zugabe von etwas Methanol wird das überschüssige Acetanhydrid abgefangen. Die flüchtigen Reagenzien werden unter vermindertem Druck abgezogen. Der Rückstand wird in 100 ml Dichlormethan gelöst und dreimal mit 100 ml gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung ausgeschüttelt. Die organische Phase wird über Natriumsulfat getrocknet und filtriert. Das Lösungsmittel wird unter vermindertem Druck abgezogen.

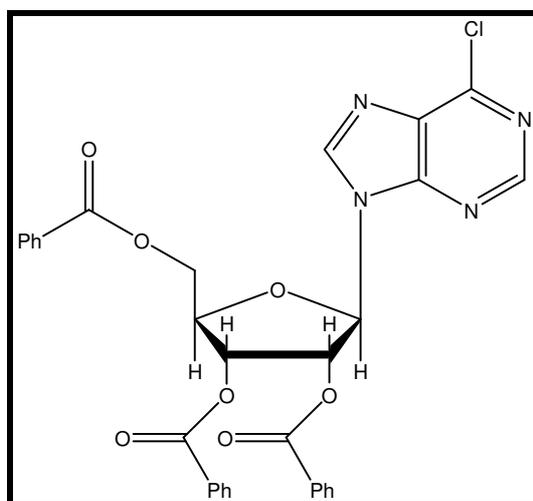
Ausbeute: 15,2 g (88 %)

Analytische Daten

Berechnete Masse: 580.4 für C₃₁H₂₄N₄O₈

¹H-NMR (DMSO-d₆, 500 MHz): δ = 4.80, 4.68 (2dd, 2H, 5'-CH₂-, ³J = 4.73 Hz), 4.90 (m, 1H, 4'-CH₂-, ³J = 4.73 Hz), 6.26 (t, 1H, 2'-CH₂-, ³J = 4.41 Hz), 6.49 (m, 1H, 3'-CH₂-, ³J = 4.71 Hz), 6.71 (d, 1H, 1'-CH₂-, ³J = 4.41 Hz), 7.42-7.98 (m, 15H, CH_{Aromat}), 8.05 (s, 1H, 2-C), 8.64 (s, 1H, 8-C).

¹³C-NMR (DMSO-d₆, 125 MHz): δ = 63.2 (s, 1C, 5'-C), 70.78 (s, 1C, 2'-C), 73.4 (s, 1C, 3'-C), 79.9 (s, 1C, 4'-C), 87.5 (s, 1C, 1'-C), 128.42-134.01 (16s, 16C, 5-C und C_{Aromat}), 146.23 (s, 1C, 8-C), 146.82 (s, 1C, 4-C), 159.80 (s, 1C, 6-C), 151.37 (s, 1C, 2-C), 164.60, 164.76, 165.51 (4s, 4C, OCOCH₃).

6-Chlor-2',3',5'-benzoylribofuranosylpurin (132)StrukturSubstanzeigenschaften

Hellgelbes Öl, löslich in Dichlormethan

Ansatz

2',3',5'-Tribenzoylinosin 5.16 g (8.8 mmol)

Phosphoroxchlorid 15 ml

N,N-Dimethylanilin 1.4 g (8.8 mmol)

Versuchsvorschrift

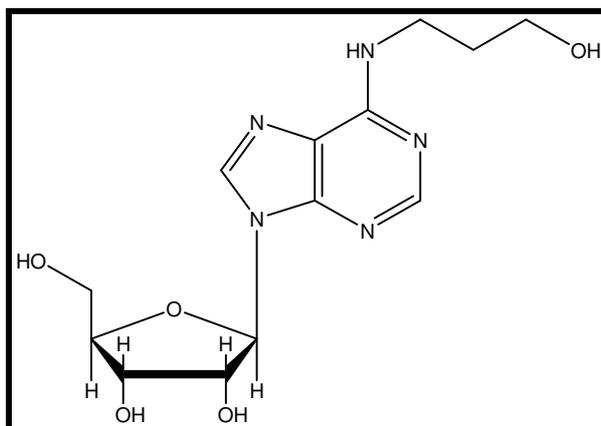
5.16 g (8.8 mmol) 2',3',5'-Tribenzoylinosin (**131**) wird bei 140 °C im Ofen getrocknet. Die Substanz wird langsam in eine Lösung von 1.4 g (8.8 mmol) Dimethylanilin und 15 ml (15.2 mmol) frisch destilliertem Phosphoroxychlorid gegeben. Die Lösung wird auf 100°C erhitzt. Die Reaktion ist beendet, wenn eine klare orangefarbene Lösung entstanden ist. Das Phosphoroxychlorid wird bei 40°C abdestilliert und der Rückstand wird unter Eiskühlung mit Eis hydrolysiert. Die Suspension wird 1 h unter Eiskühlung gerührt. Die wässrige Lösung wird dreimal mit Dichlormethan ausgeschüttelt. Die vereinigten organischen Phasen werden dreimal mit 1N-Salzsäure, dreimal mit Wasser und einmal mit Kochsalzlösung ausgeschüttelt und über Magnesiumsulfat getrocknet. Das Dichlormethan wird unter vermindertem Druck abgezogen und man erhält die Substanz als gelbes Öl.

Analytische Daten

Berechnete Masse: 598.98 für C₃₁H₂₄N₄O₈

¹H-NMR (DMSO-d₆, 500 MHz): δ = 4.80, 4.68 (2dd, 2H, 5'-CH₂-, ³J = 4.73 Hz), 4.90 (m, 1H, 4'-CH₂-, ³J = 4.73 Hz), 6.26 (t, 1H, 2'-CH₂-, ³J = 4.41 Hz), 6.49 (m, 1H, 3'-CH₂-, ³J = 4.71 Hz), 6.71 (d, 1H, 1'-CH₂-, ³J = 4.41 Hz), 7.42-7.98 (m, 15H, CH_{Aromat}), 8.64 (s, 1H, 8-C), 8.93 (s, 1H, 2-C).

¹³C-NMR (DMSO-d₆, 125 MHz): δ = 63.2 (s, 1C, 5'-C), 70.78 (s, 1C, 2'-C), 73.4 (s, 1C, 3'-C), 79.9 (s, 1C, 4'-C), 87.5 (s, 1C, 1'-C), 128.42-134.01 (16s, 16C, 5-C und C_{Aromat}), 146.23 (s, 1C, 8-C), 146.82 (s, 1C, 4-C), 159.80 (s, 1C, 6-C), 151.37 (s, 1C, 2-C), 164.60, 164.76, 165.51 (4s, 4C, OCOCH₃).

3-(N⁶-adenosyl)-aminopropan-1-ol (57)¹⁷²StrukturSubstanzeigenschaften

Weißes Pulver, löslich in Methanol und Ethanol.

Ansatz

6-Chlor-2',3',5'-triacetylribofuranosylpurin (54)	0.5 g (1.2 mmol)
3-Aminopropanol	4 ml (52.5 mmol)

Versuchsvorschrift

0.5 g (1.2 mmol) 6-Chlor-2',3',5'-triacetylribofuranosylpurin (**54**) werden in 3 ml Dichlormethan gelöst. Die Lösung wird auf -20 °C gekühlt und tropfenweise langsam mit 4 ml (52.5 mmol) 3-Aminopropanol versetzt. Die Mischung wird für weitere 20 min bei -20 °C gerührt und anschließend eine weitere Stunde bei Raumtemperatur. Das Dichlormethan wird unter vermindertem Druck abgezogen. Das überschüssige 3-Aminopropanol wird bei 90 °C im Hochvakuum (1.2 mbar) entfernt. Der Rückstand wird auf Kieselgel 60 aufgetragen und mittels klassischer Säulenchromatographie mit Dichlormethan: Ethanol (8:2) eluiert.

Analytische Daten

Schmp.: 140 °C

Berechnete Masse: 325.32 als C₁₃H₁₉N₅O₅

¹H-NMR (CDCl₃, 500 MHz): δ = 1.73 (m, 2H, 2''-CH₂-), 3.47 (t, 2H, 1''-CH₂-), 3.55 (m, 2H, 3''-CH₂-), 3.66 (3'-CH-) 4.47 (dd, 1H, 2'-CH-), 5.12 (t, 1H, 4'-CH-), 5.36 (dd,

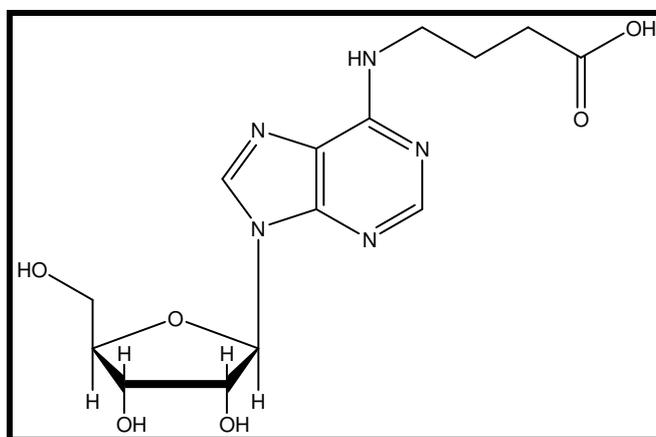
2H, 5'-CH₂-), 5.87 (d, 1H, 1'-CH-), 7.76 (bs, 1H, ⁶NH), 8.19 (s, 1H, 2-CH-), 8.31 (s, 1H, 8-CH-).

¹³C-NMR (DMSO-d₆, 125 MHz): δ = 32.42 (s, 1C, 2''-CH₂-), 37.41 (s, 1C, 1''-CH₂-), 58.8 (s, 1C, 3''-CH₂-), 61.8 (s, 1C, 5'-CH), 70.78 (s, 1C, 2'-C), 73.61 (s, 1C, 3'-C), 86.03 (s, 1C, 4'-C), 88.06 (s, 1C, 1'-C), 119.88 (s, 1C, 5-C), 139.77 (s, 1C, 8-C), 148.34 (s, 1C, 4-C), 152.47 (s, 1C, 2-C), 154.83 (s, 1C, 6-C).

Die Daten entsprechen den Literaturwerten.¹⁷²

N-[9-(β-D-Ribofuranosyl)-9H-purin-6-yl]-γ-aminobuttersäure (58)

Struktur



Substanzeigenschaften

Weißes Pulver, löslich in Wasser und Methanol, unlöslich in Dichlormethan.

Ansatz

6-Chlor-2',3',5'-triacetylribofuranoslypurin (54)	0.2 g (0.48 mmol)
γ-Aminobuttersäure	0.31 g (3 mmol)

Versuchsvorschrift

0.2 g (0.48 mmol) 6-Chlor-2',3',5'-triacetylribofuranoslypurin (**54**) und 0.31 g (3 mmol) γ-Aminobuttersäure werden in einem Gemisch aus 1 ml Ethanol, 2.5 ml Wasser und 2.5 ml Triethylamin für drei Tage bei 80°C erhitzt. Das Lösungsmittelgemisch wird vollständig entfernt. Das Rohprodukt wird in 5 ml Ethanol gelöst und mit 2 ml Diethylether versetzt. Der resultierende Niederschlag wird abfiltriert und verworfen. Das Lösungsmittelgemisch wird entfernt und der

resultierende Rückstand aus einem Gemisch aus Ethanol: Diethylether: Petrolether (1:1:1) umkristallisiert.

Ausbeute: 0.05 g (30 %)

Analytische Daten

Schmp. : 215-218 °C

Berechnete Masse: 353.34 für C₁₄H₁₉N₅O₆

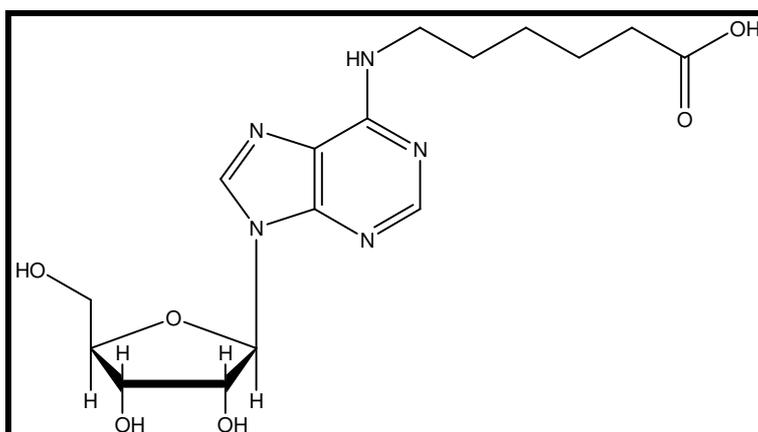
MS (ESI): 354.1 [M+H]⁺ und 352.0 [M-H]⁺

¹H-NMR (DMSO-d₆, 500 MHz): δ = 1.83 (m, 2H, 2''-CH₂-), 2.27 (t, 2H, 3''-CH₂-), 3.49 (m, 2H, 5'-CH₂-), 3.55, 3.95, 4.14 (3m, 3H, -OH), 3.43 (m, 1H, 4'-CH-, ³J = 3.47 Hz), 3.67 (d, 1H, 3'-CH-, ³J = 3.47 Hz und ³J = 3.74 Hz), 4.59 (m, 1H, 2'-CH- ³J = 5.67 Hz), 5.87 (d, 1H, 1'-CH-, ³J = 5.99 Hz), 7.88 (bs, 1H, ⁶NH), 8.19 (s, 1H, 2-CH-), 8.33 (s, 1H, 8-CH-).

¹³C-NMR (DMSO-d₆, 125 MHz): δ = 24.72 (s, 1C, 2''-CH₂), 31.42 (s, 1C, 3''-CH₂-), 57.8 (s, 1C, 1''-CH₂-), 61.81 (s, 1C, 5'-CH₂-), 70.79 (s, 1C, 2'-C), 73.62 (s, 1C, 3'-C), 86.03 (s, 1C, 4'-C), 88.10 (s, 1C, 1'-C), 119.89 (s, 1C, 5-C), 139.81 (s, 1C, 8-C), 152.45 (s, 1C, 2-C), 154.85 (s, 1C, 6-C), 174.43 (s, 1C, 4''-COOH).

N-[N⁶-adenosyl]-6-aminohexansäure (59)

Struktur



Substanzeigenschaften

Weißes Pulver, löslich in Wasser und Methanol, unlöslich in Dichlormethan.

Ansatz

6-Chlor-2',3',5'-triacetylribofuranosylpurin (54)	1 g (2.4 mmol)
6-Aminohexansäure	1.96 g (15 mmol)

Versuchsvorschrift

1 g (2.4 mmol) 6-Chlor-2',3',5'-triacetylribofuranosylpurin (**54**) und 1.96 g (15 mmol) 6-Aminohexansäure werden in einem Gemisch aus 5 ml Ethanol, 12.5 ml Wasser und 12.5 ml Triethylamin für drei Tage bei 80°C erhitzt. Das Lösungsmittelgemisch wird vollständig entfernt. Das Rohprodukt wird in 5 ml Ethanol gelöst und mit 2 ml Diethylether versetzt. Der resultierende Niederschlag wird abfiltriert und verworfen. Das Lösungsmittelgemisch wird entfernt und der Rückstand aus einem Gemisch aus Ethanol: Diethylether: Petrolether (1:1:1) umkristallisiert.

Ausbeute: 0.805 g (92 %)

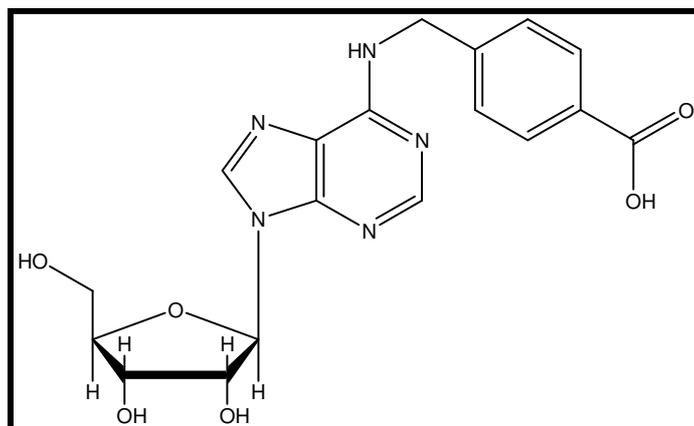
Analytische Daten

Schmp.: 190-193°C

Berechnete Masse: 353.34 für C₁₆H₂₃N₅O₆

¹H-NMR (DMSO-d₆, 500 MHz): δ = 1.32 (m, 2H, 3''-CH₂-), 1.59-1.67 (m, 6H, 2''-CH₂-, 4''-CH₂- und 5''-CH₂-), 2.19 (t, 2H, 1''-CH₂-), 3.45 (m, 2H, 5'-CH₂-), 3.53, 3.55, 4.13 (3m, 3H, -OH), 3.67 (dd, 1H, 4'-CH-, ³J = 3.47 Hz), 3.95 (d, 1H, 3'-CH-, ³J = 3.47 Hz und ³J = 3.74 Hz), 4.59 (m, 1H, 2'-CH- ³J = 5.67 Hz), 5.87 (d, 1H, 1'-CH-, ³J = 5.99 Hz), 7.82 (bs, 1H, ⁶NH), 8.18 (s, 1H, 2-CH-), 8.31 (s, 1H, 8-CH-).

¹³C-NMR (DMSO-d₆, 125 MHz): δ = 24.49 (s, 1C, 4''-CH₂-), 26.10 (s, 1C, 3''-CH₂-), 29.01 (s, 1C, 2''-CH₂-), 33.93 (s, 1C, 5''-CH₂-), 45.82 (s, 1C, 1''-CH₂-), 61.81 (s, 1C, 5'-C), 70.78 (s, 1C, 2'-C), 73.60 (s, 1C, 3'-C), 86.03 (s, 1C, 4'-C), 88.10 (s, 1C, 1'-C), 139.71 (s, 1C, 8-C), 152.47 (s, 1C, 2-C), 174.64 (s, 1C, 6''-COOH).

4-{[9-(Ribofuranoyl)-9H-purin-6-ylamino]methyl}benzoesäure (60)StrukturSubstanzeigenschaften

Weißes Pulver, löslich in Wasser und Methanol, unlöslich in Dichlormethan.

Ansatz

6-Chlor-2',3',5'-triacetylribofuranosylpurin (54)	1 g (2.4 mmol)
4-(Aminomethyl)benzoesäure	2.26 g (15 mmol)

Versuchsvorschrift

1 g (2.4 mmol) 6-Chlor-2',3',5'-triacetylribofuranosylpurin (**54**) und 2.26 g (15 mmol) 4-(Aminomethyl)benzoesäure werden in einem Gemisch aus 5 ml Ethanol, 12.5 ml Wasser und 12.5 ml Triethylamin für drei Tage bei 80°C erhitzt. Das Lösungsmittelgemisch wird vollständig entfernt. Das Rohprodukt wird in 5 ml Ethanol gelöst und mit 2 ml Diethylether versetzt. Der resultierende Niederschlag wird abfiltriert und verworfen. Das Lösungsmittelgemisch wird entfernt und der Rückstand aus einem Gemisch aus Ethanol: Diethylether: Petrolether (1:1:1) umkristallisiert.

Ausbeute: 0.48 g (50 %)

Analytische Daten

Schmp.: 184-186°C

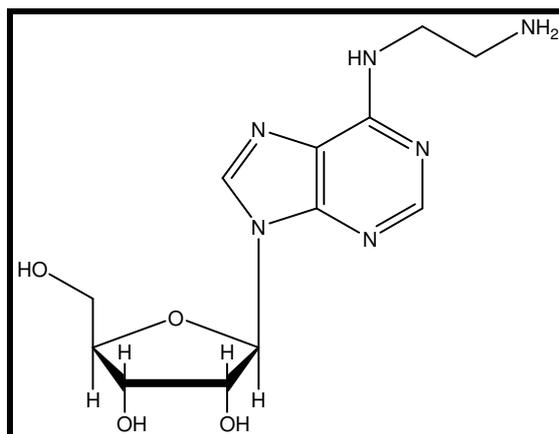
Berechnete Masse: 353.34 für C₁₈H₁₉N₅O₆

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6 , 500 MHz): $\delta = 3,49$, 3.95, 4.15 (3m, 3H, -OH), 3.53 (m, 1H, 4'-CH-, $^3J = 3.47$ Hz), 3.55 (d, 1H, 3'-CH-, $^3J = 3.47$ Hz und $^3J = 3.74$ Hz), 3.67 (dd, 2H, 5'-CH $_2$ -), 4.76 (t, 1H, 2'-CH- $^3J = 5.67$ Hz), 5.89 (d, 1H, 1'-CH-, $^3J = 5.99$ Hz), 7.40 (d, 2H, 3''-C_{Aromat} und 5''-C_{Aromat}), 7.85 (d, 2H, 2''-C_{Aromat} und 6''-C_{Aromat}), 8.18 (s, 1H, 2-CH-), 8.37 (s, 1H, 8-CH-), 8.47 (bs, 1H, ^6NH).

$^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- d_6 , 125 MHz): $\delta = 45.71$ (s, 1C, N-CH $_2$ -Ar), 61.76 (s, 1C, 5'-C), 70.75 (s, 1C, 2'-C), 73.63 (s, 1C, 3'-C), 86.00 (s, 1C, 4'-C), 88.07 (s, 1C, 1'-C), 127.06 und 129.42 (2s, 4H, C_{Aromat}), 140.12 (s, 1C, 8-C), 144.93 (s, 1C, 1''-C_{Aromat}), 148.68 (s, 1C, 4''-C_{Aromat}), 152.45 (s, 1C, 2-C), 154.60 (s, 1C, 6-C), 167.25 (s, 1C, Ar-COOH).

N⁶-(2-Aminoethyl)adenosin (61)¹²⁴

Struktur



Substanzeigenschaften

Gelbes Öl, unlöslich in Dichlormethan, leicht löslich in Wasser und Methanol.

Ansatz

6-Dichlor-2',3',5'-triacetylribofuranosylpurin (54)	0.81 g (1.97 mmol)
Ethylendiamin	5 ml (75 mmol)

Versuchsvorschrift

0.81 g (1.97 mmol) 6-Dichlor-2',3',5'-triacetylribofuranosylpurin (**54**) werden in 4 ml Dichlormethan gelöst und auf -20 °C gekühlt. Unter heftigem Rühren werden 5 ml (75 mmol) Ethylendiamin vorsichtig zugegeben. Die Lösung wird 1 h bei RT gerührt. Das überschüssige Ethylendiamin (Sdp. 116 °C) wird unter Hochvakuum abgezogen

und das Rohprodukt durch einen Dowex OH⁻ Anionenaustauscher mit dem Eluenten Methanol gereinigt.

Ausbeute : 410 mg (67%)

Analytische Daten

Berechnete Masse: 310.14

MS (ESI): 311.3 [M+H]⁺ für C₁₂H₁₈N₆O₄

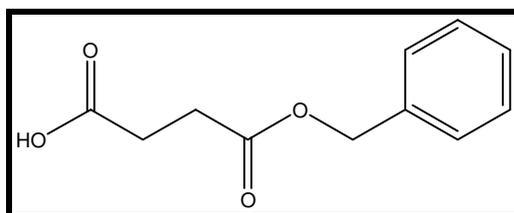
¹H-NMR (DMSO-d₆, 500 MHz): δ = 1.83 (t, 2H, 1'-CH₂-), 2.25 (t, 3H, 2'-CH₂-), 3.49 (bs, 2H, CH₂-NH₂), 3.54 und 3.52 (2d, 2H, 5'-CH₂-, ³J = 3.46 Hz), 3.49, 3.65, 3.67 (3d, 3H, -OH), 3.95 (m, 1H, 4'-CH-, ³J = 3.16 Hz und ³J = 3.46 Hz), 4.13 (d, 1H, 3'-CH-, ³J = 5.04 Hz und ³J = 3.15 Hz), 4.59 (m, 1H, 2'-CH-, ³J = 6.31 Hz und ³J = 5.04 Hz), 5.87 (d, 1H, 1'-CH-, ³J = 6.3 Hz), 7.88 (m, 1H, -NH-CH₂-), 8.18 (s, 1H, 2-CH-), 8.33 (s, 1H, 8-CH-).

¹³C-NMR (DMSO-d₆, 125 MHz): δ = 32.42 (s, 1C, 2''-CH₂-), 56.16 (s, 1C, 1''-CH₂-), 57.84 (s, 1C, 3''-CH₂-), 61.81 (s, 1C, 5'-CH), 70.79 (s, 1C, 2'-C), 73.62 (s, 1C, 3'-C), 86.03 (s, 1C, 4'-C), 88.10 (s, 1C, 1'-C), 139.81 (s, 1C, 8-C), 152.45 (s, 1C, 2-C), 154.84 (s, 1C, 6-C).

*Diese Verbindung wird von *Golisade et al.* beschrieben, allerdings ohne Angaben über Ausbeute und analytischen Daten.

Bernsteinsäuremonobenzylester (62)¹⁶⁵

Struktur



Substanzeigenschaften

Farbloses Öl, löslich in Ethylacetat und Methanol, unlöslich in Dichlormethan.

Ansatz

Bernsteinsäureanhydrid	1 g (10 mmol)
Benzylalkohol	0.86 g (8.3 mmol)
Dimethylaminopyridin (DMAP)	1.02 g (8.3 mmol)

Versuchsvorschrift

Eine Mischung aus 1 g (10 mmol) Bernsteinsäureanhydrid, 1.02 g (8.3 mmol) DMAP und 0.86 g (8.3 mmol) Benzylalkohol in 30 ml Dichlormethan, wird 18 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend werden 30 ml einer 5%igen Natriumcarbonatlösung hinzu gegeben und die beiden Phasen getrennt. Die wässrige Phase wird mit 1N-HCl angesäuert und dreimal mit 30 ml Ethylacetat ausgeschüttelt. Die vereinigten organischen Phasen werden mit 30 ml gesättigter Natriumchloridlösung gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet, filtriert und vom Lösungsmittel befreit.

Ausbeute: 0.963 g (56 %);

Literatur-Ausbeute: 94 %¹⁶⁵

Analytische Daten

Berechnete Masse: 208.07 für $C_{11}H_{12}O_4$

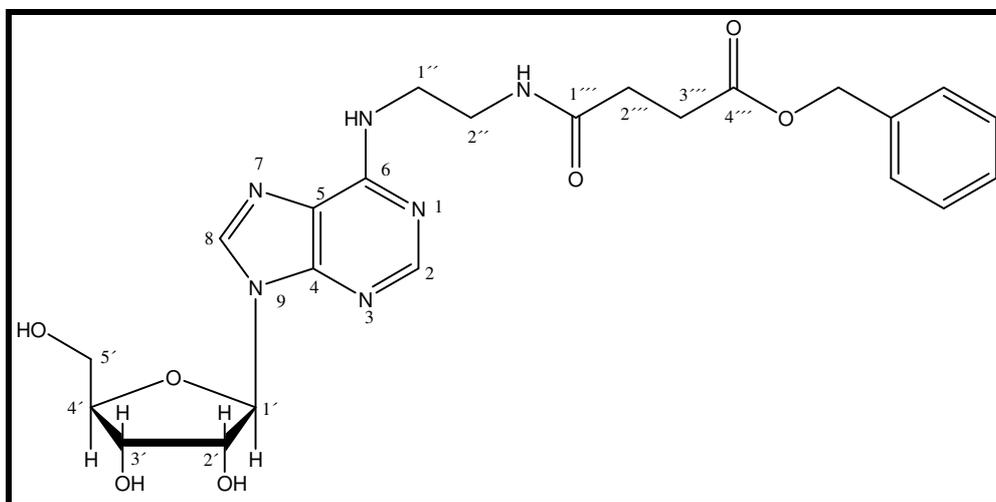
$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6 , 500 MHz): δ = 2.56 (m, 2H, 3- CH_2 -), 5.08 (s, 2H, O- CH_2 -Ar), 7.31-7.36 (m, 5H, $\text{CH}_{\text{Aromat}}$), 12.2 (s, 1H, COOH).

$^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- d_6 , 125 MHz): δ = 28.82 und 28.90 (2s, 2C, 3- CH_2 - und 2- CH_2 -), 65.6 (s, 1C, Ar- CH_2 -O), 127.9 – 136.3 (4s, 5C, C_{Aromat}), 172.1 und 173.5 (2s, 2C, -COOH und COOR).

Die Daten entsprechen den Literaturwerten.¹⁶⁵

4-[2-(9-Ribofuranosyl-9H-purin-6-ylamino)ethylamino]-4-oxo-
buttersäurebenzylester (63)

Struktur



Substanzeigenschaften

Weißes Pulver, löslich in Methanol.

Ansatz

2-(N ⁶ -Adenosyl-)ethylamin (61)	0.35 g (1.12 mmol)
Bernsteinsäuremonobenzylester (62)	232 g (1.12 mmol)
2-(7-Aza-1H-benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyl-uronium (HCTU)	0.464 g (1.12 mmol)
1-Hydroxybenzotriazol (HOBT)	0.166 g (1.12 mmol)
Diisopropylethylamin (DIPEA)	0.2 ml (1.232 mmol)

Versuchsvorschrift

Unter Argonatmosphäre werden 0.232 g (1.12 mmol) **62** und 0.2 ml (1.232 mmol) Diisopropylethylamin (DIPEA) in 5 ml trockenem Dimethylformamid suspendiert. Nach Zugabe von 0.464 g (1.12 mmol) HCTU und 0.166 g (1.12 mmol) HOBT wird ein Minute gerührt und anschließend mit 0.35 g (1.12 mmol) **61** versetzt. Die Lösung wird 36 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wird unter vermindertem Druck abgezogen und das Rohprodukt auf Kieselgel aufgetragen. Eluiert wird mit Dichlormethan: Methanol (9:1).

Ausbeute: 0.085 g (15 %)

Analytische Daten

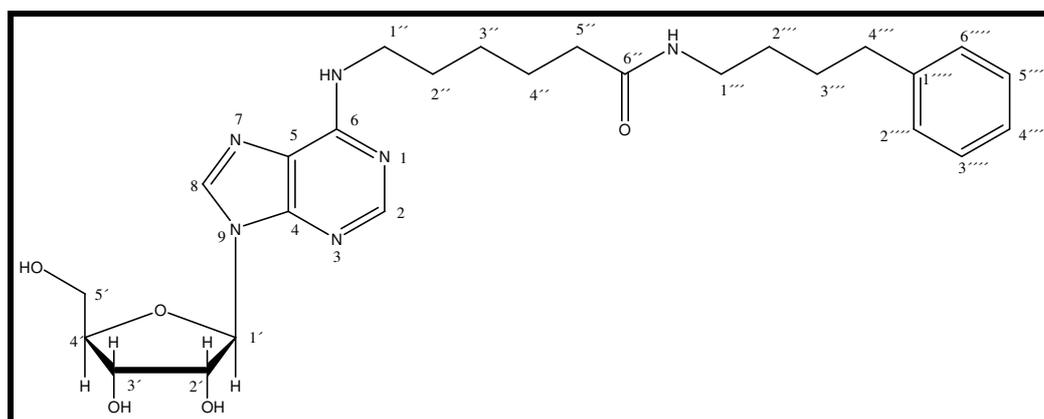
Schmp.: 197-200 °C

Berechnete Masse: 500.2 für C₂₃H₂₈N₆O₇

¹H-NMR (DMSO-d₆, 500 MHz): δ = 2.36 (t, 2H, 3''''-CH₂-), 2.55 (t, 2H, 2''''-CH₂-), 3.28 (m, 6H, 1''-CH₂- und 2''-CH₂- und 3'-CH und 4'-CH), 3.53, 3.67, 4.14 (3 m, 3H, -OH), 3.55 (d, 1H, 5'-CH₂-, ³J = 3.47 Hz), 3.95 (m, 1H, 5'-CH₂-, ³J = 3.47 Hz), 4.59 (t, 1H, 2'-CH), 5.06 (s, 2H, O-CH₂-Ar), 5.88 (d, 1H, 1'-CH), 7.29-7.36 (m, 5H, CH_{Aromat}), 7.82 (s, 1H, ⁶NH-), 7.98 (t, 1H, CONH-), 8.20 (s, 1H, 2-C), 8.33 (s, 1H, 8-C).

¹³C-NMR (DMSO-d₆, 125 MHz): δ = 29.17 (s, 1C, 3''''-CH₂-), 30.02 (s, 1C, 2''''-CH₂-), 38.50 (s, 1C, 2''-CH₂-), 61.70 (s, 1C, 5'-C), 70.76 (s, 1C, 2'-C), 73.65 (s, 1C, 3'-C), 86.01 (s, 1C, 4'-C), 88.08 (s, 1C, 1'-C), 119.99 (5-C), 123.48 bis 139.37 (6s, 6C, C_{Aromat}), 141.53 (s, 1C, 8-C), 149.89 (s, 1C, 4-C), 152.40 (s, 1C, 2-C), 154.82 (s, 1C, 6-C), 170.91 und 172.26 (2s, 2C, RCONHR und RCOOR).

6-(9-Ribofuranosyl-9H-purin-6-ylamino)-N-(4-phenylbutyl)hexansäureamid (64)

StrukturSubstanzeigenschaften

Weisser Feststoff, löslich in Ethanol und Methanol, unlöslich in Dichlormethan und Petrolether.

Ansatz

N-[N ⁶ -adenosyl]-6-aminohexansäure (59)	0.102 g (0.28 mmol)
Phenylbutylamin	44 µl (0.28 mmol)
Benzotriazol-1-yl-oxytripyrrolidinophosphonium-hexafluorophosphat (PyBOP)	0.145 g (0.28 mmol)
1-Hydroxybenzotriazol (HOBT)	0.037 g (0.28 mmol)
Diisopropylethylamin (DIPEA)	51 µl (0.308 mmol)

Versuchsvorschrift

Unter Argonatmosphäre werden 0.102 g (0.28 mmol) **59** und 51 µl (0.308 mmol) DIPEA in 5 ml trockenem Dimethylformamid suspendiert. Nach Zugabe von 0.145 g (0.28 mmol) PyBOP und 0.037 g (0.28 mmol) HOBT wird ein Minute gerührt und anschließend mit 44 µl (0.28 mmol) Phenylbutylamin versetzt. Die Lösung wird 36 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wird vollständig entfernt und das Rohprodukt auf Kieselgel 60 aufgetragen und mit Dichlormethan: Methanol (9:1) eluiert. Die das Produkt enthaltenden Fraktionen werden vereinigt und vom Lösungsmittel befreit. Der Rückstand wird in Ethanol gelöst, und nach Zugabe von Petrolether fällt das Produkt in reiner Form aus.

