

INAUGURAL-DISSERTATION
ZUR
ERLANGUNG DER DOKTORWÜRDE
DER
NATURWISSENSCHAFTLICH-MATHEMATISCHEN GESAMTFAKULTÄT
DER
RUPRECHT-KARLS-UNIVERSITÄT
HEIDELBERG

VORGELEGT VON
APOTHEKER JOST REINHARD
AUS TRABEN-TRARBACH

TAG DER MÜNDLICHEN PRÜFUNG: 16. NOVEMBER 2000

MONOSACCHARID-KONJUGATE VON INHIBITOREN DER O⁶-METHYLGUANIN-DNA
METHYLTRANSFERASE, DER POLY-(ADP-RIBOSE) POLYMERASE UND DES SWITCH PHÄNOMENS
DES HIV-HÜLLPROTEINS GP120: SYNTHESE, BIOLOGISCHE AKTIVITÄT UND STRUKTUR-
WIRKUNGSBEZIEHUNGEN.

GUTACHTER:

PROF. DR. MANFRED WIEßLER

PROF. DR. GERT FRICKER

AUS DER ABTEILUNG
MOLEKULARE TOXIKOLOGIE
LEITER: PROF. DR. RER. NAT. MANFRED WIEßLER
AM DEUTSCHEN KREBSFORSCHUNGSZENTRUM (DKFZ) IN HEIDELBERG

FÜR MEINE ELTERN

DANKSAGUNG

Mein Dank gilt...

- ganz besonders Prof. Dr. M. Wießler für die Überlassung der interessanten Themenstellung, das mir entgegengebrachte Vertrauen, die guten Arbeitsbedingungen und seine stete Diskussionsbereitschaft.
- Prof. Dr. G. Fricker für die freundliche Übernahme des zweiten Gutachtens.
- Dr. H.C. Kliem für die vielen aufmunternden Worte und die Korrektur dieser Arbeit.
- Dr. E. Frei, Dr. M. Weigand und PD Dr. H. Schmeiser für die immerwährende Diskussionsbereitschaft, die vielen Saccharidkonjugate der anderen Art, ihre Kompetenz und *Pure Prot.*
- Prof. Dr. B. Kaina und Frau U. Eichhorn für die tatkräftige Unterstützung bei den Experimenten zur MGMT-Hemmung.
- Dr. C.-W. von der Lieth für die Hilfe bei der Durchführung der Molecular-Modeling Studien, seine Geduld und seinen Kaffee.
- PD Dr. J. Reed für die Unterstützung bei der Evaluation der biologischen Aktivität der SWITCH-Inhibitoren und die Einblicke in die Proteinbiochemie.
- Frau Baumann, Frau G. Schwebel Schilling, Prof. Dr. W. Hull und Dr. D. Alberts, für die Aufnahme der NMR-Spektren, sowie Prof. Dr. W.-D. Lehmann und Herrn Erben für die massenspektrometrischen Untersuchungen.
- Dr. M. Frey für die Hilfe bei der Bestimmung der Aktivität der PARP-Inhibitoren.
- Dr. H. Helmbach für die Bereitstellung der MeWo-Zellen und die Unterstützung bei den Untersuchungen.
- K. Klokow für zahlreiche HPLC-Messungen und die vielen Tips.
- B. L. Sorg, E. P. Mark, P. Lorenz und E. Müller für die Schublade, Ihre Hilfsbereitschaft, den Kaffee und zahlreiche Dinge mehr.
- Dr. B. Schmauser, Dr. B. Sauerbrei, Dr. S. Raddatz, Dr. Ch. Ch. T. Wörth, Dr. R. Uhrig für die gute Laboratmosphäre, die guten Ratschläge und ihre ständige Hilfsbereitschaft.
- Antonia und Kristina Renz ruf eid ehcsitirk Theishcrud reseid Tiebra dnu eid etets EfliH.
- Christina, Andrea, Evelyn, Nicole, Ursula, Regina, Ilse, Marie, Chris, Olli, Dirk, Volker, Thomas, Thomas, Hartmut, Rainer, Walter und allen weiteren derzeitigen und ehemaligen Mitgliedern dieser Abteilung für die schönen Jahre.

INHALTSVERZEICHNIS

1. Einleitung	1
1.1. Tumorthherapie	3
1.1.1. Allgemeine Grundlagen	3
1.1.2. Alkylierende Zytostatika	4
1.2. DNA-Reparatur	8
1.2.1. Allgemeine Grundlagen	8
1.2.2. O ⁶ -Methylguanin-DNA methyltransferase	10
1.2.3. Zusammenhang zwischen Resistenzen in der Antineoplastischen Therapie und DNA-Reparatur	13
1.3. Resistenzüberwindung	15
1.3.1. Doppeltherapie	15
1.3.2. MGMT-Inhibitoren	16
1.4. PARP-Inhibitoren	19
1.4.1. Allgemeine Grundlagen	19
1.4.2. PARP-Inhibitoren	24
1.5. HIV und AIDS	26
1.5.1. Allgemeine Grundlagen	26
1.5.2. Molekularer Mechanismus der HIV-Infektion	27
1.5.3. HIV-Therapie	29
1.5.4. SWITCH-Inhibitoren	31
1.6. Drug targeting via Glucosetransporter	36
2. Aufgabenstellung und Zielsetzung	40
2.1. Allgemein	40
2.2. MGMT-Inhibitoren	40
2.3. PARP-Inhibitoren	41
2.4. SWITCH-Inhibitoren	41
3. Ergebnisse	42
3.1. Synthese	42
3.1.1. MGMT-Inhibitoren	45
3.1.1.1. O ⁴ -substituierte Pyrimidine	45
3.1.1.2. Bromoalkylglucoside und O ⁶ -substituierte Purine	51
3.1.1.3. Darstellung der MGMT-Inhibitor-Glucoside	56
3.1.2. PARP-Inhibitoren	64
3.1.3. SWITCH-Inhibitoren	66
3.2. Biologische Aktivität der MGMT-Inhibitoren	70
3.2.1. MGMT-Test an zellfreien Proteinextrakten von HeLaS3-Zellen	72
3.2.2. MGMT-Test an HeLaS3-Zellen	77
3.2.3. Untersuchungen an MeWo-, MeWo _{Fote4-} und MeWo _{Fote40-} Zellen	79
3.2.3.1. Untersuchungen mit variierenden Fotemustin-Konzentrationen	79
3.2.3.2. Untersuchungen mit variierenden MGMT-Inhibitor-Konzentrationen	83
3.3. Eigenschaften der MGMT-Inhibitoren	89
3.3.1. Stabilitätsuntersuchungen in wäßrigen Lösungen	93
3.3.2. Glucosidase-Stabilität der MGMT-Inhibitoren	93
3.4. Molecular Modeling der MGMT-Inhibitoren	97

3.4.1.	Bestimmung der QSAR bezogen auf den Abstand Glucose-Purin	97
3.4.2.	Studien am Homologiemodell der humanen MGMT	99
3.4.3.	Studien an Kristallstrukturen der humanen MGMT	103
3.5.	Biologische Aktivität der PARP-Inhibitoren	111
3.5.1.	Untersuchungen an permeabilisierten C4I-Zellen	112
3.5.2.	Untersuchungen an intakten C4I-Zellen	113
3.6.	Biologische Aktivität der SWITCH-Inhibitoren	115
3.6.1.	CD-Messungen der SWITCH-Inhibitoren	116
3.6.2.	gp120-CD4-Bindungsversuch an HeLaT4-Zellen	119
4.	Diskussion	127
4.1.	Synthese	127
4.2.	Biologische Aktivität der MGMT-Inhibitoren	129
4.2.1.	MGMT-Tests	131
4.2.2.	Untersuchungen an MeWo-, MeWo _{Fote4-} und MeWo _{Fote40-} Zellen	133
4.3.	Eigenschaften der MGMT-Inhibitoren	136
4.3.1.	Physikochemische Eigenschaften	136
4.3.2.	Glucosidase-Stabilität der MGMT-Inhibitoren	138
4.4.	Molecular Modeling der MGMT-Inhibitoren	139
4.5.	Biologische Aktivität der PARP-Inhibitoren	142
4.6.	Biologische Aktivität der SWITCH-Inhibitoren	144
5.	Zusammenfassung und Ausblick	146
6.	Experimenteller Teil	150
6.1.	Materialien und Methoden	150
6.1.1.	Synthesen	150
6.1.2.	MGMT-Inhibitoren	154
6.1.2.1.	MGMT-Tests	154
6.1.2.2.	Untersuchungen an MeWo-, MeWo _{Fote4-} und MeWo _{Fote40-} Zellen	156
6.1.2.3.	Eigenschaften der MGMT-Inhibitoren	158
6.1.2.4.	Molecular Modeling	160
6.1.3.	PARP-Inhibitoren	162
6.1.4.	SWITCH-Inhibitoren	164
6.1.4.1.	CD-Messungen	164
6.1.4.2.	gp120-CD4-Bindungsversuch	164
6.2.	Synthesevorschriften	166
6.2.1.	MGMT-Inhibitoren	166
6.2.1.1.	O ⁴ -substituierte Pyrimidine	166
6.2.1.2.	O ⁶ -substituierte Guanin-Derivate	171
6.2.1.3.	Bromoalkylglucoside	175
6.2.1.4.	MGMT-Inhibitor-Glucoside	183
6.2.2.	PARP-Inhibitor-Glucoside	198
6.2.3.	SWITCH-Inhibitor-Glucoside	200
6.3.	Ausgewählte NMR-Spektren	208
6.4.	Interaktionsanalysen der MGMT mit den MGMT-Inhibitor Glucosiden	212
7.	Literaturverzeichnis	219

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

μM	Micromolar [10^{-6} mol / l]
μg	Microgramm [10^{-6} g]
μl	Microliter [10^{-6} l]
μmol	Micromol [10^{-6} mol]
8ABG	8-Aza- O^6 -benzylguanin
4BTG	O^6 -(4-Bromothienyl)-guanin
cm	Centimeter [10^{-2} m]
DC	Düschichtchromatographie
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ESI	Electron spray ionisation
FAB	Fast atom bombardment
FCS	Fötales Kälberserum
gp120	Glykoprotein 120
HIV	Human Immunodeficiency virus
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
IC_{50}	Halbmaximale inhibitorische Konzentration
k.R.	keine Reaktion
LAV	Lymphadenopathy associated virus
LAV-15	15- meres Peptid aus gp120 von LAV, Details siehe 1.5
LAV-38	38- meres Peptid aus gp120 von LAV, Details siehe 1.5
LAV-44	44- meres Peptid aus gp120 von LAV, Details siehe 1.5
M	Molar [mol / l]
MGMT	humane O^6 -Methylguanin-DNA methyltransferase
mM	Millimolar [10^{-3} mol / l]
MMR	Fehlpaarungsreparatursystem
mg	Milligramm [10^{-3} g]
ml	Milliliter [10^{-3} l]
mmol	Millimol [10^{-3} mol]
n.d.	nicht durchgeführt
nmol	Nanomol [10^{-9} mol]
nM	Nanomolar [10^{-9} mol / l]
NMR	Nuclear magnetic resonance
O6BG	O^6 -Benzylguanin
PAR	Poly-(ADP-ribose)
PARP	Poly-(ADP-ribose) polymerase
PBS	Salinischer Phosphatpuffer
RNA	Ribonukleinsäure
$\text{S}_{\text{N}}1$	Monomolekulare nukleophile Substitution
$\text{S}_{\text{N}}2$	Bimolekulare nukleophile Substitution
SP	Schmelzpunkt
THF	Tetrahydrofuran

1. Einleitung

Weltweit suchen Wissenschaftler fieberhaft nach neuen Medikamenten zur Anwendung in der Tumorthherapie und bei HIV-Infektionen. Trotz entscheidender Verbesserungen scheint die Lösung der Probleme noch weit entfernt.

Krebserkrankungen sind nach wie vor die zweithäufigste Todesursache in Deutschland – jährlich sterben in Deutschland rund 210.000 Menschen an den Folgen bösartiger Tumore [Becker & Wahrendorf 1998]. Obwohl die Prävention immer weiter in das Interesse der Forschung rückt, werden seit Jahren enorme Anstrengungen darauf verwendet, bestehende Therapieformen wirksamer und verträglicher zu gestalten, sowie neue Konzepte zu erarbeiten [Teicher 1997]. Da auch die Gentherapie trotz der großen Erwartungen noch nicht die in sie gesteckten Hoffnungen erfüllen kann, müssen die bestehenden Möglichkeiten ausgebaut und verbessert werden. Um eine effiziente, nebenwirkungsarme Therapie zu gewährleisten, sind ein gezielterer Angriff des neoplastischen Gewebes und die Umgehung von Resistenzen von entscheidender Bedeutung [Zeller & zur Hausen 1998].

Die Wirkmechanismen vieler etablierter Chemotherapeutika beruhen auf der Induktion von DNA-Modifikationen, wodurch die reguläre Zellteilung verhindert wird [Wießler & Scheulen 1995]. Die DNA-Reparatur, die in der Regel das Gewebe vor schädlichen Einflüssen auf das Erbgut schützt, kann ebenso diese durch Chemotherapeutika induzierten Läsionen reparieren [Sancar 1995; Chaney & Sancar 1996]. Insbesondere wenn das Tumorgewebe eine erhöhte Reparatur-Aktivität gegenüber dem Normalgewebe aufweist, kann dadurch die Resistenz von Tumorzellen vermittelt werden [Domoradzki et al. 1984]. Die Modulation der DNA-Reparatur zur Überwindung solcher Resistenzen wird sowohl experimentell als auch klinisch erprobt. Inhibitoren der O⁶-Methylguanin-DNA methyltransferase (MGMT) und der Poly-(ADP-ribose) Polymerase (PARP) sind geeignet, die Wirkung einiger alkylierender Chemotherapeutika zu verstärken, doch wurden bislang keine Substanzen gefunden, die in der Lage wären, selektiv in den Tumorzellen ihre Wirkung zu entfalten [Dolan & Pegg 1997; Berger et al. 1982]. Das Ausschalten der protektiven Mechanismen im Normalgewebe jedoch führt in der Regel zu erhöhten Nebenwirkungen *in vivo*, wodurch die Anwendungsmöglichkeiten von MGMT- und PARP-Inhibitoren stark limitiert sind.

Ein Konzept zur Erhöhung der Selektivität gegenüber neoplastischem Gewebe wurde von Wießler und Mitarbeitern entwickelt und basiert auf der Konjugation von Tumorthapeutika an Monosaccharide [Dickes 1989, Scharper 1996, Stüben 1997, Mier 1998, Uhrig 1999]. Man geht davon aus, daß aufgrund der verstärkt stattfindenden anaeroben Glycolyse in

Tumorzellen ein erhöhter Energiebedarf besteht, der durch die verstärkte Aufnahme von Glucose über aktive Transportmechanismen gedeckt wird [Argiles & Lopez-Soriano 1990]. Die dazu erforderlichen Transportproteine erkennen die Glucokonjugate als Substrate und akkumulieren diese vergleichbar mit *trojanischen Pferden* in der Zelle. Dementsprechend können die Tumorzellen aufgrund der verstärkten Expression von Glucosetransportern auch eine höhere Aufnahme des Therapeutikums im Vergleich zum Normalgewebe aufweisen. Durch Übertragung des Konzepts auf Inhibitoren der DNA-Reparatur-Enzyme würde eine Modulation der Reparatur präferentiell im Tumorgebe erreicht, wohingegen im Normalgewebe der Schutz des Genoms durch die Reparaturmechanismen erhalten bliebe.

Auch auf dem Gebiet der HIV- und AIDS-Forschung wurden seit der Entdeckung des HI-Virus im Jahre 1984 enorme Anstrengungen darauf verwendet, geeignete Medikamente gegen den Erreger und das durch ihn hervorgerufene AIDS zu entwickeln [Wagner et al. 1995]. Inhibitoren der reversen Transkriptase und von HIV-Proteasen ermöglichen es heute, den Ausbruch der Krankheit um Jahre zu verzögern, doch stellt diese Therapie in der Regel eine erhebliche Belastung des Organismus dar [Carpenter et al. 1999]. Durch den Angriff eines weiteren Targets könnten die Entstehung von Resistenzen verhindert und eine Langzeittherapie verträglicher gestaltet werden. Es ist bekannt, daß zur HIV-Infektion ein Hüllprotein des HI-Virus (*gp120*) mit bestimmten Rezeptoren der Zielzellen (*CD4*) interagieren muß, wobei eine Konformationsänderung von *gp120* notwendig ist [Reed & Kinzel 1991]. Diese findet bei Annäherung an die unpolare Membran der *CD4*-tragenden Zellen statt und ist, da es sich um einen stufenlosen Prozeß handelt, vergleichbar mit einem Schalter (*SWITCH*). Die Hemmung der *gp120-CD4*-Interaktion führt zu einer verringerten Infektionsrate durch das HI-Virus, wobei verschiedene Modelle wie beispielsweise lösliche *CD4*-Rezeptor-Anloga und andere Peptidomimethika zur Anwendung kamen [Traunecker et al. 1988; Finberg et al. 1990]. Auch durch Hemmung des *SWITCH* kann die Interaktion des Hüllproteins mit dem Rezeptor unterbunden werden, wobei sich jedoch die bislang zu diesem Zwecke entwickelten Substanzen durch zu geringe Wasserlöslichkeit auszeichneten [Reed et al. 1999].

In der belebten Natur werden eine Reihe schlecht löslicher Substanzen an Zucker gebunden, um diese in Zellkompartimenten besser löslich zu machen [Wagner 1993] oder um in metabolischen Reaktionen der Phase II eine Ausscheidung über die Nieren zu ermöglichen [Pfeifer et al. 1995]. Die Glucokonjugation kann auch dazu dienen, durch chemische Synthesen schlecht lösliche Verbindungen in geeigneter Weise zu modifizieren, um neue

Moleküle mit vollkommen veränderten Eigenschaften zur Verfügung zu stellen [Schmitt 1989].

Im folgenden werden einleitend die theoretischen Grundlagen der Themengebiete und die Aufgabenstellung dieser Arbeit beschrieben. Anschließend werden die Ergebnisse der Synthesen und die biologische Evaluation der Substanzen dargestellt und diskutiert. An die Zusammenfassung ist der experimentelle Teil angeschlossen, der die detaillierten Versuchsbeschreibungen, sowie die analytischen Daten der Verbindungen enthält.