Ausbeute: 0.027 g (19 %)

Analytische Daten

Schmp.: 145 °C

Berechnete Masse: 512.77 für C₂₆H₃₆N₆O₅

MS (ESI): 513.2 [M+H]⁺ und 511.0 [M-H]⁻

¹H-NMR (DMSO-d₆, 500 MHz): δ = 1.58-1.35 (m, 10H), 2.03 (t, 2H, 5''-CH₂-), 2.56 (t, 2H, 4'''-CH₂-), 3.08 (m, 2H, 1''-CH₂-), 3.13 (m, 2H, 1'''-CH₂-), 3.95, 4.67 (2m, 2H, -OH), 4.14 (m, 1H, 3'-CH, ³J = 5.05 Hz und ³J = 4.41 Hz), 4.60 (m, 1H, 2'-CH, ³J = 5.99 Hz und ³J = 5.30 Hz), 5.12 (d, 1H, 4'-CH, ³J = 4.41 Hz), 5.38 (d, 2H, 5'-CH, ³J = 6.31 Hz), 5.87 (d, 1H, 1'-CH, ³J = 5.99 Hz), 7.12-7.17 (d, 2H, CH_{Aromat}), 7.23-7.26 (d, 2H, CH_{Aromat}), 7.67 (t, 1H, CONHR), 7.80 (bs, 1H, ⁶NH), 8.18 (s, 1H, 2-C), 8.31 (s, 1H, 8-C).

^{13}C -NMR (DMSO- d_6 , 125 MHz): δ = 18.23 (s, 4''-CH $_2$ -), 25.29 (s, 1C, 3''-CH $_2$ -), 26.21 (s, 1C, 3'''-CH $_2$ -), 28.49 (s, 1C, 2''-CH $_2$ -), 28.95 (s, 1C, 2'''-CH $_2$ -), 35.55 (s, 1C, 4'''-CH $_2$ -), 38.25 (s, 1C, 5''-CH $_2$ -), 41.95 (s, 1C, 1'''-CH $_2$ -), 53.75 (s, 1C, N 6 -R), 61.82 (s, 1C, 5'-C), 70.79 (s, 1C, 2'-C), 73.59 (s, 1C, 3'-C), 86.03 (s, 1C, 4'-C), 88.10 (s, 1C, 1'-C), 139.71, 128.38, 128.32, 125.73 (4s, C $_{\text{Aromat}}$), 142.27 (s, 1C, 8-C), 152.46 (s, 1C, 2-C), 154.82 (s, 1C, 6-C), 171.95 (s, 1C, CONR).

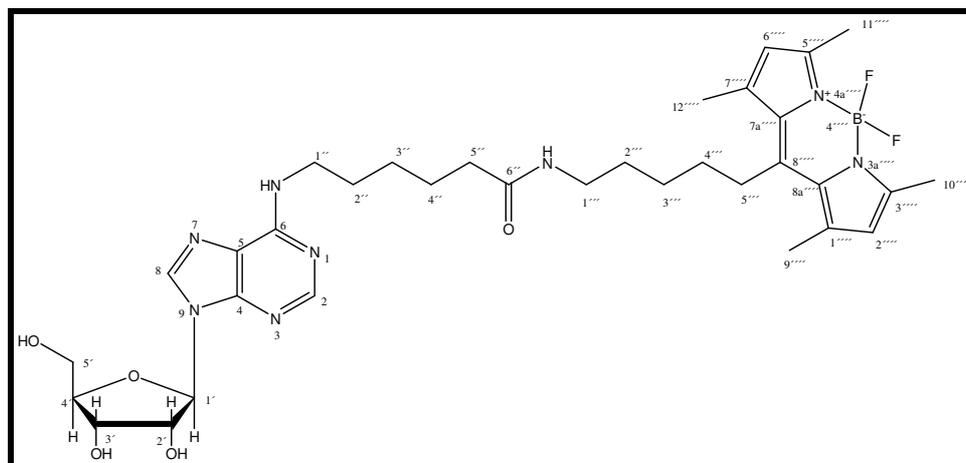
Reinheit

LC-MS

Säule	Luna RP-C $_{18}$, 3 μm , Firma <i>Phenomenex</i> [®]
Puffer	2 mmol Ammoniumacetat
Eluent	Gradient von Wasser: Methanol 9:1 auf 100% Methanol innerhalb von 20 min
Detektion	UV (254 nm)
Injektion	1 mg /1 ml
Retentionzeit	20.71 min
Reinheit	97 %

6-(9-Ribofuranosyl-9H-purin-6-ylamino)-N-(5-(4,4-difluoro-1,3,5,7-tetra-methyl-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacen-8-yl)pentyl-hexansäureamid (65)

Struktur



Substanzeigenschaften

Orange-roter Feststoff, löslich in Ethanol und Methanol, unlöslich in Dichlormethan und Petrolether

Ansatz

N-[N ⁶ -adenosyl]-6-aminohexansäure (59)	0.102 g (0.28 mmol)
8-(5-Aminopentyl)-4,4-difluoro-1,3,5,7-tetramethyl-4-bora-3a,4a-s-indacen (32)	0.094 g (0.28 mmol)
Benzotriazol-1-yl-oxytripyrrolidinophosphonium-hexafluorophosphat (PyBOP)	0.145 g (0.28 mmol)
1-Hydroxybenzotriazol (HOBT)	0.037 g (0.28 mmol)
Diisopropylethylamin (DIPEA)	51 μ l (0.308 mmol)

Versuchsvorschrift

Unter Argonatmosphäre werden 0.102 g (0.28 mmol) **59**, 0.145 g (0.28 mmol) PyBOP und 0.037 g (0.28 mmol) HOBT in 5 ml trockenem Dimethylformamid suspendiert. Nach Zugabe von 51 μ l DIPEA wird ein Minute gerührt und anschließend mit 0.094 g (0.28 mmol) **32**, welches in 2 ml Dimethylformamid gelöst wurde, versetzt. Die Lösung wird 36 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wird vollständig entfernt und das Rohprodukt auf Kieselgel 60 aufgetragen und mit Dichlormethan: Methanol (9:1) eluiert. Die das Produkt enthaltenden Fraktionen werden vereinigt und vom Lösungsmittel befreit. Der Rückstand wird in Ethanol gelöst, und nach Zugabe von Petrolether fällt das Produkt in reiner Form aus.

Ausbeute: 0.02 g (10 %)

Analytische Daten

Schmp.: 106 °C _{Zers.}

Berechnete Masse: 696.37 für C₃₄H₄₇BF₂N₈O₅

MS (ESI): 697.3 [M+H]⁺ und 695.5 3[M-H]⁺

¹H-NMR (DMSO-d₆, 500 MHz): δ = 1.44-1.52 (m, 12H, 2''-CH₂- bis 4''-CH₂- und 2'''-CH₂- bis 4'''-CH₂-), 1.72 (m, 2H, 5'''-CH₂-), 2.09 (t, 2H, 5''-CH₂-), 2.38 (s, 6H, 9''''-CH₃ and 12''''-CH₃), 2.39 (s, 6H, 10''''CH₃ and 11''''-CH₃), 2.90 (m, 2H, 1'''-CH₂-), 3.01 (m, 2H, 1''-CH₂-), 3.53 (d, 1H, 5'-CH, ³J = 3.47 Hz), 3.55 (d, 1H, 3'-CH, ³J = 3.78 Hz), 3.66 (dd, 1H, 4'-CH, ³J = 3.78 Hz), 3.94 (m, 1H, 5'-CH, ³J = 3.78 Hz und ³J = 3.47 Hz), 4.13 (m, 1H, -OH), 4.66 (t, 1H, 2'-CH, ³J = 5.6 Hz), 5.87

(d, 1H, 1'-CH, $^3J = 3.47$ Hz), 6.21 (s, 2H, 2''''-CH und 6''''-CH), 7.68 (t, 1H, CONHR), 7.91 (bs, 1H, $^6\text{NH-}$), 8.19 (s, 1H, 2-CH), 8.33 (s, 1H, 8-CH).

$^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- d_6 , 125 MHz): $\delta = 14.18$ (s, 2C, 10''''-CH $_3$ und 11''''-CH $_3$), 15.99 (s, 2C, 9''''-CH $_3$ und 12''''-CH $_3$), 25.29 (s, 1C, 4''-CH $_2$ -), 26.05 (s, 1C, 3''-CH $_2$ -), 26.21 (s, 1C, 3'''-CH $_2$ -), 27.12 (s, 1C, 4'''-CH $_2$ -), 27.90 (s, 1C, 2''-CH $_2$ -), 28.96 (s, 1C, 2''-CH $_2$ -), 31.25 (s, 1C, 5''-CH $_2$ -), 35.57 (s, 1C, 5''-CH $_2$ -), 38.25 (s, 1C, 1''-CH $_2$ -), 45.97 (s, 1C, 1''-CH $_2$ -), 61.79 (s, 1C, 5'-CH $_2$ -), 70.77 (s, 1C, 2'-C), 73.65 (s, 1C, 3'-C), 86.03 (s, 1C, 4'-C), 88.09 (s, 1C, 1'-C), 121.79 (s, 2C, 2''''-CH und 6''''-CH), 130.85 (s, 2C, 3''''-C und 7''''-C), 139.82 (s, 1C, 8-C), 140.91 (s, 1C, 8''''-C), 146.91 (s, 1C, 2-C), 153.14 (s, 1C, 6-C), 172.01 (s, 1C, RCONHR).

Spektroskopische Daten

UV-Absorption (MeOH) λ_{max} : 497 nm

Fluoreszenzemission (MeOH) λ_{max} : 498 nm

Reinheit

Kapillarelektrophorese

Puffer : Tris-HCl, 100 mM SDS, pH 9.2
 Injektion : 5 s mit 5 psi
 Stromstärke : 25 kV
 Messzeit : 25 min
 Kapillare : Fused-silica Kapillare, 40 cm (30 cm), 75 μm ID
 Detektor : UV (260 nm)
 Retentionszeit : 11.41 min
 Reinheit : 100 %

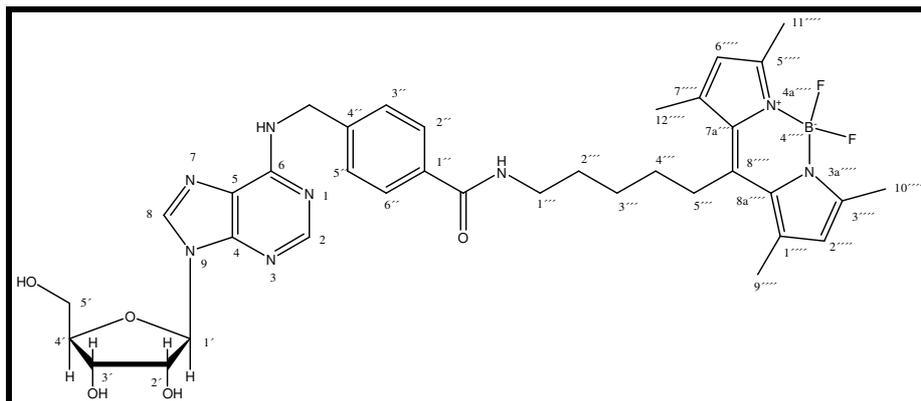
Kapillarelektrophorese

Puffer : Tris-HCl, 100 mM SDS, pH 9.2
 Injektion : 5 s mit 5 psi
 Stromstärke : 25 kV
 Messzeit : 25 min
 Kapillare : Fused-silica Kapillare, 40 cm (30 cm), 75 μm ID
 Detektor : UV (495 nm)

Retentionszeit : 11.41 min

Reinheit : 100 %

4-([9-(Ribofuranoyl)-9H-purin-6-ylamino]methyl)-N-[5-(4,4-difluoro-1,3,5,7-tetra-methyl-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacen-8-yl)pentyl]-benzoesäureamid (66)

StrukturSubstanzeigenschaften

Orange-roter Feststoff, löslich in Ethanol, Methanol, unlöslich in Dichlormethan, Petrolether

Ansatz

4-[1-(N ⁶ -adenosyl)-1-amino-methyl]benzoesäure (60)	0.112 g (0.28 mmol)
2-(7-Aza-1H-benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium (HCTU)	0.115 g (0.28 mmol)
1-Hydroxybenzotriazol (HOBT)	0.037 g (0.28 mmol)
Diisopropylethylamin (DIPEA)	51 µl (0.308 mmol)
8-(5-Aminopentyl)-4,4-difluoro-1,3,5,7-tetramethyl-4-bora-3a,4a-s-indacen (32)	0.094 g (0.28 mmol)

Versuchsvorschrift

Unter Argonatmosphäre werden 0.115 g (0.28 mmol) **60**, 0.115 g (0.28 mmol) HCTU und 0.037 g (0.28 mmol) HOBT in 3 ml trockenem Dimethylformamid suspendiert. Nach Zugabe von 51 µl DIPEA wird ein Minute gerührt und anschließend mit 0.094 g (0.28 mmol) **32**, welches in 2 ml Dimethylformamid gelöst wurde, versetzt. Die

Lösung wird 36 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wird vollständig entfernt und das Rohprodukt in etwas mobiler Phase suspendiert und auf Kieselgel aufgezogen. Das Rohprodukt-Kieselgel Gemisch wird auf eine gepackte Säule aufgetragen und mit einem Gemisch aus Dichlormethan : Methanol (9:1), das 2% Triethylamin enthält langsam und vorsichtig eluiert.

Ausbeute: 0.035 g (18 %)

Analytische Daten

Schmp.: 145 °C_{Zers.}

Berechnete Masse: 716.58 für C₃₆H₄₃BF₂N₈O₅

MS (ESI): 717.3 [M+H]⁺ und 715.5 [M-H]⁺

¹H-NMR (DMSO-d₆, 500 MHz): δ = 1.24 (m, 2H, 3''''-CH₂-), 1.49-1.60 (m, 6H, 2''''-CH₂-, 4''''-CH₂- und 5''''-CH₂-), 2.36 (s, 12H, 10''''CH₃, 11''''-CH₃, 9''''-CH₃ und 12''''-CH₃), 2.9 (m, 2H, 1''''-CH₂), 4.14 (d, 1H, 5'-CH, ³J = 4.73 Hz und ³J = 5.05 Hz), 4.30 (t, 1H, 4'-CH, ³J = 5.04 Hz), 4.60 (d, 1H, 3'-CH, ³J = 6.1 Hz und ³J = 5.3 Hz), 4.74 (s, 2H, N-CH₂-Ar), 3.65, 3.95, 5.14 (3m, 3H, -OH), 5.31 (m, 1H, 5'-CH, ³J = 4.72), 5.39 (d, 1H, 2'-CH, ³J = 6.3 Hz), 5.89 (d, 1H, 1'-CH, ³J = 6.3 Hz), 6.20 (s, 2H, 2''''-CH und 6''''-CH), 7.39 (d, 2H, CH_{Aromat}), 7.74 (d, 2H, CH_{Aromat}), 8.18 (bs, 1H, ⁶NH-), 8.32 (t, 1H, CONHR), 8.18 (bs, 1H, ⁶NH-), 8.37 (s, 1H, 2-CH), 8.45 (s, 1H, 8-CH).

¹³C-NMR (DMSO-d₆, 125 MHz): δ = 14.19 (s, 2C, 10''''-CH₃ und 11''''-CH₃), 16.81 (s, 2C, 9''''-CH₃ und 12''''-CH₃), 27.2 (s, 1C, 4''''-CH₂-), 27.92 (s, 1C, 3''''-CH₂-), 28.9 (s, 1C, 5''''-C), 42.9 (s, 1C, 1''''-CH₂-), 31.27 (s, 1C, 2''''-CH₂-), 53.78 (s, 1C, N-CH₂-Ar), 61.78 (s, 1C, 5'-CH₂-), 70.75 (s, 1C, 2'-C), 73.65 (s, 1C, 3'-C), 86.03 (s, 1C, 4'-C), 88.09 (s, 1C, 1'-C), 121.86 (s, 2C, 2''''-CH und 6''''-CH), 126.9 und 127.25 (2s, 4C, 2''C_{Aromat}, 3''C_{Aromat}, 5''C_{Aromat}, 6''C_{Aromat}), 130.8 (s, 1C, 1''-C_{Aromat}), 133.3 (s, 2C, 1''''-C und 7''''-C), 140.12 (s, 1C, 8-C), 140.95 (s, 1C, 4''-C), 146.93 (s, 2C, 3''''-C und 5''''-C), 152.44 (s, 1C, 6-C), 153.15 (s, 1C, 6-C), 166.19 (s, 1C, ArCONR).

Spektroskopische DatenUV-Absorption (MeOH) λ_{\max} : 497 nmFluoreszenzemission (MeOH) λ_{\max} : 498 nmReinheit

Kapillarelektrophorese

Puffer : Tris-HCl, 100 mM SDS, pH 9.2

Injektion : 5 s mit 5 psi

Stromstärke : 25 kV

Messzeit : 25 min

Kapillare : Fused-silica Kapillare, 40 cm (30 cm), 75 μ m ID

Detektor : UV (260 nm)

Retentionszeit : 11.07 min

Reinheit : 100 %

Kapillarelektrophorese

Puffer : Tris-HCl, 100 mM SDS, pH 9.2

Injektion : 5 s mit 5 psi

Stromstärke : 25 kV

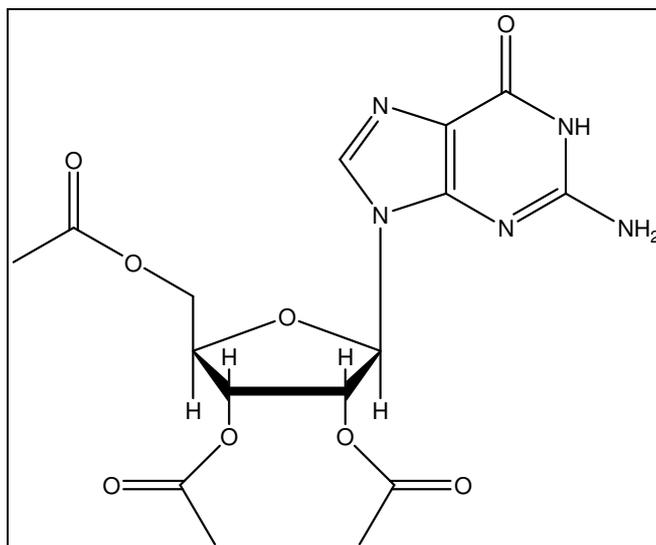
Messzeit : 25 min

Kapillare : Fused-silica Kapillare, 40 cm (30 cm), 75 μ m ID

Detektor : UV (495 nm)

Retentionszeit : 11.07 min

Reinheit : 100 %

2',3',5'-Triacetylguanosenin (74)¹⁶⁶StrukturSubstanzfarbe

Weißes Pulver, gut löslich in Dichlormethan unlöslich in Wasser.

Ansatz

Guanosin	8.40 g (29,7mmol)
4-Dimethylaminopyridin	0.2 g
Ethyldimehylamin (EDMA)	8.8 g (120 mmol)
Acetanhydrid	10.2 g (100 mmol)

Versuchsvorschrift

8,92 g (29.7 mmol) Guanosin-Monohydrat werden für einige Stunden bei 130°C im Ofen getrocknet. Die getrocknete Substanz wird zusammen mit 0,2 g Dimethylaminopyridin in einer Mischung aus 8,8 g (120 mmol) EDMA und 10,2 g (100 mmol) Acetanhydrid und 100 ml Acetonitril suspendiert. Es wird 45 min bei Raumtemperatur gerührt, bis eine klare Lösung entstanden ist. Zum Abfangen des überschüssigen Acetanhydrids wird etwas Methanol zugesetzt, wobei die Lösung sich leicht erwärmt. Die überschüssigen Reagentien werden im Vakuum entfernt und der Rückstand aus Isopropanol umkristallisiert.

Ausbeute: 9,2 g (76 %)

Literaturausbeute: 83 %¹⁶⁶

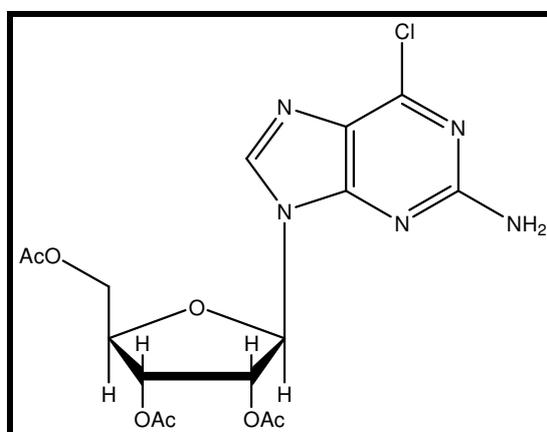
Analytische Daten

Schmp.: 223 °C

Berechnete Masse: 409.36 für C₁₆H₁₉N₅O₈

¹H-NMR (DMSO-d₆, 500 MHz): δ = 4.37 und 4.30 (2m, 2H, 5'-CH₂-, ³J = 4.1 Hz), 4.23 (d, 1H, 3'-CH-, ³J = 5.99 Hz), 5.48 (m, 1H, 4'-CH-, ³J = 4.1 Hz und ³J = 5.99 Hz), 5.76 (m, 1H, 2'-CH-, ³J = 5.99 Hz), 5.96 (d, 1H, 1'-CH-, ³J = 5.99 Hz), 6.49 (s, 2H, -NH₂), 7.90 (s, 1H, 8-CH-), 10.68 (s, 1H, NH).

¹³C-NMR (DMSO- d₆, 125 MHz): δ = 20.3, 20.5 (2s, 2C, CH₃-CO) 20.7 (s, 1C, CH₃C-5'-C), 62.2 (s, 1C, 5'-C), 70.4 (s, 1C, 2'-C), 72.2 (s, 1C, 3'-C), 79.7 (s, 1C, 4'-C), 84.6 (s, 1C, 1'-C), 117.0 (s, 1C, 5-C), 135.72 (s, 1C, 8-C), 151.2 (s, 1C, 4-C), 154.7 (s, 1C, 2-C), 156.8 (s, 1C, 6-C), 169.4; 169.5; 170.2; (3s, 3C, OCOCH₃).

Die Daten entsprechen den Litertaturwerten.¹⁶⁶**2-Amino-6-chlor-2',3',5'-triacetylribofuranoslypurin (75)¹⁶⁷**StrukturSubstanzeigenschaften

Weiß-beigefarbener Schaum, löslich in Dichlormethan und Ethylacetat, unlöslich in Wasser und Methanol.

Ansatz

2',3',5'-Triacetylguanodin (75)	5.5 g (13.4mmol)
Tetraethylammoniumchlorid	1.88 g (11.8 mmol)
N,N Dimethylanilin	1.41 g (11.8 mmol)
Phosphoroxchlorid	10.86 g (70.8 mmol)

Versuchsvorschrift

5.5 g (13.4 mmol) Triacetylguanodin (**75**) und 1.88 g (11.8 mmol) Tetraethylammoniumchlorid werden bei 140 °C im Ofen getrocknet. Die Substanzen werden vereinigt und langsam wird eine Mischung aus 1.41 g (11.8 mmol) Dimethylanilin in 10.96 g (70.8 mmol) frisch destilliertem Phosphoroxchlorid zugegeben. Die Lösung wird auf 100°C erhitzt. Die Reaktion ist beendet wenn eine klare orange-farbene Lösung entstanden ist. Das Phosphoroxchlorid wird bei 40°C abdestilliert und der Rückstand wird unter Eiskühlung mit Eis hydrolysiert. Die Suspension wird 20 min unter Eiskühlung gerührt. Die wässrige Lösung wird dreimal mit 100 ml Dichlormethan ausgeschüttelt. Die vereinigten organischen Phasen werden dreimal mit 100 ml 1N-Salzsäure, zweimal mit 100 ml Wasser und einmal mit 100 ml Kochsalzlösung ausgeschüttelt und über Magnesiumsulfat getrocknet. Das Dichlormethan wird unter vermindertem Druck abgezogen und die Substanz wird als weiß-beigefarbener Schaum erhalten.

Ausbeute: 2,72 g (48 %)

Literaturausbeute: 87%¹⁶⁷

Analytische Daten

Schmp.: 149°C

Berechnete Masse: 301.68 für C₁₆H₁₈ClN₅O₇

¹H-NMR (CDCl₃, 500 MHz): δ = 2.06 (s, 3H, OCOCH₃), 2.12 (s, 3H, OCOCH₃), 2.14 (s, 3H, OCOCH₃), 4.40 (d, 2H, 5'-CH₂-), 4.46 (t, 1H, 4'-CH-), 5.53 (d, 1H, 2'-CH₂-), 5.77 (d, 1H, 3'-CH₂-), 6.20 (d, 1H, 1'-CH₂-), 8.28 (s, 1H, 8-C).

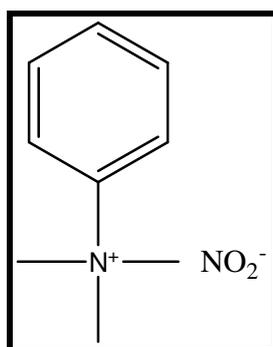
¹³C-NMR (CDCl₃, 125 MHz): δ = 20.5 und 20.3 (2s, 2C, CH₃-CO), 20.7 (s, 1C, CH₃C-5'-C), 62.6 (s, 1C, 5'-C), 70.5 (s, 1C, 2'-C), 73.2 (s, 1C, 3'-C), 80.8 (s, 1C, 4'-C),

86.5 (s, 1C, 1'-C), 130.90 (s, 1C, 5-C), 142.2 (s, 1C, 8-C), 143.9 (s, 1C, 4-C), 153.45 (s, 1C, 6-C), 160.0 (s, 1C, 2-C), 169.35 (4s, 4C, OCOCH₃), 169.6, 170.17.

Die Daten entsprechen den Literaturwerten.¹⁶⁷

Benzyltriethylammoniumnitrit¹³⁴

Struktur



Substanzeigenschaften

Klares Öl

Versuchsvorschrift

Eine Chromatographiesäule wird mit 20 g DOWEX 1X8 gepackt. Die Säule wird mit 100 ml 1N-Natriumnitrit Lösung gespült. Dieser Vorgang wird so oft wiederholt, bis aus dem Eluat kein Chlorid mehr nachweisbar ist, Es wird zweimal mit einer wässrigen 1 M-Benzyltriethylammoniumchlorid-Lösung eluiert. Das Wasser wird aus den vereinigten Fraktionen mittels Gefriertrocknung entfernt. Der Gehalt wird cerimetrisch bestimmt:

Vorschrift für die Gehaltsbestimmung

0.2 g (0.839 mmol) Substanz, genau gewogen, werden in 100.0 ml Wasser gelöst (Lösung 1). Diese Lösung wird in eine Bürette gefüllt. 2.0 ml 0.1 M Cer(IV)-Sulfat Maßlösung werden mit 20 ml ca. 1 M Schwefelsäure versetzt. Die Lösung wird mit Lösung 1 titriert bis sich die gelbe Farbe abgeschwächt hat. Nun werden einige Tropfen Ferroin-Lösung zugegeben und bis zum Umschlag von Blassblau nach Rosa titriert.

Berechnung: 0.2 mmol Cer(IV) à 0.1 mmol Nitrit

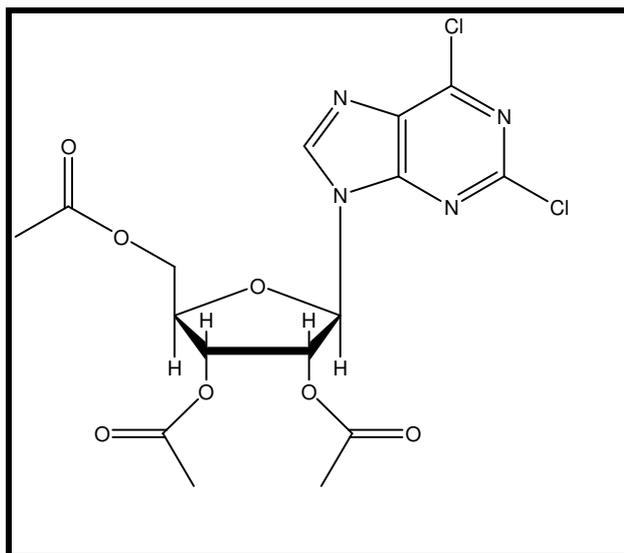
Theoretischer Verbrauch: 0.1 mmol: 0.839 mmol = 0.119 à 11,9 ml

Gehalt: (11.9 ml : tatsächlicher Verbrauch) * (200 mg: tatsächliche Einwaage)

Berechnung

Einwaage : 0.200 g

Verbrauch: 14.5 ml

Gehalt: $(11.9 : 14.5) * (200:200) = 82 \%$ **2,6-Dichlor-2',3',5'-triacetylribofuranoslypurin (76)**¹³⁴StrukturSubstanzeigenschaften

Gelber Schaum, gut löslich in Dichlormethan.

Ansatz

2-Amino-6-chlor-2',3',5'-triacetylribofuranoslypurin (75)	0.6 g (2.34mmol)
Acetylchlorid	0.92 g (11.76mmol)
BTEA-Nitrit	0.8 g (3.51mmol)

Versuchsvorschrift

0.6 g (2.34 mmol) 2-Amino-6-chlor-2',3',5'-triacetylribofuranoslypurin (**76**) und 0.92 g (11.76 mmol) Acetylchlorid werden unter Argonatmosphäre in 20 ml wasserfreiem Dichlormethan gelöst. Unter Eiskühlung werden 0.8 g BTEA-Nitrit, das in 10 ml wasserfreiem Dichlormethan gelöst wurde, innerhalb einer Stunde zugetropft. Anschließend wird unter Eiskühlung gerührt, bis die DC eine vollständige Umsetzung zeigt. Die Lösung wird dreimal mit je 100 ml Wasser ausgeschüttelt. Die organische Phase wird über Magnesiumsulfat getrocknet, filtriert und vom Lösungsmittel befreit.

Ausbeute: 0.715 g (68%)

Literaturausbeute: 84 % (Methode C)

Analytische Daten

Schmp.: 158 °C

Berechnete Masse: 321.11 für C₁₆H₁₆Cl₂N₄O₇

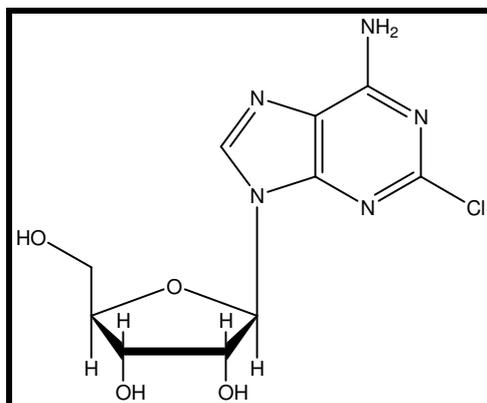
¹H-NMR (CDCl₃, 500 MHz): δ = 2.07(s, 3H, OCOCH₃), 2.12 (s, 3H, OCOCH₃), 2.15 (s, 3H, OCOCH₃), 4.40 (d, 2H, 5'-CH₂-), 4.46 (t, 1H, 4'-CH-), 5.53 (d, 1H, 2'-CH₂-), 5.77 (d, 1H, 3'-CH₂-), 6.20 (d, 1H, 1'-CH₂), 8.28 (s, 1H, 8-C).

¹³C-NMR (CDCl₃, 125 MHz) δ = 20.5 und 20.3 (2s, 2C, CH₃-CO), 20.7 (s, 1C, CH₃C-5'-C), 62.6 (s, 1C, 5'-C), 70.5 (s, 1C, 2'-C), 73.2 (s, 1C, 3'-C), 80.8 (s, 1C, 4'-C), 86.5 (s, 1C, 1'-C), 131.35 (s, 1C, 5-C), 143.2 (s, 1C, 8-C), 152.0 (s, 1C, 4-C), 152.45 (s, 1C, 6-C), 153.0 (s, 1C, 2-C), 169.35; (4s, 4C, OCOCH₃), 169.6, 170.17.

Die Daten entsprechen den Literaturwerten.¹³⁴

2-Chloradenosin (72)¹⁶⁸

Struktur



Substanzeigenschaften

Weißer Feststoff, löslich in Alkoholen und Wasser.

Ansatz

2,6-Dichlor-2',3',5'-triacetylribofuranosylpurin (76)	0.5 g (1.12 mmol)
Ammoniakalische Ethanollösung	25 ml

Versuchsvorschrift

Die ammoniakalische Ethanollösung wird hergestellt, indem in 100 ml absolut trockener Ethanol, unter Eiskühlung, Ammoniakgas eingeleitet wird. Die Lösung wird ohne weitere Aufarbeitung verwendet.

0.5 g (1.12 mmol) 2,6-Dichlor-2',3',5'-triacetylribofuranosylpurin (**76**) werden in 25 ml ammoniakalischer Ethanollösung gelöst und drei Tage bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wird unter vermindertem Druck abgezogen und das Rohprodukt auf eine Kieselgelsäule aufgetragen und mit Dichlormethan: Methanol (9:1) eluiert. Die gesammelten Fraktionen werden vom Lösungsmittel befreit und durch eine Reversed-Phase-Chromatographie (HPLC) mit einem steigenden Gradienten Methanol in Wasser (10:90 zu 90:10 über 70 min) vom Acetamid befreit. Das Lösungsmittel wird durch Lyophilisation entfernt.

Ausbeute: 40 mg (12%)

Analytische Daten

Schmp.: 162 °C

Berechnete Masse: 301.68 für C₁₀H₁₂ClN₅O₄

MS (ESI): 302.1 [M+H]⁺

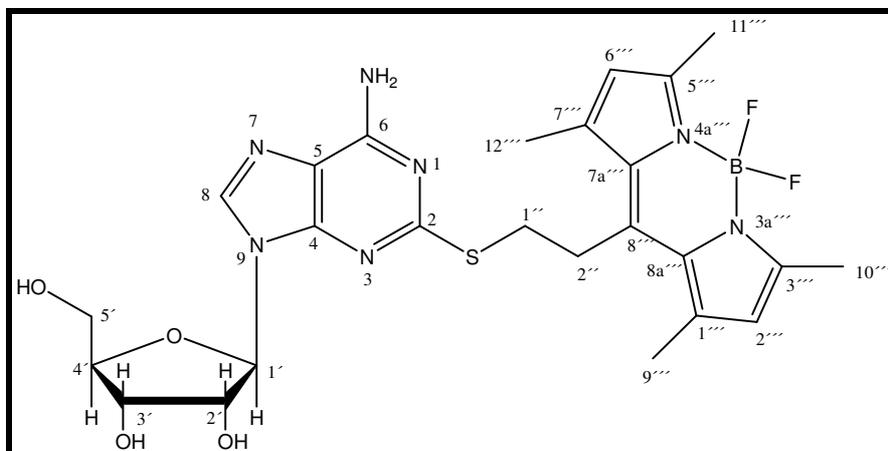
¹H-NMR (DMSO-d₆, 500 MHz): δ= 3.54 und 3.56 (2m, 2H, 5'-CH₂-), 3.93, 4.12, 4.51 (3m, 3H, -OH), 5.01 (t, 1H, 4'-CH-, ³J = 5.67 Hz), 5.16 (d, 1H, 3'-CH-, ³J = 5.04 Hz), 5.42 (d, 1H, 2'-CH-, ³J = 5.99 Hz), 5.79 (d, 1H, 1'-CH-, ³J = 5.99 Hz), 7.80 (s, 2H, -NH₂), 8.36 (s, 1H, 8-CH-).

¹³C-NMR (DMSO-d₆, 125 MHz): δ= 61.53 (s, 1C, 5'-C), 70.53 (s, 1C, 2'-C), 73.57 (s, 1C, 3'-C), 85.86 (s, 1C, 4'-C), 87.53 (s, 1C, 1'-C), 118.33 (5-C), 140.17 (s, 1C, 8-C), 150.49 (s, 1C, 4-C), 153.14 (s, 1C, 2-C), 156.95 (s, 1C, 6-C).

Die Daten entsprechen den Literaturwerten.¹⁶⁸

S-[2-(4,4-difluoro-1,3,5,7-tetra-methyl-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacen-8-yl)ethyl]-2-thioadenosin (82)

Struktur



Substanzeigenschaften

Roter Feststoff, löslich in Methanol und Wasser, unlöslich in Dichlormethan.

Ansatz

2-Thioadenosin	0.124 g (0.41 mmol)
8-(2-Bromethyl)-4,4-difluoro-1,3,5,7-tetramethyl-4-bora-3a,4a-s-indacen (22)	0.120 g (0.34 mmol)
Natriummethanolat	0.015 g (0.27 mmol)

Versuchsvorschrift

0.129 g (0.43 mmol) 2-Thioadenosin werden in 15 ml Dimethylformamid suspendiert. Nach Zugabe von 0.015 g (0.27 mmol) Natriummethanolat wird gerührt, bis eine klare Lösung entstanden ist. Unter ständigem Rühren werden 0.120 g (0.33 mmol) **22** hinzu gegeben und die Lösung 18 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wird unter Vakuum abgezogen und das Rohprodukt auf Kieselgel 60 aufgetragen und mit dem Eluenten Dichlormethan: Methanol (9:1) eluiert.

Ausbeute: 0.093 g (47 %)

Analytische Daten

Schmp.: 183-185 °C

Berechnete Masse: 573.3 für C₂₅H₃₀BF₂N₇O₄S

MS (ESI): 573.8 [M+H]⁺

¹H-NMR (DMSO-d₆, 500 MHz): δ = 2.41 (s, 6H, 9'''-CH₃ und 12'''-CH₃), 2.46 (s, 6H, 10'''-CH₃ und 11'''-CH₃), 3.28 bis 3.37 (m, 4H, 1''-CH₂- und 2''-CH₂-), 3.62 und 3.53 (2m, 2H, 5'-CH₂-), 3.92, 4.09, 4.51 (3m, 3H, -OH), 5.02 (t, 1H, 4'-CH-, ³J = 5.36 Hz), 5.13 (d, 1H, 3'-CH-, ³J = 5.04 Hz), 5.38 (d, 1H, 2'-CH-, ³J = 6.3 Hz), 5.82 (d, 1H, 1'-CH-, ³J = 6.3 Hz), 6.25 (s, 2H, 2'''-CH und 6'''-CH), 7.39 (s, 2H, -NH₂), 8.25 (s, 1H, 8-CH-).

¹³C-NMR (DMSO-d₆, 125 MHz): δ = 14.26 (s, 2C, 10'''-CH₃ und 11'''-CH₃), 16.02 (s, 2C, 9'''-CH₃ und 12'''-CH₃), 28.14 (s, 1C, 1''-CH₂), 31.28 (s, 1C, 2''-CH₂), 61.68 (s, 1C, 5'-C), 70.65 (s, 1C, 2'-C), 73.84 (s, 1C, 3'-C), 85.89 (s, 1C, 4'-C), 86.57 (s, 1C, 1'-C), 117.10 (5-C), 122.13 (s, 2C, 2'''-CH und 6'''-CH), 131.02 (s, 2C, 7a-C'''' und 8a-C''''), 138.7 (s, 2C, 1'''-C und 7'''-C), 141.48 (s, 1C, 8-C), 143.59 (s, 1C, 8'''-C), 150.39 (s, 1C, 4-C), 154.4 (s, 2C, 3'''-C und 5'''-C), 155.75 (s, 1C, 6-C), 162.74 (s, 1C, 2-C).

Spektroskopische Daten

UV-Absorption (MeOH) λ_{max}: 497 nm

Fluoreszenzemission (MeOH) λ_{max}: 498 nm

Reinheit

Kapillarelektrophorese

Puffer : Tris-HCl, 100 mM SDS, pH 9.2

Injektion : 5 s mit 5 psi

Stromstärke : 25 kV

Messzeit : 25 min

Kapillare : Fused-silica Kapillare, 40 cm (30 cm), 75 μm ID

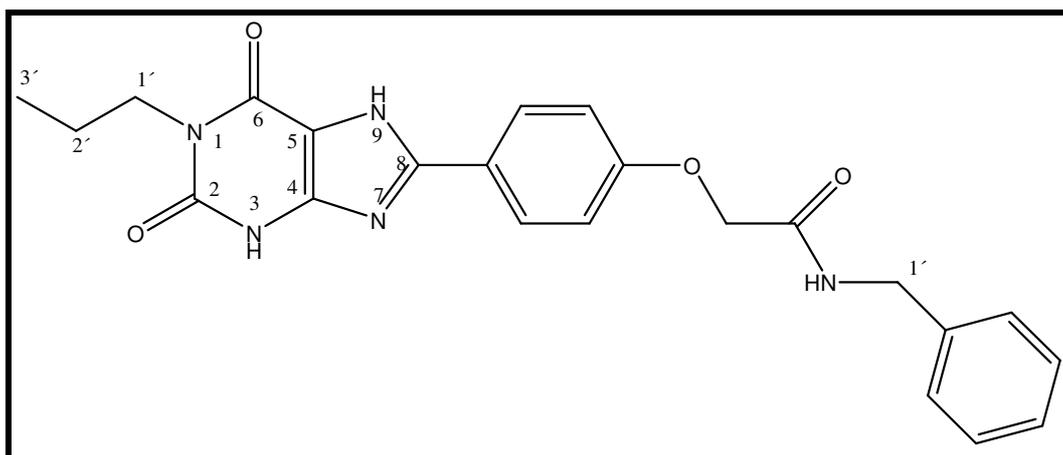
Detektor : UV (260 nm)

Retentionszeit : 11.71 min

Reinheit : 100 %

Kapillarelektrophorese

Puffer	: Tris-HCl, 100 mM SDS, pH 9.2
Injektion	: 5 s mit psi
Stromstärke	: 25 kV
Messzeit	: 25 min
Kapillare	: Fused-silica Kapillare, 40 cm (30 cm), 75 µm ID
Detektor	: UV (495 nm)
Retentionszeit	: 11.71 min
Reinheit	: 100 %

1-Propyl-purin-2,6-dion-8-(phenoxyessigsäure-4-phenylbenzylamid)**(92)**StrukturSubstanzeigenschaften

Weißer Feststoff, gut löslich in Dimethylformamid und Dimethylsulfoxid.

Ansatz

1-Propyl-purin-2,6-dion-8-phenoxyessigsäure (90)	0.060 g (0.17 mmol)
Chlorameisensäureisobutylester	23 µl (0.17 mmol)
N-Methylmorpholin	21 µl (0.187 mmol)
Benzylamin	19 µl (0.17 mmol)

Versuchsvorschrift

0.060 g (0.17 mmol) 1-Propyl-purin-2,6-dion-8-phenoxyessigsäure (**90**) werden in 5 ml Dimethylformamid suspendiert und mit 23 μ l (0.187 mmol) N-Methylmorpholin versetzt. Es wird 5 min bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wird der Ansatz auf -22°C gekühlt und mit 23 μ l (0.17 mmol) Chlorameisensäureisobutylester versetzt. Nach 15 min werden 19 μ l (0.17 mmol) Benzylamin hinzu gegeben und es wird weitere 3 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wird unter vermindertem Druck abdestilliert und die Substanz wird in 20 ml mobiler Phase gelöst. Die Suspension wird auf Kieselgel 60 aufgetragen und mit Dichlormethan: Methanol (40:1) eluiert.

Ausbeute: 0.018 g (25 %)

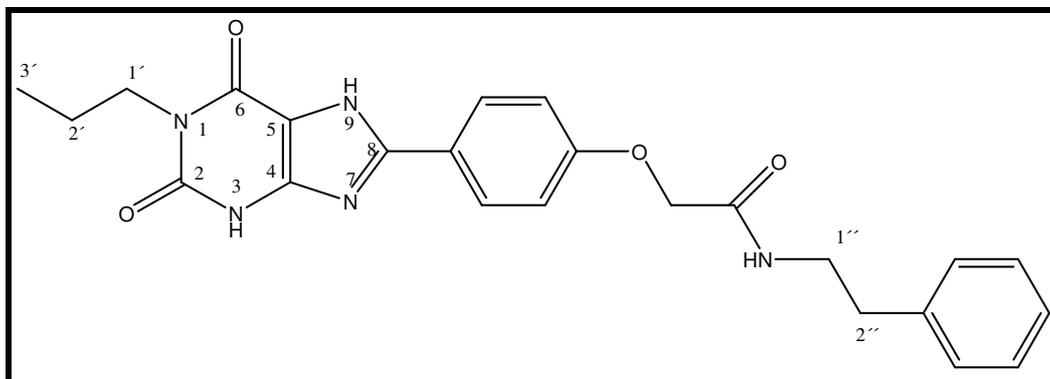
Analytische Daten

Schmp.: $>300^{\circ}\text{C}$

Berechnete Masse: 433.17 für $\text{C}_{23}\text{H}_{23}\text{N}_5\text{O}_4$

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6 , 500 MHz): $\delta = 0.86$ (t, 3H, 3'- CH_3), 1.59 (m, 2H, 2'- CH_2 -), 3.81 (m, 2H, 1'- CH_2 -), 4.35 (d, 2H 1''- CH_2 -), 4.63 (s, 2H, - OCH_2 -CONHR), 7.03 und 8.02 (2d, 4H, $\text{C}_{\text{Phenoxy-H}}$), 7.17 bis 7.28 (m, 5H, $\text{C}_{\text{Phenyl-H}}$), 8.62 (t, 1H, - CH_2 -CONHR), 11.80 (s, 1H, 3-NH), 13.44 (s, 1H, 7-NH).

$^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- d_6 , 125 MHz): $\delta = 67.15$ (s, 1C, OCH_2 -CONHR), 107.38 (s, 1C, 5-C), 147.91 (s, 1C, 4-C), 151.13 (s, 1C, 2-C), 154.85 (s, 1C, 6-C), 167.56 (s, 1C, R-CONHR), 115.32, 122.2, 127.34, 159.4 (4s, $\text{C}_{\text{Phenoxy}}$), 125.82, 128.05-128.34, 139.37 (4s, 6C, C_{Phenyl}).

1-Propyl-purin-2,6-dion-8-(phenoxyessigsäure-4-phenylethylamid)**(93)**StrukturSubstanzeigenschaften

Weißer Feststoff, gut löslich in Dimethylformamid und Dimethylsulfoxid.

Ansatz

1-Propyl-purin-2,6-dion-8-phenoxyessigsäure (90)	0.096 g (0.28 mmol)
Chlorameisensäureisobutylester	37 µl (0.28 mmol)
N-Methylmorpholin	34 µl (0.308 mmol)
Phenylethylamin	35 µl (0.28 mmol)

Versuchsvorschrift

0.096 g (0.28 mmol) 1-Propyl-purin-2,6-dion-8-phenoxyessigsäure (**90**) werden in 5 ml Dimethylformamid suspendiert und mit 34 µl (0.308 mmol) N-Methylmorpholin versetzt. Es wird 5 min bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wird der Ansatz auf -22°C gekühlt und mit 37 µl (0.28 mmol) Chlorameisensäureisobutylester versetzt. Nach 15 min werden 35 µl (0.28 mmol) Phenylethylamin hinzu gegeben und es wird weitere 3 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wird unter vermindertem Druck abdestilliert und die Substanz wird in 20 ml mobiler Phase gelöst. Die Suspension wird auf Kieselgel 60 aufgetragen und mit Dichlormethan: Methanol (40:1) eluiert.

Ausbeute: 0.069 g (55 %)

Analytische Daten

Schmp.: $> 300^{\circ}\text{C}$

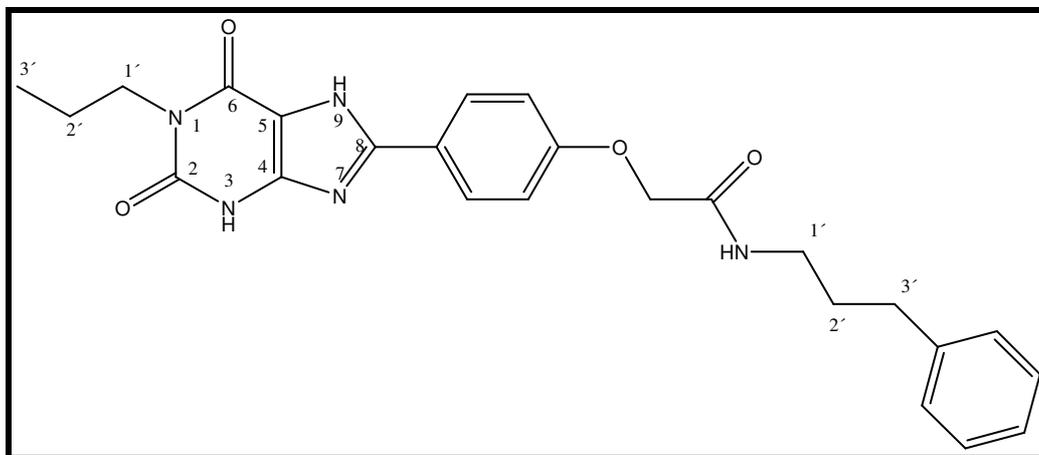
Berechnete Masse: 447,19 g/mol für $C_{24}H_{25}N_5O_4$

1H -NMR(DMSO- d_6 , 500 MHz): δ = 0.86 (t, 3H, 3'-CH₃), 1.57 (sex, 2H, 2'-CH₂-), 2.76 (t, 2H, 2''-CH₂-), 3.35 (dt, 2H 1''-CH₂-), 3.81 (t, 2H 1'-CH₂-), 4.53 (s, 2H, -OCH₂-CONHR), 7.03 und 8.02 (2d, 4H, C_{Phenoxy}-H), 7.17 bis 7.28 (m, 5H, C_{Phenyl}-H), 8.14 (t, 1H, -CH₂-CONHR), 11.80 (s, 1H, 3-NH), 13.44 (s, 1H, 7-NH).

^{13}C -NMR (DMSO- d_6 , 125 MHz): δ = 22.50 (s, 1C, 3'-CH₃), 29.93 (s, 1C, 2'-CH₂-), 32.61 (s, 2C, 2''-CH₂-), 38.23 (s, 1C, 1''-CH₂-), 39.20 (s, 1C, 1'-CH₂-), 67.54 (s, 1C, OCH₂-CONHR), 115.27 (s, 1C, 5-C), 141.77 (s, 1C, 2-C), 151.12 (s, 1C, 6-C), 159.36 (s, 1C, 4-C), 167.08 (s, 1C, R-CONHR), 131.27, 131.2 (2s, C_{Phenoxy}), 125.82, 128.3, 128.95, 142.2 (4s, 6C, C_{Phenyl}).

Darstellung von 1-Propyl-purin-2,6-dion-8-(phenoxyessigsäure-4-phenylpropylamid) (94)

Struktur



Substanzeigenschaften

Weißer Feststoff, gut löslich in Dimethylformamid, Dimethylsulfoxid

Ansatz

1-Propyl-purin-2,6-dion-8-phenoxyessigsäure (90)	0.096 g (0.28 mmol)
Chlorameisensäureisobutylester	37 μ l (0.28 mmol)
N-Methylmorpholin	34 μ l (0.308 mmol)
Phenylpropylamin	40 μ l (0.28 mmol)

Versuchsvorschrift

0.096 g (0.28 mmol) 1-Propyl-purin-2,6-dion-8-phenoxyessigsäure (**90**) werden in 5 ml Dimethylformamid suspendiert und mit 34 μ l (0.308 mmol) N-Methylmorpholin versetzt. Es wird 5 min bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wird der Ansatz auf -22°C gekühlt und mit 37 μ l (0.28 mmol) Chlorameisensäureisobutylester versetzt. Nach 15 min werden 40 μ l (0.28 mmol) Phenylpropylamin hinzu gegeben und es wird weitere 3 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wird unter vermindertem Druck abdestilliert und die Substanz wird in 20 ml mobiler Phase gelöst. Die Suspension wird auf Kieselgel 60 aufgetragen und mit Dichlormethan: Methanol (40:1) eluiert.

Ausbeute: 0.113 g (88 %)

Analytische Daten

Schmp.: > 300°C

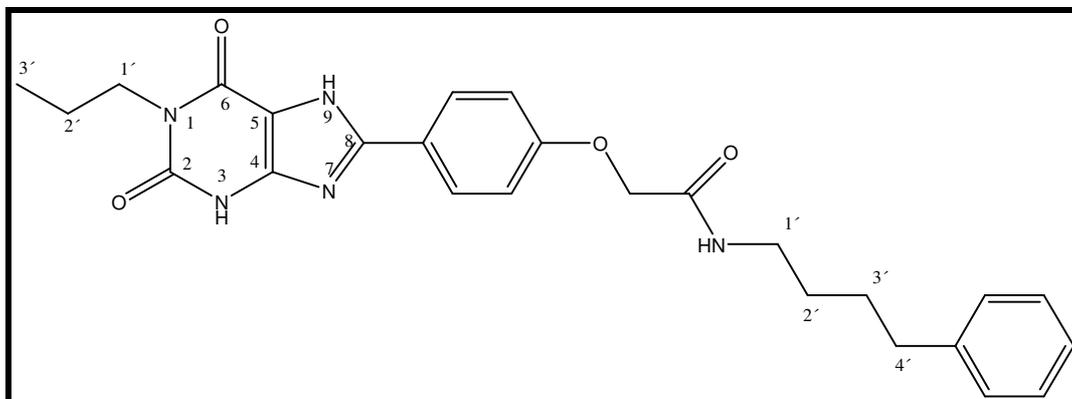
Berechete Masse: 461,20 für $\text{C}_{25}\text{H}_{27}\text{N}_5\text{O}_4$

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6 , 500 MHz): δ = 1.75 (m, 2H, 2'- CH_2 -), 2.-53 (t, 2H, 3''- CH_2 -), 3.15 (dt, 2H 1''- CH_2 -), 3.81 (t, 2H 1'- CH_2 -) 4.55 (s, 2H, - OCH_2 -CONHR), 7.06 und 8.02 (2d, 4H, $\text{C}_{\text{Phenoxy-H}}$), 7.14 bis 7.25 (m, 5H, $\text{C}_{\text{Phenyl-H}}$), 8.09 (t, 1H, - CH_2 -CONHR), 11.80 (s, 1H, 3-NH), 13.43 (s, 1H, 7-NH).

$^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- d_6 , 125 MHz): δ = 22.50 (s, 1C, 3'- CH_3), 28.48 und 29.93 (s, 2C, 2''- CH_2 - und 3''- CH_2 -), 30.95 (s, 1C, 2'- CH_2 -), 38.23 (s, 1C, 1'- CH_2 -), 67.55 (s, 1C, OCH_2 -CONHR), 107.37 (s, 1C, 5-C), 147.91 (s, 1C, 4-C), 151.13 (s, 1C, 2-C), 154.85 (s, 1C, 6-C), 167.08 (s, 1C, R-CONHR), 115.27, 122.2, 128.03, 159.4 (4s, $\text{C}_{\text{Phenoxy}}$), 125.82, 128.3-128.95, 142.2 (4s, 6C, C_{Phenyl}).

Darstellung von 1-Propyl-purin-2,6-dion-8-(phenoxyessigsäure-4-phenylbutylamid) (95)

Struktur



Substanzeigenschaften

Weißer Feststoff, gut löslich in Dimethylformamid und Dimethylsulfoxid,

Ansatz

1-Propyl-purin-2,6-dion-8-phenoxyessigsäure (90)	0.096 g (0.28 mmol)
Chlorameisensäureisobutylester	37 µl (0.28 mmol)
N-Methylmorpholin	34 µl (0.308 mmol)
Phenylbutylamin	44 µl (0.28 mmol)

Versuchsvorschrift

0.096 g (0.28 mmol) 1-Propyl-purin-2,6-dion-8-phenoxyessigsäure (**90**) werden in 5 ml Dimethylformamid suspendiert und mit 34 µl (0.308 mmol) N-Methylmorpholin versetzt. Es wird 5 min bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wird der Ansatz auf -22°C gekühlt und mit 37 µl (0.28 mmol) Chlorameisensäureisobutylester versetzt. Nach 15 min werden 44 µl (0.28 mmol) Phenylbutylamin hinzu gegeben und es wird weitere 3 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wird unter vermindertem Druck abdestilliert und die Substanz wird in 20 ml mobiler Phase gelöst. Die Suspension wird auf Kieselgel 60 aufgetragen und mit Dichlormethan: Methanol 40:1 eluiert.

Ausbeute: 0.090 g (68 %)

Analytische Daten

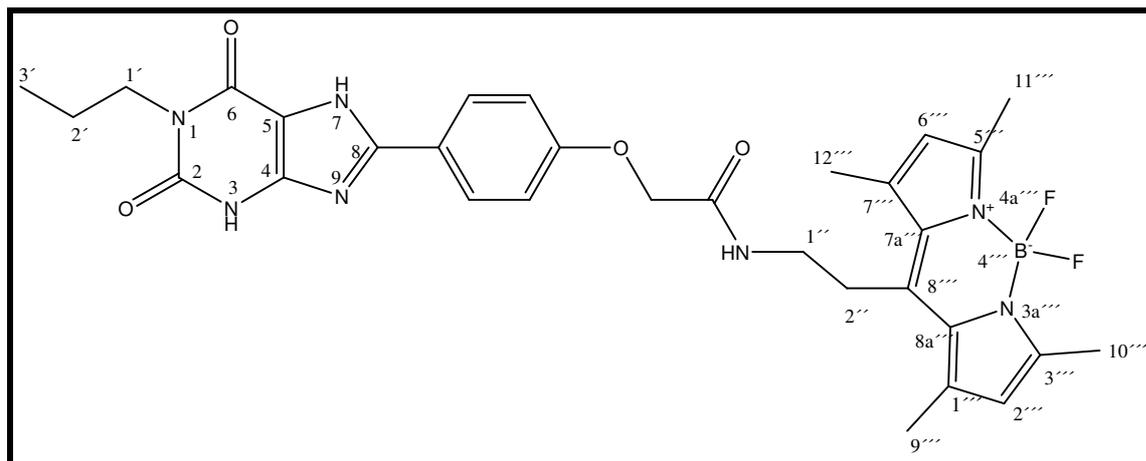
Schmp.: > 300 °C

Berechnete Masse: 475,22 für C₂₆H₂₉N₅O₄

¹H-NMR (DMSO-d₆, 500 MHz): δ = 2.54 (t, 2H, 4''CH₂), 3.17 (dt, 2H 1''-CH₂), 3.81 (t, 2H 1'-CH₂) 4.53 (s, 2H, -OCH₂-CONHR), 7.06 und 8.01 (2d, 4H; C_{Aromat}-H-Phenoxy), 7.12 bis 7.24 (m, 5H, C_{Aromat}-H-Phenyl), 8.07 (t, 1H, -CH₂-CONHR), 11.80 (s, 1H, 3-NH), 13.44 (s, 1H, 7-NH).

¹³C-NMR (DMSO-d₆, 125 MHz): δ = 18.71 (s, 1C, 3'-CH₃), 28.49 und 29.93 (s, 2C, 2''-CH₂ und 3''-CH₂), 34.9 (s, 1C, 2'-CH₂), 38.23 (s, 1C, 4''-CH₂), 41.48 (s, 1C, 1'-CH₂), 67.55 (s, 1C, OCH₂-CONHR), 107.37 (s, 1C, 5-C), 147.91 (s, 1C, 4-C), 150.21 (s, 1C, 8-C), 151.13 (s, 1C, 2-C), 154.85 (s, 1C, 6-C), 167.08 (s, 1C, R-CONHR), 115.25, 122.2, 128.4, 159.4 (4s, C_{Aromat}-Phenoxy), 125.72, 128.3, 131.85, 142.2 (4s, 6C, C_{Aromat}-Phenyl).

4-(1-Propyl-2,6-dioxo-2,3,6,7-tetrahydro-1H-purin-8-yl)-N-[2-(4,4,-difluoro-1,3,5,7-tetramethyl-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacen-8-yl)-ethyl]phenoxyessigsäureamid (105)

StrukturSubstanzeigenschaften

Oranger Feststoff, gut löslich in Dimethylformamid und Dimethylsulfoxid.

Ansatz

1-Propyl-purin-2,6-dion-7-phenoxyessigsäure (90)	0.096 mg (0.28 mmol)
2-(7-Aza-1H-benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium (HCTU)	0.115 g (0.28 mmol)
1-Hydroxybenzotriazol (HOBT)	0.037 g (0.28 mmol)
N-Methylmorpholin	34 μ l (0.308 mmol)
8-(2-Aminoethyl)-4,4-difluoro-1,3,5,7-tetramethyl-4-bora-3a,4a-s-indacen (29)	0.078 g (0.28 mmol)

Versuchsvorschrift

Unter Argonatmosphäre werden 0.096 g (0.28 mmol) 1-Propyl-purin-2,6-dion-8-phenoxyessigsäure (**90**), 0.115 g (0.28 mmol) HCTU und 0.37 g (0.28 mmol) HOBT in 5 ml Dimethylformamid suspendiert. Nach Zugabe von 34 μ l (0.308 mmol) N-Methylmorpholin wird eine Minute gerührt. Anschließend werden 0.078 g (0.28 mmol) 8-(2-Aminoethyl)-4,4-difluoro-1,3,5,7-tetramethyl-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacen (**29**), das in 2 ml Dimethylformamid gelöst wurde, hinzu gegeben. Es wird über 16 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wird unter vermindertem Druck vollständig entfernt. Die Substanz wird in 20 ml mobiler Phase gelöst, auf Kieselgel 60 aufgetragen und mit Dichlormethan: Methanol (40:1) eluiert.

Ausbeute: 0.065 g (40%)

Analytische Daten

Schmp.: 285 °C_{Zers}

Masse (berechnet): 618,48 g für C₃₁H₃₄BF₂N₇O₄

MS (ESI): 616.7 [m-H⁺], 596.3 [m-HF], 576.3 [m-2HF]

¹H-NMR (DMSO-d₆, 500 MHz): δ = 0.89 (t, 3H, 3'-CH₃), 1.58 (m, 2H, 2'-CH₂-, ³J = 7,44 Hz), 2.39 (s, 6H, C^{'''}9-CH₃ und C^{'''}12-CH₃), 3.19 (dt, 2H, 2''-CH₂-, ³J = 5,46 und 7,25 Hz), 3.33 (m, 2H, 1''-CH₂-, ³J = 5,46 Hz), 3.83 (m, 2H, 1'-CH₂-, ³J = 7,41 Hz), 4.59 (s, 2H, -OCH₂-CONHR), 6.23 (s, 2H, 2'''-CH- und 6'''-CH-), 7.08 (d, 2H, ArCH-Phenoxy), 8.04 (dd, 2H, ArCH-Phenoxy), 8.64 (s, 1H, Amid-NH), 11.8 (s, 1H, 3-NH), 13.43 (s, 1H, 7-NH).

^{13}C -NMR (DMSO- d_6 -125 MHz): δ = 11.3 (s, 1C, 3'-CH₃), 14.22 (s, 2C, 10'''-CH₃ und 11'''-CH₃), 16.16 (s, 2C, 9'''-CH₃ und 12'''-CH₃), 28.58 (s, 1C, 1''-CH₂-), 39.20 (s, 1C, 2''-CH₂-), 41.48 (s, 1C, 1'-CH₂-), 67.21 (s, 1C, -O-CH₂-), 107.37 (s, 1C, 5-C), 121.98 (s, 1C, 2'''-CH und 6'''-CH), 131.85 (s, 2C, 7a'''C und 8a'''C), 140.81 (s, 2C, 1'''C und 7'''C), 146.98 (s, 1C, 8'''C), 147.88 (s, 1C, 4-C), 150.19 (s, 1C, 8-C), 151.67 (s, 1C, 2-C), 153.10 (s, 2C, 5'''C und 3'''C), 154.77 (s, 1C, 6-C), 167.78 (s, 1C, R-CONHR), 115.33, 122.27, 128.09, 159.35 (4s, 6C, ArC-phenoxy).

Spektroskopische Daten

UV-Absorption (DMSO) λ_{max} : 497 nm

Fluoreszenzemission (DMSO) λ_{max} : 498 nm

Reinheit

Kapillarelektrophorese

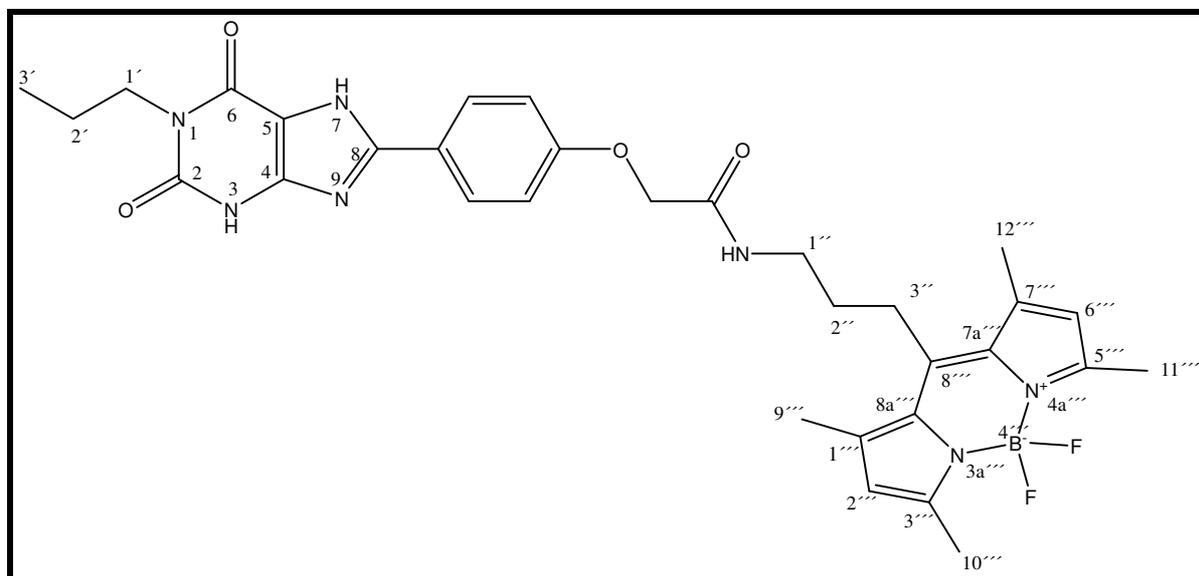
Puffer : Tris-HCl, 100 mM SDS, pH 9.2
Injektion : 5 s mit 5 psi
Stromstärke : 25 kV
Messzeit : 25 min
Kapillare : Fused-silica Kapillare, 40 cm (30 cm), 75 μm ID
Detektor : UV (260 nm)
Retentionszeit : 11.02 min
Reinheit : 100 %

Kapillarelektrophorese

Puffer : Tris-HCl, 100 mM SDS, pH 9.2
Injektion : 5 s mit 5 psi
Stromstärke : 25 kV
Messzeit : 25 min
Kapillare : Fused-silica Kapillare, 40 cm (30 cm), 75 μm ID
Detektor : UV (495 nm)
Retentionszeit : 11.02 min
Reinheit : 100 %

4-(1-Propyl-2,6-dioxo-2,3,6,7-tetrahydro-1H-purin-8-yl)-N-[3-(4,4,-difluoro-1,3,5,7-tetramethyl-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacen-8-yl)-propyl]phenoxyessigsäureamid (96)

Struktur



Substanzeigenschaften

Oranger Feststoff, gut löslich in Dimethylformamid, Dimethylsulfoxid

Ansatz

1-Propyl-purin-2,6-dion-8-phenoxyessigsäure (90)	69 mg (0.20 mmol)
Chlorameisensäureisobutylester	26 µl (0.20 mmol)
N-Methylmorpholin	24 µl (0.22 mmol)
8-(3-Aminopropyl)-4,4-difluoro-1,3,5,7-tetramethyl-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacen (30)	60 mg (0.2 mmol)

Versuchsvorschrift

69 mg (0.2 mmol) 1-Propyl-purin-2,6-dion-8-phenoxyessigsäure (**90**) werden in 5 ml Dimethylformamid suspendiert und mit 26 µl (0.22 mmol) N-Methylmorpholin versetzt. Es wird 5 min bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wird der Ansatz auf -22°C gekühlt und mit 26 µl (0.2 mmol) Chlorameisensäureisobutylester versetzt. Nach 15 min werden 60 mg (0.20 mmol) 8-(3-Aminobutyl)-4,4-difluoro-1,3,5,7-tetramethyl-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacen (**30**) hinzu gegeben und weitere 3 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wird unter vermindertem Druck

abdestilliert und die Substanz wird in etwas mobiler Phase gelöst. Die Suspension wird auf Kieselgel 60 aufgetragen und mit Dichlormethan: Methanol (40:1) eluiert.