1.1. Tumorthherapie

1.1.1. Allgemeine Grundlagen

Die Behandlung von malignen Tumoren kann auf unterschiedlichem Wege erfolgen, wobei die Verfahren nach verschiedenen Kriterien klassifiziert werden. Es kann unterteilt werden in *systemische* und *lokale*, aber auch in *operative* und *nicht invasive* Verfahren [Erbar 1995]. Am

wichtigsten sind hierbei:

- Radikale, operative Entfernung (*Tumorexstirpation*)
- Strahlentherapeutische Maßnahmen (*Radiotherapie*)
- Medikamentöse Maßnahmen (*Chemo-, Hormontherapie*)
- Immuntherapie

Während der chirurgische Eingriff den soliden Tumor zum Ziel hat, wird mittels der medikamentösen und der Strahlentherapie versucht, jede entartete Zelle anzugreifen. Dementsprechend werden diese Formen oftmals kombiniert oder sequentiell eingesetzt, um den größtmöglichen Erfolg zu gewährleisten.

Die Chemotherapeutika waren klassischerweise definiert als nicht natürlich vorkommende oder von natürlichen Stoffen abgeleitete antimikrobiell wirksame Substanzen, die sich von den Antibiotika durch Herkunft oder Gewinnung unterscheiden [Burger & Wachter 1998]. Mit dem Aufkommen der ersten antineoplastischen Substanzen wurde dieser Begriff erweitert, so daß dieser heute Stoffe zusammenfaßt, die durch Eingriff in den Stoffwechsel maligner Zellen und deren Zellteilungsvorgänge entweder zytostatisch oder zytotoxisch-zytolytisch wirken. Die Wirkung kann zwar in allen Zellen entfaltet werden, doch sollen Tumorzellen eine höhere Empfindlichkeit zeigen als das Normalgewebe. Im allgemeinen Sprachgebrauch werden diese Stoffe nicht nur als *Chemotherapeutika*, sondern auch als "Zytostatika" bezeichnet. Entsprechend der Struktur, der Herkunft oder dem zellulären Angriffsort kann eine Einteilung in Stoffklassen erfolgen [Burger & Wachter 1998]:

- *Alkylierende Zytostatika (Kapitel 1.1.2)*
- *Antimetabolite*
- *Topoisomerase-I-Inhibitoren*
- *Mitosehemmstoffe (Spindelgifte, Antimitotika)*
- *Antibiotika*
- *Enzyme, Hormone und diverse andere Stoffe*

Die Mitglieder der ersten fünf Gruppen greifen allesamt an verschiedenen Stellen des Nucleinsäurestoffwechsels oder der Zellteilung ein. Die Antimetabolite verhindern den Aufbau von RNA und DNA, die Topoisomerase-Inhibitoren blockieren ein für die Spaltung und das Zusammenfügen der doppelhelikalen DNA-Struktur notwendiges Enzym, die Mitosehemmstoffe hemmen die Zellteilung und die Antibiotika binden sequenzspezifisch an die DNA und verhindern dadurch die Replikation.

1.1.2. Alkylierende Zytostatika

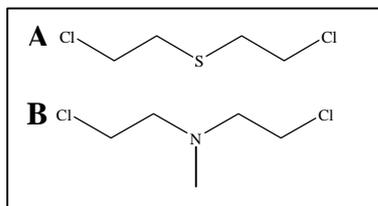


Abbildung 1.1-1 Strukturformeln von S-Lost (A) und N-Lost (B)

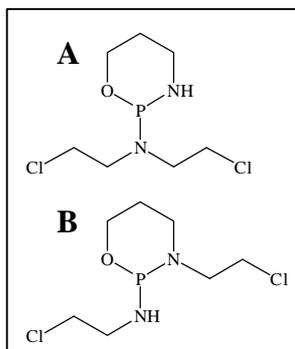


Abbildung 1.1-2 Strukturformeln von Cyclofosfamid (A), Ifosfamid (B).

Die alkylierenden Zytostatika stellen die größte Stoffklasse dar, die sich in sechs Untergruppen gliedern lässt: Stickstoff-Lost-Derivate, Aziridine und Epoxide, Alkyl-Alkan-Sulfonate, Nitroso-Harnstoffe, monofunktionelle und nicht-klassische Alkylantien sowie die Platin-Analoga [Zeller & zur Hausen 1998]. Schon 1942 wurde Stickstoff-Lost (Mechlorethamin, Abbildung 1.1-1, B) erstmals zur Behandlung eines Lymphosarkoms eingesetzt [Gilman 1963]. Es handelte sich hierbei um eine Weiterentwicklung des im ersten Weltkrieg verwendeten Kampfstoffes Schwefel-Lost (Senfgas, Abbildung 1.1-1, A), das aufgrund von Hinweisen auf einen antiproliferativen Effekt (Leukopenie, Knochenmarksaplasie und Ulzerationen im Magen-Darm-Trakt) entdeckt wurde. Auch das Mechlorethamin war ursprünglich für den militärischen Einsatz gedacht, zeigte

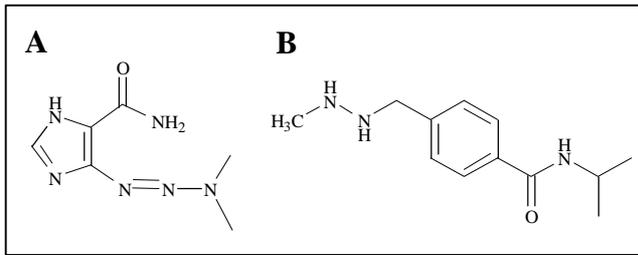


Abbildung 1.1-3 Strukturformeln von Dacarbazin (DTIC) (A) und Procarbazin (B)

dann aber sowohl experimentell als auch klinisch einen therapeutischen Effekt [Gilman & Philips 1946; Gilman 1963]. In der folgenden Zeit wurde eine Reihe weiterer Derivate synthetisiert und

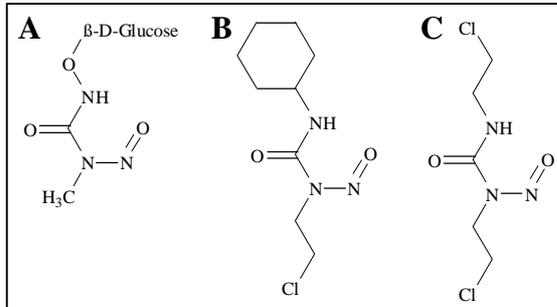


Abbildung 1.1-4 Strukturformeln von Nitroso-Harnstoff-Derivate: Streptozocin (A), 1-(Chloethyl)-1-nitroso-3-cyclohexylharnstoff (B) und 1,3-bis-(2-Chloroethyl)-1-nitrosoharnstoff (C)

erfolgreich bis zur klinischen Anwendung weiterentwickelt. Besonders hervorzuheben ist hierbei das Cyclophosphamid, welches auch heute noch eine sehr breite Anwendung findet, und das davon abgeleiteten Oxazaphosphorin Ifosfamid (Abbildung 1.1-2; siehe auch Kapitel 1.6) [Brock 1989].

Eine weitere wichtige Gruppe der Alkylantien stellen die Nitrosoharnstoff-Derivate dar.

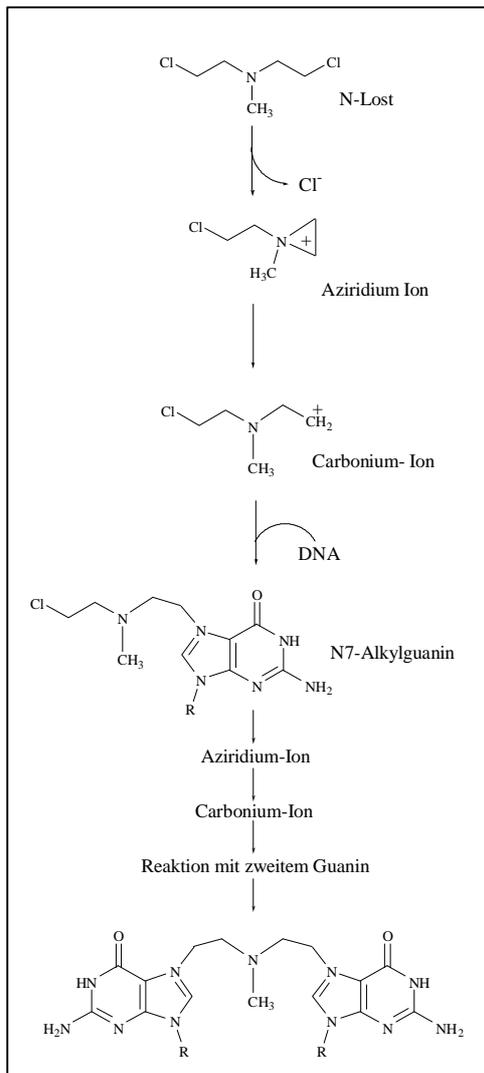


Abbildung 1.1-5 DNA-Quervernetzung durch Stickstoff-Lost

Methylnitroso-harnstoff (MNU) und 1-Methyl-3-nitro-1-nitroso-guanidin (MNNG) werden heute lediglich noch experimentell verwendet, doch waren dies die ersten Vertreter einer Gruppe, bei denen eine zytostatische Wirkung beobachtet wurde. Abgeleitet von diesen Substanzen und den Lost-Derivaten wurden die Nitrosoharnstoffe der ersten Generation entwickelt, von denen noch heute einige klinisch angewendet werden [Wassermann et al. 1975; Seeber & Schütte 1995]. Ihre strukturelle Verwandtschaft mit den Lost-Derivaten wird bei Betrachtung von Abbildung 1.1-4 deutlich. Dacarbazin (DTIC) und Procarbazine werden den monofunktionellen Alkylantien zugeordnet (Abbildung 1.1-3) [Seeber & Schütte 1995]. Ursprünglich als Monoaminoxidase-Hemmstoff entwickelt (Procarbazine) bzw. mit dem Ziel, die Purinbiosynthese zu beeinflussen, (Dacarbazine) entwickelt, werden diese Substanzen heute als Chemotherapeutika in der antineoplastischen Therapie

eingesetzt. Allen alkylierenden Agenzien ist gemeinsam, daß diese über Nucleophile Substitutionsreaktionen in der Lage sind, zelluläre Strukturen zu alkylieren [Price 1975; Tong et al. 1982; Tong et al. 1983; Brock. 1989; Wiessler & Scheulen. 1995]. Die dabei gebildeten DNA-Addukte unterscheiden sich in Abhängigkeit von der Struktur des angreifenden Nucleophils und im bevorzugten Substitutionsort. Die Stickstoff-Lost Derivate bilden durch Abspaltung eines Chlorid-Anions und intramolekularen Ringschluß ein Aziridium- und ein Carbonium-Ion (Abbildung 1.1-5). Cyclophosphamid und Ifosfamid unterscheiden sich zwar hinsichtlich der Aktivierung, besitzen jedoch die gleichen Zwischenstufen in Form des Aziridium- und des Carbonium-Ions [Lawley & Phillips 1996]. Dies sind potentiell in der Lage, mit verschiedenen Funktionalitäten in Aminosäuren und Nucleinbasen zu reagieren [Price 1975]. Präferentiell greifen die Aziridium-Ionen die N7-Position des Guanins an, da diese sterisch am wenigsten gehindert ist. Da beide Chloroethyl-Seitenketten auf gleiche Weise reagieren können, sind neben Monoaddukten auch Quervernetzungen von zwei Basen eines Stranges (*intrastrand crosslinks*) oder zwischen zwei DNA-Strängen (*interstrand crosslinks*) möglich. Die Wirkung der N-Lost-Derivate kommt in erster Linie durch die

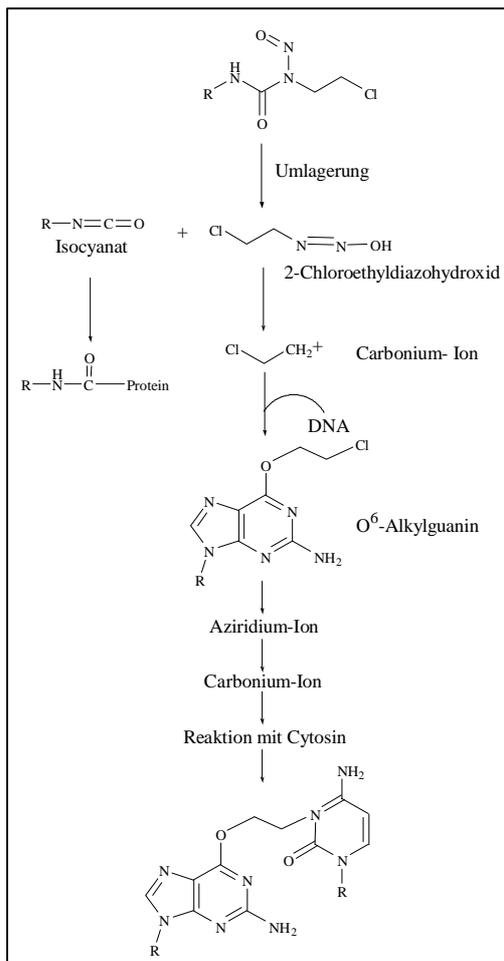


Abbildung 1.1-6 Mechanismus der Aduktbildung der N-Nitrosoharnstoffe

Hemmung der Replikation zustande [Brock 1989].

Nitroso-Harnstoffe reagieren analog zu oben beschriebenem Mechanismus (Abbildung 1.1-6). Durch Umlagerung wird aus einer Diazohydroxy-Zwischenstufe das Carbenium-Ion gebildet, welches bevorzugt die O⁶-Position des Guanins angreift. Neben dem 2-Chloroethyldiazohydroxid wird ein Isocyanat freigesetzt, das in der Lage ist, durch Carbamoylierung sowohl DNA- als auch RNA Synthese zu hemmen [Ludlum 1990; Briscoe et al. 1990]. Die zytotoxische Wirkung hierbei wird zum einen der Quervernetzung zugeschrieben [Erickson et al. 1980], zum anderen spielen O⁶-Alkylierungen eine große Rolle. Beispielsweise führt O⁶-Methylguanin zu anderen Chromosomenbrüchen, Einzelstrangbrüchen und besitzt Apoptose-induzierende Eigenschaften. [Kaina et al. 1997]. Die Bedeutung des O⁶-Methylguanin wird in Kapitel 1.2.2 eingehender behandelt.

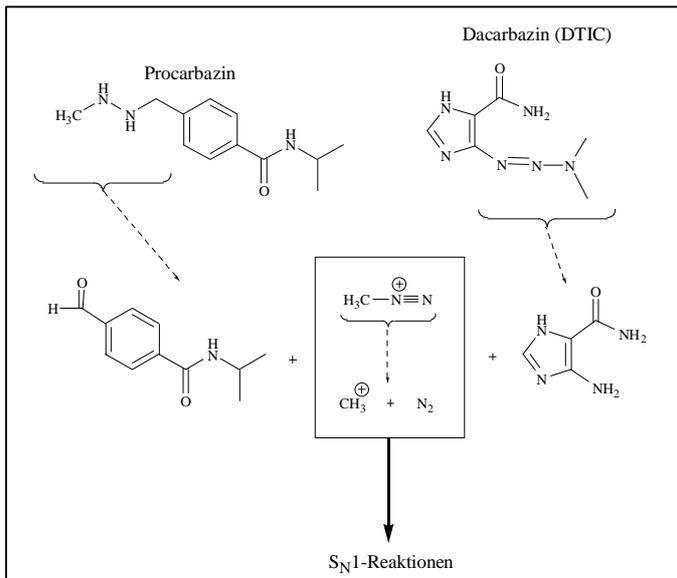


Abbildung 1.1-7 Vereinfachtes Schema der Aktivierung von Procarbazin und Dacarbazin. Die oxidativen Zwischenstufen sind nicht aufgeführt.

Procarbazin und Dacarbazin (DTIC) gehören beide zu den methylierenden Agentien. Für Procarbazin werden sowohl eine enzymatische als auch eine nicht enzymatische Aktivierung beschrieben. Bei Dacarbazin handelt es sich um ein sogenanntes *Prodrug*, das durch Cytochrom P450 abhängige Enzyme in der Leber aktiviert werden muß. In beiden Fällen werden über verschiedene oxidative Zwischenschritte Methyl-diazonium-Ionen, Methylcarbonium-Ionen und Radikale

freigesetzt, welche die reaktiven Metabolisierungsintermediate darstellen. Beide Substanzen werden deshalb auch als S_N1 -Typ Alkylantien bezeichnet. Die Bindung an Makromoleküle führt zur Hemmung von RNA-, DNA- und Proteinsynthese. Für Procarbazin ist die Induktion von Chromosomenbrüchen und DNA-Einzelstrangbrüchen beschrieben [Averbuch 1990], was auf gebildetes O^6 -Methylguanin zurückzuführen sein kann. Auch das genotoxische Potential des Dacarbazins wird in erster Linie dem O^6 -Methylguanin zugeschrieben [Psaroudi & Kyrtopoulos 2000].

Die Alkylantien besitzen klinisch ein sehr breites Anwendungsspektrum. Aufgrund der sehr unterschiedlichen pharmakokinetischen und pharmakodynamischen Eigenschaften lassen sich deshalb keine allgemeingültigen Aussagen machen. Eine sehr gute Übersicht über Indikationsgebiete, Pharmakologie, Metabolismus und Toxizität der einzelnen Substanzen findet sich im Übersichtswerk von Zeller und zur Hausen [Zeller & zur Hausen 1998] und von Seeber und Schütte [Seeber & Schütte 1995].

Nicht alle Tumoren sprechen auf die Therapie mit alkylierenden Zytostatika an. Es werden Resistenzen, die seit Anfang der Behandlung bestehen (natürliche Resistenzen), von solchen die sich im Laufe der Behandlung entwickeln (erworbene Resistenzen), unterschieden [Burger und Wachter 1998]. Die Mechanismen, die diesen Phänomenen zugrunde liegen, können einzeln oder kombiniert ausgeprägt sein und somit unterschiedliche Grade der Widerstandsfähigkeit mit sich bringen [Yabro 1992]. Im einzelnen handelt es sich um:

- Verminderten Zytostatikatransport in die Zelle
- Erhöhten Zytostatikatransport aus der Zelle

- Erhöhte Inaktivierung des Zytostatikums oder dessen aktiver Metaboliten
- Erhöhte DNA-Reparatur
- Eröffnung alternativer Stoffwechselfvorgänge zur Bildung inaktiver Metaboliten
- Erhöhte Targetproduktion infolge Genamplifikation
- Veränderung des Targets und infolgedessen reduzierte Zytostatikabindung

Im folgenden wird der Zusammenhang zwischen der DNA-Reparatur und der Therapie mit alkylierenden Zytostatika beschrieben. Es wird dabei verdeutlicht, weshalb der protektive Charakter der DNA-Reparatur sich ungünstig auf die Behandlung mit DNA-schädigenden Substanzen auswirken kann.