Ausbeute: 0.029 g (22 %)

Analytische Daten

Schmp.: 270 °C_{Zers}

Berechnete Masse: 631.28 für C₃₂H₃₆BF₂N₇O₄

MS (ESI): 630.3 [m - H]⁻, 620 [m - F]⁻

¹H-NMR (DMSO-d₆, 500 MHz): δ = 1.54-1.59(m, 4H, 2'CH₂ und 2''CH₂), 2.40 (s, 12H, 10-CH₃ und 9-CH₃, 12-CH₃ und 11-CH₃), 2.94 (m, 2H, 3''CH₂), 3.32 (dt, 2H, 1''CH₂), 3.80 (t, 2H, 1'CH₂), 4.56 (s, 2H, -OCH₂-CONHR), 7.07 und 8.05 (2d, 4H, ArCH-Phenoxy), 8.32 (t, 1H, Amid-NH), 11.80 (s, 1H, 3-NH), 13.44 (s, 1H, 7-NH).

¹³C-NMR (DMSO-d₆, 125 MHz): δ = 11.3 (s, 1C, 3'-CH₃), 13.9 (t, 2C, 10''-CH₃ und 11''-CH₃), 15.95 (s, 2C, 9'''-CH₃ und 12'''-CH₃), 22.5 (s, 1C, 2''-CH₂-), 28.5 (s, 1C, 3''-CH₂-), 29.9 (s, 1C, 2'-CH₂-), 38.2 (s, 1C, 1''-CH₂-), 41.5 (s, 1C, 1'-CH₂-), 67.5 (s, 1C, -OCH₂-CONHR), 107.37 (s, 1C, 5-C), 121.85 (s, 2C, 2'''-CH₂- und 6'''-CH₂-), 130.8 und 129.25 (2s, 2C, 7a'''-C und 8a'''-C), 140.9 (s, 2C, 1'''-C und 7'''-C), 146.8 (s, 1C, 8'''-C), 147.9 (s, 1C, 4-C), 150.2 (s, 1C, 8-C), 151.1 (s, 1C, 2-C), 153.3 (s, 2C, 3'''-C und 5'''-C), 154.83 (s, 1C, 6-C), 167.65 (s, 1C, R-CONHR), 115.3, 122.2, 128.0, 128.7, 159.3 (5s, 6C, ArC-Phenoxy).

Spektroskopische Daten

UV-Absorption (DMSO) λ_{max}: 497 nm

Fluoreszenzemission (DMSO) λ_{max}: 598 nm

Reinheit

Kapillarelektrophorese

Puffer : Tris-HCl, 100 mM SDS, pH 9.2

Injektion : 5 s mit 5 psi

Stromstärke : 25 kV

Messzeit : 25 min

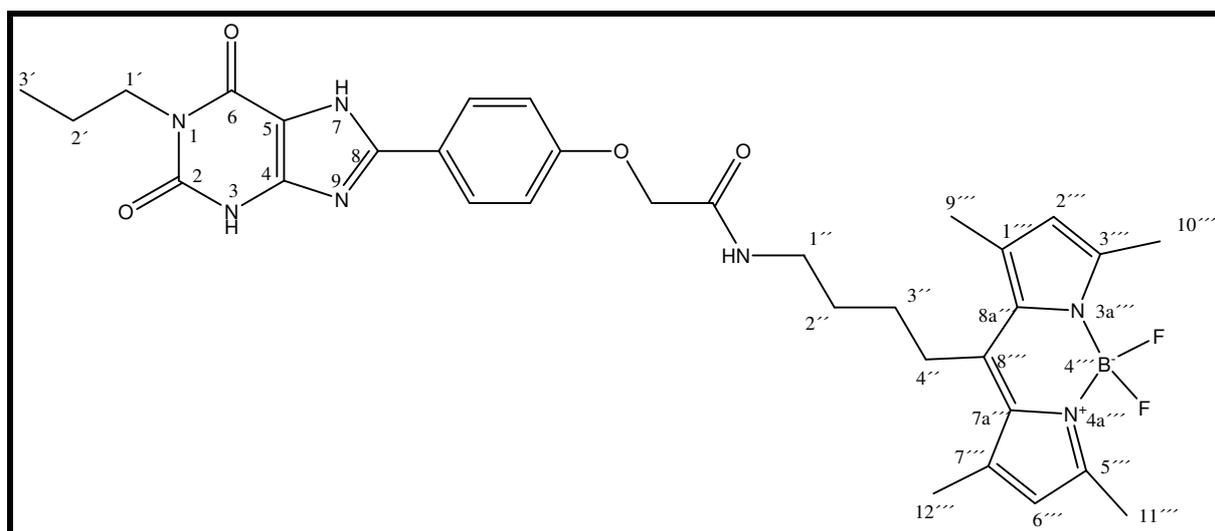
Kapillare : Fused-silica Kapillare, 40 cm (30 cm), 75 μ m ID
 Detektor : UV (260 nm)
 Retentionszeit : 15.49 min
 Reinheit : 100 %

Kapillarelektrophorese

Puffer : Tris-HCl, 100 mM SDS, pH 9.2
 Injektion : 5 s mit 5 psi
 Stromstärke : 25 kV
 Messzeit : 25 min
 Kapillare : Fused-silica Kapillare, 40 cm (30 cm), 75 μ m ID
 Detektor : UV (495 nm)
 Retentionszeit : 15.49 min
 Reinheit : 100 %

4-(1-Propyl-2,6-dioxo-2,3,6,7-tetrahydro-1H-purin-8-yl)-N-[4-(4,4,-difluoro-1,3,5,7-tetramethyl-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacen-8-yl)-butyl]phenoxyessigsäureamid (97)

Struktur



Substanzeigenschaften

Oranger Feststoff, gut löslich in Dimethylformamid und Dimethylsulfoxid.

Ansatz

1-Propyl-purin-2,6-dion-8-phenoxyessigsäure (90)	62 mg (0.18mmol)
Chlorameisensäureisobutylester	24 μ l (0.18mmol)
N-Methylmorpholin	22 μ l (0.198mmol)
8-(4-Aminobutyl)-4,4-difluoro-1,3,5,7-tetramethyl-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacen (31)	60 mg (0.18mmol)

Versuchsvorschrift

62 mg (0.18 mmol) 1-Propyl-purin-2,6-dion-8-phenoxyessigsäure (**90**) werden in 5 ml Dimethylformamid suspendiert und mit 22 μ l (0.198 mmol) N-Methylmorpholin versetzt. Es wird 5 min bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wird der Ansatz auf -22°C gekühlt und mit 24 μ l (0.18 mmol) Chlorameisensäureisobutylester versetzt. Nach 15 min werden 60 mg (0.18 mmol) 8-(3-Aminobutyl)-4,4-difluoro-1,3,5,7-tetramethyl-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacen (**31**) hinzu gegeben und weitere 3h bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wird unter vermindertem Druck abdestilliert und die Substanz wird in 20 ml mobiler Phase gelöst. Die Suspension wird auf Kieselgel 60 aufgetragen und mit Dichlormethan: Methanol (40:1) eluiert.

Ausbeute: 0.02 g (17 %)

Analytische Daten

Schmp.: $260^{\circ}\text{C}_{\text{Zers}}$

Berechnete Masse: 645.5 für $\text{C}_{33}\text{H}_{38}\text{BF}_2\text{N}_7\text{O}_4$

MS (ESI): 644.7 [m - H]⁺

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6 , 500 MHz): $\delta = 0.88$ (t, 3H, 3'-CH₃), 1.56-1.62 (m, 6H, 2''-CH₂-, 3''-CH₂-, 2'-CH₂-), 2.37 (s, 12H, 9'''-CH₃, 10'''-CH₃, 11'''-CH₃ und 12'''-CH₃), 2.91 (m, 2H, 1''-CH₂-), 3.19 (m, 2H, 4''-CH₂-), 3.81 (m, 2H, 1'-CH₂-), 4.53 (s, 2H, -OCH₂-CONHR), 6.18 (s, 2H, 2''-CH und 6''-CH), 7.04 und 8.01 (2d, 4H, ArCH-Phenoxy), 8.11 (t, 1H, Amid-NH), 11.81 (s, 1H, 3-NH), 13.44 (s, 1H, 7-NH).

$^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- d_6 , 125 MHz): $\delta = 11.3$ (s, 1C, 3'-CH₃), 14.1 (t, 2C, 10''-CH₃ und 11''-CH₃), 15.9 (s, 2C, 9''-CH₃ und 12'''-CH₃), 27.0 (s, 1C, 3''-CH₂-), 27.8 (s, 1C, 2''-CH₂-), 29.9 (s, 1C, 4''-CH₂-), 31.2 (s, 1C, 2'-CH₂-), 38.2 (s, 1C, 1''-CH₂-), 41.4 (s,

1C, 1'-CH₂-), 67.5 (s, 1C, -OCH₂-CONHR), 107.36 (s, 1C, 5-C), 121.7 (s, 2C, 2'''-CH₂- und 6'''-CH₂-), 130.8 (s, 2C, 7a'''-C und 8a'''-C), 140.8 (s, 2C, 1'''-C und 7'''-C), 146.8 (s, 1C, 8'''-C), 147.9 (s, 1C, 4-C), 150.2 (s, 1C, 8-C), 151.1 (s, 1C, 2-C), 153.1 (s, 2C, 3'''-C und 5'''-C), 154.82 (s, 1C, 6-C), 167.32 (s, 1C, R-CONHR), 115.2, 122.2, 128.0, 128.7, 159.3 (5s, 6C, ArC-Phenoxy).

Spektroskopische Daten

UV-Absorption (DMSO) λ_{\max} : 497 nm

Fluoreszenzemission (DMSO) λ_{\max} : 498 nm

Reinheit

Kapillarelektrophorese

Puffer : Tris-HCl, 100 mM SDS, pH 9.2

Injektion : 5 s mit 5 psi

Stromstärke : 25 kV

Messzeit : 25 min

Kapillare : Fused-silica Kapillare, 40 cm (30 cm), 75 μ m ID

Detektor : UV (260 nm)

Retentionszeit : 13.51 min

Reinheit : 100 %

Kapillarelektrophorese

Puffer : Tris-HCl, 100 mM SDS, pH 9.2

Injektion : 5 s mit 5 psi

Stromstärke : 25 kV

Messzeit : 25 min

Kapillare : Fused-silica Kapillare, 40 cm (30 cm), 75 μ m ID

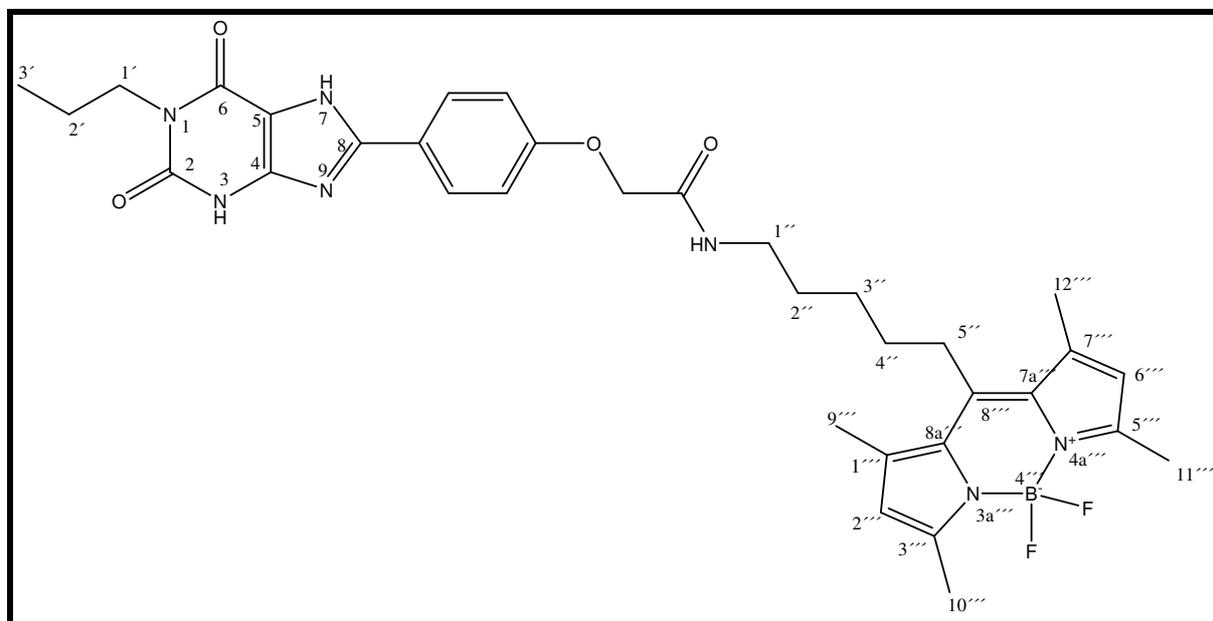
Detektor : UV (495 nm)

Retentionszeit : 13.51 min

Reinheit : 100 %

4-(1-Propyl-2,6-dioxo-2,3,6,7-tetrahydro-1H-purin-8-yl)-N-[5-(4,4,-difluoro-1,3,5,7-tetramethyl-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacen-8-yl)-pentyl]phenoxyessigsäureamid (98)

Struktur



Substanzeigenschaften

Oranger Feststoff, gut löslich in Dimethylformamid und Dimethylsulfoxid.

Ansatz

1-Propyl-purin-2,6-dion-8-phenoxyessigsäure (90)	96.4 mg (0.28 mmol)
2-(7-Aza-1H-benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyl-uronium (HCTU)	115.8 mg (0.28 mmol)
1-Hydroxybenzotriazol (HOBT)	37.8 mg (0.28 mmol)
N-Methylmorpholin	34 µl (0.308 mmol)
8-(5-Aminopentyl)-4,4-difluoro-1,3,5,7-tetramethyl-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacen (32)	93.6 mg (0.28 mmol)

Versuchsvorschrift

Unter Argonatmosphäre werden die 96.4 mg (0.28 mmol) 1-Propyl-purin-2,6-dion-8-phenoxyessigsäure (**90**), 115.8 mg (0.28 mmol) HCTU und 37.8 mg (0.28 mmol) HOBT in 5 ml Dimethylformamid suspendiert. Nach Zugabe von 34 µl (0.308 mmol) N-Methylmorpholin wird eine weitere Minute gerührt. Anschließend werden 93.6 mg (0.28 mmol) 8-(5-Aminpenthyl)-4,4-dufluoro-1,3,5,7-tetramethyl-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacen (**32**), das in 2 ml Dimethylformamid gelöst wurde, hinzu gegeben. Die

Lösung wird über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wird unter vermindertem Druck vollständig entfernt. Der Rückstand wird in 20 ml mobiler Phase gelöst, auf Kieselgel 60 aufgetragen und mit Dichlormethan: Methanol (40:1) eluiert.

Ausbeute: 55 mg (30%)

Analytische Daten

Schmp.: 265 °C_{Zers}

Berechnete Masse: 659.53 für C₃₄H₄₀BF₂N₇O₄

MS (ESI): 658.3 [m- H]⁻

¹H-NMR (DMSO-d₆, 500 MHz): δ = 0.88 (t, 3H, 3'-CH₃), 1.42 (sex, 2H, 2'-CH₂-), 1.45-1.58 (m, 6H, 2''-CH₂-, 3''-CH₂-, 4''-CH₂-), 2.37 (s, 12H, 9'''-CH₃, 10'''-CH₃, 11'''-CH₃ und 12'''-CH₃), 2.91 (m, 2H, 5''-CH₂-), 3.17 (dt, 2H, 1''-CH₂-), 3.80 (t, 2H, 1'-CH₂-), 4.54 (s, 2H, -OCH₂-CONHR), 6.19 (s, 2H, 2''-CH und 6''-CH), 7.06 und 8.03 (2d, 4H, ArCH-Phenoxy), 8.07 (t, 1H, Amid-NH), 11.79 (s, 1H, 3-NH), 13.43 (s, 1H, 7-NH).

¹³C-NMR (DMSO-d₆, 125 MHz): δ = 11.3 (s, 1C, 3'-CH₃), 14.1 (t, 2C, 10''-CH₃ und 11''-CH₃), 15.9 (s, 2C, 9'''-CH₃ und 12'''-CH₃), 23.4 (s, 1C, 3''-CH₂-), 27.6 (s, 1C, 2''-CH₂-), 28.4 (s, 1C, 4''-CH₂-), 29.9.1 (s, 1C, 5''-CH₂-), 31.2 (s, 1C, 2'-CH₂-), 38.2 (s, 1C, 1''-CH₂-), 41.4 (s, 1C, 1'-CH₂-), 67.8 (s, 1C, -OCH₂-CONHR), 107.36 (s, 1C, 5-C), 121.7 (s, 2C, 2'''-CH₂- und 6'''-CH₂-), 130.8 (s, 2C, 7a'''-C und 8a'''-C), 140.8 (s, 2C, 1'''-C und 7'''-C), 146.8 (s, 1C, 8'''-C), 147.9 (s, 1C, 4-C), 150.22 (s, 1C, 8-C), 151.13 (s, 1C, 2-C), 153.18 (s, 2C, 3'''-C und 5'''-C), 154.84 (s, 1C, 6-C), 167.39 (s, 1C, R-CONHR), 115.2, 122.2, 128.0, 128.7, 159.4 (5s, 6C, ArC-Phenoxy).

Spektroskopische Daten

UV-Absorption (DMSO): λ_{max}: 497 nm

Fluoreszenzemission (DMSO) λ_{max}: 598 nm

Reinheit

Kapillarelektrophorese

Puffer : Tris-HCl, 100 mM SDS, pH 9.2

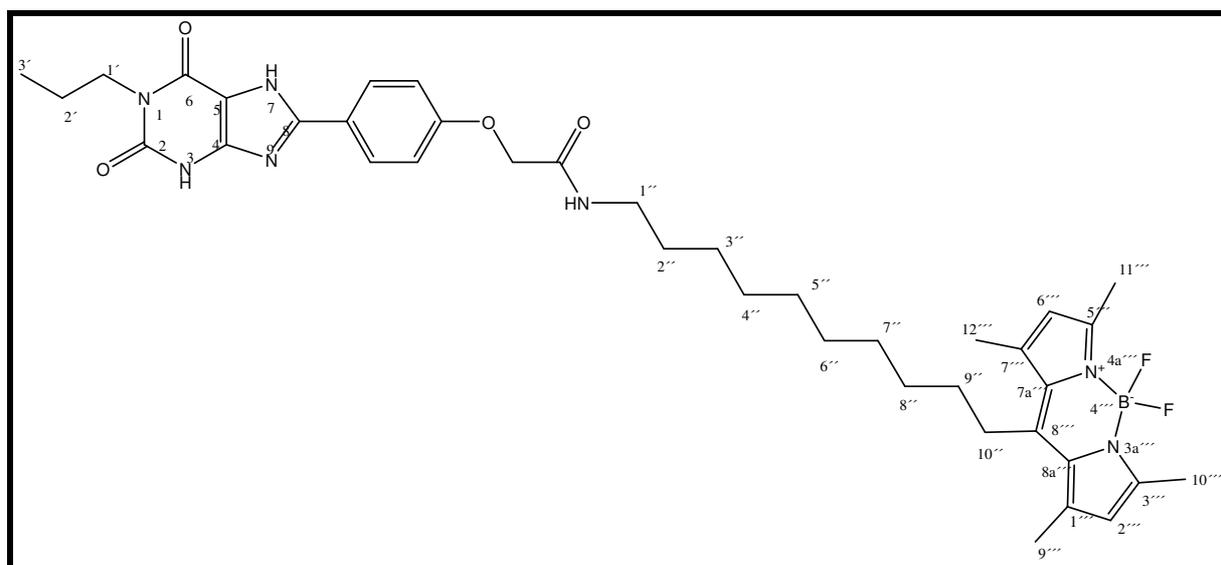
Injektion	: 5 s mit 5 psi
Stromstärke	: 25 kV
Messzeit	: 25 min
Kapillare	: Fused-silica Kapillare, 40 cm (30 cm), 75 µm ID
Detektor	: UV (260 nm)
Retentionszeit	: 13.63 min
Reinheit	: 100 %

Kapillarelektrophorese

Puffer	: Tris-HCl, 100 mM SDS, pH 9.2
Injektion	: 5 s mit 5 psi
Stromstärke	: 25 kV
Messzeit	: 25 min
Kapillare	: Fused-silica Kapillare, 40 cm (30 cm), 75 µm ID
Detektor	: UV (495 nm)
Retentionszeit	: 13.63 min
Reinheit	: 100 %

4-(1-Propyl-2,6-dioxo-2,3,6,7-tetrahydro-1H-purin-8-yl)-N-[10-(4,4,-difluoro-1,3,5,7-tetramethyl-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacen-8-yl)-decyl]phenoxyessigsäureamid (99)

Struktur



Substanzeigenschaften

Oranger Feststoff, gut löslich in Dimethylformamid und Dimethylsulfoxid.

Ansatz

1-Propyl-purin-2,6-dion-8-phenoxyessigsäure (90)	0.096 g (0.28 mmol)
Chlorameisensäureisobutylester	37 μ l (0.18mmol)
N-Methylmorpholin	34 μ l (0.198mmol)
8-(10-Aminodecyl)-4,4-difluoro-1,3,5,7-tetramethyl-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacen (33)	113 mg (0.18mmol)

Versuchsvorschrift

0.096 g (0.28 mmol) 1-Propyl-purin-2,6-dion-8-phenoxyessigsäure (**90**) werden in 5 ml Dimethylformamid suspendiert und mit 34 μ l (0.22 mmol) N-Methylmorpholin versetzt. Es wird 5 min bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wird der Ansatz auf -22°C gekühlt und mit 37 μ l (0.2 mmol) Chlorameisensäureisobutylester versetzt. Nach 15 min werden 0.113 g (0.20 mmol) 8-(10-Aminodecyl)-4,4-difluoro-1,3,5,7-tetramethyl-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacen (**33**) hinzu gegeben und weitere 3 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wird unter vermindertem Druck abdestilliert und die Substanz wird in 20 ml mobiler Phase gelöst. Die Suspension wird auf Kieselgel 60 aufgetragen und mit Dichlormethan: Methanol (40:1) eluiert.

Ausbeute: 0.023 g (11 %)

Analytische Daten

Schmp.: $262^{\circ}\text{C}_{\text{Zers}}$

Berechnete Masse: 729.3 für $\text{C}_{39}\text{H}_{50}\text{BF}_2\text{N}_7\text{O}_4$

MS (ESI): 728.7 $[\text{m} - \text{H}]^-$, 708.8 $[\text{m} - \text{HF}]^-$

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6 , 500 MHz): $\delta = 0.91$ (t, 3H, 3'-CH₃), 1.19-1.56 (m, 18H, 2'-CH₂-, 2''-CH₂- bis 9''-CH₂-), 2.37 (s, 12H, 10'''-CH₃ und 9'''-CH₃, 12'''-CH₃ und 11'''-CH₃), 2.91 (m, 2H, 10''-CH₂-), 3.20 (t, 2H, 1''-CH₂-), 3.78 (t, 2H, 1'-CH₂-), 4.53 (s, 2H, -OCH₂-CONHR), 6.19 (s, 2H, 2'''CH und 6'''CH), 7.05 (dd, 2H, ArCH-Phenoxy), 8.03 (m, 3H, ArCH-Phenoxy, Amid-NH), 11.79 (s, 1H, 3-NH), 13.43 (s, 1H, 7-NH).

$^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- d_6 , 125 MHz): $\delta = 13.8$ (s, 1C, 4'-CH₃), 14.2 (s, 2C, 10'''CH₃ und 11'''CH₃), 15.9 (s, 2C, 9'''CH₃ und 12'''CH₃), 19.7 (s, 1C, 3'-CH₂-), 21.0 (s, 1C,

2'-CH₂-), 26.4 (s, 1C, 2''-CH₂-), 27.8 (s, 1C, 3''-CH₂-), 28.7 (s, 1C, 4''-CH₂-), 28.9 (s, 1C, 5''-CH₂-), 29.0 (s, 1C, 6''-CH₂-), 29.1 (s, 1C, 7''-CH₂-), 29.7 (s, 1C, 8''-CH₂-), 31.5 (s, 1C, 10''-CH₂-), 38.5 (s, 1C, 1''-CH₂-), 41.4 (s, 1C, 1'-CH₂-) 67.2 (s, 1C, -O-CH₂-), 107.38 (s, 1C, 5-C), 121.8 (s, 2C, 2'''-CH- und 6'''-CH), 130.8 (s, 2C, 7a'''C und 8a'''C), 140.92 (s, 2C, 1'''-C und 7'''C), 146.3 (s, 1C, 8'''C), 147.8 (s, 1C, 4-C), 150.1 (s, 1C, 8-C), 151.1 (s, 1C, 2-C), 153.3 (s, 2C, 5'''C und 3'''C), 154.8 (s, 1C, 6-C), 167.6 (s, 1C, R-CONHR-), 115.3, 122.2, 128.1, 159.3 (4s, 6C, ArC-Phenoxy-).

Spektroskopische Daten

UV-Absorption (DMSO) λ_{\max} : 497 nm

Fluoreszenzemission (DMSO) λ_{\max} : 598 nm

Reinheit

Kapillarelektrophorese

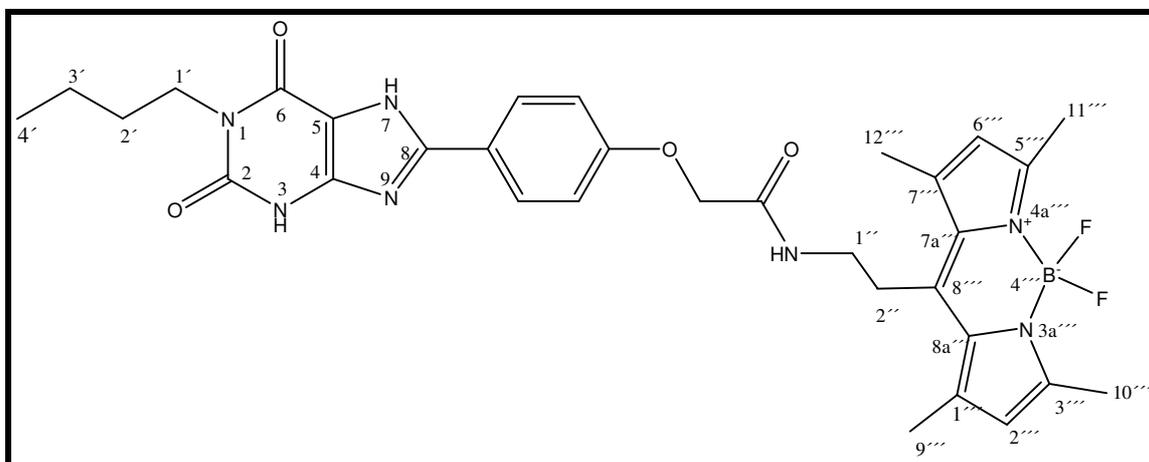
Puffer : Tris-HCl, 100 mM SDS, pH 9.2
Injektion : 5 s mit 5 psi
Stromstärke : 25 kV
Messzeit : 25 min
Kapillare : Fused-silica Kapillare, 40 cm (30 cm), 75 μ m ID
Detektor : UV (260 nm)
Retentionszeit : 10.10 min
Reinheit : 100 %

Kapillarelektrophorese

Puffer : Tris-HCl, 100 mM SDS, pH 9.2
Injektion : 5 s mit 5 psi
Stromstärke : 25 kV
Messzeit : 25 min
Kapillare : Fused-silica Kapillare, 40 cm (30 cm), 75 μ m ID
Detektor : UV (495 nm)
Retentionszeit : 10.10 min
Reinheit : 100 %

4-(1-Butyl-2,6-dioxo-2,3,6,7-tetrahydro-1H-purin-8-yl)-N-[2-(4,4-difluoro-1,3,5,7-tetramethyl-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacen-8-yl)-ethyl]phenoxyessigsäureamid (106)

Struktur



Substanzeigenschaften

Oranger Feststoff, gut löslich in Dimethylformamid und Dimethylsulfoxid.

Ansatz

1-Butyl-purin-2,6-dion-8-phenoxyessigsäure (91)	0.082 mg (0.22 mmol)
2-(7-Aza-1H-benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyl-uronium (HCTU)	0.095 g (0.23 mmol)
1-Hydroxybenzotriazol (HOBT)	0.031 g (0.23 mmol)
N-Methylmorpholin	28 µl (0.253 mmol)
8-(2-Aminoethyl)-4,4-difluoro-1,3,5,7-tetramethyl-4-bora-3a,4a-s-indacen (29)	0.064 g (0.23 mmol)

Versuchsvorschrift

Unter Argonatmosphäre werden 0.082 g (0.22 mmol) 1-Butyl-purin-2,6-dion-7-phenoxyessigsäure (**91**), 0.095 g (0.23 mmol) HCTU und 0.31 g (0.23 mmol) HOBT in 5 ml Dimethylformamid suspendiert. Nach Zugabe von 28 µl (0.253 mmol) N-Methylmorpholin wird eine Minute gerührt. Anschließend werden 0.064 g (0,23 mmol) 8-(2-Aminoethyl)-4,4-difluoro-1,3,5,7-tetramethyl-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacen (**29**), das in 2 ml Dimethylformamid gelöst wurde, hinzu gegeben. Es wird über 16 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wird unter vermindertem

Druck vollständig entfernt. Die Substanz wird in 20 ml mobiler Phase gelöst, auf Kieselgel 60 aufgetragen und mit Dichlormethan: Methanol (40:1) eluiert.

Ausbeute: 0.016 g (11 %)

Analytische Daten

Schmp.: 288 °C_{Zers}

Berechnete Masse: 631.2 für C₃₂H₃₆BF₂N₇O₄

MS (ESI): 630.5 [m-H]⁻, 610.1 [m-HF]⁻, 590.3 [m-2HF]⁻

¹H-NMR (DMSO-d₆, 500 MHz): δ = 0.89 (t, 3H, 4'-CH₃), 1.30 (m, 2H, 3'-CH₂-, ³J = 7,46 Hz), 1.52 (m, 2H, 2'-CH₂-, ³J = 7,42 Hz), 2.39 (s, 6H, C^{'''}9-CH₃ und C^{'''}12-CH₃), 3.21 (dt, 2H, 2''-CH₂-, ³J = 5,46 und 7,25 Hz), 3.33 (m, 2H, 1''-CH₂-, ³J = 5,46 Hz), 3.84 (t, 2H, 1'-CH₂-, ³J = 7,41 Hz), 4.59 (s, 2H, -OCH₂-CONHR), 6.23 (s, 2H, 2'''-CH- und 6'''-CH-), 7.08 (d, 2H, ArCH-Phenoxy), 8.04 (dd, 2H, ArCH-Phenoxy), 8.64, 1H, Amid-NH), 11.8 (s, 1H, 3-NH), 13.43 (s, 1H, 7-NH).

¹³C-NMR (DMSO-d₆, 125 MHz): δ = 13.86 (s, 1C, 4'-CH₃), 14.22 (s, 2C, 10'''-CH₃ und 11'''-CH₃), 16.16 (s, 2C, 9'''-CH₃ und 12'''-CH₃), 19.76 (s, 1C, 3'-CH₂-), 28.58 (s, 1C, 2'-CH₂-), 29.91 (s, 1C, 2''-CH₂-), 38.37 (s, 1C, 1''-CH₂-), 40.29 (s, 1C, 1'-CH₂-), 67.21 (s, 1C, -O-CH₂-), 107.37 (s, 1C, 5-C), 121.99 (s, 1C, 2'''-CH und 6'''-CH), 131.16 (s, 2C, 7a'''C und 8a'''C), 141.60 (s, 2C, 1'''C und 7'''C), 142.41 (s, 1C, 8'''C), 147.88 (s, 1C, 4-C), 150.18 (s, 1C, 8-C), 151.10 (s, 1C, 2-C), 153.65 (s, 2C, 5'''C und 3'''C), 154.80 (s, 1C, 6-C), 167.78 (s, 1C, R-CONHR), 115.33, 122.27, 128.09, 159.35 (4s, 6C, ArC-phenoxy).