1.2. DNA-Reparatur

1.2.1. Allgemeine Grundlagen

Das menschliche Genom ist zahlreichen Schädigungen ausgesetzt, die die Unversehrtheit der Zelle gefährden und eine fehlerfreie Replikation verhindern. Es kann sich dabei um Einflüsse durch die Umgebung handeln [Sancar 1995; Otteneder & Lutz 1999] oder um spontane Prozesse, die innerhalb der Zelle ablaufen [Rydberg & Lindahl 1982]. Das Erkennen und die Reparatur dieser Schädigungen sind von entscheidender Bedeutung für das einwandfreie Fortbestehen eines Organismus, da die DNA-Schädigungen mit Zelltod, Gewebedegeneration, -alterung und dem Auftreten von Krebs in Verbindung gebracht werden (Abbildung 1.2-1) [Sancar 1995; Singer & Hang 1997]. Die Mechanismen, die sich aus diesem Grunde ausgebildet haben, zeichnen sich durch unterschiedliche Komplexität, unterschiedliche Substratspezifität und unterschiedliche Kinetiken aus [Sancar 1995; Singer & Hang 1997; O'Connor et al. 2000].

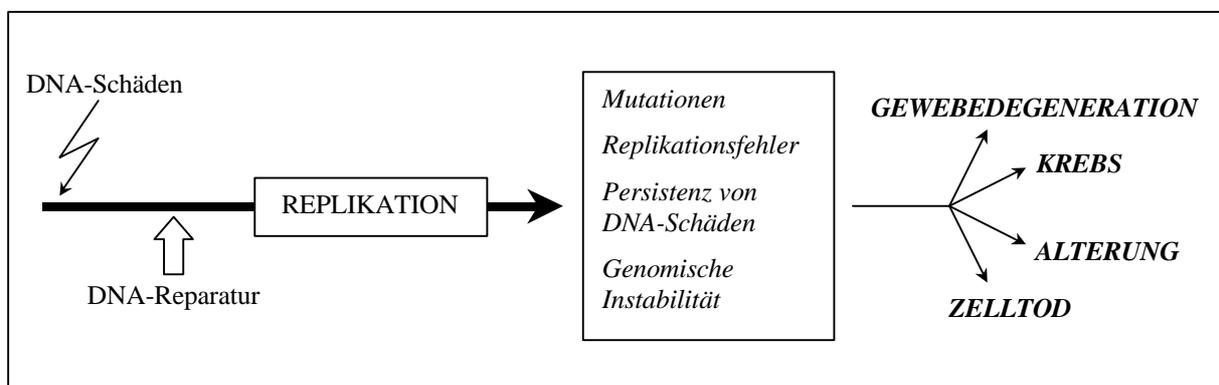


Abbildung 1.2-1 Schematische Darstellung des Zusammenhangs zwischen DNA-Schädigung, DNA-Reparatur, Replikation und den möglichen Konsequenzen

Entscheidend für die erfolgreiche Reparatur ist, daß die Doppelhelix der DNA in einem der beiden komplementären Stränge die unbeschädigte Sequenz aufweist, so daß diese als Matrize für die Erneuerung der fehlerhaften Base dienen kann.

Man unterscheidet im Wesentlichen zwischen:

- Direkter Reparatur
- Basen Exzisionsreparatur
- Nukleotid Exzisionsreparatur
- Basenfehlpaarungsreparatur

Die *direkte Reparatur* trennt in einer einfachen Reaktion die kovalente Bindung einer Läsion mit der DNA. Die zwei wichtigsten Vertreter sind die O⁶-Methylguanin-DNA methyltransferase (MGMT) und die Photolyasen, die sich beide durch eine hohe Substratspezifität auszeichnen [Sancar 1995]. Die Photolyasen sind in der Lage, durch UV-Einwirkung entstandene cyclobutanartige Pyrimidin-Dimere zu spalten. Dies geschieht durch Bindung des Enzyms an den dimeren Komplex und Spaltung desselben durch Elektronentransfer [Vassylyev et al. 1995]. Die MGMT repariert nur bestimmte Alkylierungen der O⁶-Position des Guanins und der O⁴-Position des Thymins (Kapitel 1.2.2).

Sowohl Basen- und Nukleotid-Exzisionsreparatur als auch Basenfehlpaarungsreparatur beruhen auf wesentlich komplexeren Vorgängen, an denen verschiedene Enzyme beteiligt sind. In allen Abläufen muß die Erkennung der Läsion stattfinden, die fehlerhafte Base entfernt und durch die korrekte ersetzt werden.

Mittels *Basenexzisionsreparatur* können in Abhängigkeit von der Spezifität der ersten Glykosylase verschiedenste Addukte erkannt werden, die in der Regel keine Torsion der DNA-Helix zur Folge haben. Typische Substrate sind z.B. das durch die Alkylpurin-DNA-glykosylase erkannte 3-Methyladenin [Labahn et al. 1996] oder das von der Uracil-Glykosylase entfernte Uracil [Slupphaug et al. 1996]. Da lediglich die N-glykosidische Bindung hydrolysiert wird, entstehen abasische Stellen (*AP-sites*). Unterschiedliche AP-Lyasen und AP-Endonucleasen schneiden daraufhin einen Abschnitt, bestehend aus der verbleibenden Deoxyribose und 1 bis 4 Nukleotiden, aus der DNA heraus. Mittels DNA-Polymerase β und einer DNA-Ligase wird diese Lücke aufgefüllt und geschlossen [Sancar 1994].

Auf ähnliche Weise werden mittels *Nukleotid-Exzisionreparatur* größere DNA-Addukte entfernt, die in der Regel eine Veränderung der helikalen Struktur der DNA zur Folge haben [Singer & Hang 1997]. Durch ATP abhängige Aktivität von 6 Faktoren (RPA, TFIIH, XPA, XPD, XPF, XPG) wird hierzu ein 29-meres Oligopeptid aus dem veränderten Strang entfernt

und die entstandene Lücke, wie oben beschrieben, durch Aktivität einer DNA-Polymerase und einer DNA-Ligase ersetzt und zusammengefügt [Sancar 1996].

Die DNA-Struktur kann auch infolge einer Reihe möglicher Fehlpaarungen abnormal sein, welche z.B. durch Replikationsfehler, Insertionen und Deletionen zustande kommen. Problematischerweise wird hierbei der Fehler durch „normale“ Nukleotide verursacht [Sancar 1995].

Das *Fehlpaarungsreparatursystem (Mismatch system)* ist in der Lage, den korrekten DNA-Strang als Matrize zu identifizieren und durch Aktivität einer Dam-Methylase zu markieren. Durch Interaktion dreier Proteine (MutL, MutH, MutS) wird der Fehler erkannt und ein Abschnitt des falsch besetzten DNA-Strangs mittels einer Exonuklease entfernt. Die Rekonstitution erfolgt wiederum durch Aktivität einer DNA-Polymerase und einer DNA-Ligase [MacPhee 1995; Modrich. & Lahue 1996]. In Anbetracht der Tatsache, daß bis 1000 Nukleotide umfassende Abschnitte auf diese Weise prozessiert werden, wird die Bedeutung der Reparatur für eine fehlerfreie Replikation sehr deutlich.

1.2.2. *O⁶-Methylguanin-DNA methyltransferase*

O⁶-Methylguanin entsteht sowohl durch externe Faktoren wie Umwelteinflüsse und Zytostatikatherapie [Kyrtopoulos et al. 1997] als auch durch Prozesse innerhalb der Zelle [Rydberg & Lindahl 1982]. O⁶-Methylguanin führt zu Chromosomenbrüchen, Einzelstrangbrüchen und besitzt Apoptose-induzierende Eigenschaften [Kaina et al. 1997]. Die primären Läsionen führen zu O⁶-Methylguanin-Thymin-Fehlpaarungen, die vom **Mismatch-Reparatur-System (MMR)** korrigiert werden. Da die Matrize jedoch wieder zum Einbau des Thymins gegenüber dem O⁶-Methylguanin führt, das wiederum die Aktion des MMR hervorruft, entsteht ein Kreislauf mit fortwährender Reparatur und fehlerhaftem Einbau eines Thymins. Dadurch erhöht sich das Risiko von Strangbrüchen [Kaina 1998], welche zum Zeitpunkt der nächsten S-Phase Apoptose auslösen können [Lage & Dietel 1999]. Defizite im MMR-System führen im nächsten Replikationszyklus zu manifesten GC → AT –Mutationen. Wegen der Gefahr, die von der Persistenz des O⁶-Methylguanins ausgeht, hat die Natur einen besonderen Reparatur-Mechanismus entwickelt, der eine effiziente und schnelle Korrektur der Fehler gewährleistet.

Die O⁶-Methylguanin-DNA methyltransferase (MGMT) weicht vom klassischen Bild der Enzyme als „Biokatalysatoren“ ab. Sie ist in der Lage, Alkylierungen von der O⁶-Position des Guanins und der O⁴-Position des Thymins zu entfernen, indem diese in einer Ein-Schritt-Reaktion auf ein zuvor generiertes Thiolat-Anion innerhalb ihres aktiven Zentrums übertragen

werden (Abbildung 1.2-2) [Graves et al. 1989; Pegg & Byers 1992]. Es handelt sich dabei um ein relativ kleines Protein (207 Aminosäuren; 23 kDa), das sich in erster Linie im Zellkern, teilweise jedoch auch im Zytoplasma wiederfindet [Belanich et al. 1994]. Die Expression des *MGMT*-Gens ist zell- und gewebsspezifisch und unterliegt möglichen Veränderungen im Rahmen der Differenzierung [Mitra & Kaina 1993; Pieper 1997]. Es ist durch DNA-Schäden und Corticoide induzierbar, doch scheint die Antwort von Zelltyp-spezifischen Faktoren abzuhängen [Grombacher et al. 1996]. Die Expression wird darüberhinaus durch *p53* bzw. den Transkriptionsfaktor Sp1 beeinflusst [Grombacher et al. 1998; Pegg 2000]. Für die durchschnittlich verfügbare Aktivität des Enzyms ist außerdem von Bedeutung, inwieweit die Zelle einer hohen Exposition durch Alkylantien unterworfen ist [Pegg 2000]. In Einzelfällen wird diskutiert, ob neben der Depletion durch kontinuierlichen Verbrauch durchaus auch eine Induktion der *MGMT*-Expression durch Dauerstreß mit z.B. Tabakrauch erfolgt [Mattern et al. 1998].

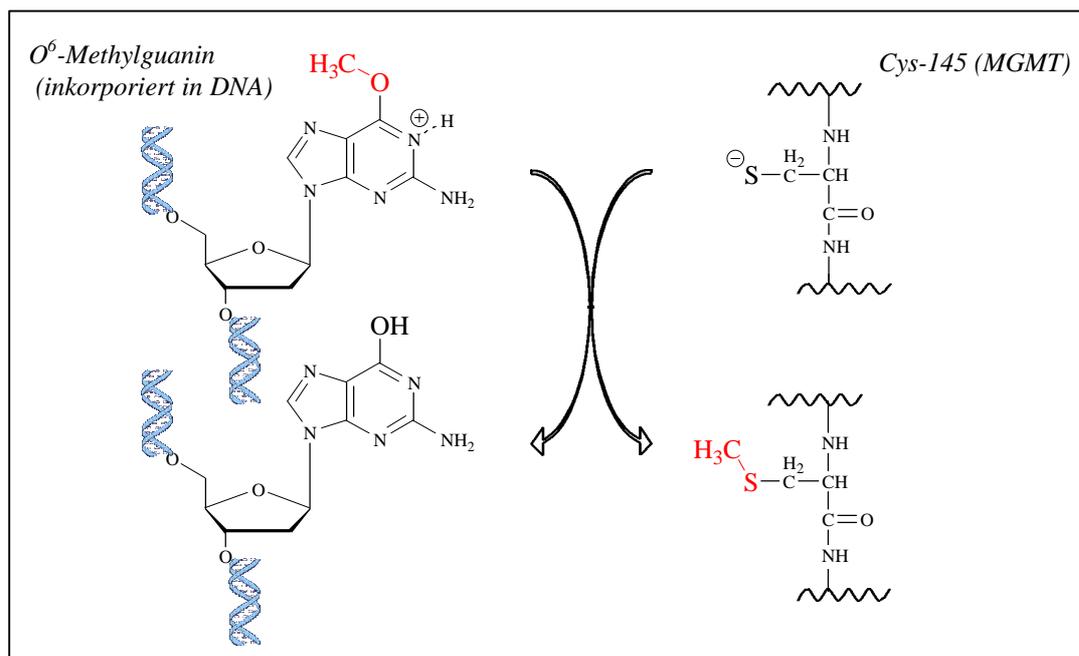


Abbildung 1.2-2 Alkylgruppentransfer auf MGMT am Beispiel *O*⁶-Methylguanins (in DNA)

Abgesehen von bekannten Polymorphismen (s.u.), sind 22 nicht variante Residuen in allen bislang untersuchten Primärstrukturen unterschiedlicher Spezies zu finden. Das aktive Zentrum befindet sich an Position 145 der Sequenz der humanen *MGMT* (im folgenden nur noch als *MGMT* bezeichnet) innerhalb einer konstanten Abfolge von Aminosäuren [-- Isoleucin(I) / Valin(V)-Prolin(P)-Cystein(C)-Histidin(H)-Arginin(R)-Isoleucin(I) / Valin(V)] [Mitra & Kaina 1993; Pegg et al. 1995]). Mittels einfacher Versuche durch ortsspezifische Mutagenese (*site directed mutagenesis*) [Chueh et al. 1992] und Versuche mit

unterschiedlichen Pseudo-Substraten [Spratt & De-Los-Santos 1992; Pegg et al. 1993] konnte der Einfluß dieser Aminosäuren bestätigt und der Mechanismus des Alkyltransfers als bimolekulare nukleophile Substitution aufgeklärt werden. Das hierzu benötigte starke Nukleophil in Form eines Thiolat-Anions wird durch Protonen-Transfer auf benachbarte basische Aminosäuren generiert, wobei His-148 und Glu-172 als potentielle Kandidaten identifiziert wurden [Chueh et al. 1992; Rafferty et al. 1994]. Von essentieller Bedeutung für diese Reaktion ist desweiteren der Transfer eines Protons auf die N1-Position des O⁶-alkylierten Guanins wahrscheinlich durch Asn-137 [Spratt et al. 1999]. Infolge der Etherbildung kommt es zu einer Konformationsänderung der Tertiärstruktur, was als Signal zur Degradation via Ubiquitin abhängiger Proteolyse erkannt wird [Srivenugopal et al. 1996]. Die Wiederherstellung der Aktivität kann lediglich über *de novo* Synthese des Enzyms erfolgen [Pieper 1997]. Da folglich ein MGMT-Molekül in einer 1:1 Stöchiometrie lediglich eine einzelne Modifikation reparieren kann und keine Reaktivierung möglich ist, wird es auch als *Suizid-Enzym* bezeichnet. Der hohe energetische Aufwand, der dem Verbrauch eines Proteins mit 207 Aminosäuren pro Addukt entspricht verdeutlicht die große Bedeutung der Reparatur dieser Läsionen.

Zur Reaktion sind Konformationsänderungen sowohl im Substrat als auch in der MGMT notwendig. Ein möglicher „Ausklappmechanismus“ (*flipping out mechanism*) der defekten Base aus der helikalen Struktur der DNA, kombiniert mit strukturellen Veränderungen der MGMT werden hierzu diskutiert [Federwisch et al. 1997; Vora et al. 1998].

Das optimale Substrat der MGMT ist O⁶-Methylguanin, eingebettet in DNA oder Oligonukleotide [Pegg & Byers 1992; Mitra & Kaina 1993; Pegg et al. 1995]. Mit deutlich niedrigerer Präferenz wird das O⁴-Methylthymine repariert [Paalman et al. 1997; Pegg et al. 1998; Spratt et al. 1999]. Neben dem O⁶-Methylguanin werden andere Alkylierungsprodukte der O⁶-Position des Guanins von verschiedenen Alkyltransferasen als Substrate akzeptiert [Morimoto et al. 1985; Graves et al. 1989; Wilkinson et al. 1989]. Die Geschwindigkeitskonstanten der Reparatur sinken von der Methylierung über Ethyl-, *n*-Propyl-, *n*-Butyl-, 2-Chloroethyl-, 2-Hydroxyethyl-. Es zeigt sich jedoch am Beispiel des Benzylierungsproduktes, daß Aussagen bezüglich einer direkten Abhängigkeit zwischen der Reparaturaktivität und der Größe der Addukte nur bedingt möglich sind [Goodzova et al. 1997; Pegg et al. 1998]. Die Reparatur des O⁶-(2-Chloroethyl)-guanins und des O⁶-(2-Hydroxyethyl)-guanins verdeutlicht den Zusammenhang mit der Therapie durch Chloroethylnitrosoharnstoffe, da diese die entsprechenden Addukte verursachen (Kapitel 1.1.2). Interessanterweise ist die MGMT auch in der Lage das Pyridyloxybutyl-Addukt O⁶-[4-

oxo-4-(3-pyridyl)butyl]guanin zu reparieren, welches durch das tabak-spezifische Nitrosamin *NNK* verursacht wird [Wang et al. 1997]. Neben modifizierten Basen in Nukleinsäuren werde auch kleinere Moleküle, Purin- und Pyrimidin-Derivate als Substrate akzeptiert und reagieren mit der MGMT. Anfangs wurde dies zur Evaluation der Bedeutung der MGMT herangezogen, doch erschloß sich schon bald die Anwendung auch als Therapieadjuvantien (Kapitel 1.3.2) [Dolan et al. 1990].