Spektroskopische Daten

UV-Absorption (DMSO) λ_{max}: 497 nm

Fluoreszenzemission (DMSO) λ_{max}: 498 nm

Reinheit

Kapillarelektrophorese

Puffer : Tris-HCl, 100 mM SDS, pH 9.2

Injektion : 5 s mit 5 psi

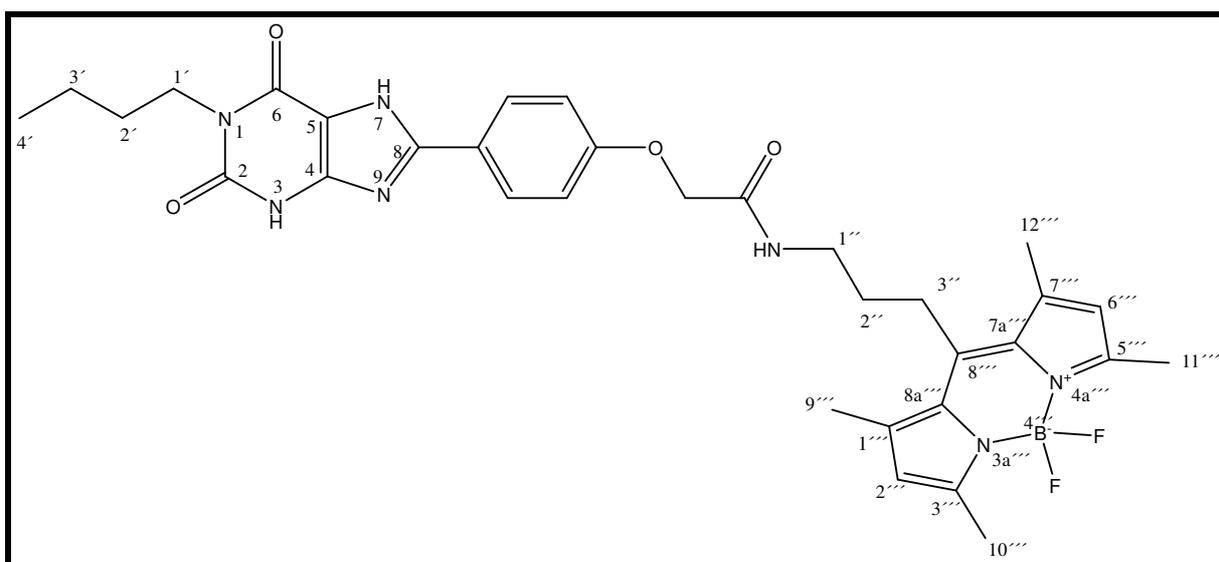
Stromstärke : 25 kV
Messzeit : 25 min
Kapillare : Fused-silica Kapillare, 40 cm (30 cm), 75 µm ID
Detektor : UV (260 nm)
Retentionszeit : 11.15 min
Reinheit : 100 %

Kapillarelektrophorese

Puffer : Tris-HCl, 100 mM SDS, pH 9.2
Injektion : 5 s mit 5 psi
Stromstärke : 25 kV
Messzeit : 25 min
Kapillare : Fused-silica Kapillare, 40 cm (30 cm), 75 µm ID
Detektor : UV (495 nm)
Retentionszeit : 11.15 min
Reinheit : 100 %

4-(1-Butyl-2,6-dioxo-2,3,6,7-tetrahydro-1H-purin-8-yl)-N-[3-(4,4,-difluoro-1,3,5,7-tetramethyl-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacen-8-yl)-propyl]phenoxyessigsäureamid (100)

Struktur



Substanzeigenschaften

Oranger Feststoff, gut löslich in Dimethylformamid und Dimethylsulfoxid.

Ansatz

1-Butyl-purin-2,6-dion-8-phenoxyessigsäure (91)	0.101 g (0.28 mmol)
Chlorameisensäureisobutylester	38 µl (0.28 mmol)
N-Methylmorpholin	34 µl (0.308 mmol)
8-(3-Aminopropyl)-4,4-difluoro-1,3,5,7-tetramethyl-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacen (30)	0.086 g (0.28 mmol)

Versuchsvorschrift

0.101 g (0.28 mmol) 1-Butyl-purin-2,6-dion-8-phenoxyessigsäure (**91**) wird in 5 ml Dimethylformamid suspendiert und mit 34 µl (0.308 mmol) N-Methylmorpholin versetzt. Es wird 5 min bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wird der Ansatz auf -22°C gekühlt und mit 38 µl (0.28 mmol) Chlorameisensäureisobutylester versetzt. Nach 15 min werden 0.086 g (0.28 mmol) 8-(3-Aminopropyl)-4,4-difluoro-1,3,5,7-tetramethyl-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacen (**30**) hinzu gegeben und weitere 3 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wird unter vermindertem Druck abdestilliert und die Substanz wird in 20 ml mobiler Phase gelöst. Die Suspension wird auf Kieselgel 60 aufgetragen und mit Dichlormethan: Methanol (40:1) eluiert.

Ausbeute: 0.054 g (30 %)

Analytische Daten

Schmp.: $289^{\circ}\text{C}_{\text{Zers}}$

Berechnete Masse: 645.28 für $\text{C}_{33}\text{H}_{38}\text{BF}_2\text{N}_7\text{O}_4$

MS (ESI): 644.3 [m - H]⁺, 624.7 [m - HF]⁺

¹H-NMR (DMSO-d₆, 500 MHz): $\delta = 0.91$ (t, 3H, 4'-CH₃), 1.20 (m, 2H, 3'-CH₂-), 1.25-1.74 (m, 4H, 2'-CH₂-, 2''-CH₂-), 2.40 (s, 12H, 10'''-CH₃ und 9'''-CH₃, 12'''-CH₃ und 11'''-CH₃), 2.94 (m, 2H, 3''-CH₂-), 3.32 (dt, 2H, 1''-CH₂-), 3.84 (t, 2H, 1'-CH₂-), 4.56 (s, 2H, -OCH₂-CONHR), 6.18 (s, 2H, 2'''CH und 6'''CH), 7.07 und 8.04 (2d, 4H, ArCH-Phenoxy), 8.32 (t, 1H, Amid-NH), 11.80 (s, 1H, 3-NH), 13.44 (s, 1H, 7-NH).

¹³C-NMR (DMSO-d₆, 125 MHz): $\delta = 11.2$ (s, 1C, 4'-CH₃), 14.2 (s, 2C, 10'''CH₃ und 11'''CH₃), 15.9 (s, 2C, 9'''CH₃ und 12'''CH₃), 19.7 (s, 1C, 3'-CH₂-), 25.6 (s, 1C, 2''-CH₂-), 29.7 (s, 1C, 3''-CH₂-), 31.5 (s, 1C, 2'-CH₂-), 38.2 (s, 1C, 1''-CH₂-), 67.2 (s, 1C, -O-CH₂-), 107.38 (s, 1C, 5-C), 121.8 (s, 2C, 2'''-CH- und 6'''-CH), 130.8 (s, 2C,

7a''''C und 8a''''C), 140.92 (s, 2C, 1''''-C und 7''''C), 146.3 (s, 1C, 8''''C), 147.8 (s, 1C, 4-C), 150.1 (s, 1C, 8-C), 151.1 (s, 1C, 2-C), 153.3 (s, 2C, 5''''C und 3''''C), 154.8 (s, 1C, 6-C), 167.6 (s, 1C, R-CONHR-), 115.3, 122.2, 128.1, 159.3 (4s, 6C,ArC-Phenoxy-).

Spektroskopische Daten

UV-Absorption (DMSO) λ_{\max} : 497 nm

Fluoreszenzemission (DMSO) λ_{\max} : 498 nm

Reinheit

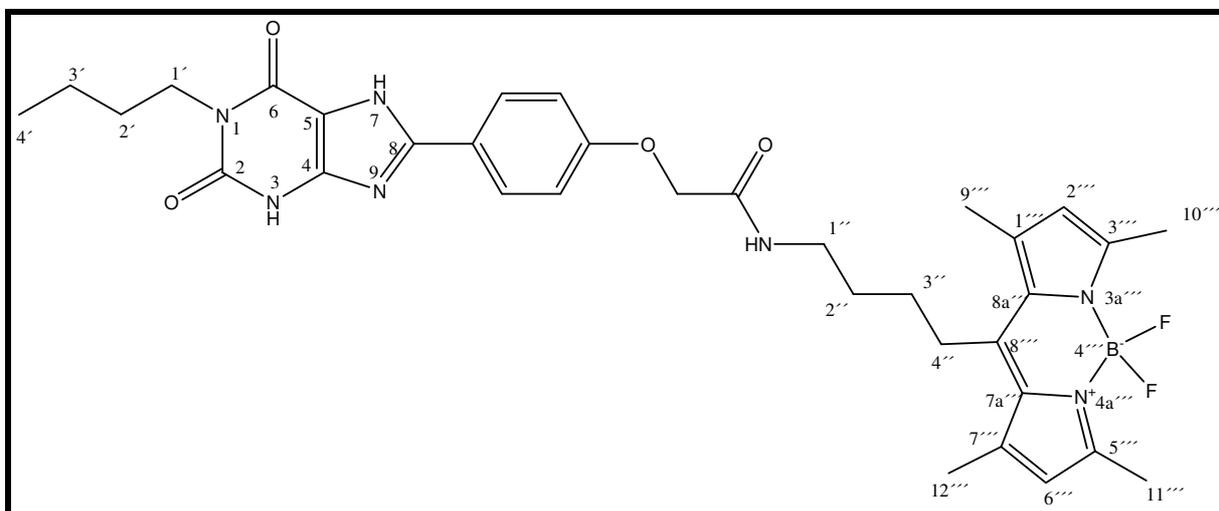
Kapillarelektrophorese

Puffer : Tris-HCl, 100 mM SDS, pH 9.2
Injektion : 5 s mit 5 psi
Stromstärke : 25 kV
Messzeit : 25 min
Kapillare : Fused-silica Kapillare, 40 cm (30 cm), 75 μ m ID
Detektor : UV (260 nm)
Retentionszeit : 12.07 min
Reinheit : 100 %

Kapillarelektrophorese

Puffer : Tris-HCl, 100 mM SDS, pH 9.2
Injektion : 5 s mit 5 psi
Stromstärke : 25 kV
Messzeit : 25 min
Kapillare : Fused-silica Kapillare, 40 cm (30 cm), 75 μ m ID
Detektor : UV (495 nm)
Retentionszeit : 12.07 min
Reinheit : 100 %

4-(1-Butyl-2,6-dioxo-2,3,6,7-tetrahydro-1H-purin-8-yl)-N-[4-(4,4-difluoro-1,3,5,7-tetramethyl-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacen-8-yl)-butyl]phenoxyessigsäureamid (101)

StrukturSubstanzeigenschaften

Oranger Feststoff, gut löslich in Dimethylformamid und Dimethylsulfoxid.

Ansatz

1-Butyl-purin-2,6-dion-8-phenoxyessigsäure (91)	0.101 g (0.28 mmol)
Chlorameisensäureisobutylester	38 µl (0.28 mmol)
N-Methylmorpholin	34 µl (0.308 mmol)
8-(4-Aminobutyl)-4,4-difluoro-1,3,5,7-tetramethyl-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacen (31)	0.09 g (0.28 mmol)

Versuchsvorschrift

0.101 g (0.28 mmol) 1-Butyl-purin-2,6-dion-8-phenoxyessigsäure (**91**) wird in 5 ml Dimethylformamid suspendiert und mit 34 µl (0.308 mmol) N-Methylmorpholin versetzt. Es wird 5 min bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wird der Ansatz auf -22°C gekühlt und mit 38 µl (0.28 mmol) Chlorameisensäureisobutylester versetzt. Nach 15 min werden 0.09 g (0.28 mmol) 8-(4-Aminobutyl)-4,4-difluoro-1,3,5,7-tetramethyl-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacen (**31**) hinzu gegeben und weitere 3 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wird unter vermindertem Druck abdestilliert und die Substanz in 20 ml mobiler Phase gelöst. Die Suspension wird auf Kieselgel 60 aufgetragen und mit Dichlormethan: Methanol (40:1) eluiert.

Ausbeute: 0.025 g (14 %)

Analytische Daten

Schmp.: 285 °C_{Zers}

Berechnete Masse: 659.32 für C₃₄H₄₀BF₂N₇O₄

MS (ESI): 658.8 [m - H]⁺, 638.5 [m - HF]⁺

¹H-NMR (DMSO-d₆, 500 MHz): δ = 0.91 (t, 3H, 4'-CH₃), 1.20 (m, 2H, 3'-CH₂-), 1.25-1.74 (m, 6H, 2'-CH₂-, 2''-CH₂-, 3''-CH₂-), 2.37 (s, 12H, 10'''-CH₃ und 9'''-CH₃, 12'''-CH₃ und 11'''-CH₃), 2.91 (m, 2H, 4''-CH₂-), 3.20 (t, 2H, 1''-CH₂-), 3.84 (t, 2H, 1'-CH₂-), 4.53 (s, 2H, -OCH₂-CONHR), 6.18 (s, 2H, 2'''CH und 6'''CH), 7.05 und 8.00 (2d, 4H, ArCH-Phenoxy), 8.12 (t, 1H, Amid-NH), 11.80 (s, 1H, 3-NH), 13.42 (s, 1H, 7-NH).

¹³C-NMR (DMSO-d₆, 125 MHz): δ = 13.8 (s, 1C, 4'-CH₃), 14.2 (s, 2C, 10'''CH₃ und 11'''CH₃), 15.9 (s, 2C, 9'''CH₃ und 12'''CH₃), 19.7 (s, 1C, 3'-CH₂-), 27.6 (s, 1C, 2''-CH₂-), 29.0 (s, 1C, 3''-CH₂-), 29.7 (s, 1C, 4''-CH₂-), 29.9 (s, 1C, 2'-CH₂-), 38.2 (s, 1C, 1''-CH₂-), 67.2 (s, 1C, -O-CH₂-), 107.38 (s, 1C, 5-C), 121.8 (s, 2C, 2'''-CH- und 6'''-CH), 130.8 (s, 2C, 7a'''C und 8a'''C), 140.92 (s, 2C, 1'''-C und 7'''C), 146.3 (s, 1C, 8'''C), 147.8 (s, 1C, 4-C), 150.1 (s, 1C, 8-C), 151.1 (s, 1C, 2-C), 153.3 (s, 2C, 5'''C und 3'''C), 154.8 (s, 1C, 6-C), 167.6 (s, 1C, R-CONHR-), 115.3, 122.2, 128.1, 159.3 (4s, 6C, ArC-Phenoxy-).

Spektroskopische Daten

UV-Absorption (DMSO) λ_{max}: 497 nm

Fluoreszenzemission (DMSO) λ_{max}: 498 nm

Reinheit

Kapillarelektrophorese

Puffer : Tris-HCl, 100 mM SDS, pH 9.2

Injektion : 5 s mit 5 psi

Stromstärke : 25 kV

Messzeit : 25 min

Kapillare : Fused-silica Kapillare, 40 cm (30 cm), 75 μm ID

Detektor : UV (260 nm)

Retentionszeit : 12.07 min

Reinheit : 100 %

Kapillarelektrophorese

Puffer : Tris-HCl, 100 mM SDS, pH 9.2

Injektion : 5 s mit 5 psi

Stromstärke : 25 kV

Messzeit : 25 min

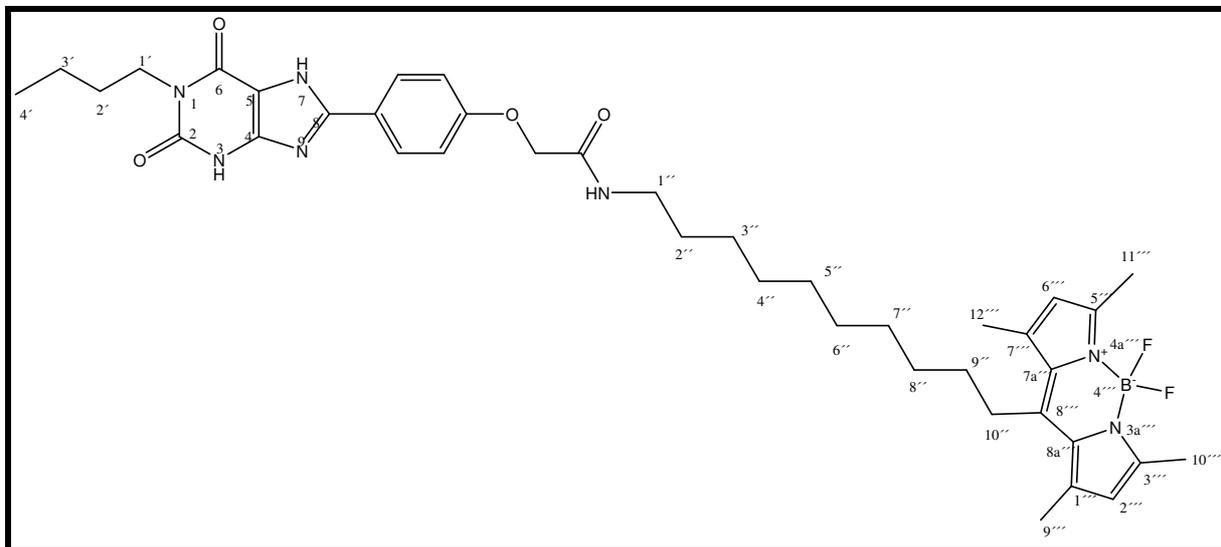
Kapillare : Fused-silica Kapillare, 40 cm (30 cm), 75 µm ID

Detektor : UV (495 nm)

Retentionszeit : 12.07 min

Reinheit : 100 %

4-(1-Butyl-2,6-dioxo-2,3,6,7-tetrahydro-1H-purin-8-yl)-N-[10-(4,4,-difluoro-1,3,5,7-tetramethyl-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacen-8-yl)-decyl]phenoxyessigsäureamid (102)

Struktur**Substanzeigenschaften**

Oranger Feststoff, gut löslich in Dimethylformamid und Dimethylsulfoxid.

Ansatz1-Butyl-purin-2,6-dion-8-phenoxyessigsäure (**91**) 0.101 g (0.28 mmol)

2-(7-Aza-1H-benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyl-uronium (HCTU) 0.115 g (0.28 mmol)

1-Hydroxybenzotriazol (HOBT)	0.037 g (0.28 mmol)
N-Methylmorpholin	34 μ l (0.308 mmol)
8-(10-Aminodecyl)-4,4-difluoro-1,3,5,7-tetramethyl-4-bora-3a,4a-s-indacen (33)	0.113 g (0.28 mmol)

Versuchsvorschrift

Unter Argonatmosphäre werden 0.101 g (0.28 mmol) 1-Butyl-purin-2,6-dion-8-phenoxyessigsäure (**91**), 0.115 g (0.28 mmol) HCTU und 0.37 g (0.28 mmol) HOBT in 5 ml Dimethylformamid suspendiert. Nach Zugabe von 34 μ l (0.308 mmol) N-Methylmorpholin wird eine Minute gerührt. Anschließend werden 0.078 g (0,28 mmol) 8-(10-Aminodecyl)-4,4-difluoro-1,3,5,7-tetramethyl-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacen (**33**), das in 2 ml Dimethylformamid gelöst wurde, hinzu gegeben. Es wird über 16 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wird unter vermindertem Druck vollständig entfernt. Die Substanz wird in etwas mobiler Phase gelöst, auf Kieselgel 60 aufgetragen und mit Dichlormethan: Methanol 40:1 eluiert.

Ausbeute: 0.023 g (11 %)

Analytische Daten

Schmp.: 275 °C_{Zers}

Masse (berechnet): 743,41 g/mol für C₄₀H₅₂BF₂N₇O₄

MS (ESI): 742.8 [m-H]⁻, 722.7 [m-HF]⁻

¹H-NMR (DMSO-d₆, 500 MHz): δ = 0.88 (t, 3H, 4'-CH₃), 1.19-1.39 (m, 20H, 2'-CH₂-, 3'-CH₂-, 2''-CH₂- bis 9''-CH₂-), 2.38 (s, 12H, 9'''-CH₃, 10'''-CH₃, 11'''-CH₃, 12'''-CH₃), 2.87 (m, 2H, 10''-CH₂-), 3.10 (t, 2H, 1''-CH₂-), 3.83 (t, 2H, 1'-CH₂-), 4.53 (s, 2H, -OCH₂-CONHR), 6.19 (s, 2H, 2'''-CH- und 6'''-CH-), 7.05 (d, 2H, ArCH-Phenoxy), 8.03 (m, 3H, ArCH-Phenoxy, Amid-NH), 11.8 (s, 1H, 3-NH), 13.43 (s, 1H, 7-NH).

¹³C-NMR (DMSO-d₆, 125 MHz): δ = 13.83 (s, 1C, 4'-CH₃), 14.17 (s, 2C, 10'''-CH₃ und 11'''-CH₃), 15.92 (s, 2C, 9'''-CH₃ und 12'''-CH₃), 19.76 (s, 1C, 3'-CH₂-), 26.17 (s, 1C, 2''-CH₂-), 27.88 (s, 1C, 3''-CH₂-), 28.72 (s, 1C, 5''-CH₂-), 28.88 (s, 1C, 1''-CH₂-), 29.04 (s, 1C, 6''-CH₂-), 29.14 (s, 1C, 7''-CH₂-), 29.74 (s, 1C, 8''-CH₂-),

29.90 (s, 1C, 9''-CH₂-), 31.41 (s, 1C, 2`-CH₂-), 38.38 (s, 1C, 10''-CH₂-), 39.90 (s, 1C, 1``-CH₂-), 40.04 (s, 1C, 1'-CH₂-), 67.20 (s, 1C, -O-CH₂-), 107.35 (s, 1C, 5-C), 121.76 (s, 1C, 2'''-CH und 6'''-CH), 130.85 (s, 2C, 7a'''C und 8a'''C), 140.81 (s, 2C, 1'''C und 7'''C), 146.98 (s, 1C, 8'''C), 147.88 (s, 1C, 4-C), 150.19 (s, 1C, 8-C), 151.67 (s, 1C, 2-C), 153.10 (s, 2C, 5'''C und 3'''C), 154.77 (s, 1C, 6-C), 167.21 (s, 1C, R-CONHR), 115.25, 122.18, 128.02, 159.37 (4s, 6C, ArC-phenoxy).

Spektroskopische Daten

UV-Absorption (DMSO) λ_{\max} : 497 nm

Fluoreszenzemission (DMSO) λ_{\max} : 598 nm

Reinheit

Kapillarelektrophorese

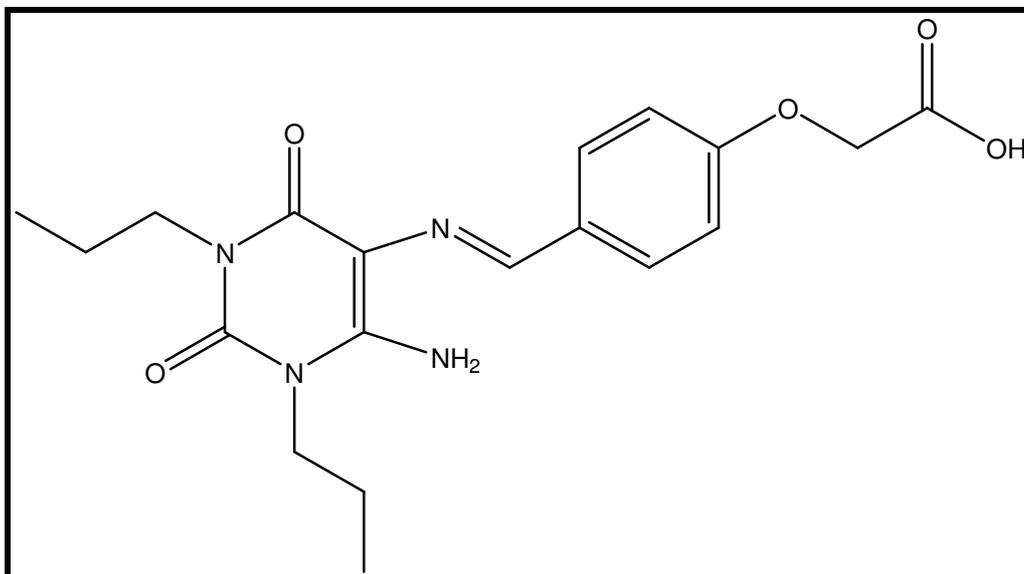
Puffer : Tris-HCl, 100 mM SDS, pH 9.2
Injektion : 5 s mit 5 psi
Stromstärke : 25 kV
Messzeit : 25 min
Kapillare : Fused-silica Kapillare, 40 cm (30 cm), 75 μ m ID
Detektor : UV (260 nm)
Retentionszeit : 12.10 min
Reinheit : 100 %

Kapillarelektrophorese

Puffer : Tris-HCl, 100 mM SDS, pH 9.2
Injektion : 5 s mit 5 psi
Stromstärke : 25 kV
Messzeit : 25 min
Kapillare : Fused-silica Kapillare, 40 cm (30 cm), 75 μ m ID
Detektor : UV (495 nm)
Retentionszeit : 12.10 min
Reinheit : 100 %

4-(6-Amino-2,4,-dioxo-1,3-dipropyl-1,2,3,4-tetrahydropyrimidin-5-ylimino)phenoxyessigsäure

Struktur



Substanzeigenschaften

Weißer Feststoff, unlöslich in Ethanol, löslich in Dimethylformamid.

Ansatz

5,6-Diamino-1,3-dipropyluracil	0.90 g (3.99 mmol)
4-Formylphenoxyessigsäure	0.718 g (3.99 mmol)

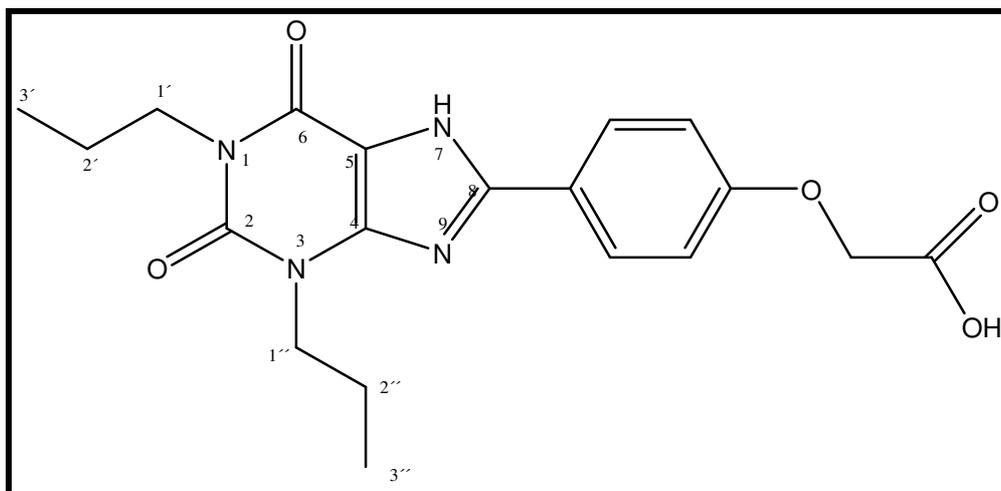
Synthesevorschrift

0.9 g (3.99 mol) 5,6-Diamino-1,3-dipropyluracil werden in 20 ml Ethanol gelöst. Nach Zugabe von 0.718 g (3.99 mmol) 4-Formylphenoxyessigsäure wird 24 h bei 80°C unter Rückfluss erhitzt.

Die ausgefallene Substanz wird abfiltriert, dem Filtrat wird etwas Wasser hinzu gegeben und über Nacht im Kühlschrank stehen gelassen.

Nach erneuter Filtration werden die vereinigten Produkte im Exsikkator getrocknet. Das Produkt wird ohne weitere Aufreinigung direkt weiter zur 4-(2,6-Dioxo-1,3-dipropyl-2,3,6,7,8,9-hexahydro-1H-purin-8-yl)phenoxyessigsäure, umgesetzt.

Ausbeute: 1,14 g (73%)

1,3-Dipropyl-purin-2,6-dion-8-phenoxyessigsäure (87)¹⁶⁹StrukturSubstanzeigenschaften

Weißer Feststoff

Ansatz

4-[(6-Amino-2,4,-dioxo-1,3-dipropyl-1,2,3,4-tetrahydropyrimidin-5-ylimino]phenoxyessigsäure	1,14g (0,0029mmol)
Thionylchlorid	100 ml

Synthesvorschrift

Bei 0°C werden unter Eiskühlung 1,14 g (0,0029 mmol) 4-[(6-Amino-2,4-dioxo-1,3-dipropyl-1,2,3,4-tetrahydro-pyrimidin-5-ylimino]phenoxyessigsäure mit 100 ml Thionylchlorid versetzt und 2 h bei Raumtemperatur gerührt. Das überschüssige Thionylchlorid wird abdestilliert. Das entstandene Säurechlorid wird durch Zugabe von Eis zur entsprechenden Carbonsäure hydrolysiert.

Ausbeute: 0.975 g (86,5%)

Analytische Daten

Schmp.: 295°C

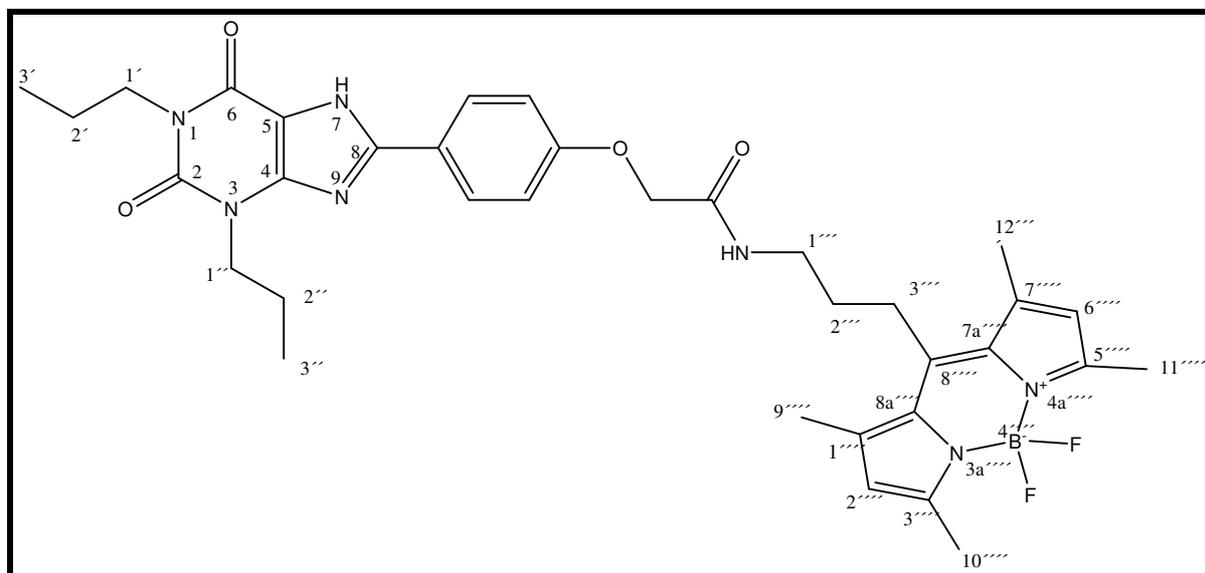
Berechnete Masse: 386,16 g/mol für C₁₉H₂₂N₄O₅

¹H-NMR (DMSO-d₆, 500 MHz): δ = 0.87 (m, 6H, 3'-CH₃ und 3'''-CH₃), 1.56 (m, 2H, 2'-CH₂-), 1.72 (m, 2H, 2''-CH₂-), 3.85 (t, 2H, 1'-CH₂-), 4.00 (t, 2H, 1''-CH₂-), 4.75 (s, 2H, Ar-CH₂-COOH), 7.02 und 8.05 (2d, 4H, ArCH-Phenoxy).

^{13}C -NMR (DMSO- d_6 , 1252 MHz): δ = 11.15 (s, 1C, 3'''-CH₃), 11.3 (s, 1C, 3'-CH₃), 20.98 (s, 2C, 2'-CH₂- und 2''-CH₂-), 42.21 (s, 1C, 1'-CH₂-), 44.51 (s, 1C, 1''-CH₂-), 64.67 (s, 1C, -CH₂-CONHR), 107.49 (s, 1C, 5-C), 148.49 (s, 1C, 8-C), 150.11 (s, 1C, 2-C), 154.09 (s, 1C, 6-C), 169.98 (s, 1C, R-COOH), 115.04, 121.89, 128.22, 159.38 (4s, 6C, C_{Aromat}-Phenoxy).

4-(1,3-Dipropyl-2,6-dioxo-2,3,6,7-tetrahydro-1H-purin-8-yl)-N-[3-(4,4-difluoro-1,3,5,7-tetramethyl-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacen-8-yl)-propyl]phenoxyessigsäureamid (107)

Struktur



Substanzeigenschaften

Oranger Feststoff, gut löslich in Dimethylformamid, Dimethylsulfoxid

Ansatz

1,3-Dipropyl-purin-2,6-dion-8-phenoxyessigsäure (87)	0.109 g (0,28 mmol)
2-(7-Aza-1H-benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyl-uronium (HCTU)	0.116 g (0.28 mmol)
1-Hydroxybenzotriazol (HOBT)	0.038 g (0.28mmol)
N-Methylmorpholin	34 μl (0.308 mmol)
8-(3-Aminopropyl)-4,4-difluoro-1,3,5,7-tetramethyl-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacen (30)	0.086 g (0.28 mmol)

Versuchsvorschrift

Unter Argonatmosphäre werden 0.109 g (0,28 mmol) 1,3-Dipropyl-purin-2,6-dion-8-phenoxyessigsäure (**87**), 0.116 g (0.28 mmol) HCTU und 0.038 g (0.28 mmol) HOBT in 5 ml Dimethylformamid suspendiert. Nach Zugabe von 34 μ l (0.308 mmol) N-Methylmorpholin wird eine weitere Minute gerührt. Anschließend werden 0.086 g (0.28 mmol) 8-(3-Aminopropyl)-4,4-difluoro-1,3,5,7-tetramethyl-4-bora-3a,4a-diazas-indacen (**30**), das in 2 ml Dimethylformamid gelöst wurde, hinzu gegeben. Die Lösung wird über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wird unter vermindertem Druck vollständig entfernt. Der Rückstand wird in 20 ml mobiler Phase gelöst, auf Kieselgel 60 aufgetragen und mit Dichlormethan Methanol (40:1) eluiert.

Ausbeute: 0.087 g (46 %)

Analytische Daten

Schmp.: 269 °C_{Zers}

Berechnete Masse: 673.56 g/mol für C₃₅H₄₂BF₂N₇O₄

MS (ESI): 672.3 [m- H⁺]

¹H-NMR (DMSO-d₆, 500 MHz): δ = 0.86 (m, 6H, 3'-CH₃ und 3''-CH₃), 1.58 (m, 2H, 2'-CH₂-), 1.61-1.75 (m, 4H, 2''-CH₂- und 2'''-CH₂-), 2.41 (s, 12H, 9''''-CH₃, 10''''-CH₃, 11''''-CH₃ und 12''''-CH₃), 2.95 (m, 2H, 3'''-CH₂-), 3.33 (m, 2H, 1'''-CH₂-), 3.80 (t, 2H, 1'-CH₂-), 4.08 (t, 2H, 1''-CH₂-), 4,54 (s, 2H, -OCH₂-CONHR), 6.21 (s, 2H, 2''''-CH und 6''''-CH), 7.10 und 8.06 (2d, 4H, C_{Aromat}H), 8.32 (t, 1H, Amid-NH).