1.2.3. *Zusammenhang zwischen Resistenzen in der antineoplastischen Therapie und DNA-Reparatur*

Wie in Kapitel 1.1.2 ausführlicher beschrieben, beruht die Therapie mit alkylierenden Zytostatika auf der Hemmung der Zellteilung durch die Induktion von DNA-Addukten. In Kapitel 1.2.1 wurde dargelegt, daß DNA-Addukte durch Reparatur-Mechanismen entfernt werden, um somit eine ungehemmte, störungsfreie Replikation zu gewährleisten. Da die Reparaturmechanismen nicht in der Lage sind, therapeutisch induzierte- von unerwünschten DNA-Schädigungen zu unterscheiden, besteht oftmals ein Zusammenhang zwischen der Aktivität der Reparaturmechanismen und dem Therapieerfolg mittels alkylierender Chemotherapeutika (Abbildung 1.2-3) [Chaney & Sancar 1996]. Dabei muß das Verhältnis

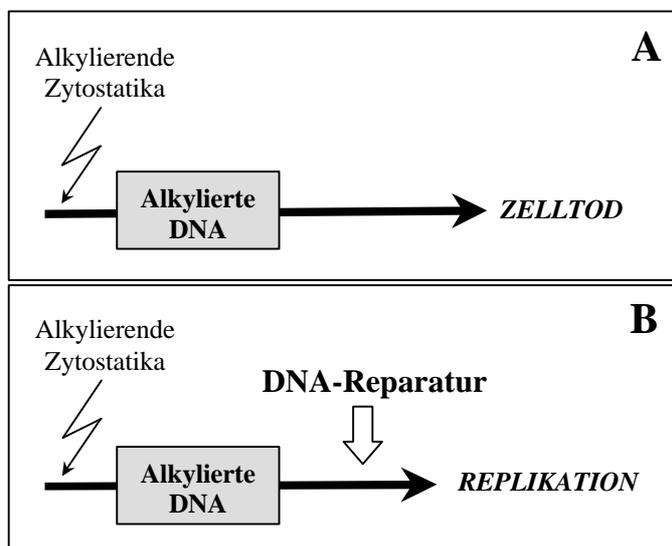


Abbildung 1.2-3 Vereinfachte Darstellung der Folgen einer Behandlung mit alkylierenden Zytostatika bei bestehender DNA-Reparatur-Aktivität (A) und ohne Reparatur-Aktivität (B).

der Reparaturaktivität in Tumor- und Normalgewebe betrachtet werden, um sich ein Bild davon zu machen, wie sich dieser Zusammenhang klinisch auswirken kann.

Im folgenden wird vereinfacht von Tumor- und Normalgewebe gesprochen, wobei dadurch zwischen therapeutischen Zielgeweben und Gewebearten, die im Idealfalle nicht durch die Therapie beeinflusst werden, unterschieden wird.

Der Erfolg einer Behandlung mit alkylierenden Zytostatika hängt von

einer ausreichenden Menge an DNA-Addukten im Tumorgewebe und einem möglichst geringen Adduktierungsgrad im Normalgewebe ab. Im Tumorgewebe müssen genügend Schädigungen persistieren, um die Zellen in den programmierten Zelltod (*Apoptose*) zu

treiben und damit keine überlebensfähige Mutanten oder initiierte Zellen erhalten bleiben. Im Normalgewebe manifestieren sich die DNA-Schädigungen durch das Auftreten von Nebenwirkungen, die oftmals limitierend für die Anwendungsmöglichkeiten der Therapeutika sind. Am Beispiel der O⁶-Methylguanin-DNA methyltransferase (MGMT) läßt sich dieser Zusammenhang verdeutlichen (Abbildung 1.2-4). Das günstigste Verhältnis, bezogen auf den Therapieerfolg bei der Behandlung mit methylierenden oder chlorethylierenden Chemotherapeutika besteht bei maximaler Aktivität der MGMT im Normalgewebe und minimaler MGMT-Aktivität im Tumorgewebe. Im optimalen Falle würde dies zur Eindämmung des Tumorwachstums bei geringen Nebenwirkungen führen, da die protektiven Mechanismen nur das Normalgewebe, und nicht das Tumorgewebe schützen. Umgekehrt kann es zur Therapieresistenz bei Tumoren kommen, wenn diese verglichen mit dem Normalgewebe sehr hohe MGMT-Level aufweisen. Die Adukte werden im Tumorgewebe repariert, so daß dieses weitestgehend störungsfrei proliferieren kann. Im Normalgewebe jedoch persistieren die Schädigungen, weshalb es zu ausgeprägten Nebenwirkungen kommt.

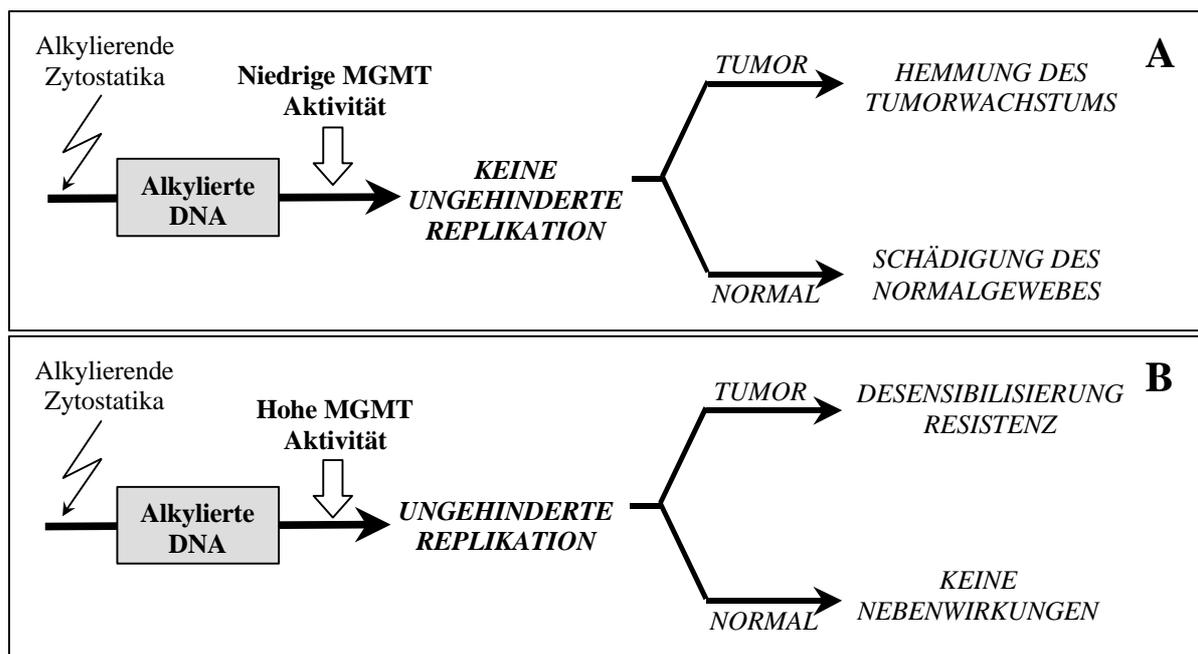


Abbildung 1.2-4 Zusammenhang zwischen DNA-Reparatur und dem möglichen Therapieerfolg mit alkylierenden Zytostatika am Beispiel der MGMT im Vergleich Tumor- und Normalgewebe.

In zahlreichen Versuchen wurde gezeigt, daß MGMT sowohl vor dem Einfluß methylierender- [Domoradzki et al. 1984; Kaina et al. 1991] und chlorethylierender Alkylantien [Preuss et al. 1996; Becker et al. 1997] als auch vor der toxischen Wirkung von Cyclophosphamid [Friedman et al. 1999; Cai et al. 1999], von Dacarbazin [Psaroudi & Kyrtopoulos 2000] und Azoxymethan [Wali et al. 1999] schützt. Die MGMT hemmt die

Induktion von Mutationen [Federwisch et al. 1997], Einzelstrang- und Chromosomenbrüchen [Kaina et al. 1997; Bean et al. 1994], sowie die toxische Gesamtwirkung der Substanzen. Der protektive Effekt konnte *in vitro*- [Pegg & Dolan 1987] und *in vivo* [Becker et al. 1996; Kaina et al. 1998; Wali et al. 1999] gezeigt werden. Die Auswirkungen der Depletion der MGMT-Aktivität (Kapitel 1.3) sind ein weiterer Beweis für die Bedeutung im Zusammenhang mit der Resistenz von Tumoren. Das Ansprechverhalten auf Chloroethylnitrosoharnstoff konnte in klinischen Versuchen bei Patienten mit Hirntumoren (Astrozytomen) mit der MGMT-Expression korreliert werden [Jaeckle et al. 1998].

1.3. Resistenzüberwindung

Wie in Kapitel 1.2.3 erläutert, besteht ein Zusammenhang zwischen der Resistenz eines Tumors gegenüber der Behandlung mit alkylierenden Zytostatika und der Aktivität der O⁶-Methylguanin-DNA methyltransferase (MGMT). Durch Inaktivierung der MGMT können Tumoren mit einer hohen MGMT-Aktivität sensibilisiert werden, so daß deren Wachstum durch die Therapie mit methylierenden und chlorethylierenden Agenzien gehemmt werden kann. Neben der Doppeltherapie (Kapitel 1.3.1) und dem Einsatz von MGMT-Inhibitoren (Kapitel 1.3.2) existieren weitere Strategien, auf die nicht näher eingegangen wird. Hierzu gehört beispielsweise die Anwendung von Ribozymen [Citti et al. 1999] oder eine Antisense-Strategie [Citti et al. 1996].

1.3.1. Doppeltherapie

Die Doppeltherapie beruht auf dem sequentiellen Einsatz einer methylierenden und einer chloroethylierenden Substanz. Das methylierende Alkylans verursacht eine Reihe von Läsionen in der DNA, die durch die MGMT-Aktivität repariert werden. Aufgrund seiner typischen Eigenschaften als *Suizid-Enzym* (Kapitel 1.2.2) wird dadurch die MGMT vollständig inaktiviert („verbraucht“) und steht nicht zur Reparatur der anschließend durch das chloroethylierende Agens verursachten DNA-Schäden zur Verfügung (Abbildung 1.3-1). Ein Vorteil besteht darin, daß solche Verbindungen in vielen Ländern bereits als Arzneimittel zugelassen sind und somit keine langwierigen Anmeldeverfahren erforderlich wären, bis eine klinische Anwendung erfolgen könnte [Dolan & Pegg 1997]. Erste Versuche mit solchen Kombinationen zeigten sowohl *in vitro* [Futscher et al. 1989] als auch *in vivo* Erfolg [Meer et al. 1989]. In Einzelfällen jedoch war trotz nachgewiesener MGMT-Inaktivierung keine Verbesserung des therapeutischen Index von BCNU erkennbar [Mitchell & Dolan 1993]. Es wurden klinische Studien durchgeführt, in denen Streptozotozin und BCNU sowie

Dacarbazin, kombiniert mit Fotemustin, zum Einsatz kamen. Für erstgenannte Kombination konnte bei Melanom [Gerard et al. 1993] und metastasierendem Colon-Karzinom [Willson et al. 1995] keine klinische Verbesserung gezeigt werden.

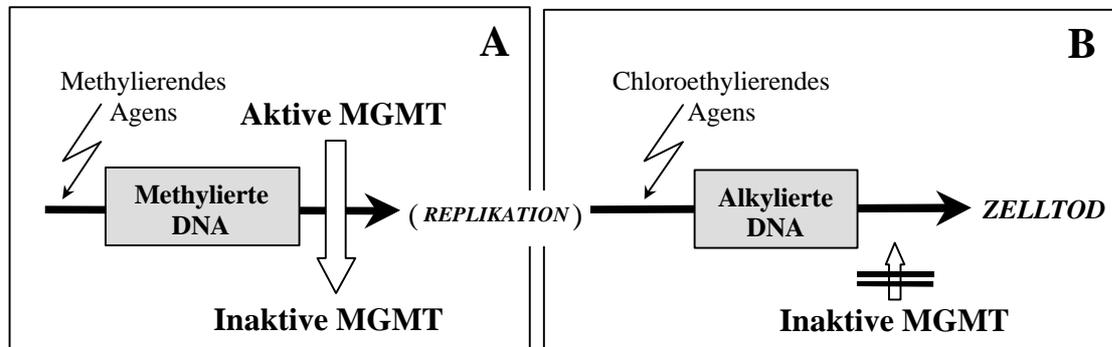


Abbildung 1.3-1 Schematische Darstellung der Doppeltherapie mit einem methylierenden Zytostatikum (A) zur Inaktivierung der MGMT und einem chloroethylierenden Zytostatikum zur Hemmung des Tumorwachstums (B).

Vor allem die erhöhte Gesamttoxizität und eine möglicherweise nicht vollständige Hemmung der MGMT-Aktivität im Tumor wurden als Gründe für die Ergebnisse diskutiert. Die Kombination von Dacarbazin mit Fotemustin hingegen erwies sich in einer weiteren Studie an Melanom-Patienten als wirksam [Gerard et al. 1993]. Wegen des mutagenen und kancerogenen Potentials des methylierenden Agens [Saffhill et al. 1985] wurde die Entstehung sekundärer Leukämien befürchtet, weshalb die Doppeltherapie insgesamt als wenig vielversprechend erachtet wird [Dolan & Pegg 1997].

1.3.2. MGMT-Inhibitoren

Bereits 1985 wurden erste Versuche zur Hemmung der MGMT-Aktivität mittels O⁶-Alkylguaninen *in vitro* unternommen [Dolan et al. 1985]. Durch diese Experimente konnte die Bedeutung des protektiven Charakters des Enzyms evaluiert werden. Es zeigte sich dabei an verschiedenen Modellen [Dolan et al. 1990 und 1991; Terashima & Kohda 1998; Buchdahl et al. 1998], daß die MGMT-Hemmung eine Verstärkung der Effektivität chlorethylierender und methylierender Substanzen in einer Reihe von Zelllinien zur Folge hat. MGMT schützt vor den mutagenen Eigenschaften der Alkylantien in Ratten [Wali et al. 1999] und den toxischen Eigenschaften der Alkylantien in Mäusen [Cussac et al. 1994]. Die Pseudosubstrate reagieren mit der MGMT analog der alkylierten DNA. In einer S_N2-Reaktion wird der O⁶-Substituent eines Guaninderivates auf die Cystein-Akzeptorstelle im aktiven Zentrum der MGMT übertragen (Abbildung 1.3-2) [Dolan et al. 1990 und 1991]. Der am besten untersuchte MGMT-Inhibitor ist das O⁶-Benzylguanin. Durch den Benzyl-Rest wird der

Übergangszustand der S_N2 -Reaktion stabilisiert und somit ein entscheidender Vorteil gegenüber aliphatischen Substituenten erreicht. O^6 -Benzylguanin ist in sehr vielen biochemischen und biologischen Experimenten untersucht und charakterisiert worden [Pegg & Byers 1992; Pegg et al. 1995; Dolan & Pegg 1997; Pegg 2000]). Neben pharmakodynamischen Größen wurden auch pharmakokinetische Parameter in Mäusen und Ratten [Dolan et al. 1994], sowie in Affen [Berg et al. 1995] ermittelt. O^6 -Benzylguanin

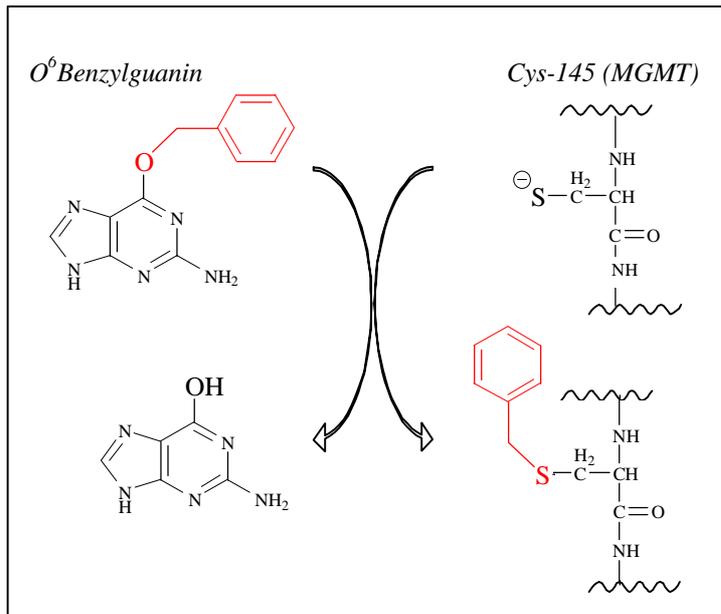


Abbildung 1.3-1 Mechanismus der MGMT-Inaktivierung durch O^6 -Benzylguanin

befindet sich derzeit in klinischen Prüfungen der Phase II an verschiedenen Kliniken in den USA und wird dort in der Kombination mit BCNU getestet [Friedman et al. 1998; Dolan & Pegg 1997]. O^6 -Benzylguanin ist nicht in der Lage, mit allen bekannten MGMTs zu reagieren. Außer dem Produkt des *E.coli ada*-Gens [DOLAN et al. 1991] sind weitere resistente Alkyltransferasen gegenüber

der Inaktivierung durch O^6 -Benzylguanin bekannt. Hierunter fallen neben experimentell erzeugten Mutanten auch einige Polymorphismen [Xu et al. 1999; Deng et al. 1999; Kaur et al. 2000; Inoue et al. 2000]. Die Tatsache, daß der Austausch einzelner Aminosäuren zur Resistenzentwicklung gegenüber O^6 -Benzylguanin führen kann, erhöht die Gefahr, daß resistente MGMT-Stämme, bedingt durch den Selektionsdruck während einer chemotherapeutischen Behandlung, auftreten. Auf der anderen Seite können solche Proteine, bzw. deren Gene genutzt werden, um während einer Hochdosistherapie Stammzellen damit zu transfizieren. Insbesondere vor dem Hintergrund, daß Knochenmarkzellen nur sehr niedrige MGMT-Level aufweisen, wäre nach der Transplantation dieser Stammzellen ein wirksamer Schutz gegenüber der darauffolgenden Kombinationstherapie mit O^6 -Benzylguanin und einem Alkylans gegeben [Limpfoster & Kelley 2000; Jelinek. et al. 1996].

Die entscheidenden Nachteile des O^6 -Benzylguanin sind die mangelnde Wasserlöslichkeit und die geringe Selektivität gegenüber Tumorgewebe. Aus diesen beiden Gründen und um wirksamere Substanzen zu identifizieren, wurden zahlreiche weitere potentielle MGMT-

Inhibitoren synthetisiert und getestet. Anhand der fast 250 untersuchten Substanzen mit Pyrimidin- und Purin-Grundgerüsten lassen sich einige Aussagen bezüglich der Struktur-Wirkungs-Beziehung ableiten [Pegg & Byers 1992; Pegg et al. 1995; Pegg 2000].

A *O*⁶-substituierte Purine:

- Werden Positionen 1, 3, 7 durch Kohlenstoffatome ersetzt, zeigt lediglich die Veränderung an 1 signifikante Verringerung der Aktivität [Spratt & De-Los-Santos 1992].
- Entfernung der exozyklischen Amino-Gruppe an Position 2 führt zu vollständigem Wirkungsverlust [Spratt & De-Los-Santos 1992]; Substitutionen an dieser Stelle führen zu verringerter Wirkung [Chae et al. 1994].
- Wird der exozyklische Sauerstoff an Position 6 durch Se oder S ersetzt, wird nur durch Se die Wirkung verringert [Spratt & De-Los-Santos 1992].
- An Position 6 führen einige Substituenten zu aktiveren Verbindungen als O6BG, z.B. ist die Aktivität des 4-Bromophenyl-Derivat um Faktor 10 höher angegeben [Cancer Research Campaign Technology Limited 1997; McElhinney et al. 1998].
- Substitution in Position 7 führt zu massivem Wirkungsverlust (Kapitel 3.4) [Moschel et al. 1992; Chae et al. 1994].
- Bildung des 8-Aza- (X = N, Abbildung 1.3-9) oder des 8-Bromo-O⁶-Benzylguanin-Derivates führt zu aktiveren Verbindungen. Andere Substituenten (Methyl-, Hydroxy-, Trifluoromethyl-) sind ähnlich potent wie O6BG [Chae et al. 1995].
- In Position 9 ist festzustellen, daß Substituenten prinzipiell akzeptiert werden, jedoch eine Abhängigkeit von der Größe und der Lipophilie zu bestehen scheint. Hydrophile Substituenten wirken sich stark aktivitätsmindernd aus [Moschel et al. 1992]. Die Größe spielt vor allem nach Zusatz von DNA eine Rolle [Pegg et al. 1997].

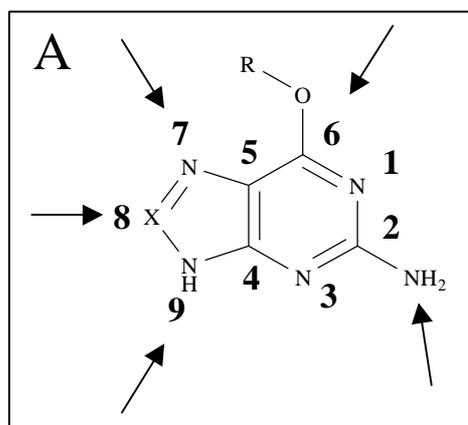


Abbildung 1.3-3 Nomenklatur des Purin-Grundgerüsts. Die Pfeile kennzeichnen die Substitutionsorte.

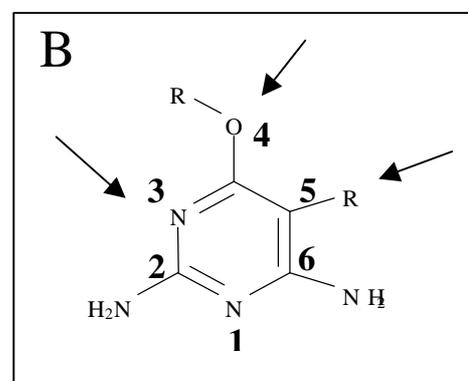


Abbildung 1.3-4 Nomenklatur des Pyrimidin-Grundgerüsts. Die Pfeile kennzeichnen mögliche Substitutionsorte.

BO⁴-substituierte Pyrimidine:

- Substitution der NH₂-Gruppe in Position 2 führt zu massivem Wirkungsverlust [Chae et al. 1994].

- In Position 5 sind das entsprechende Nitro- und Nitroso- Derivat der O⁶-Benzyl-Verbindung wirksamer als O6BG [Chae et al. 1994].
- Substituenten in Position 4 mit zusätzlichem elektronenziehendem (*-I*)-Effekt (z.B. *p*-Fluorobenzyl-) wirken sich steigernd auf die MGMT-Inhibition aus.

Einige Substanzen wurden wegen gewisser Vorteile gegenüber O6BG näher untersucht. Hierzu gehörten aktivere, wie 8-Aza-O⁶-benzylguanin (8ABG), 8-Bromo-O⁶-benzylguanin und das O⁶-(4-Bromophenyl)-guanin (4BTG), sowie 2,6-Diamino-4-(benzyloxy)-5-nitrosopyrimidin (5-Nitro-BP, 5-Nitroso-BP). Für keine der drei erstgenannten Substanzen konnte eine tumorspezifische Wirkung im Tiermodell nachgewiesen werden [Mitchell & Dolan 1993; Bibby et al. 1999; Middleton et al. 2000]. Die Pyrimidine zeigten Halbwertszeiten von weniger als 4 min (5-Nitroso-BP), bzw. unter 15 min (5-Nitro-BP) und sind dementsprechend ungeeignet für eine therapeutische Maßnahme [Roy et al. 1996]. Weitere vielversprechende Substanzen sind O⁶-Benzylierte Derivate des N-Acetylguanosins [Cussac et al. 1994; Buchdahl et al. 1998], bzw. des Desoxyguanosins [Kokkinakis et al. 1994 und 1996]. Insbesondere wegen der verbesserten Wasserlöslichkeit und günstigerer pharmakokinetischer Eigenschaften wurden diese trotz erheblich geringerer MGMT-Aktivität getestet. Auch in diesen Fällen konnte für keine der Substanzen eine Selektivität gegenüber Tumorgewebe gezeigt werden. Dennoch zeigen die Versuche, daß auch Verbindungen, die *in vitro* wenig vielversprechend sind, aufgrund anderer Vorteile *in vivo* vergleichbare Ergebnisse liefern.

1.4. PARP-Inhibitoren

1.4.1. Allgemeine Grundlagen

PARP ist die allgemein gebräuchliche Abkürzung für Poly-(ADP-Ribose) Polymerase; (EC-Nomenklatur: NAD^+ : *poly(adenosine diphosphate D-ribose) ADP-D-ribosyl-transferase*). PARP bildet unter Verbrauch von NAD^+ durch Polymerisierung von ADP-Einheiten Poly-(ADP-Ribose) zur posttranslationalen Modifikation von Proteinen. Das Enzym besitzt drei funktionelle Domänen [Oliver et al. 1999]: (1) eine *DNA-Bindungsdomäne*, die mittels zweier sogenannter „Zinkfinger“-Strukturen spezifisch an DNA-Einzel- und Doppelstrangbrüche bindet [Gradwohl & Menissier de Murcia 1990], (2) eine *NAD^+ -bindende Domäne*, über die die eigentliche Polymerisierung durchgeführt wird, sowie (3) eine glutamatreiche *Automodifikationsdomäne*, an der sich das Enzym selber poly-(ADP-Ribosyl)iert [Oliver et al.

1999]. Der Aufbau der Poly-(ADP-Ribose) erfolgt in drei wesentlichen Schritten [Alvarez Gonzalez et al. 1994]:

Initiation: Bildung von Nikotinamid aus der oxidierten Form des Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid (= NAD⁺) und Veresterung des ADP-Ribose-Teils mit der freien Carboxylgruppe (C1'-Asp oder C1'Glu) des Akzeptorproteins.

Elongation: Bildung des Rückgrats durch glykosidische Verknüpfung weiterer ADP-Ribose-Einheiten.

Branching: Einführung von Quervernetzungen durch Knüpfung von Ribose(1''-2'')Ribose(1'-2')Ribose-Bindungen (ca. 1 Quervernetzung / 40 Monomere).

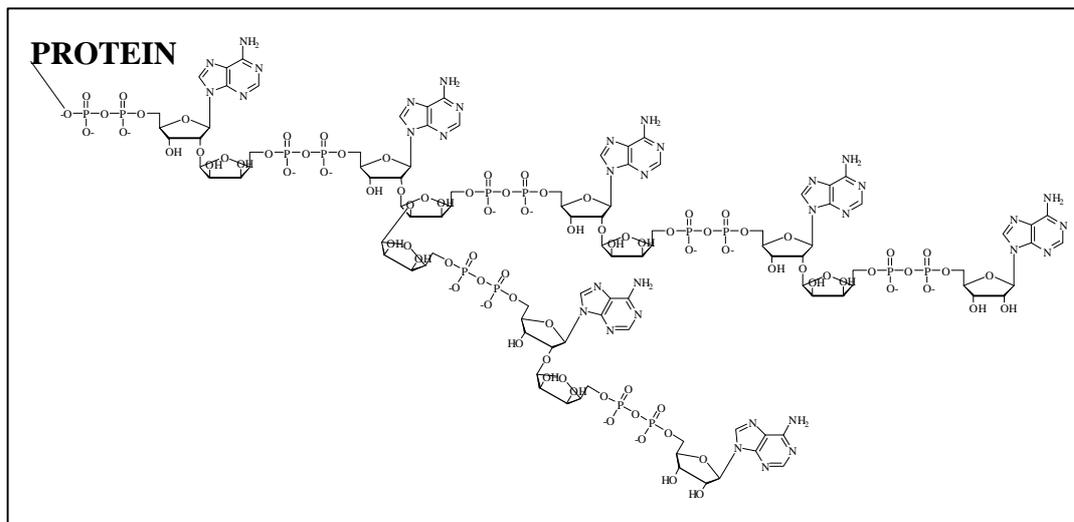


Abbildung 1.4-1 Struktur der Poly-(ADP-ribose). Ausschnitt nach [Oei et al. 1997].

Zum Abbau der Poly-(ADP-Ribose) (PAR) wird das Polymer durch die Poly-(ADP-Ribose) Glykohydrolyase systematisch in kleinere Fragmente zerlegt [Desnoyers et al. 1995].

Der PARP-Aktivität wird eine wichtige Rolle in der DNA-Reparatur [Malanaga & Althaus 1994], genauer der Basen-Exzisionsreparatur (Kapitel 1.2.1) zugeordnet [Molinet et al. 1993]. Darüberhinaus werden Einflüsse auf eine Vielzahl weiterer zellulärer Prozesse wie z.B. Differenzierung, Transkriptionsregulation, Apoptose und Alterung kontrovers diskutiert, wobei die genaue physiologische Rolle immer noch unklar ist [Oei et al. 1997]. Der hohe Energieverbrauch jedoch legt den Schluß nahe, daß es sich um sehr wichtige Prozesse innerhalb des Zellkerns handeln muß.

Im Zusammenhang mit der Basen-Exzisions-Reparatur konnte gezeigt werden, daß PARP-Aktivität zwar nicht notwendig zur Aufrechterhaltung ist, wohl aber stimulierenden Charakter auf diese Funktion hat [Lindahl et al. 1995]. Althaus und Mitarbeiter propagieren, daß PARP in diesem Zusammenhang nach einem sogenannten "Shuttle"-Mechanismus ihre Wirkung entfalten könnte [Althaus et al. 1992]. Demnach bindet die PARP selektiv über nicht

kovalente Wechselwirkungen an die Histone von geschädigten DNA-Abschnitten und löst diese dadurch von der DNA, so daß diese frei zugänglich für die Reparatur vorliegt. Nach Abschluß des Vorgangs wird die PARP inaktiv, die Poly(ADP-Ribose) abgebaut und die Histone können wieder an die DNA binden.

Eine weitere, sehr wichtige Rolle innerhalb der zellulären Regulation nimmt die PARP im physiologischen Ablauf der Apoptose ein.

Apoptose spielt eine wesentliche Rolle bei physiologischen Prozessen wie z.B. Embryogenese (Absterben überflüssiger Organanlagen), Gewebshomöostase (Verhinderung von Neubildungen) und der Funktion des Immunsystems (Apoptose-Induktion bei Zielzellen von Killerzellen). Der Zelluntergang wird durch die genetische Information der betroffenen Zelle selbst reguliert [Hildebrandt et al. 1998]. Apoptose kann durch Rezeptoraktivierung, Entzug von Wachstumsfaktoren und genotoxische Einflüsse wie auch durch Chemotherapeutika induziert werden. Morphologisch macht sich die Degradation durch Merkmale wie Zellverkleinerung, Chromatinkondensation und DNA-Fragmentierung bemerkbar. Als letzter Schritt führt dies zur Bildung der apoptotischen Körper, die aus membrangebundenen Zellbestandteilen bestehen, wodurch das umliegende Gewebe vor toxischen Einflüssen der Abbauprodukte geschützt wird [Evan & Littlewood 1998]. Die intrazelluläre Signaltransduktion der Apoptose erfolgt wahrscheinlich hauptsächlich über Caspasen, Proenzyme, die inaktiv im Cytoplasma vorliegen und in kaskadenförmiger Abfolge Proteine, die an Reparatur- und Homöostase beteiligt sind, inaktivieren und gleichzeitig die notwendigen Abbauschritte der zellulären Bestandteile einleiten [Thornberry & Lazebnik 1998].

Während der Apoptose wird die PARP von Caspasen an einer Stelle hydrolysiert, wodurch die DNA-Bindungsdomäne vom aktiven Zentrum getrennt wird und ein inaktives Enzym zurückbleibt [Kauffmann et al. 1993]. Entsprechend wird durch Hemmung der Apoptose auch die PARP-Inaktivierung blockiert [Duriez. & Shah 1997]. Der Zusammenhang zwischen der Apoptose und der Notwendigkeit der PARP-Hemmung läßt sich in zwei wichtigen Punkten zusammenfassen [Oliver et al. 1999]:

- PARP-Inaktivierung ist notwendig, damit zelluläre Genom-Überwachungsmechanismen und DNA-Reparatur keinen retardierenden Einfluß auf die Chromatin-Degradation ausüben.
- PARP-Inaktivierung verbessert die Zugänglichkeit des Chromatins für Endonucleasen, die verantwortlich für die DNA-Fragmentierung sind, und verhindert die Reparatur der Einzelstrangbrüche, die über PARP-Bindung vermittelt werden würden [Le Cam et al. 1994]. Die DNA-Bindungsdomäne der PARP bindet an internucleosomale DNA, was entscheidend für den irreversiblen Charakter der Apoptose sein könnte [Smulson et al. 1998].

Außer durch Apoptose können Zellen auch durch Nekrose zugrunde gehen. Hierunter versteht man den Zelltod infolge irreparabler Ausfälle von Zellfunktionen, der keinem programmierten Ablauf unterliegt.

Welcher dieser beiden Wege eingeschlagen wird, hängt hauptsächlich vom Ausmaß der DNA-Schädigungen ab:

- Eine limitierte Anzahl an Läsionen führt nach PARP-Aktivierung zur DNA-Reparatur oder über einen p53-vermittelten Weg in die Apoptose.
- Ein zu hoher Grad an Modifikationen hingegen leitet die Nekrose ein, bei der die PARP eine ebenso entscheidende Rolle einnehmen kann.

Auch während dieser Prozesse wird die PARP hydrolysiert. Die Fragmente unterscheiden sich dabei strukturell und funktionell von den apoptotischen, da die nekrotischen PARP-Bruchstücke die Aktivität des Enzyms aufrecht erhalten können [Guillouff et al. 1999].

Die Überaktivierung der PARP durch die große Zahl an DNA-Schäden hat einen extrem hohen ATP-Verbrauch zur Folge, wodurch die zellulären ATP-Vorräte vollständig depletiert werden. Der Verlust dieses Energielieferanten bringt essentielle Zellstoffwechselfvorgänge zum Erliegen und führt in letzter Konsequenz zum nekrotischen Zelltod [Hirsch et al. 1997]. Die Pathologie einiger Erkrankungen wird mit der vorhergehenden Inaktivierung der Apoptose in Verbindung gebracht. Man geht hierbei davon aus, daß die Gewebeschädigungen durch Substanzen, die aus nekrotischen Zelluntergängen freigesetzt werden, verursacht werden [Hirsch et al. 1997]. Die PARP reagiert dabei im umliegenden Gewebe wie ein Multiplikator: Weitere Zellen werden geschädigt, die PARP Aktivität führt zur ATP-Depletion, infolge dessen stirbt auch diese Zelle an Nekrose und setzt dabei wieder zyto- und genotoxische Verbindungen frei, die wiederum das umliegende Gewebe angreifen und so fort. Es entwickelt sich ein *circulus vitiosus*, der erst durch Apoptose-effiziente Zellen außer Kraft gesetzt wird.

PARP wird dementsprechend mit Krankheiten in Verbindung gebracht, bei denen nekrotische Zelldegenerationen infolge von Entzündungen eine Rolle spielen wie z.B. Ischämie (Schlaganfall, Herzinfarkt), Diabetis, und septischer Schock.

Inaktivierung der PARP in Tiermodellen führte nach Induktion solcher Ereignisse in allen Fällen zu einem positiveren klinischen Verlauf. Eine Begründung hierfür wird von Szabo und Dawson vorgeschlagen [Szabo & Dawson 1998]: Nach entzündlich bedingtem Streß oder während der Reperfusion nach zerebraler Ischämie wird durch Makrophagen und endotheliales Gewebe die Produktion von Stickoxid (NO) angeregt. Dieses wird zu Peroxiden oxidiert, welche als hochpotentielle Oxidantien im Gewebe um die primär geschädigten

Zellen DNA-Läsionen verursachen. Die infolgedessen entstehenden Einzelstrangbrüche induzieren die PARP-Aktivität, was zur ATP-Depletion und zur Nekrose führt. Desweiteren konnte ein Zusammenhang zwischen der PARP und NF- κ B gezeigt werden, einem Transkriptionsfaktor, der eine Schlüsselrolle in entzündlichen Prozessen einnimmt [Oliver et al. 1999].

Es ergibt sich infolgedessen der Ansatz, PARP-Inhibitoren bei solchen Erkrankungen einzusetzen, um das Voranschreiten von Gewebeschädigungen zu verhindern. Die Inhibitoren sollten eine hohe Präferenz gegenüber geschädigten Zellverbänden aufweisen, damit die protektive Funktion im restlichen Gewebe erhalten bleibt. Daneben ist die Tumorthherapie mittels Alkylantien und ionisierenden Strahlen ein vielversprechendes Anwendungsgebiet zur Modulation der PARP-Aktivität. Bei der Behandlung mit alkylierenden Agenzien konnte sowohl *in vivo* als auch *in vitro* eine Potenzierung der Wirkung durch Zusatz von PARP-Inhibitoren erreicht werden [Berger et al. 1982; Brown et al. 1984; Malapetsa et al. 1996]. Der Effekt konnte desweiteren für Bleomycin [Huet & Laval 1985], Cisplatin [Bürkle et al. 1993] und ionisierende Strahlung [Fritz et al. 1994; Chatterjee et al. 1999] nachgewiesen werden. Eine erhöhte Sensibilisierung war auch bei der Behandlung mit nicht therapeutisch angewandten Alkylantien wie dem *N*-Methyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidin oder Methylmethansulfonat zu beobachten [Fritz et al. 1994; Chatterjee et al. 1999]. Der protektive Effekt der PARP auf die Einwirkung alkylierender Agentien und von γ -Strahlung wurde anhand von PARP-*Knockout*-Mäusen, einem *Two-Hybrid-Screen* und weiteren Testsystemen wie dem *Comet-Assay* gezeigt [Oliver et al. 1999]. Bei allen Ergebnissen muß jedoch kritisch hinterfragt werden, ob diese ausschließlich durch den Effekt der Poly(ADP-Ribosyl)ierung oder aber auch durch Hemmung der Mono(ADP-Ribosyl)ierung bedingt sein können. Hierbei handelt es sich ebenfalls um posttranslationale Modifikationen von Proteinen, die in verschiedenen Kompartimenten vorliegen können [Rankin et al. 1989]. Eine Problem der Behandlung mit PARP-Inhibitoren stellt deren Einfluß auf die Genamplifikation dar. Die erhöhte Expression der Dihydrofolat-Reduktase stellt einen wichtigen Mechanismus in der Resistenzentwicklung gegenüber Methotrexat dar. Die Induktion dieser Amplifikation durch alkylierende Agenzien wie auch durch ionisierende Strahlung wird durch die Inhibition der PARP potenziert [Bürkle et al. 1990; Hahn et al. 1990]. In letzter Konsequenz kann dies zu einer Entstehung neuer Resistenzen führen.