¹³C-NMR (DMSO-d₆, 125 MHz): δ = 11.15 (s, 1C, 3''-CH₃), 11.28 (s, 1C, 3'-CH₃), 14.18 (t, 2C, 10''''-CH₃ und 11''''-CH₃), 15.95 (s, 2C, 9''''-CH₃ und 12''''-CH₃), 20.97 (s, 2C, 2'-CH₂- und 2''-CH₂-), 25.6 (s, 1C, 2'''-CH₂-), 30.9 (s, 1C, 3'''-CH₂-), 35.89 (s, 1C, 1'''-CH₂-), 42,21 (s, 1C, 1'-CH₂-), 44,5 (s, 1C, 1''-CH₂-), 67,25 (s, 1C, -OCH₂-CONHR), 107.46 (s, 1C, 5-C), 121.7 (s, 2C, 2''''-CH und 6''''-CH), 130.8 (s, 2C, 7a''''-C und 8a''''-C), 140.8 (s, 2C, 1''''-C und 7''''-C), 146.8 (s, 1C, 8''''-C), 148.5 (s, 1C, 4-C), 150.2 (s, 1C, 8-C), 150.8 (s, 1C, 2-C), 153.1 (s, 2C, 3''''-C und 5''''-C), 154.7 (s, 1C, 6-C), 167.28 (s, 1C, R-CONHR), 115.3, 122.0, 128.2, 130.8, 159.3 (5s, 6C, C_{Aromat}).

Spektroskopische DatenUV-Absorption (MeOH) λ_{\max} : 497 nmFluoreszenzemission (MeOH) λ_{\max} : 498 nmReinheit

Kapillarelektrophorese

Puffer : Tris-HCl, 100 mM SDS, pH 9.2

Injektion : 5 s mit 5 psi

Stromstärke : 25 kV

Messzeit : 25 min

Kapillare : Fused-silica Kapillare, 40 cm (30 cm), 75 μ m ID

Detektor : UV (260 nm)

Retentionszeit : 11.55 min

Reinheit : 100 %

Kapillarelektrophorese

Puffer : Tris-HCl, 100 mM SDS, pH 9.2

Injektion : 5 s mit 5 psi

Stromstärke : 25 kV

Messzeit : 25 min

Kapillare : Fused-silica Kapillare, 40 cm (30 cm), 75 μ m ID

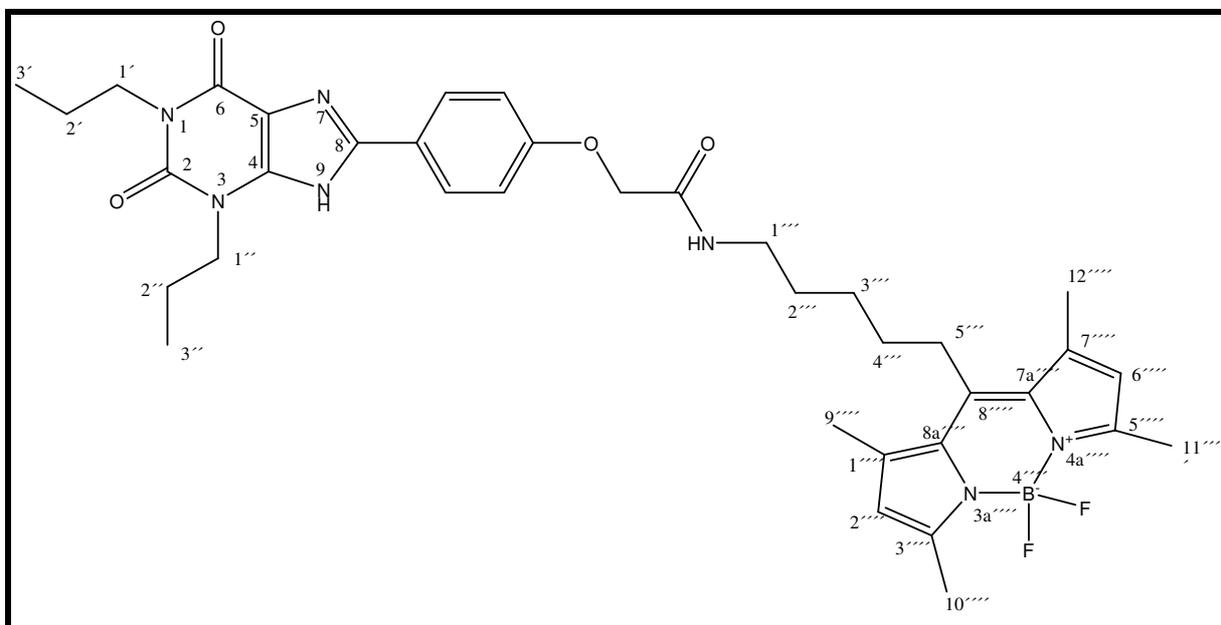
Detektor : UV (495 nm)

Retentionszeit : 11.55 min

Reinheit : 100 %

4-(1,3-Dipropyl-2,6-dioxo-2,3,6,7-tetrahydro-1H-purin-8-yl)-N-[5-(4,4,-difluoro-1,3,5,7-tetramethyl-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacen-8-yl)-pentyl]phenoxyessigsäureamid (108)

Struktur



Substanzeigenschaften

Orangefarbener Feststoff, gut löslich in Dimethylformamid und Dimethylsulfoxid.

Ansatz

1,3-Dipropyl-purin-2,6-dion-8-phenoxyessigsäure (87)	0.109 g (0,28 mmol)
2-(7-Aza-1H-benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium (HCTU)	0.116 g (0.28 mmol)
1-Hydroxybenzotriazol (HOBT)	0.038 g (0.28mmol)
N-Methylmorpholin	34 µl (0.308 mmol)
8-(5-Aminopentyl)-4,4-difluoro-1,3,5,7-tetramethyl-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacen (32)	0.094 g (0.28 mmol)

Versuchsvorschrift

Unter Argonatmosphäre werden 0.109 g (0,28 mmol) 1,3-Dipropyl-purin-2,6-dion-8-phenoxyessigsäure (**8**), 0.116 g (0.28 mmol) HCTU und 0.038 g (0.28 mmol) HOBT in 5 ml Dimethylformamid suspendiert. Nach Zugabe von 34 µl (0.308 mmol) N-Methylmorpholin wird eine weitere Minute gerührt. Anschließend wird 0.094 g (0.28 mmol) 8-(5-Aminpenthyl)-4,4-dufluoro-1,3,5,7-tetramethyl-4-bora-3a,4a-diaza-s-

indacen (**32**), das in 2 ml Dimethylformamid gelöst wurde, hinzu gegeben. Die Lösung wird über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wird unter vermindertem Druck vollständig entfernt. Der Rückstand wird in etwas mobiler Phase gelöst, auf Kieselgel 60 aufgetragen und mit Dichlormethan Methanol (40:1) eluiert.

Ausbeute: 0.051 g (26 %)

Analytische Daten

Schmp.: 253 °C_{Zers}

Berechnete Masse: 701.36 g/mol für C₃₇H₄₆BF₂N₇O₄

MS (ESI): 700.5 [m- H⁺]

¹H-NMR (DMSO-d₆, 500 MHz): δ = 0.86 (m, 6H, 3'-CH₃ und 3''-CH₃), 1.42 (sex, 2H, 2'-CH₂-), 1.45-1.58 (m, 6H, 2''-CH₂-, 3'''-CH₂-, 4'''-CH₂-), 1.72 (m, 2H, 2'''-CH₂-), 2.37 (s, 12H, 9''''-CH₃, 10''''-CH₃, 11''''-CH₃ und 12''''CH₃), 2.87 (m, 2H, 5''''-CH₂-), 3.14 (m, 2H, 1'''-CH₂-), 3.80 (t, 2H, 1'-CH₂-), 3.98 (t, 2H, 1''-CH₂-), 4.54 (s, 2H, -OCH₂-CONHR), 6.18 (s, 2H, 2''''-CH und 6''''-CH), 7.06 und 8.03 (2d, 4H, ArCH-Phenoxy), 8.07 (t, 1H, Amid-NH).

¹³C-NMR (DMSO-d₆, 125 MHz): δ = 11.12 (s, 1C, 3''-CH₃), 11.28 (s, 1C, 3'-CH₃), 14.1 (t, 2C, 10''''-CH₃ und 11''''CH₃), 15.9 (s, 2C, 9''''CH₃ und 12''''-CH₃), 20.97 (s, 2C, 2'-CH₂- und 2''-CH₂-), 27.0 (s, 1C, 3'''-CH₂-), 27.9 (s, 1C, 4'''-CH₂-), 28.9 (s, 1C, 2'''-CH₂-), 31.2 (s, 1C, 5''''-CH₂-), 42.1 (s, 1C, 1'''-CH₂-), 44.4 (s, 1C, 1''-CH₂-), 45.9 (s, 1C, 1'-CH₂-), 67.25 (s, 1C, -OCH₂-CONHR), 107.46 (s, 1C, 5-C), 121.7 (s, 2C, 2''''-CH und 6''''-CH), 13.8 (s, 2C, 7a''''-C und 8a''''-C), 140.8 (s, 2C, 1''''-C und 7''''-C), 146.8 (s, 1C, 8''''-C), 148.5 (s, 1C, 4-C), 150.2 (s, 1C, 8-C), 150.8 (s, 1C, 2-C), 153.1 (s, 2C, 3''''-C und 5''''-C), 154.7 (s, 1C, 6-C), 167.28 (s, 1C, R-CONHR), 115.3, 122.0, 128.2, 130.8, 159.3 (5s, 6C, ArC-Phenoxy).

Spektroskopische Daten

UV-Absorption (MeOH) λ_{max}: 497 nm

Fluoreszenzemission (MeOH) λ_{max}: 498 nm

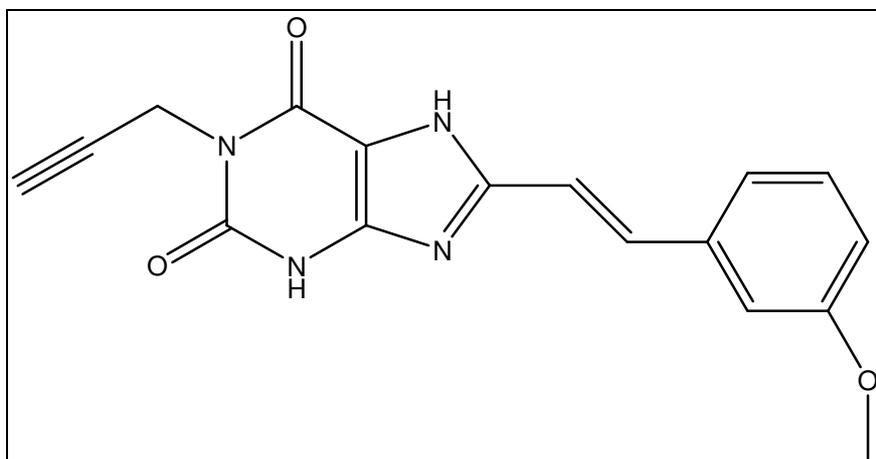
Reinheit

Kapillarelektrophorese

Puffer	: Tris-HCl, 100 mM SDS, pH 9.2
Injektion	: 5 s mit 5 psi
Stromstärke	: 25 kV
Messzeit	: 25 min
Kapillare	: Fused-silica Kapillare, 40 cm (30 cm), 75 µm ID
Detektor	: UV (260 nm)
Retentionszeit	: 9.78 min
Reinheit	: 100 %

Kapillarelektrophorese

Puffer	: Tris-HCl, 100 mM SDS, pH 9.2
Injektion	: 5 s mit 5 psi
Stromstärke	: 25 kV
Messzeit	: 25 min
Kapillare	: Fused-silica Kapillare, 40 cm (30 cm), 75 µm ID
Detektor	: UV (495 nm)
Retentionszeit	: 9.78 min
Reinheit	: 100 %

(Z)-8-(3-Methoxystyryl)-1-(prop-2-ynyl)-1H-purine-2,6(3H,7H)-dion**(130)**StrukturSubstanzeigenschaften

Gelber Feststoff, löslich in heißem Dimethylsulfoxid schlecht löslich in Wasser und Methanol und Ethanol.

Ansatz

N-(4-Amino-2,6-dioxo-1-(prop-2-ynyl)-1,2,3,6-tetrahydro-
pyrimidin-5-yl)-3-(3-methoxyphenyl)acrylamide

1 g (2,9 mmol)

Phosphorpentoxid

1.5 g (10.5 mmol)

Versuchsvorschrift

1 g (2,9 mmol) N-(4-Amino-2,6-dioxo-1-(prop-2-ynyl)-1,2,3,6-tetrahydropyrimidin-5-yl)-3-(3-methoxyphenyl)acrylamid werden in 15 ml wasserfreiem Dimethylformamid suspendiert und mit 1.5 g (10.5 mmol) Phosphorpentoxid versetzt. Die Suspension wird kurz aufgekocht, auf Raumtemperatur abgekühlt und erneut erhitzt. Nach dem Erkalten der Lösung wird mit Wasser versetzt und das ausgefallene Produkt abfiltriert. Das Rohprodukt wird mehrmals mit Wasser gewaschen und bei 70°C mehrere Stunden getrocknet.

Ausbeute: 700 mg (75%)

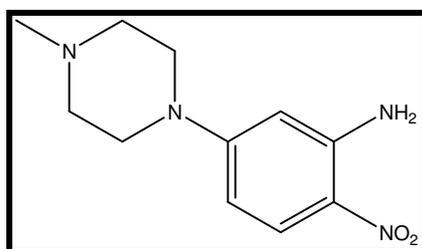
Analytische Daten

Schmp.: °C

Berechnete Masse: 322.31 g/mol für C₁₇H₁₄N₄O₃

¹H-NMR (DMSO-d₆, 500 MHz): δ = 3.04 (t, 1H, 3'-CH-), 3.78 (s, 3H, O-CH₃), 4.56 (d, 2H, 1'-CH₂-), 6.92 (dd, 1H, 4''-C_{arom}H), 7.00 (d, 1H, ³J = 16 hz, R-CH=CH-Ph), 7.17 (m, 2H, 2''-C_{arom}H und 5''-C_{arom}H), 7.34 (m, 1H, 6''-C_{arom}H), 7.57 (d, 1H, ³J = 16 hz, R-CH=CH-Ph), 12.00 und 13.5 (2bs, 2H, 3-NH und 9-NH).

¹³C-NMR (DMSO-d₆, 125 MHz): δ = 29.59 (s, 1C, 1'-C), 55.37 (s, 1C, -CH₃), 72.74 (s, 1C, 2'-C), 80.06 (s, 1C, 3'-C), 106.95 (s, 1C, 5-C), 112.39 (s, 1C, CH=CH-Ph), 115.17 (s, 1C, 2''-C_{Aromat}), 116.20 (s, 1C, 4''-C_{Aromat}), 119.82 (s, 1C, 6''-C_{Aromat}), 130.22 (s, 1C, 5''-C_{Aromat}), 135.50 (s, 1C, 1''-C_{Aromat}), 136.98 (s, 1C, CH=CH-Ph), 148.28 (s, 1C, 8-C), 150.21 (s, 1C, 2-C), 150.57 (s, 1C, 6-C), 153.83 (s, 1C, 4-C), 159.8 (s, 1C, 3''-C).

5-(4-Methyl-1-piperazinyl)-2-nitroanilin (116)¹⁵⁹StrukturSubstanzeigenschaften

Hellgelbes Pulver, löslich in heißem Ethanol und Dimethylformamid, unlöslich in Wasser.

Ansatz

5-Chloro-2-nitroanilin	2.59 g (15 mmol)
Methylpiperazin	1.57 g (15 mmol)
Kaliumcarbonat	2.1 g (15 mmol)

Versuchsvorschrift

2.59 g (15 mmol) 5-Chloro-2-nitroanilin, 1.57 g (15 mmol) Methylpiperazin und 2.1 g (15 mmol) Kaliumcarbonat werden in 5 ml Dimethylformamid gelöst und 3 h unter Rückfluss gekocht. Das Reaktionsgemisch wird auf Raumtemperatur abgekühlt und in 15 ml Eiswasser gegossen. Der sich bildende Niederschlag wird in 50 ml 2N-Essigsäure gelöst, nach Zugabe von Aktivkohle wird kurz aufgekocht. Die Aktivkohle wird abfiltriert und das Produkt durch Zugabe von verdünnte, wässrige Ammoniak Lösung ausgefällt. Das Produkt wird abfiltriert und aus Ethanol umkristallisiert, bis es eine hellgelbe Farbe angenommen hat.

Ausbeute: 2.18 g (61.5 %),

Literaturausbeute: 59 %

Analytik

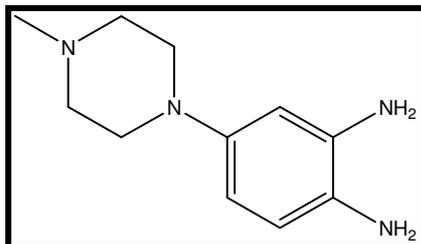
Schmp.: 156-157 °C

Berechnete Masse: 236.27 g/mol für $C_{11}H_{16}N_4O_2$

1H -NMR ($CDCl_3$, 500 MHz): δ = 1.68 (s, 3H, N- CH_3), 2.49 (t, 4H, 3'- CH_2 - und 5'- CH_2 -), 3.34 (t, 4H, 2'- CH_2 - und 6'- CH_2 -), 5.93 (s, 1H, 6- C_{Aromat} -H), 6.12 (bs, 2H, Ar- NH_2), 6.26 (dd, 1H, 4- C_{Aromat} -H), 7.99 (dd, 1H, 3- C_{Aromat} -H).

^{13}C -NMR ($CDCl_3$, 125 MHz): δ = 46.03 (s, 1C, N- CH_3), 46.79 (s, 2C, 3'- CH_2 - und 5'- CH_2 -), 54.53 (s, 2C, 2'- CH_2 - und 6'- CH_2 -), 98.32 (s, 1C, 4- C_{Aromat} -H), 105.67 (s, 1C, 2- C_{Aromat} -H), 124.76 (s, 1C, 3- C_{Aromat} -H), 128.21 (s, 1C, 5- C_{Aromat} -H), 147.04 (s, 1C, 1- C_{Aromat} -H), 155.46 (s, 1C, 6- C_{Aromat} -H).

Die Daten entsprechen den Literaturwerten.¹⁵⁹

4-(4-Methyl-1-piperazinyl)-1,2-diaminobenzen (117)¹⁵⁹StrukturSubstanzeigenschaften

Gelb-braunes Pulver, löslich in Ethanol, Methanol, instabil zersetzt sich beim Lagern

Ansatz

5-(4-Methyl-1-piperazinyl)-2-nitroanilin (116)	0.6 g (2.5 mmol)
5 %-Palladium auf Aktivkohle	0.36 g

Versuchsvorschrift

0.6 g (2.5 mmol) 5-(4-Methyl-1-piperazinyl)-2-nitroanilin (**116**) werden in 12 ml Ethanol suspendiert. Nach Zugabe des Katalysators wird die Lösung unter einer Wasserstoffatmosphäre bei Raumtemperatur und Normaldruck 12 h lang gerührt. Der Katalysator wird abfiltriert und das Lösungsmittel unter Vakuum entfernt. Die Substanz ist sauber und bedarf keiner weiteren Aufarbeitung. Die nächste Umsetzung sollte zeitnah erfolgen, da sich die gelb-braune Substanz beim Lagern zersetzt.

Ausbeute: 0.45 g (86%)

Literaturausbeute: 94%

Analytik

Schmp.: 92 °C

Berechnete Masse: 206.28 g/mol für C₁₁H₁₈N₄

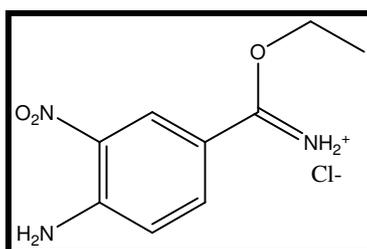
¹H-NMR (DMSO-d₆, 500 MHz): δ = 2.34 (s, 3H, N-CH₃), 2.58 (t, 4H, -3'-CH₂- und 5'-CH₂-), 3.07 (t, 4H, 2'-CH₂- und 6'-CH₂-), 6.30 (s, 1H, 6-C_{Aromat}-H), 6.31 (dd, 1H, 4-C_{Aromat}-H), 6.60 (dd, 1H, 3-C_{Aromat}-H).

^{13}C -NMR (DMSO- d_6 , 125 MHz): $\delta = 45.97$ (s, 1C, N- CH_3), 50.44 (s, 2C, 3'- CH_2 - und 5'- CH_2 -), 55.22 (s, 2C, 2'- CH_2 - und 6'- CH_2 -), 106.14 (s, 1C, 4- $\text{C}_{\text{Aromat-H}}$), 108.61 (s, 1C, 2- $\text{C}_{\text{Aromat-H}}$), 118.22 (s, 1C, 3- $\text{C}_{\text{Aromat-H}}$), 127.67 (s, 1C, 5- $\text{C}_{\text{Aromat-H}}$), 136.34 (s, 1C, 1- $\text{C}_{\text{Aromat-H}}$), 146.24 (s, 1C, 6- $\text{C}_{\text{Aromat-H}}$).

Die Daten entsprechen den Literaturwerten.¹⁵⁹

Ethyl-3-nitro-4-aminobenzimidat-Hydrochlorid (119)¹⁵⁹

Struktur



Substanzeigenschaften

Oranges Pulver, unlöslich in Ether, löslich in Ethanol.

Ansatz

3-Nitro-4-aminobenzonitril	0.48 g (3 mmol)
absoluter Ethanol	0.2 g (4.3 mmol)

Versuchsvorschrift

0.48 g (4 mmol) 3-Nitro-4-aminobenzonitril werden mit 0.2 g absoluten Ethanol (Wassergehalt: 5 ppm) versetzt. Nach Zugabe von 14 ml 4M-HCl in Dioxan wird der Ansatz für 5 Tage bei 4°C stehen gelassen. Das Produkt wird abfiltriert und mehrmals mit Diethylether gewaschen.

Ausbeute: 0.533 g (85 %)

Analytik

Schmp.: 230 °C

Berechnete Masse: 245.66 für $\text{C}_9\text{H}_{12}\text{ClN}_3\text{O}_3$

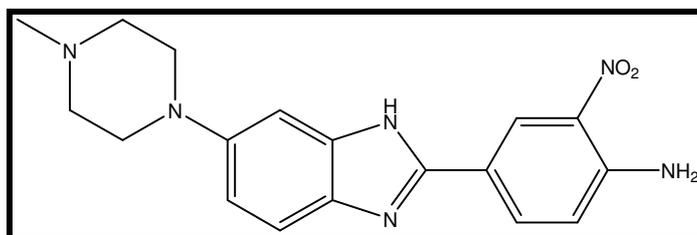
$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6 , 500 MHz): $\delta = 1.45$ (t, 3H, $-\text{CH}_3$, $^3J = 6.93$ Hz), 4.58 (q, 2H, $-\text{CH}_2-$, $^3J = 6.93$ Hz), 7.15 (d, 1H, 4- $\text{C}_{\text{Aromat-H}}$), 8.07 (dd, 1H, 5- $\text{C}_{\text{Aromat-H}}$), 8.32 (bs, 2H, Ar- NH_2), 8.80 (s, 1H, 3- $\text{C}_{\text{Aromat-H}}$), 11.05 (s, 1H, NH), 11.78 (s, 1H, NH).

$^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- d_6 , 125 MHz): $\delta = 13.65$ (s, 1C, $-\text{CH}_3$), 69.34 (s, 1C, $-\text{CH}_2-$), 168.96 (s, 1C, Ar- $\text{C}=\text{NH}_2^+$), 111.41 (s, 1C, 5- C_{Aromat}), 119.82 (s, 1C, 6- C_{Aromat}), 129.3 (s, 1C, 4- C_{Aromat}), 130.04 (s, 1C, 3- C_{Aromat}), 134.0 (s, 1C, 2- C_{Aromat}), 150.04 (s, 1C, 1- C_{Aromat}).
Die analytischen Daten stimmen mit der Literatur überein¹⁵⁹

2-(3-Nitro-4-aminophenyl)-6-(4-methyl-1-piperazinyl)benzimidazol

(120)¹⁵⁹

Struktur



Substanzeigenschaften

Braun-roter Feststoff, löslich in heißem Wasser, Essigsäure und Methanol.

Ansatz

4-(4-Methyl-1-piperazinyl)-1,2-diaminobenzen (117)	0.33 g (1.6 mmol)
Ethyl-3-nitro-4-aminobenzimidat-Hydrochlorid (119)	0.483 g (2.3 mmol)

Versuchsvorschrift

Eine Mischung von 0.33 g (1.6 mmol) 4-(4-Methyl-1-piperazinyl)-1,2-diaminobenzen und 0.483 g (2.3 mmol) Ethyl-3-nitro-4-aminobenzimidathydrochlorid wird in 4 ml Eisessig gelöst und 2h bei 100°C unter Rückfluss erhitzt. Die überschüssige Essigsäure wird unter Vakuum vollständig entfernt und der Rest in 5 ml heißem Wasser gelöst, eventuell unlösliche Bestandteile werden abfiltriert. Der nach Zugabe von Ammoniak gebildete Niederschlag wird in einer Mischung aus 2 ml 2N-Essigsäure und 0.5 ml Methanol gelöst; nicht lösliche Bestandteile werden abfiltriert und verworfen. Nach Zugabe von wässriger Ammoniaklösung fällt das Produkt aus, wird abfiltriert und bedarf keiner weiteren Aufarbeitung.

Ausbeute: 0.474 g (90%)

Literaturausbeute: 89%

Analytik

Schmp.: 181 °C

Berechnete Masse: 352.39 für C₁₈H₂₀N₆O₂

¹H-NMR (DMSO-d₆, 500 MHz): δ = 2.22 (s, 3H, N-CH₃), 3.08 (t, 4H, -2'-CH₂- und 6'-CH₂-), 6.58 (d, 1H, Ar-H), 6.93-6.86 (m, 1H, 4-C_{Ar}-H und 7-C_{Aromat}-H, ³J = 9.15 Hz und 8.51 Hz), 7.13 (d, 1H, 5-C_{Aromat}-H, ³J = 9.15 Hz), 7.43 (d, 1H, 3''-C_{Aromat}-H, ³J = 8.83 Hz), 7.71 (s, 2H, Ar-NH₂), 8.13 (d, 1H, 6''-C_{Aromat}-H, ³J = 8.83 Hz), 8.75 (s, 1H, 2''-C_{Aromat}-H), 12.58 (s, 1H, 1-NH).

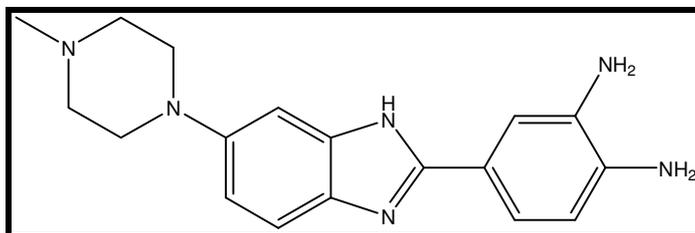
¹³C-NMR (DMSO-d₆, 125 MHz): δ = 45.9 (s, 1C, N-CH₃), 49.87 und 50.35 (2s, 2C, 2'-CH₂- und 6'-CH₂-), 54.98 und 55.05 (2s, 2C, 3'-CH₂- und 5'-CH₂-), 105.1 (s, 1C, 7-C_{Aromat}), 113.4 (s, 1C, 4-C_{Aromat}), 118.1 (s, 1C, 5-C_{Aromat}), 118.6 (s, 1C, 5''-C_{Aromat}), 119.9 (s, 1C, 1''-C_{Aromat}), 123.15 (s, 1C, 2''-C_{Aromat}), 129.39 (s, 1C, 3a-C_{Aromat}), 133.4 (s, 1C, 6''-C_{Aromat}), 135.95 (s, 1C, 4''-C_{Aromat}), 138.0 (s, 1C, 7a-C_{Aromat}), 144.78 (s, 1C, 4''-C_{Aromat}), 146.9 (s, 1C, 6-C_{Aromat}), 150.2 (s, 1C, 2-C).

Die analytischen Daten stimmen mit der Literatur überein.¹⁵⁹

2-(3,4-Diaminophenyl)-6-(4-methyl-1-piperazinyl)benzimidazol

(121)¹⁵⁹

Struktur



Substanzeigenschaften

Schwach braun-roter Feststoff, löslich in Ethanol, Methanol

Ansatz

2-(3-Nitro-4-aminophenyl)-6-(4-methyl-1-piperazinyl)benzimidazol (120)	0.6 g (1.7 mmol)
5% Palladium auf Aktivkohle	0.365 g

Versuchsvorschrift

0.6 g (1.7 mmol) 2-(3-Nitro-4-aminophenyl)-6-(4-methyl-1-piperazinyl)benzimidazol (**120**) werden in 30 ml Ethanol suspendiert. Nach Zugabe des Katalysators wird unter einer Wasserstoffatmosphäre unter Normaldruck und bei Raumtemperatur unter starkem Rühren 4 h hydriert. Der Katalysator wird abfiltriert und das Filtrat im Vakuum eingeengt.

Ausbeute: 540 mg (98.5%)

Literaturausbeute: 94 %

Analytik

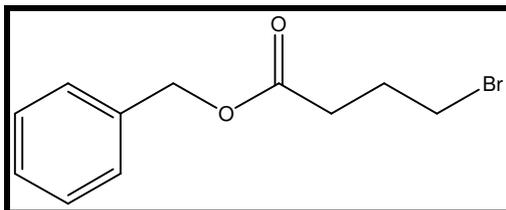
Schmp.: 258 °C

Berechnete Masse: 322.40 für C₁₈H₂₂N₆

¹H-NMR (DMSO-d₆, 500 MHz): δ = 2.23 (s, 3H, N-CH₃), 2.48 (t, 4H, -CH₂- und -CH₂-), 4.60 (bs, 2H, Ar-NH₂), 4.85 (bs, 2H, Ar-NH₂), 6.58 (d, 1H, Ar-H), 6.82 (dd, 1H, Ar-H), 6.84 (d, 1H, Ar-H), 7.13 (d, 1H, Ar-H), 7.32 (s, 1H, Ar-H), 12.01 (s, 1H, NH).

¹³C-NMR (DMSO-d₆, 125 MHz): δ = 45.88 (s, 1C, N-CH₃), 50.29 (s, 2C, 2'-C und 6'-C), 55.04 (s, 2C, 3'-C und 5'-C), 112.6 (s, 1C, Ar-C), 113.1 (s, 1C, Ar-C), 116.2 (s, 1C, Ar-C), 119.4 (s, 1C, Ar-C), 134.7 (s, 1C, 4''-C), 137.16 (s, 1C, 3''-C), 147.3 (s, 1C, 2-C).

Die analytischen Daten stimmen mit der Literatur überein.¹⁵⁹

Benzyl-4-brombutyrat (124)¹⁷⁰StrukturSubstanzeigenschaften

Farbloses Öl, mischbar mit Dichlormethan, nicht mischbar mit Wasser.

Ansatz

4-Brombuttersäurechlorid	3.32 g (17.8 mmol)
Benzylalkohol	2.9 g (26.9 mmol)
Triethylamin	3.6 g (35.9 mmol)

Versuchsvorschrift

3.32 g (17.8 mmol) 4-Brombuttersäurechlorid wird in 10 ml trockenem Dichlormethan gelöst. Die Lösung wird unter ständigem Rühren und unter Eiskühlung tropfenweise zu einer Mischung aus 2.9 g (26.9 mmol) Benzylalkohol, 3.6 g Triethylamin (35.9 mmol) und 30 ml trockenem Dichlormethan gegeben. Es wird 4 h unter Eiskühlung gerührt. Anschließend wird das Reaktionsgemisch in 200 ml Wasser gegeben. Die Organische Phase wird abgetrennt und dreimal mit 30 ml gesättigter Natriumchlorid-Lösung gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wird unter Vakuum abgezogen und der Rest auf Kieselgel 60 aufgetragen und mit Ethylacetat: Petrolether (1:1) eluiert.

Ausbeute: 2.56 g (56 %)

Literaturausbeute.: 91 %¹⁷⁰

Analytik

Berechnete Masse: 257.12 für C₁₁H₁₃BrO₂

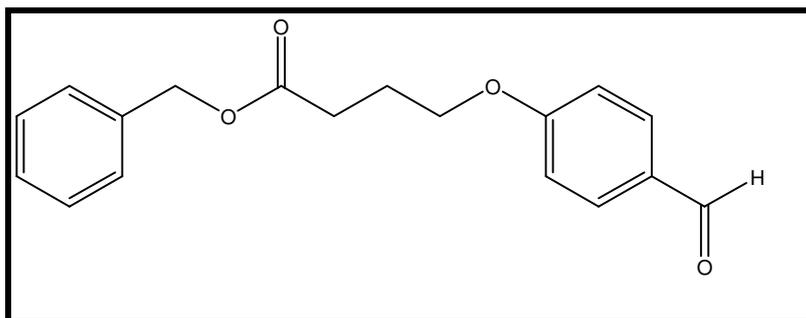
¹H-NMR (CDCl₃, 500 MHz): δ = 2.17 (m, 2H, 3-CH₂-), 2.54 (t, 2H, 2-CH₂-), 3.44 (t, 2H, 4-CH₂-), 5.11 (s, 2H, Ar-CH₂-O-R), 7.27-7.37 (m, 5H, Ar-H).

^{13}C -NMR (CDCl_3 , 125 MHz): $\delta = 27.63$ (s, 1C, 2- CH_2^-), 32.4 (s, 1C, 3- CH_2^-), 32.6 (s, 1C, 4- CH_2^-), 66.3 (s, 1C, Ar- $\text{CH}_2\text{-O-R}$), 128.12-128.57 (5s, 5C, 2'- C_{Aromat} bis 6'- C_{Aromat}), 135.8 (s, 1C, 1'- C_{Aromat}), 172.3 (s, 1C, R- COOR).

Die analytischen Daten stimmen mit der Literatur überein¹⁷⁰

Benzyl-4-(4-Formylphenoxy)butanoat (126)¹⁵⁸

Struktur



Substanzeigenschaften

Schwach gelb Öl, löslich in Dichlormethan, unlöslich in Wasser.