Die Ergebnisse lassen den gleichen Schluß zu, der für Modulation der MGMT-Aktivität gilt (Kapitel 1.2.3). Auch die Inhibition der Poly(ADP-Ribose) Synthese bietet die Möglichkeit, bestehende therapeutische Maßnahmen in der Tumorthherapie zu verbessern, indem Gewebe in

verstärktem Maße sensibilisiert wird und eventuell Resistenzen umgangen werden können. Es handelt sich jedoch um ein „zweischneidiges Schwert“, da die Hemmung der PARP im Normalgewebe zu einem Verlust des protektiven Charakters und somit zu einer erhöhten Gefahr für das Auftreten unerwünschter Nebenwirkungen führt [Thraves et al. 1985].

1.4.2. PARP-Inhibitoren

Neben theoretisch unzähligen Möglichkeiten zur allosterischen Hemmung können vor allem auch die drei funktionellen Domänen der PARP als Angriffsziele zur Inhibition dienen.

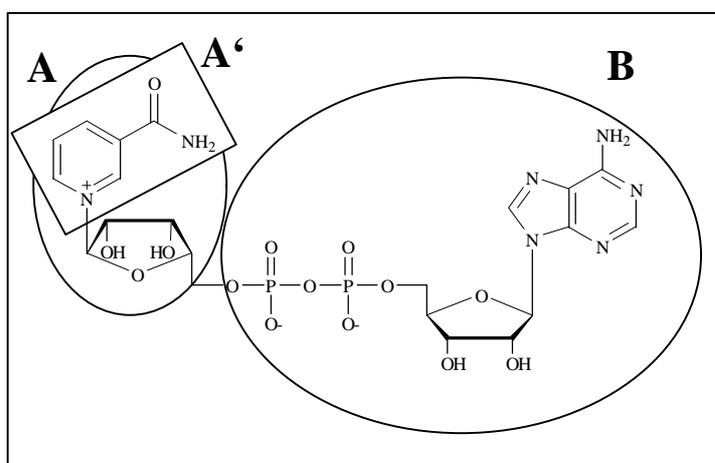


Abbildung 1.4-2 Struktur von NAD⁺

Insbesondere die NAD⁺-Bindungsstelle ist dabei von Interesse, da Hemmung der DNA-Bindungsstelle oder der Automodifikationsdomäne nicht zwangsläufig den Ausfall der Gesamtfunktion zur Folge hätte. Die Entwicklung von Molekülen, die für einen solchen Einsatz geeignet sind, orientierte sich zuerst am natürlichen Substrat, dem NAD⁺

(Abbildung 1.4-2). Es handelt sich hierbei um die oxidierte Form des Nicotinamidadenindinucleotids, das ein wichtiges Coenzym in der Übertragung von Wasserstoff, bzw. Elektronen darstellt. Teil **B** des NAD entspricht strukturell dem ADP (Adenosin-diphosphat) und würde dem Enzym keine Unterscheidung zwischen NAD und ADP ermöglichen. Dementsprechend kann man annehmen, daß die Substratspezifität in erster Linie durch Nicotinamid-*N*-ribosid (**A**) oder auch nur durch Nicotinamid (**A'**) determiniert wird. Aus diesem Grunde scheint es sinnvoll die Pseudo-Substrate, die mit der NAD-Bindungsdomäne interagieren sollen, strukturell an Teil **A** oder **A'** zu orientieren. Als erste PARP-Inhibitoren (Abbildung 1.4-3) wurden die strukturellen Analoga des Nicotinamids (**I**), das Benzamid (**II**) und das 3-Aminobenzamid (**III**) verwendet [White 1996]. Eine PARP-inhibitorische Aktivität ist jedoch erst bei Applikation von Konzentrationen im mM-Bereich zu beobachten. Die Weiterentwicklung dieser Verbindungen führte zu einer Reihe von Molekülen, die gewisse Gemeinsamkeiten aufweisen (**IV-VII**), jedoch teilweise bis um das eintausendfache wirksamer sind als die Grundstrukturen vom Benzamid-Typ. Sie besitzen

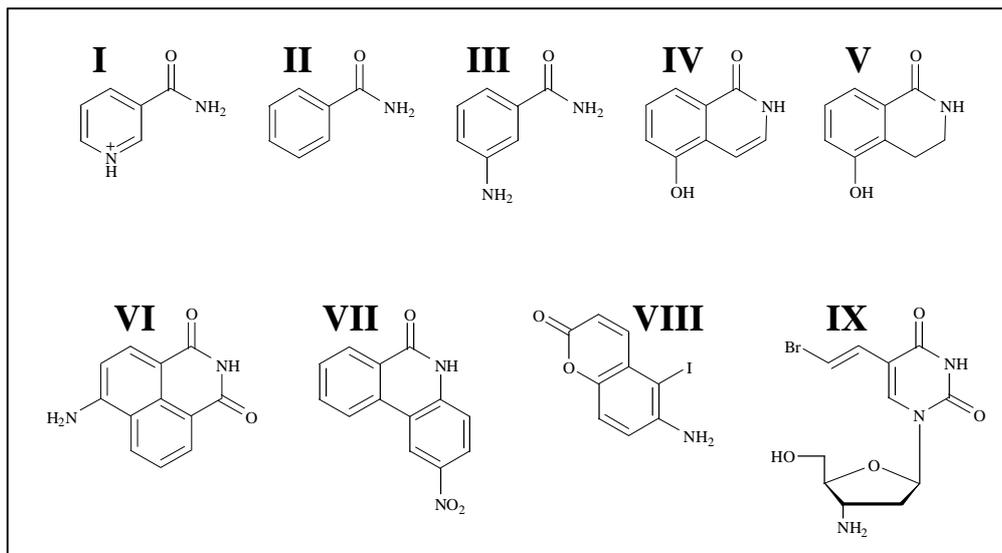


Abbildung 1.4-3 Strukturen bekannter PARP-Inhibitoren. Detaillierte Informationen im Text

eine aromatisch gebundene Säureamidfunktion (**I-III**), eine Lactamfunktion innerhalb eines Ringsystems (**IV,V,VII**), oder eine Imid-Struktur (**VI**). Die übereinander angeordnete Darstellung macht deutlich, welche Merkmale von Bedeutung für die PARP-Inhibition zu sein scheinen (Abbildung 1.4-4). Das Pharmakophor findet sich auch in Benzimidazo-Derivaten wieder, die von White 1996 synthetisiert und getestet wurden (Kapitel 3.2.2).. Dies stellt jedoch kein ausschließendes Kriterium dar, da beispielsweise auch für Dihydroisochinolinone (**VIII**, Abbildung 1.4-3) [Suto et al. 1991] und Nucleosid-Analoga (**IX**) [Pivazyan et al. 1992] eine Hemmung der Poly-(ADP-Ribosyl)ierung gezeigt werden konnte. Die Nitro-Verbindung **VII** unterscheidet sich von den anderen, da diese nicht direkt

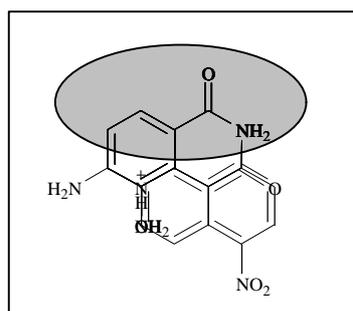


Abbildung 1.4-4
Darstellung der Strukturen der PARP-Inhibitoren aus Abb. 1.4-3. Grau hinterlegt ist das Pharmakophor.

an der NAD-Bindungsdomäne angreift, sondern durch Oxidation von Cystein-Residuen des ersten Zinkfingers (s.o.) die DNA-Bindungsdomäne selektiv schädigt [Rice et al. 1992]. Die PARP-Inhibitoren vom Benzamid-Typ besitzen auch in PARP-aktiven Konzentrationen keine zytotoxische Aktivität, können jedoch auch andere Stoffwechselfvorgänge wie Mono-ADP-Ribosylierungen beeinflussen [Rankin et al. 1989; Banasik et al. 1992]. Eine Beschreibung der möglichen Anwendungsgebiete der PARP-Inhibitoren findet sich in Kapitel 1.4.1.

1.5. HIV und AIDS

1.5.1. Allgemeine Grundlagen

Das *human immunodeficiency virus* (HIV), früher auch *human t-lymphotropic virus III* (HTLV-III), *lymphadenopathy-associated virus* (LAV) oder *AIDS-related virus* (ARV) genannt wurde 1983/1984 als Erreger der 1981 erstmals beschriebenen AIDS-Krankheit (*acquired immune deficiency syndrome*) identifiziert [Barre-Sinoussi et al. 1983; Gallo et al. 1984]. AIDS entspricht per Definition dem Stadium 3 der HIV-Erkrankung [Hildebrandt et al. 1998].

Klinisch manifestiert sich die Infektion durch die erhöhte Anfälligkeit der Patienten gegenüber opportunistischen Infektionen und anderen Erkrankungen, sowie durch neurologisch-psychiatrische Symptome [Hildebrandt et al. 1998]. Das HI-Virus vermehrt sich in Zellen des Immunsystems, wobei die Zielzellen in erster Linie sogenannte T-Helferzellen und Zellen des Monozyten-Makrophagen-Systems sind, die den CD4⁺-Rezeptor tragen [Gendelman et al. 1989]. Es existieren jedoch möglicherweise auch CD4-unabhängige Adhäsions- und Replikationsmechanismen [Hildebrandt et al. 1998]. Mononukleäre Zellen sind gegenüber den zytotoxischen Wirkungen des Virus resistent und können noch über Jahre als mögliches Reservoir für den Erreger dienen [Gendelman et al. 1989]. Die Helferzellen sterben nach der Infektion mit dem HI-Virus ab, was zu einer direkten Schwächung der zellulären Immunität führt. Die Freisetzung ungerichteter Immunglobuline hemmt dabei indirekt die spezifische Abwehr. Zusätzlich kommt es durch dauerhafte antigene Stimulation zur Bildung von Entzündungsprozessen, insbesondere der Neuroglia des ZNS [Hildebrandt et al. 1998]. Zwischen der Infektion und der Entwicklung eines klinisch manifesten Krankheitsbildes können zwischen 6 Monate und 10 Jahre liegen. Nicht alle unbehandelten Patienten, jedoch der größte Teil zeigt dabei den Immundefekt im Sinne der AIDS-Erkrankung [Hildebrandt et al. 1998]. Die Übertragung des Erregers erfolgt über ungeschützten Geschlechtsverkehr, Blut- und Organtransplantationen, Schwangerschaft, gemeinsame Verwendung kontaminierter Injektionsnadeln und über Kontakt mit infiziertem Blut (Stichverletzungen, Wunden etc.). Der Erreger ist mittels üblicher Desinfektionsmaßnahmen rasch inaktivierbar und außerhalb von Körperflüssigkeiten sehr instabil [Hildebrandt et al. 1998].

1.5.2. Molekularer Mechanismus der HIV-Infektion

Unter Viren versteht man die von Pasteur erstmals verwendete Sammelbezeichnung für “infektiöse Einheiten“, die im Gegensatz zu den “Protisten“ keine Zellstrukturen aufweisen. Viren bestehen aus Makromolekülen, weisen jedoch nur einen Nucleinsäuretyp als Erbgut auf. Formgebend ist das Kapsid, eine aus (Lipo-)Proteinen zusammengesetzte Hülle, die dem Virus insgesamt nur eine Größe von 20-300 nm verleiht. Sie besitzen keine eigenen

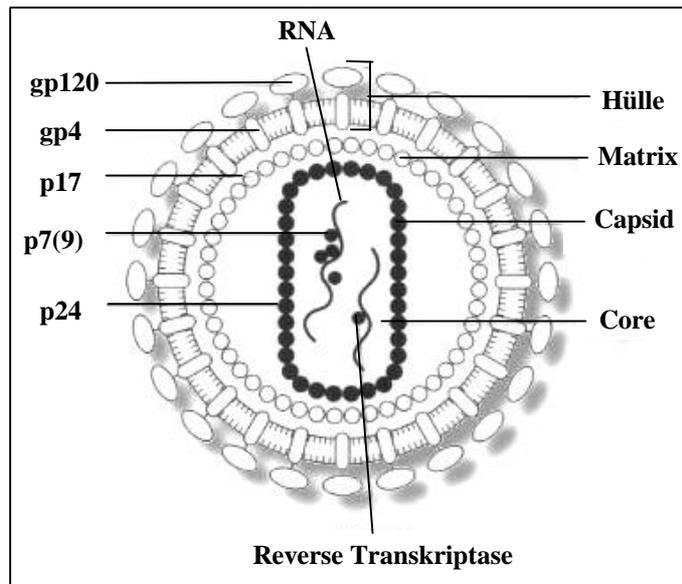


Abbildung 1.5-1 Schematischer Aufbau des HI-Virus.

Stoffwechsellzyme und können sich nicht selbst vermehren. Die Replikation erfolgt in Wirtszellen, in die die Viren ihr Erbgut einschleusen und so umprogrammieren, daß die Produktion aller Bestandteile eines infektionstauglichen Viruspartikels (Virion) erfolgen kann. Die Klassifikation erfolgt über den Aufbau, die Wirtszelle, die Nucleinsäure oder eine organspezifische Affinität [Burger & Wachter 1998]. Das *human*

immunodeficiency virus (HIV) gehört zu den neuro- und lymphotropen Retroviren, deren Erbgut in Form von RNA vorliegt und besitzt eine durchschnittliche Größe von 100 nm. Das Virus weist eine Vielzahl genetischer Polymorphismen auf, die unter anderem auf mangelnde Genauigkeit bei der Umschreibung der viralen RNA in Doppelstrang-DNA, sowie auf Rekombinationen zurückgeführt werden [Preston et al. 1988; Moutouh et al. 1996]. Es sind 15 Subtypen von HIV1 und HIV2 beschrieben: HIV1 Gruppe M, Subtypen A bis J; HIV1 Gruppe O Subtyp O; HIV2 Subtypen A bis E. Inwiefern die genetische Variabilität einen Einfluß auf die Pathogenität, die Präferenz für einen Zelltyp (*Zelltropismus*) oder die Übertragungswahrscheinlichkeit (*Transmissionswahrscheinlichkeit*) besitzt, ist nicht hinreichend geklärt.

Wie Abbildung 1.5-1 zeigt, besteht das HI-Virus aus sehr wenigen essentiellen “Bausteinen“. Im *Core*, dem “Herz“ des Virus, befindet sich, eingeschlossen von dem aus Proteinen (p24) gebildeten ikosaederförmigen Kapsid, das Erbgut in Form zweier RNAs von ca. 10 kb, die Reverse Transkriptase (RT) und ein Protein, p7(9). Die drei Bestandteile bilden den sogenannten Ribonucleoproteinkomplex. Die Matrix ist ebenso wie das Kapsid aus Proteinen

(p17) aufgebaut und liegt innerhalb der Hülle. Die Hauptbestandteile der lipidhaltigen Hülle, zwei Glykoproteine (gp41 und gp120) spielen eine entscheidende Rolle bei der Infektion: Der Kontakt mit der Wirtszelle erfolgt über Wechselwirkung von gp120 und gp41 mit dem auf der Zelloberfläche lokalisierten CD4-Rezeptor [McDougal et al. 1986; Lasky et al. 1987]. Auch spielen dabei Korezeptoren wie Fusin und CCR5 eine wichtige Rolle [Moore 1997; Weiss 1996]. CD4-Rezeptoren wurden anfangs nur auf T-Helferzellen vermutet, doch ist heute bekannt, daß sich solche Rezeptoren auch auf Makrophagen, Langerhans-Zellen, Dickdarmepithelien und im Gehirn finden [Berger 1997]. Nachdem der Virus-Zell-Kontakt hergestellt ist, fusionieren Virus und Zelle und die Virusbestandteile werden in das Zellinnere freigesetzt. Durch Aktivität der reversen Transkriptase wird die virale RNA in doppelsträngige DNA übersetzt, in den Zellkern importiert und mittels eines weiteren Virus-spezifischen Proteins, der Integrase, in das Wirtsgenom integriert (=Provirus). Der Zellstoffwechsel wird aktiviert und produziert genomische, sowie *messenger*-RNA, die für die notwendigen Virusbestandteile (Proteine) kodiert. Die Protease setzt die Bausteine zu infektiösen Viren zusammen und schleust diese als neue HI-Viren durch die Zellmembran. Ein wesentliches Merkmal der HI-Viren ist die große Heterogenität der im Laufe einer Infektion auftretenden Virusvarianten. Die reverse Transkriptase weist nur eine sehr geringe Lesegenauigkeit auf und verursacht ca. einen Fehler pro 1000 Nucleotide, was ungefähr 10 Fehlern bezogen auf das Virusgenom entspricht [Preston et al. 1988]. Angetrieben durch den Selektionsdruck des Immunsystems des Wirtes, entstehen immer neue Varianten des Virus, so daß aufgrund der zeitlichen Verzögerung der Immunantwort eine adäquate Immunität nicht erreicht werden kann [Tersmette et al. 1998].

Darüberhinaus können Rekombinationen durch sogenanntes *template switching* der beiden RNA-Kopien zu resistenten Mutanten führen [Moutouh et al. 1996]. Die HIV-Infektion unterliegt einer sehr großen Dynamik: Die Tatsache, daß ständig Viren repliziert und eliminiert werden, führt zu einer hohen *Turnover*-Rate, wobei pro Tag ca. 1×10^9 Viren neu gebildet werden. Ähnlich viele CD4-positive Zellen werden täglich ausgetauscht, was ca. 5 % des gesamten Lymphozyten-Pools entspricht. Die Zahl der gemessenen infizierten und nicht-infizierten Zellen, sowie die frei zirkulierenden Viren stellen dementsprechend jeweils nur eine Momentaufnahme des Gleichgewichts dar. Dies entspricht nicht der klassischen Vorstellung einer latenten Infektion [Ho et al. 1995; Wei et al. 1995].