Ansatz

4-Hydroxabenzaldehyd	1.3 g (10.6 mmol)
Benzyl-4-brombutyrat (124)	3 g (11.67 mmol)
Caesiumcarbonat	4.17 g (12.84 mmol)

Versuchsvorschrift

1.3 g (10.6 mmol) 4-Hydroxybenzaldehyd und 3 g (11.67 mmol) Benzyl-4-brombutyrat (**124**) werden in 21 ml trockenem Dimethylacetamid gelöst. Nach Zugabe von 4.17 g (12.84 mmol) Caesiumcarbonat wird 15 h bei 100°C erhitzt. Das Reaktionsgemisch wird auf Raumtemperatur abgekühlt und die unlöslichen Bestandteile werden abfiltriert. Das Lösungsmittel wird unter Vakuum vollständig entfernt. Der Rest wird in 100 ml trockenem Dichlormethan gelöst, eventuell unlösliche Bestandteile werden abfiltriert. Die Lösung wird dreimal mit jeweils 40 ml Wasser und je zweimal mit 40 ml 2N- Natriumhydroxidlösung und einmal mit 40 ml gesättigter Natriumchloridlösung ausgeschüttelt. Die organische Phase wird über Natriumsulfat getrocknet, mit Aktivkohle versetzt und anschließend filtriert. Das Lösungsmittel wird unter Vakuum abgezogen und der Rückstand im Exsikkator getrocknet.

Ausbeute: 1.88 g (66 %)

Literaturausbeute: 98 %

Analytik

Berechnete Masse: 270.32 für C₁₈H₁₈O₄

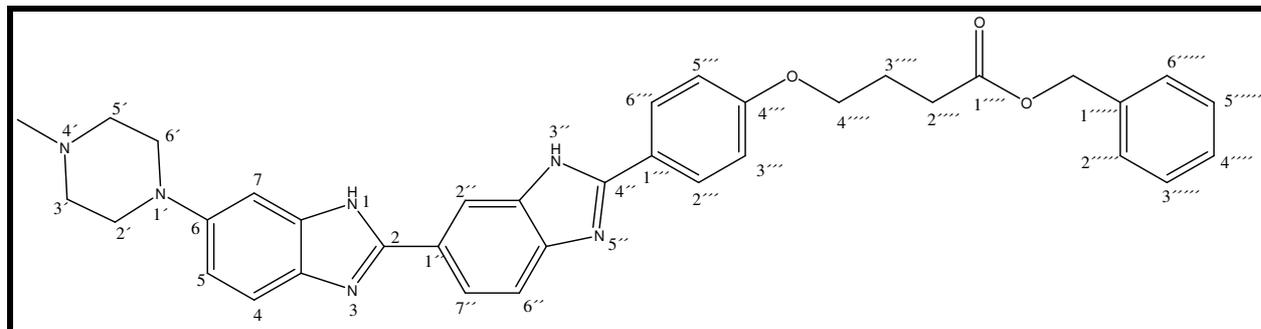
¹H-NMR (CDCl₃, 500 MHz): δ = 2.14 (m, 2H, 3-CH₂-), 2.57 (t, 2H, 2-CH₂-), 4.07 (t, 2H, 4-CH₂-), 5.12 (s, 2H, Ar-CH₂-OR), 6.94 (dd, 2H, 3''-C_{Aromat}-H und 5''-C_{Aromat}-H), 7.28-7.35 (m, 5H, 2'-C_{Aromat}-H bis 6'-C_{Aromat}-H), 7.80 (dd, 2H, 2''-C_{Aromat}-H und 6'-C_{Aromat}-H), 9.85 (s, 1H, CHO).

¹³C-NMR (CDCl₃, 125 MHz): δ = 24,4 (s, 1C, 3-CH₂-), 30.6 (s, 1C, 2-CH₂-), 66.4 (s, 1C, 4-CH₂-), 67.0 (s, 1C, Ar-CH₂-O-R), 126-129.98 (10s, 10C, Ar-C), 163.81 (s, 1C, 1''-C_{Aromat}), 172.77 (s, 1C, ROCOOR), 190.7 (s, 1C, Ar-CHO).

Die analytischen Daten stimmen mit der Literatur überein¹⁵⁸

Benzyl-4-(4-(5-(4-methylpiperazin-1-yl)-2,5'-bis(3H-benzo[d]imidazol)2-yl)phenoxy)butanoat (127)

Struktur



Substanzeigenschaften

Weiß-gelbes Pulver, leicht löslich in Methanol, unlöslich in Dichlormethan und Wasser.

Methode AAnsatz

Benzyl-4-(4-formylphenoxy)butanoat (126)	0.501 g (1.67 mmol)
2-(3,4-Diaminophenyl)-6-(4-methyl-1-piperazinyl)benzimidazol (121)	0.540 g (1.67 mmol)

Versuchsvorschrift

Eine Mischung aus 0.501 g (1.67 mmol) Benzyl-4-(4-formylphenoxy)butanoat (**126**) und 0.540 g (1.67 mmol) 2-(3,4-Diaminophenyl)-6-(4-methyl-1-piperazinyl)benzimidazol (**121**) wird in 17 ml Nitrobenzol bei 130 °C für 24 h unter Rückfluss erhitzt. Die Lösung wird auf Raumtemperatur abgekühlt, durch Zugabe von Hexan wird das Rohprodukt ausgefällt. Nach Filtration wird die Substanz in etwas mobiler Phase suspendiert und auf Kieselgel aufgezogen. Eluiert wird das Produkt mit Hilfe einer Flashchromatographie mit dem Eluenten Ethylacetat: Methanol (9:1), das 0.1 % Triethylamin enthält.

Ausbeute: 0.3 g (30 %)

Literaturausbeute: 87%

Methode BAnsatz

Benzyl-4-(4-formylphenoxy)butanoat (126)	0.183 g (0.61 mmol)
2-(3,4-Diaminophenyl)-6-(4-methyl-1-piperazinyl)benzimidazol (121)	0.2 g (0.61 mmol)

Versuchsvorschrift

Eine Mischung aus 0.183 g (0.61 mmol) Benzyl-4-(4-formylphenoxy)butanoat (**126**) und 0.2 g (0.61 mmol) 2-(3,4-Diaminophenyl)-6-(4-methyl-1-piperazinyl)benzimidazol (**121**) wird in 10 ml Ethanol bei 80 °C für 7 h unter Rückfluss erhitzt. Das Lösungsmittel wird unter vermindertem Druck abgezogen und das Rohprodukt in Dichlormethan gelöst. Durch tropfenweise Zugabe von Petrolether wird das Produkt gefällt, abfiltriert und getrocknet.

Ausbeute: 0.17 g (47%)

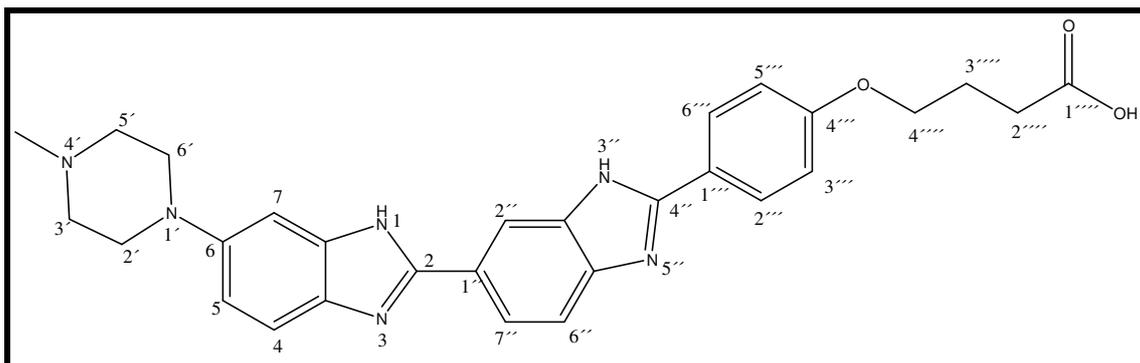
AnalytikSchmp.: 180 °C_{Zersetz.}Berechnete Masse: 600.28 für C₃₆H₃₆N₆O₃MS (ESI): 601.5 [M+H]⁺

¹H-NMR (DMSO-d₆, 500 MHz): δ = 2.04 (m, 2H, 3''''-CH₂-), 2.53-2.57 (m, 6H, 3'-CH₂- und 5'-CH₂- und 2''''-CH₂-), 3.13 (t, 4H, 2'-CH₂- und 6'-CH₂-), 4.09 (t, 2H, 4''''-CH₂-), 5.11 (s, 2H, Ar-CH₂-O), 6.91 (d, 1H, 5-C_{Aromat}-H), 7.10 (d, 2H, 3'''-C_{Aromat}-H und 5'''-C_{Aromat}-H), 7.30 bis 7.36 (m, 5H, 2''''-C_{Aromat}-H bis 6''''-C_{Aromat}-H), 7.59, 7.97, 8.43 (d, 3H, C_{Aromat}-H), 8.13 (d, 2H, 2'''-C_{Aromat}-H und 6'''-C_{Aromat}-H), 12.53 (s, 1H, NH), 12.90 (s, 1H, NH).

¹³C-NMR (DMSO-d₆, 125 MHz): δ = 24.34 (s, 1C, 2''''-CH₂-), 30.3 (s, 1C, 3''''-CH₂-), 45.74 (s, 1C, N-CH₃), 49.96 (s, 2C, 2'-CH₂- und 5-CH₂-), 54.92 (s, 2C, 3'-CH₂ und 5'-CH₂-), 65.65 (s, 1C, 1''''-CH₂-), 66.88 (s, 1C, O-CH₂-Ar), 111.50 (s, 1C, 7-C_{Aromat}), 115.0 (s, 2C, 3'''-C_{Aromat} und 5'''-C_{Aromat}), 128.09 bis 128.55 (5s, 7C, 2'''-C_{Aromat} und 6'''-CH₂- und 2''''-C_{Aromat} bis 6''''-C_{Aromat}), 117.75 (s, 1C, C_{Aromat}), 120.47 (s, 1C, C_{Aromat}), 121.20 (s, 1C, C_{Aromat}), 122.57 (s, 1C, C_{Aromat}), 124.70 (s, 1C, C_{Aromat}), 124.42 (s, 1C, C_{Aromat}), 128.09 bis 128.55 (5s, 7C, 2'''-C_{Aromat} und 6'''-CH₂- und 2''''-C_{Aromat} bis 6''''-C_{Aromat}), 135.45 (s, 1C, C_{Aromat}), 136.45 (s, 1C, C_{Aromat}), 144.28 (s, 1C, 1''''-C_{Aromat}), 145.15 (s, 1C, 6-C_{Aromat}), 152.75 (s, 1C, 2-C_{Aromat}), 153.02 (s, 1C, 4''-C_{Aromat}), 160.16 (s, 1C, 4'''-C_{Aromat}), 172.54 (s, 1C, RCOOR).

Die analytischen Daten stimmen mit der Literatur überein¹⁵⁸

4-(4-(5-(4-Methylpiperazin-1-yl)-2,5'-bis(3H-benzo[d]imidazol)-2'-yl)phenoxy)butansäure (113)¹⁵⁸

Struktur

Substanzeigenschaften

Weiß-gelbes Pulver, leicht löslich in Alkoholen und Alkohol-Wasser Gemischen, unlöslich in Dichlormethan.

Ansatz

Benzyl-4-(4-(5-(4-methylpiperazin-1-yl)-2,5'-bis(3H-benzo[d]imidazol)2-yl)phenoxy)butanoat (**127**) 0.279 g (0.465 mmol)

Versuchsvorschrift

0.279 g (0.465 mmol) Benzyl-4-(4-(5-(4-methylpiperazin-1-yl)-2,5'-bis(3H-benzo[d]imidazol)2-yl)phenoxy)butanoat (**127**) werden in 10 ml verdünnter Natronlauge suspendiert und nach Zugabe von 5 Plättchen festem Natriumhydroxid 12 h bei Raumtemperatur gerührt. Die wässrige Phase wird dreimal mit Dichlormethan ausgeschüttelt und anschließend durch Gefriertrocknung vom Lösungsmittel befreit. Das Rohprodukt wird mit 10 ml Methanol versetzt, eventuell unlösliche Bestandteile werden abfiltriert. Das Methanol wird unter vermindertem Druck abgezogen und man erhält das reine Produkt.

Ausbeute: 0.085 g (36 %)

Analytik

Schmp.: 226_{Zersetz.}

Berechnete Masse: 510.4 für C₂₉H₃₀N₆O₃

MS (ESI): 509.4 [M-H]⁻

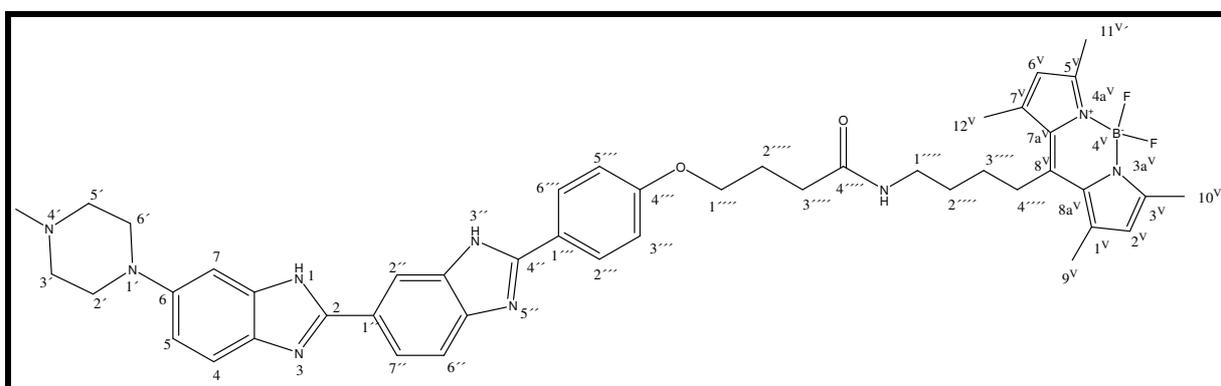
¹H-NMR (DMSO-d₆, 500 MHz): δ = 1.91 (m, 2H, 3''''-CH₂-), 2.07 (t, 2H, 2''''-CH₂-), 2.23 (s, 3H, N-CH₃), 3.11 (t, 4H, 2'-CH₂- und 6'-CH₂-), 4.05 (t, 2H, 4''''-CH₂-), 6.88 (dd, 1H, 5-C_{Aromat}-H), 6.99 (s, 1H, 7-C_{Aromat}-H), (d, 2H, 3''-C_{Aromat}-H' und 5''''-C_{Aromat}-H, ³J = 8.82 Hz), 7.40 (d, 1H 7''-C_{Aromat}-H, ³J = 8.52 Hz), 7.56 (dd, 1H, 6''-C_{Aromat}-H, ³J = 8.52 Hz), 7.86 (s, 1H, 4-C_{Aromat}-H), 8.17 (d, 2H, 2'''-C_{Aromat}-H und 6'''-C_{Aromat}-H, ³J = 8.82 Hz), 8.23 (d, 1H 2''-C_{Aromat}-H).

¹³C-NMR (DMSO-d₆, 125 MHz): δ = 26.33 (s, 1C, 2''''-CH₂-), 34.30 (s, 1C, 3''''-CH₂-), 45.92 (s, 1C, N-CH₃), 50.24 (s, 2C, 2'-CH₂- und 6'-CH₂-), 55.06 (s, 2C,

5'-CH₂- und 3'-CH₂-), 68.22 (s, 1C, 1''''-CH₂-), 112.92, 113.35, 114.54, 115.36 (s, 2C, 3'''-C_{Aromat}-H und 5'''-C_{Aromat}-H), 116.53, 119.35, 122.83, 128.27 (s, 2C, 2'''-C_{Aromat} und 6'''-C_{Aromat}), 139.34, 141.97, 142.46, 147.51, 152.68, 159.83 (s, 1C, 4''''-C_{Aromat}), 176.04 (s, 1C, RCOOR).

4-(4-(5-(4-Methylpiperazin-1-yl)-2,5'-bi(3H-benzo[d]imidazol)-2'-yl)phenoxy)-N-[4-(4,4-difluoro-1,3,5,7-tetra-methyl-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacen-8-yl)butyl] butansäureamid (128)

Struktur



Substanzeigenschaften

roter Feststoff

Ansatz

4-(4-(5-(4-Methylpiperazin-1-yl)-2,5'-bi(3H-benzo[d]imidazol)-2'-yl)phenoxy)butansäure (**113**) 0.096 g (0.156 mmol)
 Chlorameisensäureisobutylester 21 µl (0.156 mmol)
 N-Methylmorpholin 19 µl (0.171 mmol)
 8-(4-Aminobutyl)-4,4-difluoro-1,3,5,7-tetramethyl-4-bora-3a,4a-s-indacen (**31**) 0.053 g (0.156 mmol)

Versuchsvorschrift

0.096 g (0.156 mmol) 4-(4-(5-(4-Methylpiperazin-1-yl)-2,5'-bi(3H-benzo[d]imidazol)-2'-yl)phenoxy)butansäure (**113**) werden in 5 ml trockenem Dimethylformamid suspendiert und mit 19 µl (0.171 mmol) N-Methylformamid versetzt. Nach 5 minütigem Rühren bei Raumtemperatur, wird der Ansatz auf -22°C gekühlt und mit 21 µl (0.156 mmol) Chlorameisensäureisobutylester versetzt. Der Ansatz wird 15 Minuten gerührt, wobei die Temperatur bei -22°C gehalten wird. Anschließend wird

0.053 g (0.156 mmol) 8-(4-Aminobutyl)-4,4-difluoro-1,3,5,7-tetramethyl-4-bora-3a,4a-s-indacen (**31**) hinzu gegeben und 12 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wird vollständig entfernt und das Rohprodukt in 20 ml mobiler Phase suspendiert und auf Kieselgel aufgezogen. Nachdem die Lösungsmittel abgezogen wurden, wird das Rohprodukt–Kieselgel Gemisch auf eine mit Kieselgel gepackte Säule aufgetragen und mit einem Gemisch aus Dichlormethan: Methanol (9:1), das 2% Triethylamin enthält langsam und vorsichtig eluiert.

Ausbeute: 0.008 g (7%)

Analytik

Berechnete Masse 811.80 für $C_{46}H_{52}BF_2N_9O_2$

MS (ESI) 812.8.4 [M-H]⁻

Reinheit

LC-MS

Säule Luna RP-C₁₈, 3 µm, Firma *Phenomenex*[®]

Puffer 2 mmol Ammoniumacetat

Eluent Gradient von Wasser: Methanol 9:1 auf 100% Methanol
innerhalb von 20 min

Detektion UV (254 nm)

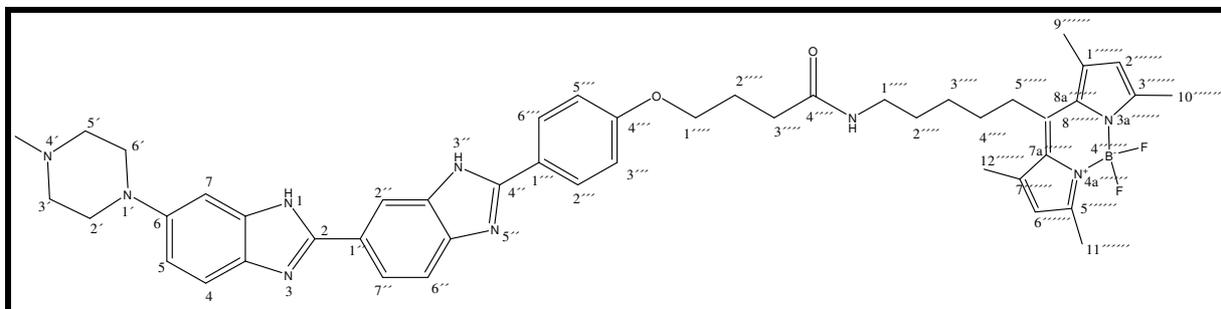
Injektion 1 mg /1 ml

Retentionzeit 22.36 min

Reinheit 93 %

4-(4-(5-(4-Methylpiperazin-1-yl)-2,5'-bis(3H-benzo[d]imidazol)-2'-yl)phenoxy)-N-[5-(4,4-difluoro-1,3,5,7-tetra-methyl-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacen-8-yl)pentyl]butansäureamid (129)

Struktur



Substanzeigenschaften

roter Feststoff

Ansatz

4-(4-(5-(4-Methylpiperazin-1-yl)-2,5'-bis(3H-benzo[d]imidazol)-2'-yl)phenoxy)butansäure (**113**) 0.173 g (0.28 mmol)
 (2-(7-Aza-1H-benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium (HCTU) 0.115 g (0.28 mmol)
 1-Hydroxybenzotriazol (HOBT) 0.037 g (0.28 mmol)
 Diisopropylethylamin (DIPEA) 51 µl (0.308 mmol)
 8-(5-Aminopentyl)-4,4-difluoro-1,3,5,7-tetramethyl-4-bora-3a,4a-s-indacen (**32**) 0.094 g (0.28 mmol)

Versuchsvorschrift

Unter Aargonatmosphäre werden 0.173 g (0.28 mmol) 4-(4-(5-(4-Methylpiperazin-1-yl)-2,5'-bis(3H-benzo[d]imidazol)-2'-yl)phenoxy)butansäure (**113**), 0.115 g (0.28 mmol) HCTU und 0.037 g (0.28 mmol) HOBT in 5 ml trockenem Dimethylformamid suspendiert. Nach Zugabe von 51 µl DIPEA wird ein Minute gerührt und anschließend mit 0.094 g (0.28 mmol) 8-(5-Aminopentyl)-4,4-difluoro-1,3,5,7-tetramethyl-4-bora-3a,4a-s-indacen (**32**), welches in 2 ml Dimethylformamid gelöst wurde, versetzt. Die Lösung wird 36 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wird vollständig entfernt und das Rohprodukt in 10 ml mobiler Phase suspendiert und auf Kieselgel aufgezogen. Nachdem die Lösungsmittel abgezogen wurden, wird das Rohprodukt-Kieselgel Gemisch auf eine mit Kieselgel gepackte

Säule aufgetragen und mit einem Gemisch aus Dichlormethan; Methanol (9:1), das 2% Triethylamin enthält langsam und vorsichtig eluiert.

Ausbeute: 0.028 g (12 %)

Analytik

Berechnete Masse 825.80 für $C_{47}H_{54}BF_2N_9O_2$

MS (ESI) 824.5 [M-H]⁻

¹H-NMR (DMSO-d₆, 500 MHz): δ = 1.47-1.55 (m, 8H, 2''''''-CH₂- bis 5''''''-CH₂-), 1.98 (m, 2H, 2''''-CH₂-), 2.25 (t, 2H, 3''''-CH₂-), 2.27 (s, 3H, N-CH₃), 2.36 (s, 6H, 9''''''-CH₃ and 12''''''-CH₃), 2.38 (s, 6H, 10''''''-CH₃ and 11''''''-CH₃), 4.07 (t, 2H, 4''''-CH₂-), 6.15 (s, 2H, 6''''''CH und 2''''''CH), 6.93 (d, 1H, 5-C_{Aromat}-H), 7.11 (m, 3H, 3''-C_{Aromat}-H und 5''-C_{Aromat}-H und 7-C_{Aromat}-H), 7.23 (d, 1H 7''- C_{Aromat}-H, ³J = 8.52 Hz), 7.32 (dd, 1H, 6''- C_{Aromat}-H, ³J = 8.52 Hz), 7.49 (s, 1H, 2''-C_{Aromat}-H), 7.56 (d, 1H, 4-C_{Aromat}-H), 7.83 (t, 1H, CONH-R), 8.15 (d, 2H, 2'''- C_{Aromat}-H und 6''''-C_{Aromat}-H).

Spektroskopische Daten

UV-Absorption (DMSO) λ_{max}: 470 nm

Fluoreszenzemission (DMSO) λ_{max}: 518 nm

Reinheit

LC-MS

Säule Luna RP-C₁₈, 3 μm, Firma *Phenomenex*[®]

Puffer 2 mmol Ammoniumacetat

Eluent Gradient von Wasser: Methanol 9:1 auf 100% Methanol innerhalb von 20 min

Detektion UV (254 nm)

Injektion 1 mg /1 ml

Retentionzeit 22.36 min

Reinheit 86%

10. Literaturverzeichnis

- ¹http://www.blacklite.com/Technical/history_of_fluorescence.htm
- ²http://laxmi.nuc.ucla.edu:8248/M248_99/synprob/part1/history.html
- ³http://www.cladonia.co.uk/index.php?option=com_content&task=view&id=313&Itemid=116
- ⁴Schwedt, G. Fluorimetrische Analyse, *Verlag Chemie* **1981**.
- ⁵<http://www-user.tu-chemnitz.de/~awill/diplom/LIF.html>
- ⁶Brandl, H.; Weiß, D.; Täuscher, E. Praxis der Naturwissenschaften-Chemie. **2004**, 3/53 2-4
- ⁷Kanaoka, Y. Organische Fluoreszenzreagentien für die Untersuchung von Enzymen und Proteinen. *Angew. Chem.* **1977**, 89, 142-152.
- ⁸Lakowicz, J. R. Principles of Fluorescence Spectroscopy. Plenum Press **1983**
- ⁹Selinger, K. A.; Falnes, J.; Sikkeland, T. Fluorescence lifetime studies of rhodamine 6G in methanol. *J. Phys. Chem.* **1977**, 81, 1960-1963.
- ¹⁰Rosenthal, I. Photochemical stability of rhodamine 6G in solution. *Opt. Comm.* **1978**, 24 (2), 164-166.
- ¹¹Panchuk-Voloshina, N.; Haugland, R. P.; Bishop-Stewart, J.; Bhargava, M. K.; Millard, P. J.; Mao, F.; Leung, W.-Y.; Haugland, R. P. Alexa Dyes, a Series of new fluorescent dyes that yield exceptionally bright, photostable conjugates. *J. Histochem. Cytochem.* **1999**, 47 (9), 1179-1188.
- ¹²Benchaib, M.; Delorme, R.; Pluvinage, M.; Bryon, P. A.; Souchier, C. Evaluation of five green fluorescence-emitting streptavidin-conjugated fluorochromes for use in immunofluorescence microscopy. *Histochem. Cell Biol.* **1996**, 106(2), 253-256.
- ¹³Ravdin, P.; Axelrod, D. Fluorescent tetramethyl rhodamine derivatives of α -bungarotoxin: preparation, separation, and characterization. *Anal. Biochem.* **1977**, 80(2), 585-592.
- ¹⁴Valdes-Aguilera, O.; Neckers, D. C. Aggregation phenomena in xanthene dyes. *Acc. Chem. Res.* **1989**, 22(5), 171-177.
- ¹⁵Mujumdar, R. B.; Ernst, L. A.; Mukjundar, S. R.; Lewis, J. L.; Waggoner, A. S. Cyanine dye labelling reagents: sulfoindocyanine succinimidyl esters. *Bioconjug. Chem.* **1993**, 4(2), 105-111.
- ¹⁶Wessendorf, M. W.; Brelje, T. C. Which Fluorophore is brightest? A comparison of the staining obtained using Fluorescein, tetramethylrhodamine, lissamine rhodamine, texas red, and cyanine 3.18. *Histochem.* **1992**, 98, 81-85.
- ¹⁷Haugland, R. P. The Handbook — A Guide to Fluorescent Probes and Labeling Technologies, Molecular Probes, Section 1.3-Alexa fluor dyes spanning the visible and infrared spectrum.
- ¹⁸Waddell, J. Lecture experiments. *J. Chem. Soc.* **1898**, 77, 131 and Waddell, J. Indicators. *J. Phys. Chem.* **1898**, 2 (3), 171-184.
- ¹⁹Fisher, N. I.; Hamer, F. M. General method for the preparation of thiocyanine dyes. Some simple thiocarbocyanines. *J. Chem. Soc.* **1930**, 2502-2510 and Hamer, F. M. Attempts to prepare cyanide dyes from quaternary salts of 2-methylacacenaphthopyridine and of 5-methylacridine. *J. Chem. Soc.* **1930**, 995-1003.
- ²⁰Ernst, L. A.; Gupta, R. K.; Mujumdar, R. B.; Waggoner, A. S. Cyanine Dye labeling reagents for sulfhydryl groups. *Cytometry* **1989**, 10, 3-10.
- ²¹Mujumdar, R. B.; Ernst, L. A.; Mukjundar, S. R.; Lewis, J.L.; Waggoner, A.S., Cyanine dye labeling reagents containing isothiocyanate groups. *Cytometry* **1989**, 10, 11-19.
- ²²Effenberger, F.; Schlosser, H.; Baeuerle, P.; Maier, S.; Port, H.; Wolf, H. C. Syntheses and optical properties of terminally substituted conjugated polyenes. *Angew. Chem.* **1988**, 100, 274-7.
- ²³Mujumdar, S. R.; Mujumdar, R. B.; Grant, C. M.; Waggoner, A. S. Cyanine-labeling reagents: sulfoindocyanine succinimidyl esters. *Bioconjug. Chem.* **1996**, 7, 356-362.
- ²⁴Narayanan, N.; Patonay, G. A new method for the synthesis of heptamethine cyanine dyes: synthesis of new near-infrared fluorescent labels. *J. Org. Chem.* **1995**, 60, 2391-2395.
- ²⁵Ceresole, M; Production of new red coloring matter, *US 377350* **1888** and Ceresole, M. Rhodamine dye. *US 516588* **1894**.
- ²⁶Mueller, C. O. Rhodamine dye. *US* **1897**.
- ²⁷MacNulty, J.; Woollard, L. D. The use of Rhodamine B in analytical chemistry. *Ann. Chim. Acta* **1955**, 13, 64-71.
- ²⁸Ravdin, P.; Axelrod, D. Fluorescent tetramethylrhodamine derivatives of α -bungarotoxin: preparation, separation, and characterization. *Anal. Biochem.* **1977**, 80, 585-592.
- ²⁹Haugland, R. P. The Handbook — A Guide to Fluorescent Probes and Labeling Technologies, Molecular Probes, Section 1.6-Long-Wavelength rhodamines, texas red dyes and QSY quenchers.
- ³⁰Drexhage, K. H. Structure and properties of laser dyes. *Top. Appl. Phys. Vol.1* **1990**, 144-193.

- ³¹Abrams, M. J.; Picker, D. H.; Fackler, P. H.; Lock, C. J. L.; Howard-Lock, H. E.; Faggiani, R.; Teider, B. A.; Richmond, R. C. Synthesis and structure of [Rhodamine 123]₂PtCl₄·3H₂O: The first tetrachloroplatinate (II) salt with anticancer activity. *Inorg. Chem.* **1986**, 25, 3980-3983.
- ³²Lefevre, C.; Kang, H. C.; Haugland, R. P.; Malekzadeh, N.; Arttamangkul, S.; Haugland, R. P. Texas Red-X and Rhodamine Red-X, new derivatives of sulforhodamine 101 and Lissamine Rhodamine B with improved labelling and fluorescence properties. *Bioconjug. Chem.* **1996**, 7, 482-489.
- ³³Beaumont, P. C.; Johnson, D. G.; Parsons, B. J. Photophysical properties of laser dyes: Picosecond laser flash photolysis studies of Rhodamine 6G, Rhodamine B and Rhodamine 101. *J. Chem. Soc. Faraday Trans.* **1993**, 89, 4185-4191.
- ³⁴Leytus, S. P.; Melhado, L. L.; Mangel, W. F. Rhodamine-based compounds as fluorogenic substrates for serine proteinases. *J. Biochem.* **1983**, 209, 299-307.
- ³⁵Adamczyk, M.; Grote, J. Efficient synthesis of rhodamine conjugates through the 2'-position. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2000**, 10, 1539-1541.
- ³⁶Rosenthal, I. Photochemical Stability of rhodamine 6G in Solution. *Optics Comm.* **1978**, 24, 164-166.
- ³⁷Selanger, K. A.; Falnes, J.; Sikkeland, T. Fluorescence Lifetime Studies of Rhodamine 6G in Methanol. *J. Phys. Chem.* **1960**, 81, 1960-1963.
- ³⁸Vogel, A. *Gilbert's Am. Phys.* **1820**, 64, 161.
- ³⁹von Werder *Merck's Jahresberichte* **1936**, 50, 88.
- ⁴⁰Bose, P.K. *J. Indian Chem. Soc.* **1958**, 35, 367.
- ⁴¹Wheelock, C. E. The fluorescence of some coumarins. *J. Am. Chem. Soc.* **1959**, 81, 1348-1352.
- ⁴²Haugland, R. P. The Handbook — A Guide to Fluorescent Probes and Labeling Technologies, Molecular Probes, Section 1.7-Coumarins, Pyrenes and other ultraviolet light-excitable fluorophores.
- ⁴³Murray, R. D. H. Coumarins. *Nat. Prod. Rep.* **1995**, 12, 477-505.
- ⁴⁴Trkovnik, M.; Ivezic, Z. Syntheses of some new coumarin-quinolone carboxylic acids. *J. Heterocyclic Chem.* **2000**, 37, 137-141.
- ⁴⁵Borges, F.; Roleira, F.; Milhazes, N.; Santana, L.; Uriarte, E. Simple Coumarins and analogues in medicinal chemistry: occurrence, synthesis and biological activity. *Curr. Med. Chem.* **2005**, 12, 887-916.
- ⁴⁷Murata, C.; Masuda, T.; Kamochi, Y.; Todoroki, K.; Yoshida, H.; Nohta, H.; Yamaguchi, M.; Takadate, A. Improvement of fluorescence characteristics of coumarins: Syntheses and fluorescence properties of 6-methoxycoumarin and benzocoumarin derivatives as novel fluorophores emitting in the longer wavelength region and their application to analytical reagents. *Chem. Pharm. Bull.* **2005**, 53, 750-758.
- ⁴⁸Hammond, P. R.; Fletcher, A. N.; Henry, R. A.; Atkins, R. L. Search for efficient, near UV lasing dyes. I. Substituent effects on bicyclic dyes. *Appl. Phys.* **1975**, 8, 311-314.
- ⁴⁹Hammond, P. R.; Fletcher, A. N.; Henry, R. A.; Atkins, R. L. Search for efficient, near UV lasing dyes. II. Aza substitution in bicyclic dyes. *Appl. Phys.* **1975**, 8, 315-318.
- ⁵⁰Gee, K. R.; Haugland, R. P.; Sun, W.-C. Derivatives of 6,8-Difluoro-7-hydroxycoumarin, Brit. UK Pat. Appl. GB 2319250 **1998**
- ⁵¹Sun, W. C.; Gee, K. R.; Haugland, R. P. Synthesis of novel fluorinated Coumarines: Excellent UV-light excitable fluorescent dyes. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1998**, 8, 3107-3110.
- ⁵²Bally, O. Process of making green dyes. US 617627 **1899**.
- ⁵³Coons, A. H.; Kaplan, M. H. Localization of antigen in tissue cells. II. Improvements in a method for the detection of antigen by means of fluorescent antibody. *J. Exper. Med.* **1950**, 91, 1-13.
- ⁵⁴Riggs, J. L. Synthesis of fluorescent compounds and their use for labelling antibody. *Masters Thesis*, University of Kansas, 1957.
- ⁵⁵Sun, W.-C.; Gee, K. R.; Klauber, D. H.; Haugland, R. P. Synthesis of fluorinated fluoresceins. *J. Org. Chem.* **1997**, 62, 6469-6475.
- ⁵⁶Haugland, R. P. The Handbook — A Guide to Fluorescent Probes and Labeling Technologies, Molecular Probes, Section 1.5-Fluorescein, Oregon Green and Rhodamine green dyes.
- ⁵⁷von Liebig, H. Fluorescein. *J. prakt. Chem.* **1913**, 86, 472-516.
- ⁵⁸Neckers, D. C. Rose Bengal. *J. Photochem. Photobiol. Chem.* **1989**, 47, 1-29.
- ⁵⁹Linden, S. M.; Neckers, D. C. Fundamental properties of Rose Bengal. 25 Bleaching studies of Rose Bengal onium salts. *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, 110, 1257-60.
- ⁶⁰Mottram, L. F.; Boonyarattanakalin, S.; Kovel, R. E.; Peterson, B.R. The Pennsylvania green Fluorophore: A hybrid of Oregon green and Tokyo Green for the construction of hydrophobic and pH-insensitive Molecular Probes. *Org. Lett.* **2006**, 8(4), 581-584.
- ⁶¹Treibs, A.; Kreuzer, F. H. Difluoroboryl-Komplexe von Di- und Tripyrrylmethen. *Liebigs Ann. Chem.* **1968**, 718, 208-223.
- ⁶²Vos de Wael, E.; Pardoën, J. A.; van Koeveeringe, J. A.; Lugtenburg, J. Pyromethene-BF₂ complexes (4,4'-difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacenes). Synthesis and luminescence properties. *Recl. Trav. Chim. Pays-Bas* **1977**, 96, 306-309.