1.5.3. HIV-Therapie

Nach wie vor kann AIDS nur symptomatisch behandelt werden. Neben der Vorbeugung und Therapie opportunistischer Erkrankungen steht die Verminderung der HIV-Replikation im Vordergrund. Primäre Ziele dabei sind das Absenken der HIV-RNA-Spiegel im Plasma und den Wiederanstieg der CD4⁺-Lymphozyten-Zahl zu erreichen. Dadurch verhindert man die voranschreitende Schädigung des Immunsystems und das Ausbleiben der in 1.5.2 beschriebenen Effekte [Carpenter et al. 2000]. In Abbildung 1.5-2 sind schematisch alle *Targets* der antiretroviralen Therapie dargestellt. Die zwei Hauptangriffsorte der heute verwendeten Chemotherapeutika sind die reverse Transkriptase (RT) und die HIV-Protease. RT-Hemmstoffe verhindern die Übersetzung der viralen RNA in doppelsträngige DNA, die zum Einbau in das Wirtsgenom und die anschließende Synthese der Virusbestandteile unerlässlich ist. Es werden dabei Nukleosidanaloga und nicht-nukleosidische-RT-Inhibitoren unterschieden.

Protease-Inhibitoren unterdrücken die Prozessierung der Virusbestandteile, so daß keine infektiösen Virione entstehen können. Daneben werden Integrase-Hemmer und Eintritts-Inhibitoren getestet, jedoch hat bis dato noch keine Verbindung dieser Klassen den die Zulassung als Arzneimittel erhalten.

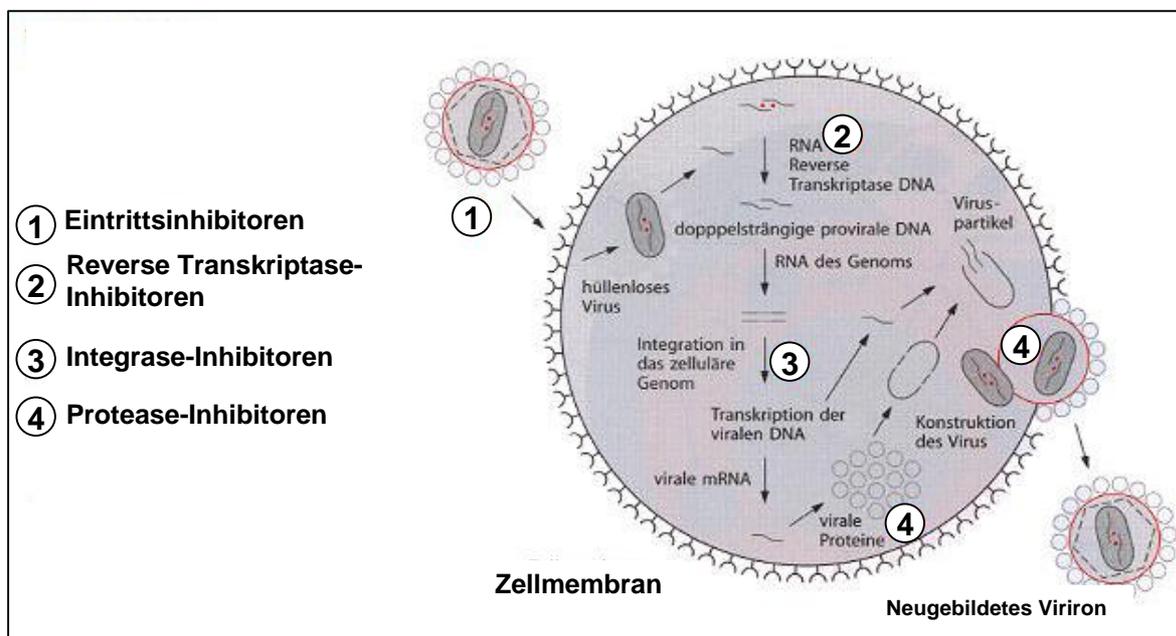


Abbildung 1.5-2 Schematische Darstellung der möglichen Angriffspunkte von Antiretroviralen Therapeutika.

Die effektivste Behandlung besteht in der simultanen Applikation von Therapeutika, die verschiedene *Targets* angreifen. Dadurch wird die Wahrscheinlichkeit der Entstehung überlebensfähiger Mutanten exponentiell gesenkt. Da nur eine begrenzte Anzahl an

Therapiemöglichkeiten besteht und das HI-Virus durch ausgeprägte genetische Polymorphismen sehr schnell resistente Varianten entwickelt, muß äußerst bedacht mit den Ressourcen umgegangen werden [Coffin 1995]. Jährlich werden deshalb neue Therapieempfehlungen ausgesprochen, die z.B. über das Robert-Koch-Institut oder über Richtlinien der *International AIDS Society* [Carpenter et al. 2000] eingesehen werden können. Die Bereitstellung von antiviralen Substanzen, die ein weiteres *Target* angreifen, würde eine erhebliche Verbesserung der Therapiemöglichkeiten darstellen.

In Deutschland standen 1999 insgesamt 16 Verbindungen zur Verfügung [Hellwig & Mutschler 1999], wobei es sich um die fünf Protease Inhibitoren *Indinavir*, *Ritonavir*, *Saquinavir*, *Nelfinavir* und *Amprenavir*; die sechs Nukleosidanaloga *Zidovudin*, *Didanosin*, *Zalcitabin*, *Stavudin*, und *Abacavir*, sowie die drei nicht-nukleosidischen RT-Inhibitoren *Nevirapin*, *Delavirdin* und *Efavirenz* handelt (Abbildung 1.5-3).

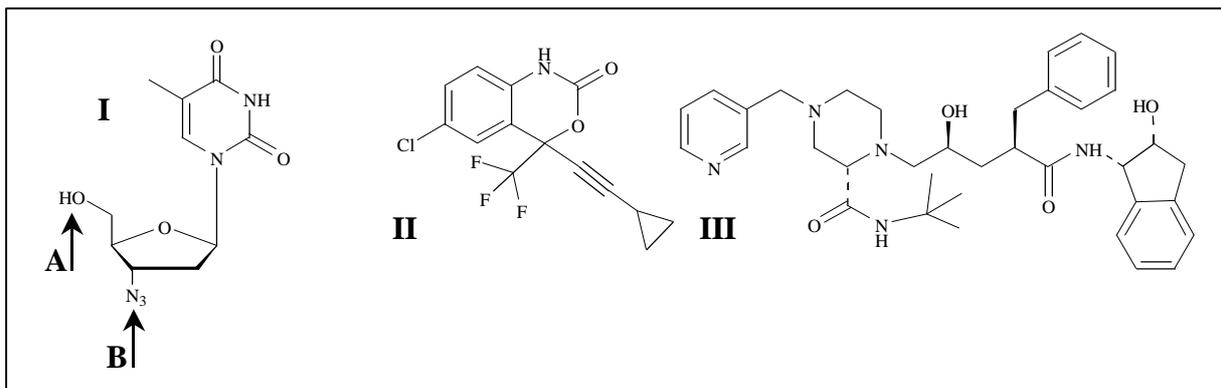


Abbildung 1.5-3 Strukturformel antiretroviraler Therapeutika: Zidovudin (I), Efavirenz (II) und Indinavir (III)

Die Wirkung der Nukleosid-Analoga auf die reverse Transkriptase wird durch einen Kettenabbruch bei der DNA-Synthese erreicht. Das 5'-Ende des Pseudo-Substrates (A, Abbildung 1.5-3) kann noch bestimmungsgemäß bei der Transkription eingefügt werden, doch ist das 3'-Ende (B, Abbildung 1.5-3) mangels notwendiger Hydroxy-Gruppe immanent gegenüber der Knüpfung einer Phosphordiester-Brücke.

Die nicht-nukleosidischen RT-Hemmstoffe binden hingegen direkt an das Enzym und hemmen nicht-kompetitiv an anderer Stelle als die Nukleosidanaloga. Auch die Protease-Inhibitoren wirken durch nicht-kompetitive Hemmung des Zielenzym und werden in aller Regel kombiniert mit RT-Hemmstoffen eingesetzt [Carpenter et al. 2000].

Wegen der oben beschriebenen starken genetischen Variabilität kann es im Laufe einer Therapie zur Entwicklung resistenter Mutanten kommen [Schuurmann et al. 1995], es ist jedoch auch möglich, daß resistente Stämme bereits vor Therapiebeginn vorliegen und lediglich infolge des Selektionsdrucks das Überleben der Viruspopulation sichern [Havlir et

al. 1996]. Desweiteren wird das Auftreten kreuzresistenter Stämme beschrieben [Condra et al. 1995], so daß oftmals das Versagen eines Medikaments die Unwirksamkeit eines anderen zur Folge hat. Die Ausprägung der Resistenz ist je nach Medikament unterschiedlich stark. Für Nevirapin ist das Absinken der Empfindlichkeit auf 1/100 bis 1/1000 durch den Austausch eines Nukleotids des HIV-RT-Gens bekannt [Richman et al. 1994], wohingegen für den Protease-Inhibitor Indinavir das Vorhandensein multipler Mutationen erst zu einem Verlust der Wirksamkeit führt [Condra et al. 1996].

Um eine optimal mögliche Wirksamkeit zu gewährleisten, müssen über Jahre strenge Dosierungsschemata eingehalten werden, weshalb die „Therapietreue“ des Patienten von entscheidender Bedeutung für den Erfolg der Behandlung ist. Da trotzdem oftmals erhebliche Nebenwirkungen auftreten und aufgrund der Resistenzentwicklung die Wirksamkeit nicht garantiert werden kann, stellt die Therapie für die Erkrankten trotz aller Fortschritte immer noch eine enorme Belastung dar.

Durch Angriff eines weiteren *Targets* könnte die Überlebensfähigkeit von HIV-Mutanten exponentiell gesenkt und somit eine deutlich effizientere Therapie gewährleistet werden. Ein dieser Forderung gerecht werdendes neues Konzept zur Behandlung von HIV-Infektionen könnte der Einsatz von SWITCH-Inhibitoren darstellen.

1.5.4. SWITCH-Inhibitoren

Essentiell für die Adhäsion des Virus an die Wirtszelle und die Internalisierung ist die Interaktion zwischen dem viralen Glykoprotein gp120 mit dem zellulären CD4-Rezeptor, wobei weitere Co-Faktoren zum Einsatz kommen [Weiss 1996; Moore 1997]. Durch Hemmung dieser Interaktion könnte die Neu-Infektion nicht befallener Zellen verhindert und somit potentielle Wirtszellen vor der Zerstörung durch die HI-Viren geschützt werden. Wie in Abschnitt 1.5-3 beschrieben, handelt es sich bei der HIV-Replikation um einen dynamischen Prozeß [Wei et al. 1995]. Dabei entsteht ein Gleichgewicht zwischen Neubildung und Eliminierung der Viren. Durch Hemmung der gp120-CD4-Bindung könnte demnach neben der Entlastung des Immunsystems auch eine Verminderung der HIV-Replikation erreicht werden, da lediglich noch eine begrenzte Anzahl an Wirtszellen zur Verfügung stände.

Eine Möglichkeit, den Bindungsmechanismus zu unterbinden, besteht darin, eine extrem hohe Konzentration an CD4-Rezeptoren im Serum zu schaffen, indem dem Virus ein lösliches CD4-Analogon angeboten wird [Hussey 1988; Fisher et al. 1988; Deen et al. 1988; Trauneker et al. 1988]. Die Realisierung dieses Konzepts als therapeutische Maßnahme ist jedoch eher unwahrscheinlich, da die Halbwertszeiten *in vivo* äußerst gering sind und unklar

ist, wie die natürlichen Liganden des CD4-Rezeptors (z.B. der *multi histocompatibility complex II*; MHCII) darauf reagieren. Daher scheint es sinnvoller zu sein, ein Konzept zu verfolgen, das nicht in das Immunsystem eingreift. Bereits 1986 wurden erste Versuche unternommen, den Bindungsmechanismus besser zu verstehen [McDougal al. 1986]. Lasky und Mitarbeiter konnten 1987 mittels monoklonaler Antikörper und Affinitätschromatographie von proteolytischen gp120-Fragmenten die Region zwischen den Aminosäuren 397 und 439 als essentiell für die oben beschriebene Bindung identifizieren. Weiter konnten sie zeigen, daß durch Deletion eines 12 Aminosäuren langen Abschnitts und durch Austausch einzelner Aminosäuren auf dieser Sequenz von gp120 die Affinität zu CD4 verloren ging.

Durch den Vergleich der Sequenzen verschiedener bis dahin publizierter HIV-Varianten zeigte sich, daß dieser Teil nahe des Carboxy-Terminus einen nur zu 50 % konservierten Abschnitt des Glykoproteins darstellt [Willey et al. 1986]. Hieraus erklärt sich auch die Schwierigkeit bei der Entwicklung potenter Antisera gegenüber gp120 *in vitro* und *in vivo*. [Myers 1989]. Cordonnier und Mitarbeiter konnten 1989 mittels *in vivo*-Studien zeigen, daß der 44 Aminosäuren lange Abschnitt von gp120 (397-440) des LA-Virus (im folgenden LAV44) auch isoliert an CD4 bindet. Davon ausgehend, daß dieser Bereich bei allen Varianten für die Bindung an CD4 verantwortlich ist, scheint die Variabilität von 50 % verwunderlich. Um die funktionelle Homogenität zu gewährleisten, wurde angenommen, daß bei variablen Primärstrukturen eine ähnliche Sekundärstruktur von gp 120 zu finden sein müsse [Reed & Kinzel 1991]. Bindungsstudien an CD4 exprimierenden Zellen zeigten, daß auch das 15-mere Peptid Leu⁴⁰⁰ bis Val⁴¹⁴ (im folgenden LAV15) in der Lage, ist an den Rezeptor zu binden. Mittels *Circular Dichroismus*-Messungen konnte die Fähigkeit der Oligopeptide, Sekundärstrukturen zu bilden, gezeigt werden. Es konnte eine Konformationsänderung dieses Abschnitts nachgewiesen werden, die bei Polaritätsänderung des Lösungsmittel auftritt: In Puffer weist LAV15 β -Faltblatt, in unpolarem Medium eine helikale Struktur auf. Die Konformationsänderung in einem Puffer-TFE (Trifluorethanol) Gradienten ist reversibel und scharf, d.h. es sind keine Übergangszustände nachweisbar, und der Polaritätsbereich, in dem der Übergang stattfindet, ist eng begrenzt. Man spricht deshalb auch von einer kooperativen Konformationsänderung, um zu unterstreichen, daß das Peptid von einer Sekundärstruktur direkt in eine andere übergeht. Aus diesem Grunde wird das Phänomen auch „Konformations-Switch“ genannt. Mittlerweile weiß man, daß diese Konformationsänderung essentiell für das Bindungsvermögen von gp120 an den CD4-Rezeptor ist. Der Polaritätsgradient *in vitro* simuliert hierbei die Annäherung der Hüllproteine des Virus aus wäßriger Lösung an den membranständigen Rezeptor, d.h. eine eher unpolare

Umgebung [von Stosch et al. 1996]. Da der Austausch von Aminosäuren, die den *Switch* verhindern, auch *in vitro* die CD4 Bindungsfähigkeit hemmten, wurde schon vorher angenommen, daß dieser Vorgang eng mit der Adhäsion von gp120 an CD4 korreliert sei [Reed & Kinzel 1991]. Es handelt sich demnach um ein Sequenz-unabhängiges Target für die antiretrovirale Therapie, da nur solche Varianten, die aktives gp120 aufweisen, auf Hemmstoffe des Mechanismus reagieren würden. Die ersten Substanzen, die eingesetzt wurden, um die Konformationsänderung zu unterbinden zeigten in vorhergehenden Versuchen antiretrovirale Aktivität [Lifson et al. 1988; Nara et al. 1989; Finberg et al. 1990], ohne daß deren Wirkprinzip erkennbar war [Reed & Kinzel 1994]. Sie wurden auf ihre Potenz als SWITCH-Inhibitoren und CD4-Bingungs-Inhibitoren getestet, indem, wie oben beschrieben, *Circular Dichroismus*-Messungen und ein *in vitro* Bindungs-Test zum Einsatz kamen.

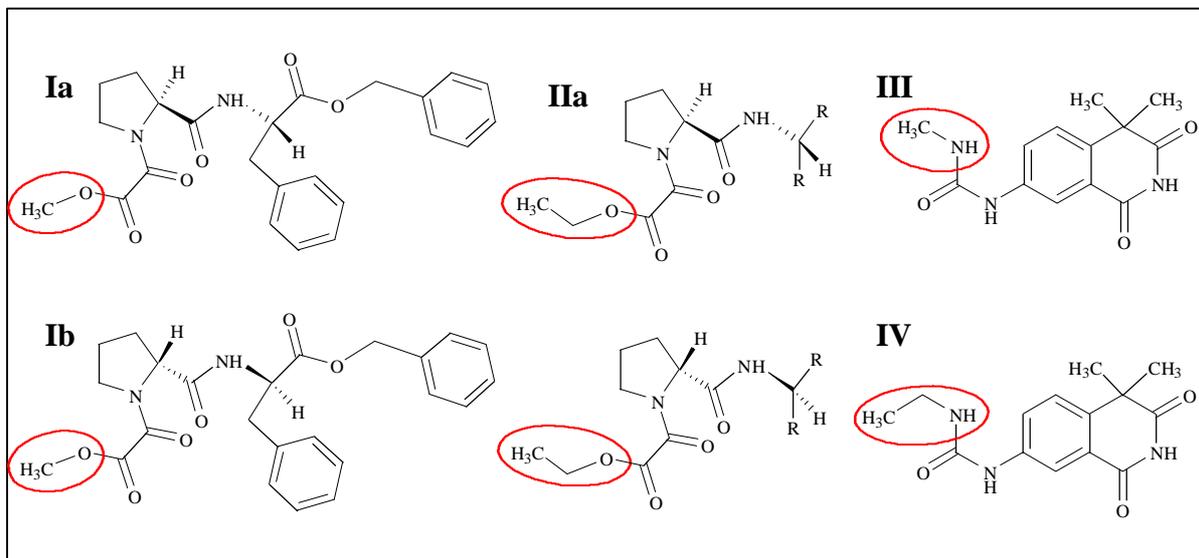


Abbildung 1.5-4 Strukturen der ersten Generation von SWITCH-Inhibitoren [Reed & Kinzel 1994].

Sowohl die beiden D,D- und L,L-Formen der *CPF-Dipeptide* *N*-Carbomethoxycarbonylprolylphenylalanylbenzylester (**Ia**[D,D]/**Ib**[L,L], Abbildung 1.5-4) und *N*-Carboethoxycarbonylprolylphenylalanylbenzylester (**IIa**[D,D]/**IIb**[L,L]) [Finberg et al. 1990] als auch Derivate einer Modell-Verbindung von Boehringer, Mannheim *BM 50.0311*, *N*-(4,4-dimethyl-4*H*-isoquinolin-1,3-dion-yl)-*N'*-alkylharnstoff (**III**, **IV**) und ein benzyliertes CD4-Peptid und dessen nicht benzyliertes Derivat der Residuen 83-94 wurden dazu eingesetzt [Lifson et al. 1988; Nara et al. 1989]. Es zeigte sich, daß die Methyl-Derivate des CPF-Peptides (**Ia**/**Ib**) den kooperativen Charakter der Konformationsänderung von β -Faltblatt nach α -Helix des LAV-Peptides unterbinden können. Der Effekt ist konzentrationsabhängig und zeigt eine halbmaximale Wirkung in einem Bereich (30-40 $\mu\text{g/ml}$), der gut korrespondiert, mit

den notwendigen Konzentrationen (80-160 µg/ml), die für maximale antivirale Wirkung festgestellt wurden [Finberg et al. 1990]. **IIa** und **IIb** hingegen zeigen lediglich eine leichte Verschiebung der Polaritätsregion in der der *Switch* stattfindet [Reed & Kinzel 1994].