- ⁶³Wories, H. J.; Koek, J. H.; Lodder, G.; Lugtenburg, J. A novel water-soluble fluorescent probe: Synthesis, luminescence and biological properties of the sodium salt of the 4-sulfonato-3,3',5,5'-tetramethyl-2,2'-pyromethen-1,1'-BF₂ complex. *Recl. Trav. Chim. Pays-Bas* **1985**, 104, 288-291.
- ⁶⁴Haugland, R. P.; Kang, H. C. Chemically reactive dipyrrometheneboron difluoride dyes. *US* 4.774.339 **1988**.
- ⁶⁵Monsma, F. J.; Barton, A. C.; Kang, H. C.; Brassard, D. L.; Haugland, R. P.; Sibley, D. R. Characterization of novel fluorescent ligands with high affinity for D₁ and D₂ Dopaminergic receptors. *J. Neurochem.* **1989**, 52, 1641-1644.
- ⁶⁶Treibs, A.; Herrmann, E.; Meissner, E.; Kuhn, A. Pyrrol-Austausch-Reaktionen: Zur Konstitution der Dipyrromethene und Porphyrine. *Liebigs Ann. Chem.* **1957**, 602, 153-183.
- ⁶⁷Goubeau, J.; Zappel, A. The reactions of ethylenediamine and trimethylenediamine with trimethylborane. *Z. anorg. allg. Chem.* **1955**, 279, 38-58.
- ⁶⁸Holmquist, H. E.; Benson, R. R. 2-Bora-and 2-thia-1,3-diazaazulenes. *J. Chem. Soc.* **1962**, 84, 4720-4722.
- ⁶⁹Haugland, R. P.; Kang, H. C. Fluorescent fatty acids derived from dipyrrometheneboron difluoride dyes *US* 5.338.854 **1994**.
- ⁷⁰Wagner, R. W.; Lindsey, J. S. Boron-dipyrromethene dyes for incorporation in synthetic multi-pigment light-harvesting arrays. *Pure Appl. Chem.* **1996**, 68 (7), 1370-1380.
- ⁷¹Karolin, J.; Johansson, B.-A.; Strandberg, L.; Ny, T. Fluorescence and absorption spectroscopic properties of dipyrrometheneboron difluoride (BODIPY) derivatives in liquids, lipid membranes, and proteins. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, 116, 7801-7806.
- ⁷²Haugland, The Handbook — A Guide to Fluorescent Probes and Labeling Technologies, Molecular Probes, Section 1.4-BODIPY Dye series.
- ⁷³Prieto, J. B.; Arbeloa, F. L.; Martínéz, V. M.; Arbeloa, I. L. Theoretical study of the ground and excited electronic states of pyromethene 546 laser dye and related compounds. *Chem. Phys.* **2004**, 296, 13-22.
- ⁷⁴Chen, J.; Burghart, A.; Derecskei-Kovacs, A.; Burgess, K. 4,4-Difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene (BODIPY) dyes modified for extended conjugation and restricted bond rotations. *J. Org. Chem.* **2000**, 65, 2900-2906.
- ⁷⁵McGrath, J. C.; Arribas, S.; Daly, C. J. Fluorescent ligands for the study of receptors. *TiPS* **1996**, 17, 393-399.
- ⁷⁶Daly, C. J.; McGrath, J. C. Fluorescent ligands, antibodies, and proteins for the study of receptors. *Pharm. Therap.* **2003**, 100, 101-118.
- ⁷⁷Anderson, M. J.; Cohen, M. W. Fluorescent staining of Ach receptors. *J. Physiol.* **1974**, 237, 385-400.
- ⁷⁸http://en.wikipedia.org/wiki/Fluorescence_recovery_after_photobleaching
- ⁷⁹Wotzlaw, C.; Otto, T.; Berchner-Pfannschmidt, U.; Metzner, E.; Acker, H.; Fandrey, J. Optical analysis of the HIF-1 complex in living cells by FRET and FRAP. *FASEB Journal* **2007**, 21, 700-707.
- ⁸⁰Schroeder, J.; Bui, T. N. FRAP analysis of protein dynamics with a non-fluorescing protein. *BIOspektrum* **2006**, 12, 515-517.
- ⁸¹Freudenthal, S. Fluorophordesign und Fluoreszenzmarkierung: Synthese funktionalisierter BODIPY-Derivate und Markierung von Purinrezeptor-Liganden. *Dissertation Universität Bonn*, **2002**.
- ⁸²March, Advanced in organic chemistry. 5 Auflage, **2001**, Wiley-Interscience, New-York.
- ⁸³Hill, S. G-Protein-coupled receptors: past, present and future. *Br. J. Pharm.* **2006**, 147, 27-37
- ⁸⁴Steinsilber, Schubert-Zsilavecz, Roth. Medizinische Chemie, Targets und Arzneistoffe, **2005**, Deutscher Apothekerverlag, Stuttgart.
- ⁸⁵Ralevic, V.; Burnstock, G. Receptors for purines and pyrimidines. *Pharm. Rev.* **1998**, 50, 413-490.
- ⁸⁶Drury, A. N.; Szent-Gyorgyi, A. The physiological activity of adenine compounds with especial reference to their action upon the mammalian heart. *J. Physiol.* **1929**, 68, 213-237.
- ⁸⁷Gillespie, J. H. The biological significance of the linkages in adenosine triphosphoric acid. *J. Physiol.* **1934**, 345-349.
- ⁸⁸Gaddum, J. H.; Holtz, P. The localization of the action of drugs on the pulmonary vessels of dogs and cats. *J. Physiol.* **1933**, 77, 139-158.
- ⁸⁹Berne, R. M. Cardiac nucleotides in hypoxia: Possible role in refutation of coronary blood flow. *Am. J. Phys.* **1963**, 204, 317-322.
- ⁹⁰Gerlach, E.; Deuticke, B.; Dreisbach, R. H. Der Nucleotid-Abbau im Herzmuskel bei Sauerstoffmangel und seine mögliche Bedeutung für die Coronardurchblutung. *Naturwissenschaften* **1963**, 50, 228-229.
- ⁹¹Sattin, A.; Rall, T. W.; The effect of adenosine and adenine nucleotides on the cyclic adenosine, 3',5' monophosphate content of guinea pig cerebral cortex slices. *Mol. Pharmacol.* **1970**, 6, 13-23.
- ⁹²Cobbin, L. A.; Einstein, R.; McGuire, M. H. Studies on the coronary dilator actions of some adenosine analogues. *Br. J. Pharm.* **1974**, 50, 25-33.

- ⁹³Burnstock, G. A basis for distinguishing two types of purinergic receptor. *In cell membrane receptors for drugs and hormones* (Bolis L and Straub RW ed.), 107-118, **1978**, Raven Press, New York.
- ⁹⁴van Calker, D.; Muller, M.; Hamprecht, B. Adenosine regulates via two different types of receptors, the accumulation of cyclic Amp in cultured brain cells. *J. Neurochem.* **1979**, 33, 999-1005.
- ⁹⁵Londos, C.; Cooper, D. M.; Wolff, J. Subclasses of external adenosine receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1980**, 77, 2551-2554.
- ⁹⁶Bruns, R. F.; Lu, G. H.; Pugsley, T. A. Characterization of the A₂ adenosine receptor labeled by [³H]NECA in rat striatal membranes. *Mol. Pharm.* **1986**, 29, 331-346.
- ⁹⁷Fredholm, B. B.; Ijzerman, A. P.; Jacobsen, K. A.; Klotz, K. N.; Linden, J. International Union of pharmacology. XXV. Nomenclature and classification of adenosine receptors. *Pharm. Rev.* **2001**, 55, 527-552.
- ⁹⁸Fredholm, B. B.; Arslan, G.; Halldner, L.; Kull, B.; Schulte, G.; Wassermann, W. Structure and function of adenosine receptors and their genes. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **2000**, 362, 364-374.
- ⁹⁹Müller, C. E. Medicinal Chemistry of Adenosine A₃ Receptor Ligands. *Curr. Top. Med. Chem.* **2003**, 3, 445-462.
- ¹⁰⁰Tracey, W. R.; Magee, W.; Masamune, H.; Oleynek, J. J.; Hill, R. J. Selective activation of adenosine A₃ receptors with N⁶-(3-chlorobenzyl)-5'-N-methylcarboxamidoadenosine (CB-MECA) provides cardioprotection via KATP channel activation. *Cardiovasc. Res.* **1998**, 40, 138-145.
- ¹⁰¹Gao, Z.; Chen, T.; Weber, M. J.; Linden, J. A₂B adenosine and P₂Y₂ receptors stimulate mitogenactivated protein kinase in human embryonic kidney-293 cells. Cross-talk between cyclic AMP and protein kinase C pathways. *J. Biol. Chem.* **1999**, 274, 5972-5980.
- ¹⁰²Linden, J.; Thai, T.; Figler, H.; Jin, X.; Robeva, A. S. Characterization of human A₂B adenosine receptors: radioligand binding, western blotting, and coupling to G_q in human embryonic kidney 293 cells and HMC-1 mast cells. *Mol. Pharmacol.* **1999**, 56, 705-713.
- ¹⁰³Libert, F.; Parmentier, M.; Lefort, A.; van Sande, J.; Maenhaut, C.; Simons, M. J.; Dumont, J. E.; Vassart, G. Selective amplification and cloning of four new members of the G-Protein-coupled receptor family. *Science* **1989**, 244, 569-572.
- ¹⁰⁴Libert, F.; Schiffmann, S. N.; Lefort, A.; Parmentier, M.; Gerard, C.; Dumont, J. E.; Vanderhaeghen, J. J.; Vassart, G. The orphan receptor cDNA RDC7 encodes an A₁ adenosine receptor. *EMBO* **1991**, 10, 1677-1682.
- ¹⁰⁵Tucker, A. L.; Linden, J.; Robeva, A. S.; D'Angelo, D. D.; Lynch, K. R. Cloning and expression of a bovine adenosine A₁ receptor cDNA. *FEBS Lett.* **1992**, 297, 107-111.
- ¹⁰⁶Reppert, S. M.; Weaver, D. R.; Stehle, J. H.; Rivkees, S. A. Molecular cloning and characterization of a rat A₁-receptor that is widely expressed in brain and spinalcord. *Mol. Endocrinol.* **1991**, 5, 1037-1048.
- ¹⁰⁷Marquardt, D. L.; Walker, L. L.; Heinemann, S. Cloning of two adenosine receptor subtypes from mouse bone marrow-derived mast cells. *J. Immunol.* **1994**, 152, 4508-4515.
- ¹⁰⁸Meng, F.; Xie, G. X.; Chalmers, D.; Morgan, C.; Watson, S. J. Jr.; Aki, I. H. Cloning and characterization of a pharmacologically distinct A₁ adenosine receptor from guinea pig brain. *Mol. Brain Res.* **1994**, 26, 143-155.
- ¹⁰⁹Bhattacharya, S.; Dewitt, D. L.; Burnatowska-Hledin, M.; Smith, W. L.; Spielman, W. S. Cloning of an adenosine A₁ receptor-encoding gene from rabbit. *Gene* **1993**, 128, 285-288.
- ¹¹⁰Libert, F.; van Sande, J.; Lefort, A.; Czernilofsky, A.; Dumont, J. E.; Vassart, G.; Ensinger, H. A.; Mendla, K. D. Cloning and functional characterization of a human A₁ adenosine receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1992**, 187, 919-926.
- ¹¹¹Soudijn, W.; van Wijngaarden, I.; Ijzerman, A. P. Medicinal Chemistry of Adenosine A₁ receptor Ligands. *Cur. Top. Med. Chem.* **2003**, 3, 355-367.
- ¹¹²Müller, C. E. Adenosine Receptor Ligands-Recent Developments Part 1. Agonists *Cur. Med. Chem.* **2000**, 1269-1288.
- ¹¹³Gao, Z. G.; Blaustein, J.; Gross, A. S.; Melman, N.; Jacobson, K. A. N⁶-Substituted adenosine derivatives: selectivity, efficacy, and species differences at A₃ adenosine receptors, *Biochem. Pharmacol.* **2003**, 65, 1675-1684.
- ¹¹⁴Knutsen, L. J.; Jesper, L.; Petersen, H.; Thomsen, C.; Weis, J. I.; Shalmi, M.; Judge, M. E.; Hansen, A. J.; Sheardown, M. J. N-substituted adenosines as novel neuroprotective A₁ agonists with diminished hypotensive effects. *J. Med. Chem.* **1999**, 42, 3463-3477.
- ¹¹⁵Macchia, M.; Salvetti, F.; Barontini, S.; Calvani, F.; Gesi, M.; Hamdan, M.; Lucacchini, A.; Pellegrini, A.; Soldani, P.; Martini, C. Fluorescent probes for adenosine receptors: synthesis and biology of N⁶-dansylaminoalkyl-substituted NECA derivatives. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1998**, 8, 3223-3228.
- ¹¹⁶Chen, R. F. Dansyl labeled proteins: Determination of extinction coefficient and number of bound residues with radioactive dansyl chloride. *Anal. Biochem.* **1968**, 25, 412-416.

- ¹¹⁷Chen, R. F. Fluorescence of dansyl amino acids in organic solvents and protein solutions. *Arch. Biochem. Biophys.* **1967**, 120, 609-620.
- ¹¹⁸Glasel, J. A.; Venn, R. F. The sensitivity of opiate receptors and ligands to short wavelength ultraviolet light. *Life Sci.* **1981**, 29, 221-228.
- ¹¹⁹George, M.; Hill, S. J.; Kellam, B.; Middleton, R. J. Preparation of fluorescently tagged nucleoside ligands as adenosine A₁ receptors. *PCT Int. Appl.* **2004**, WO 2004088312, A2 20041014.
- ¹²⁰Middleton, R. J.; Briddon, S. J.; Cordeaux, Y.; Yates, A. S.; Dale, C. L.; George, M. W.; Baker, J. G.; Hill, S. J.; Kellam, B. New fluorescent adenosine A₁-Receptor agonists that allow quantification of ligand-receptor interactions in microdomains of single living cells. *J. Med. Chem.* **2007**, 50, 782-793.
- ¹²¹Volpini, R.; Costanzi, S.; Lambertucci, C.; Taffi, S.; Vittori, S.; Klotz, K. N.; Cristalli, G. N⁶-alkyl-2-alkynyl derivatives of adenosine as potent and selective agonists at the human adenosine A₃ receptor and a starting point for searching A_{2B} ligands. *J. Med. Chem.* **2002**, 45, 3271-3279.
- ¹²²Buck, I. M.; Reese, C. B. An unambiguous synthesis of adenylosuccinic acid and its constituent nucleoside. *J. Chem. Soc. Perkin Tran.* **1990**, 2937-2942.
- ¹²³Jacobson, K. A.; Nikodijevic, O.; Ji, X. D.; Berkich, D. A.; Eveleth, D.; Dean, R. L.; Hiramatsu, K. I.; Kassell, N. F.; van Galen, P. J. M.; Lee, K. S.; Bartus, R. T.; Daly, J. W.; LaNoue, K. F.; Maillard, M. Synthesis and biological activity of N⁶-(p-sulphonyl)alkyl and N⁶-sulfoalkyl derivatives of adenosine: Water-soluble and peripherally selective adenosine agonists. *J. Med. Chem.* **1992**, 4143-4149.
- ¹²⁴Golisade, A.; Wiesner, J.; Herforth, C.; Jomaa, H.; Link, A. Anti-malarial activity of N⁶-substituted adenosine derivatives. Part 1. *Bioorg. Med. Chem.* **2002**, 10, 769-777.
- ¹²⁵Jacobson, K. A.; Kirk, K. L.; Padgett, W. L.; Daly, J. W. Functionalized congeners of adenosine: preparation of analogues with high affinity for A₁-Adenosine Receptors. *J. Med. Chem.* **1985**, 28, 1341-1346.
- ¹²⁶Chidiac, P. Considerations in the evaluation of inverse agonism and protean agonism at G protein coupled receptors. *Methods Enzymol.* **2002**, 343, 3-16.
- ¹²⁷Strange, P. G. Mechanisms of inverse agonism at G-protein-coupled receptors. *Trends Pharmacol. Sci.* **2002**, 23, 89-95.
- ¹²⁸Libert, F.; Parmentier, M.; Lefort, A.; Dinsart, C.; Van Sande, J.; Maenhaut, C.; Simons, M. J.; Dumont, J. E.; Vassart, G. Selective amplification and cloning of four new members of the G protein-coupled receptor family. *Science* **1989**, 244, 569-572.
- ¹²⁹Chern, Y.; King, K.; Lai, H. L.; Lai, H. T. Molecular cloning of a novel adenosine receptor gene from rat brain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1992**, 185, 304-309.
- ¹³⁰Furlong, T. J.; Pierce, K. D.; Selbie, L. A.; Shine, J. Molecular characterization of a human brain adenosine A₂ receptor. *Mol. Brain Res.* **1992**, 15, 62-66.
- ¹³¹Meng, F.; Xie, G. X.; Chalmers, D.; Morgan, C.; Watson, S. J.; Akil, H. Cloning and expression of the A_{2a} adenosine receptor from guinea pig brain. *Neurochem. Res.* **1994**, 19, 613-621.
- ¹³²Olah, M. E. Identification of A_{2a} adenosine receptor domains involved in selective coupling to Gs: Analysis of chimeric A₁/A_{2a} adenosine receptors. *J. Biol. Chem.* **1997**, 272, 337-344.
- ¹³³Cristalli, G.; Lambertucci, C.; Taffi, S.; Vittori, S.; Volpini, R. Medicinal Chemistry of adenosine A_{2A} receptor agonists. *Curr. Top. Med. Chem.* **2003**, 3, 387-401.
- ¹³⁴Francom, P.; Robins, M. J. Nucleic Acid Related compounds. 118. Nonaqueous Diazotization of Aminopurine Derivatives. Covalent Access to 6-Halo and 2,6-Dihalopurine Nucleosides and 2'-Deoxynucleosides with Acyl or Silyl Halides. *J. Org. Chem.* **2003**, 68, 666-669.
- ¹³⁵El Tayeb, A. Synthesis and evaluation of uracil and adenine nucleotide derivatives and analogues as p2Y-receptor-ligands. *Dissertation Universität Bonn* **2007**.
- ¹³⁶Pierce, K. D.; Furlong, T. J.; Selbie, L. A.; Shine, J. Molecular cloning of an adenosine receptor from human brain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1992**, 187, 86-93.
- ¹³⁷Rivkees, S. A.; Reppert, S. M. RFL9 encodes an A_{2b}-adenosine receptor. *Mol. Endocrinol.* **1992**, 6, 1598-1604.
- ¹³⁸Marquardt, D. L.; Walker, L. L.; Heinemann, S. Cloning of two adenosine receptor subtypes from mouse bone marrow-derived mast cells. *J. Immunol.* **1994**, 152, 4508-4515.
- ¹³⁹Volpini, R.; Costanzi, S.; Vittori, S.; Cristalli, G.; Klotz, K. N. Medicinal Chemistry and pharmacology of A_{2B} adenosine receptors. *Curr. Top. Med. Chem.* **2003**, 3, 427-443.
- ¹⁴⁰Robeva, A. S.; Woodard, R. L.; Jin, X.; Gao, Z.; Bhattacharya, S.; Taylor, H. E.; Roosin, D. L.; Linden, J. Molecular characterization of recombinant human adenosine receptors. *Drug Dev. Res.* **1996**, 39, 243-252.
- ¹⁴¹Jacobson, K. A.; Ijzerman, A. P.; Linden, J. 1,3-Dialkylxanthine derivatives having high potency as antagonists at human A_{2B} adenosine receptors. *Drug Dev. Res.* **1999**, 47, 45-53.
- ¹⁴²Müller, C. E.; Stein, B. Adenosine receptor antagonists: structure and potential therapeutic application. *Curr. Pharm. Des.* **1996**, 2, 501-530.

- ¹⁴³Hayallah, A. M.; Sandoval-Ramirez, J.; Reith, U.; Schobert, U.; Preiss, B.; Schumacher, B.; Daly, J. W.; Müller, C. E. 1,8-Disubstituted xanthine derivatives: synthesis of potent A_{2B}-selective adenosine receptor antagonists. *J. Med. Chem.* **2002**, 45, 1500-1510.
- ¹⁴⁴Briddon, S. J.; Middleton, R. J.; Cordeaux, Y.; Flavin, F. M.; Weinstein, J. A.; George, M. W.; Kellam, B.; Hill, S. J. Quantitative analysis of the formation and diffusion of A₁-adenosine receptor-antagonist complexes in single living cells. *PNAS* **2004**, 101, 4673-4678.
- ¹⁴⁴Dieckmann, M. Charakterisierung neuer Radioliganden als pharmakologische Werkzeuge für A_{2B}- und A₃-Adenosinrezeptoren, Identifizierung neuer Leitstrukturen und Analyse von Struktur-Wirkungs-Beziehungen durch Radioligand-Rezeptor-Bindungsstudien *Dissertation* Universität Bonn, **2003**.
- ¹⁴⁵Hayallah, A. M. Design, Synthesis, Biological Investigation and Structure Activity Relationships of New, Potent A_{2B}-Selective Adenosine Receptor Antagonists as Potential Immunomodulators *Dissertation* Universität Bonn, **2003**.
- ¹⁴⁶Sharom, F. J. Topical Review: The p-glycoprotein efflux pump: how does it transport drugs? *J. Mem. Biol.* **1997**, 160, 161-175.
- ¹⁴⁷Drori, S.; Eytan, G. B.; Assaraf, Y. G. Potentiation of anticancer-drug cytotoxicity by multidrug-resistance chemosensitizers involves alterations in membrane fluidity leading to increased membrane permeability. *Eur. J. Biochem.* **1995**, 228, 1020-1029.
- ¹⁴⁸Pajeva, I. K.; Globisch, C.; Wiese, M. Structure-Function relationships of multidrug resistance p-glycoprotein. *J. Med. Chem.* **2004**, 47, 2523-2533.
- ¹⁴⁹Shapiro, A. B.; Ling, V. Positively cooperative sites for drug transport by p-glycoprotein with distinct drug specificities. *Eur. J. Biochem.* **1997**, 250, 130-137.
- ¹⁵⁰Martin, C.; Berridge, G.; Higgins, C. F.; Mistry, P.; Charlton, P.; Callaghan, R. Communication between multiple drug binding sites on p-glycoprotein *Mol. Pharm.* **2000**, 58 (3), 624-632.
- ¹⁵¹Callaghan, R.; Ford, R. C.; Kerr, I. D. Minireview: The translocation mechanism of p-glycoprotein. *FEBS Letters* **2006**, 580, 1056-1063.
- ¹⁵²Loewe, H.; Urbanietz, J. Basisch substituierte 2,6-Bis-benzimidazolderivate, eine neue chemotherapeutische active Körperklasse. *Drug research* **1974**, 24 (12), 1927-2074.
- ¹⁵³<http://de.wikipedia.org/wiki/Filarien>
- ¹⁵⁴Bailly, C.; Colson, P.; Hélichart, J.-P.; Houssier, C. The different binding modes of Hoechst 33258 to DNA studied by electric linear dichroism. *Nucl. Ac. Res.* **1993**, 21 (16), 3705-3709.
- ¹⁵⁵Baraldi, P. G.; Bovero, A.; Fruttarolo, F.; Preti, D.; Tabrizi, M. A.; Pavani, M. G.; Romagnoli, R. DNA minor groove binders as potential antitumor and antimicrobial agents. *Med. Res. Rev.* **2004**, 24, 474-528.
- ¹⁵⁶<http://www.fz-borstel.de/flowcytes/technik/data/fluo.htm>
- ¹⁵⁷Rastogi, K.; Chang, J.-Y.; Pan, W.-Y.; Chen, C.-H.; Chou, T.-C.; Chen, L.-T.; Su, T.-L. Antitumor AHMA linked to DNA minor groove binding agents: synthesis and biological evaluation. *J. Med. Chem.* **2002**, 45, 4485-4493.
- ¹⁵⁸Reddy, P. M.; Bruce, T. C. Solid-Phase synthesis of positively charged Deoxynucleic guanidine (dng) tethering a heichst 33258 analogue: Triplex and duplex stabilization by simultaneous minor groove binding. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 3736-3747.
- ¹⁵⁹Ebrahimi, S. E. S.; Bibby, M. C.; Fox, K. R.; Douglas, K. T. Synthesis, DNA binding, footprinting and *in vitro* antitumour studies of a *meta*-hydroxy analogue of Hoechst 33258. *Anti-Canc. Drug Des.* **1995**, 10, 463-479.
- ¹⁶⁰Pinner, A. Conversion of nitriles into imido ethers. *Chem. Ber.* **1906**, 23, 2927-2933.
- ¹⁶¹Roger, R.; Neilson, D. The chemistry of imidates. *Chem. Rev.* **1961**, 61, 179-211.
- ¹⁶²Salehi, P.; Dabiri, M.; Zolfigol, M. A.; Otokesh, S.; Baghbanzadeh, M. Selective synthesis of 2-aryl-1-arylmethyl-1H-1,3-benzimidazoles in water at ambient temperature. *Tetrahedron Lett.* **2006**, 47, 2557-2560.
- ¹⁶³Valenzuela, J.; Pessoa-Mahana, H.; Atria, A. M.; Contreras, M.; Pezoa, J. Influence of N-substitution on electron spin resonance (ESR) behavior of 2-(2-nitrophenyl)-1H-benzimidazole derivatives. *Spectroscopy Lett.* **2005**, 38, 557-567.
- ¹⁶⁴Breitbach, K. Funktionelle Charakterisierung der Interaktion von Bindungsstellen am P-Glykoprotein. In Vorbereitung
- ¹⁶⁵Isomua, S.; Wirsching, P.; Janda, K. D. An Immunotherapeutic program for the treatment of nicotine addiction: Hapten design and synthesis. *J. Org. Chem.* **2001**, 66, 4115-4121.
- ¹⁶⁶Matsuda, A.; Shinozaki, M.; Suzuki, M.; Watanabe, K.; Miyasaka, T. A convenient method for the selective acylation of guanine nucleosides. *Synthesis* **1986**, 5, 385-386.
- ¹⁶⁷Robins, M. J.; Uznanski, B. Nucleic acid related compounds. 33. Conversions of adenosine and guanosine to 2,6-dichloro, 2-amino-6-chloro, and derived purine nucleosides. *Can. J. Chem.* **1981**, 59, 2601-2607.
- ¹⁶⁸Major, D. T.; Laxer, A.; Fischer, B. Protonation Studies of Modified Adenine and Adenine Nucleotides by Theoretical Calculations and ¹⁵N NMR. *J. Org. Chem.* **2002**, 67, 790-802.

¹⁶⁹Jacobson, K. A.; Kirk, K. L.; Padgett, W. L.; Daly, J. W. Functionalized congeners of 1,3-Dialkylxanthines: Preparation of analogues with high affinity for Adenosine Receptors. *J. Med. Chem.* **1985**, 28, 13334-1340.

¹⁷⁰Baba, A.; Kawamura, N.; Makino, H.; Ohta, Y.; Taketomi, S.; Sohda, T. Studies on disease-modifying antirheumatic drugs: Synthesis of novel quinoline and quionazoline derivatives and their anti-inflammatory effect. *J. Med. Chem.* **1996**, 39, 5176-5182.

¹⁷¹Jacobson, K. A.; Kirk, K. L.; Padgett, W. L.; Daly, J. W. Functionalized congeners of 1,3-dialkylxanthines: preparation of analogs with high affinity for adenosine receptors. *J. Med. Chem.* **1985**, 28(9), 1334-40.

¹⁷²Bressi, J. C.; Choe, J.; Hough, M. T.; Buckner, F. S.; Van Voorhis, W. C.; Verlinde, C. L. M. J.; Hol, W. G. J.; Gelb, M. H. Adenosine Analogues as Inhibitors of *Trypanosoma brucei* Phosphoglycerate Kinase: Elucidation of a Novel Binding Mode for a 2-Amino-N6-Substituted Adenosine. *J. Med. Chem.* **2000**, 43, 4135-4150.

Danksagung

Allen Mitgliedern unseres Arbeitskreises möchte ich für die nette Aufnahme und die gute Zusammenarbeit im Laufe der Jahre danken.

Zunächst möchte ich mich bei den Mitarbeitern bedanken, die mich bei der erfolgreichen Durchführung der Arbeit unterstützt haben. Die von mir synthetisierten fluoreszenzmarkierten Adenosinrezeptorliganden wurden von Andrea in Radioligand-Bindungsstudien und GTP γ S-Studien pharmakologisch untersucht. Iqbal hat sehr schnell und kurzfristig sämtliche BODIPY-Derivate mit Hilfe der Kapillarelektrophorese auf Reinheit untersucht. Für die strukturaufklärende Analytik, wie Aufnahme der NMR- und Massenspektren möchte ich Sabine, Annette und Marion für ihre schnelle Arbeit und für ihr Verständnis herzlich danken. Bei den Mitarbeitern der ehemaligen ZVE Außenstelle Poppelsdorf Stephan, Michael und Herrn Kriechel möchte ich mich für die hervorragende und freundschaftliche Zusammenarbeit bedanken. Jörg, Joe, Daniela, Sven und Andreas möchte ich für ihre Zeit danken, die sie sich immer nahmen, um mit mir wissenschaftliche und nicht wissenschaftliche Probleme zu besprechen. Ein großes Dankeschön geht an die Mitglieder des Syntheseminars für die vielen fruchtbaren Diskussionen und interessanten Vorträge.

Meinen Kollegen Andreas, Andrea, Marcus, Kerstin, Björn, Lars, Christian, Werner, Jens, Christoph G., Christoph E. und Martin, die mit mir die Praktikumsaufsicht im dritten Semester bestritten haben, möchte ich für die freundschaftliche Atmosphäre und die gute Zusammenarbeit danken.

Lenka und Meryem kann ich gar nicht genug für die sehr freundliche und warme Aufnahme und Arbeitsatmosphäre danken. Daniel und Alina danke ich für die tolle Zusammenarbeit in der „post-Lenka-Ära“ und die gute Laboratmosphäre im guten alten Poppelsdorfer Institut. Meinen Endericher Büro- und Laborkollegen Frank, Heiko und Ali danke ich für die sehr gute Zusammenarbeit in freundschaftlicher Atmosphäre. Gerade die morgendlichen Diskussionen bei einer Tasse Kaffee, oder die abendlichen „Nachsitzungen“ die wechselweise im Büro oder im GUM stattfanden, werde ich sehr vermissen.

Allen aktuellen und ehemaligen Mitgliedern des Arbeitskreis Gütschow, vor allem aber Reik, Markus, Hans-Georg und Paul danke ich für die gemütlichen Kaffeerunden und die Hilfe bei meiner Arbeit.

An die außeruniversitären Treffen wie Grillabende, GUM-Besuche oder auch Studentenfässchen mit Andreas, Thomas, Daniel, Christoph, Frank, Heiko, Markus, Marcus, Reik, Christiane, Svenja, Claudia, Rhalid usw. denke ich gerne zurück und hoffe, dass sie beibehalten werden.

Bei meiner Familie möchte ich mich für ihre ständige Unterstützung, Vertrauen und Verständnis, auch in schwierigen Situationen sehr danken. Es ist gut zu wissen, dass ich eine Familie habe, die immer für einen da ist.

Das größte Dankeschön geht an meine Freundin Jule für ihr großes Verständnis, ihre Geduld und ihre Unterstützung. Allein dass ich dich kennen gelernt habe, macht meine Promotion zu einem riesigen Erfolg und führte nie zu Zweifeln.