Die Verbindungen sind beide nicht in der Lage den kooperativen Charakter der Konformationänderung zu hemmen. Das Resultat entsprach den Erwartungen, da diese auch zuvor keine antiviralen Eigenschaften aufwiesen [Finberg et al. 1990].

Der gleiche Zusammenhang konnte für die CD4 Peptide festgestellt werden. Das benzylierte Derivat verhinderte *in vivo* HIV-Fusion und –Infektion [Nara et al. 1989; Lifson et al. 1988] und zeigte auch in diesen Versuchen, daß es in der Lage ist, als SWITCH-Inhibitor zu fungieren. Das nicht benzylierte CD4-Derivat zeigte weder *in vivo* noch *in vitro* einen Effekt auf die gp120-CD4-Interaktion, bzw. die Konformationsänderung. Die beiden Harnstoff-Derivate (**III**, **IV**) kamen zum Einsatz, da diese im Gegensatz zu den Peptid-Derivaten keine durch Proteasen spaltbare Peptid-Bindung aufweisen und dementsprechend längere Halbwertszeiten *in vivo* besitzen. Für Substanz **III** konnte eine Hemmung des *Switch*-Phänomens gezeigt werden. Auch erwies sich diese als wirksam, um im Versuch mit CD4-exprimierenden HeLa-Zellen (HeLaT4) die Bindung des LAV-Peptides bei einer halbmaximalen Konzentration von 250 µg / ml zu verhindern [Reed & Kinzel 1994].

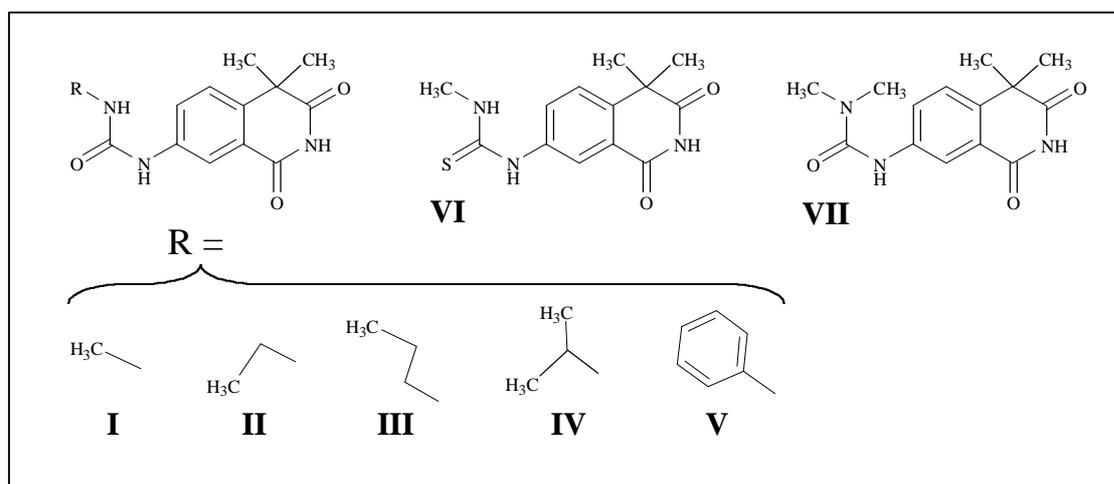


Abbildung 1.5-5 Strukturen der zweiten Generation von SWITCH-Inhibitoren [von Stosch et al. 1996].

Aufgrund dieser Ergebnisse wurde eine Reihe weiterer Substanzen auf ihre Fähigkeit zur SWITCH-Inhibition mittels *Circular Dichroismus* und *NMR*-Untersuchungen getestet [von Stosch et al. 1996]. Neben der Ermittlung der Struktur-Wirkungs-Beziehungen stellte sich die Frage, ob auch LAV44 (s.o.) [Lasky et al. 1987] analog LAV15 für die Untersuchungen eingesetzt werden kann. Dies ist für die *NMR*-Untersuchungen von großer Bedeutung, da LAV15 im Gegensatz zu LAV44 nicht in ausreichenden Konzentrationen in Puffer löslich

war und dementsprechend für diese sehr wichtigen Untersuchungen nicht eingesetzt werden konnte. Die Wahrscheinlichkeit für eine Analogie erschien hoch, da eine LPCR-Sequenz innerhalb der Peptide die verantwortliche Struktur für das *Switch*-Phänomen darstellt und deren Bedeutung für die Bildung der entsprechenden Sekundärstrukturen nachgewiesen werden konnte [Reed & Kinzel 1993; Lindemann et al. 1997].

Erwartungsgemäß zeigte sich, daß LAV44 für das *Screening* von SWITCH-Inhibitoren geeignet ist. Sowohl für die CPF-Peptide ([Finberg et al. 1990]; s.o.), als auch für die Harnstoff-Derivate (s.o.) wurden Ergebnisse erhalten, die den mit LAV15 ermittelten entsprachen: Für die aktiven Substanzen konnte ein Einfluß auf die Sekundärstruktur nachgewiesen werden, für inaktive bleibt dieser aus. Die Ermittlung aller Aktivitäten (Abbildung 1.5-5) ließ folgende Struktur-Wirkungsbeziehungen erkennen:

Alkyl-Substitution des Harnstoff-Linkers mit Gruppen, die größer als ein Methyl-Rest sind, führen zu vollständigem Wirkungsverlust (**I/II/III/IV**). Die Einführung einer weiteren Alkyl-Gruppe unter Bildung einer tertiären Aminofunktion an dieser Stelle führt ebenso zum Wirkungsverlust (**VII**). Der Austausch des Harnstoffes durch eine Thioharnstofffunktion verhindert durch die geringere Fähigkeit des Schwefels zur Bildung von Wasserstoff-Brücken eine effektive SWITCH-Inhibition (**VI**). Ersatz der Methyl-Gruppe durch einen Phenyl-Substituenten erhöht die Wirksamkeit, verschlechtert jedoch die Wasserlöslichkeit der Verbindung (**V**).

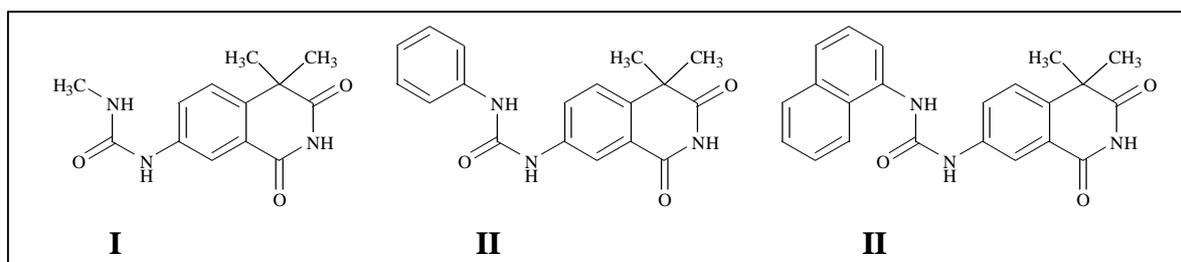


Abbildung 1.5-6 Strukturformeln der SWITCH-Inhibitoren 2'-(N-Methyl-N'-(4,4-dimethyl-1,2,3,4-tetrahydro-1,3-dioxo-7-isochinoliny))-harnstoff (**I**), 2'-(N-Phenyl-N'-(4,4-dimethyl-1,2,3,4-tetrahydro-1,3-dioxo-7-isochinoliny))-harnstoff (**II**) und 2'-(N-Naphthyl-N'-(4,4-dimethyl-1,2,3,4-tetrahydro-1,3-dioxo-7-isochinoliny))-harnstoff (**III**).

Um die Ergebnisse zu verifizieren und um potentere Substanzen zu identifizieren, wurde eine Reihe weiterer Substanzen mittels *Circular Dichroismus*-Messungen und einem HeLaT4-Bindungsversuch auf ihr Potential als SWITCH-Inhibitoren evaluiert [Reed et al. 1999]. Auch wurden Toxizitätsmessungen berücksichtigt, um eine mögliche Verwendung *in vivo* nicht durch toxische Effekte zu limitieren. Oben beschriebener Zusammenhang zwischen Aktivität und Substitution des Harnstoff-Linkers konnte dabei reproduziert werden. Desweiteren erwies

sich auch die Substitution des heterozyklischen Stickstoffs des Isochinolingerüsts als Möglichkeit, die Grundstruktur zu modifizieren. Insbesondere drei Verbindungen (Abbildung 1.5-6) erwiesen sich als hochpotente SWITCH-Inhibitoren, wenngleich ihre mangelnde Wasserlöslichkeit einen entscheidenden Nachteil für eine therapeutische Anwendung darstellt.

1.6. Drug targeting via Glucosetransporter

Unter *Drug Targeting* versteht man im allgemeinen das gezielte Ansteuern des Wirkorts therapeutischer Maßnahmen, wobei in andere Organe nur wenig Arzneistoff gelangen soll. Die *Targets*, d.h. die Zielstrukturen, müssen dementsprechend eine Unterscheidung zulassen und sollten ein für diesen Gewebetyp charakteristisches Merkmal darstellen. Zumeist handelt es sich dabei um Proteine, die ausschließlich oder in höheren Konzentrationen am Wirkort zu finden sind. Beispiele dafür sind *Protease*-Hemmer und Inhibitoren der *Reverse Transkriptase* in der HIV-Therapie (Kapitel 1.5) oder auch die *Penicilline* in der Antibiotika-Therapie [Burger & Wachter 1998]. In der Behandlung pathologisch transformierter Körperzellen ergibt sich die Schwierigkeit dadurch, daß die Zellen durch ihre Herkunft bedingt nahezu identisch mit dem gesunden Gewebe sind. Insbesondere der Einsatz hochpotenter Wirkstoffe wie in der antineoplastischen Chemotherapie führt dabei zu Schädigungen des Normalgewebes und dadurch zu den, die Therapie limitierenden Nebenwirkungen [Seeber & Schütte 1995]. *Targeting*-Konzepte basieren oftmals auf dem gezielten Ansprechen von Oberflächenstrukturen der Zelle (Lectin-vermittelt, Antikörper-vermittelt, Steroidrezeptor-vermittelt etc.) oder von charakteristischen Eigenschaften der Zellen (Einsatz pH-abhängiger *Prodrugs*, Inhibition der *Angiogenese*) [Seeber & Schütte 1995]. Ein weiterer Ansatz zur Gestaltung einer selektiveren Krebstherapie ist das von Wießler und Mitarbeitern entwickelte *Targeting via Glucosetransportern* [Dickes 1989, Stüben 1994; Schaper 1997; Mier 1998, Roth 1998, Uhrig 1999]. Es existieren Hinweise, daß in einer Vielzahl von Tumoren eine erhöhte Anzahl an Glucosetransportern und eine modulierte Funktion der *Glucosidasen* zu finden ist [Flier 1987]. Dies wird begründet mit der verstärkten metabolischen Aktivität infolge der erhöhten Proliferationsrate und der gesteigerten anaeroben Glycolyse in Tumorzellen [Newshome 1985; Arguiles & Lopez-Soriano F.J. 1990]. Glucose muß als wichtigster Energielieferant in verstärktem Maße aufgenommen werden, um den Bedarf weiterhin zu decken. Aufgrund des polaren Charakters des Moleküls kann dies nicht passiv geschehen, sondern erfordert den Einsatz membranständiger Transportproteine. Den Transportern kann neben dem natürlichen Substrat auch ein Glucose-konjugiertes Therapeutikum angeboten werden, das wie ein "Trojanisches

Pferd“ durch deren aktive Aufnahme in die Zelle gelangt. Da diese Aufnahmeprozesse in Tumorzellen verstärkt sind, um den erhöhten Energiebedarf zu decken, akkumuliert der Wirkstoff im transformierten Gewebe. *Glufosfamid* (β -D-Glucosyl-Ifosfamid-Mustard; β -D-

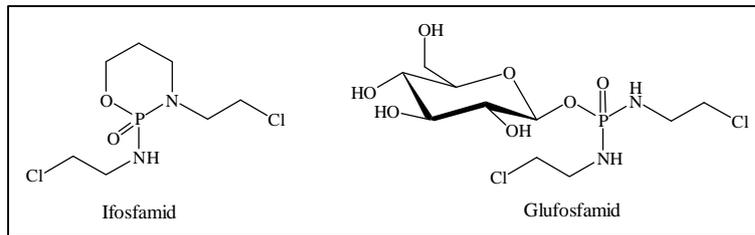


Abbildung 1.6-1 Strukturformeln von Ifosfamid und Glufosfamid

Glu-IPM; Abbildung 1.6-1) ist ein sehr gutes Beispiel für die Verwirklichung dieses Konzepts [Stüben 1994; Pohl et al. 1995]. Es handelt sich hierbei um den an Glucose gekoppelten aktiven

Metaboliten des Ifosfamids (Kapitel 1.1.3) [Zheng et al. 1994].

Die Gluco-Konjugation birgt zwei entscheidende Vorteile. Zum einen entfällt die Notwendigkeit der metabolischen Aktivierung des Ifosfamids, bei der Chlor-Acetaldehyd und Acrolein entstehen [Zeller & zur hausen 1998]. Die durch diese Abbauprodukte bedingte Nephrotoxizität wird verhindert. Zum anderen konnte gezeigt werden, daß die Substanz über einen aktiven Transportmechanismus, den *SAATI*-Transporter, in Zellen aufgenommen wird [Veyhl et al. 1998]. Hiermit werden auch die deutlich besseren Ergebnisse begründet, die *in vivo* erzielt werden konnten. So konnte mittels Ganzkörperaudiographien an Ratten eine Anreicherung der Radioaktivität nach intravenöser Applikation im Tumor beobachtet werden, wohingegen das Kontrollexperiment mit β -L-Glu-IPM keine Akkumulation beobachten ließ [Schaper 1997]. Glufosfamid besitzt eine dem Ifosfamid entsprechende Antitumor-Aktivität, bei deutlich niedrigeren Nebenwirkungen. Die Substanz befindet sich derzeit in klinischen Prüfungen Phase II und erweist sich als sehr vielversprechend [Wießler & Bertram 2000].

Neben dem oben beschriebenen *SAAT*-Transporter existieren eine Reihe weiterer Proteine, deren “Dienste“ man sich zur Gestaltung einer selektiveren Therapie zu Nutze machen kann.

Es existieren zwei Familien an Glucose-Transportern: die Natrium-unabhängigen Transporter der GLUT-Familie und die Natrium-abhängigen der SGLT-Familie (SGLT 1-3).

Die sechs Mitglieder der GLUT-Familie (GLUT 1-5,7) vermitteln den Glucose-Transport entlang eines Konzentrationsgradienten ohne Energieverbrauch [Baldwin 1993]. GLUT 1 wird in nahezu allen beschriebenen Zelllinien exprimiert [Gould & Bell 1990] und ist der häufigst vorkommende Vertreter dieser Klasse. Wahrscheinlich sorgt er für die Grundversorgung der Zellen mit Glucose [Mahraoui et al. 1994; Mueckler et al. 1997]. Neben Glucose konnte der Transport weiterer Substrate, wie 2-Deoxy- β -D-Glucose [Hansen et al. 1994] oder Dehydroascorbinsäure [Vera et al. 1993] gezeigt werden. Wie für alle anderen GLUT-Mitglieder ist die Hemmbarkeit mittels Phloretin [Randles & Kimmich 1978], speziell

aber auch mit Genistein nachgewiesen [Vera et al. 1996]. Die weiteren GLUT-Mitglieder werden differenzierter in bestimmten Geweben gefunden. GLUT 2 ist charakteristisch für Hepatozyten, β -Zellen des Pankreas, sowie die Zellen der basolateralen Membranen von Darm- und Nierenzellen. GLUT 3 wird hauptsächlich in Neuronen, GLUT 4 in Fett- und Muskelzellen nachgewiesen. GLUT 5 ist ein Fructose-Transporter in Spermien und Zellen des Dünndarms, GLUT 7 befindet sich am endoplasmatischen Retikulum von Hepatozyten [Baldwin 1993; Mueckler 1994]. Die GLUT-Transporter sind in der Lage, neben Glucose weitere Substrate anzunehmen [Fischbarg & Vera 1995; Walmsley et al. 1998]. In Position C1-substituierte Glucose wird als Substrat akzeptiert, sofern die Substituenten in der Lage sind Wasserstoff-Brücken auszubilden. C4 und C6 substituierte Glucose-Derivate werden in Abhängigkeit von ihrer Größe transportiert oder lediglich gebunden [Barnett et al. 1973; Barnett et al. 1975].

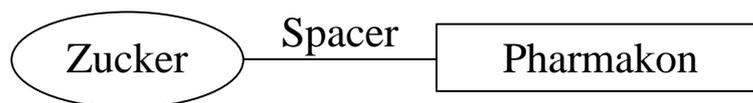
Die SGLT-Transporter SGLT 1, SGLT 2 und SGLT 3 können D-Glucose entgegen einem bestehenden Konzentrationsgradienten in die Zelle transportieren. Mittels einer Na^+ - K^+ -ATPase wird unter Energie-Verbrauch ein Natrium-Gradient aufgebaut, so daß der eigentliche Substrat-Transport durch den Co-Transport mit Natrium Ionen erfolgt (*sodium-glucose-ligated-transporter* = SGLT) [Koepsell & Spangenberg 1994]. SGLT 1 wird vor allem im Dünndarm, aber auch in Leber, Niere und Lunge exprimiert [Hediger et al. 1995]. Auch in Neuronen von Schweinen, Kaninchen und Menschen wird SGLT 1 exprimiert, liegt aber funktionell inaktiv vor [Pope et al. 1997]. Durch Induktion eines epileptischen Anfalls jedoch konnte die Aufnahme von radioaktiv markierter α -Methylglucose, einem Substrat der SGLT-Transporter, nachgewiesen werden [Nishikazi 1995]. Die Tatsache, daß Streß eventuell mit der Expression des aktiven SGLT 1 in Verbindung zu bringen ist, wäre insbesondere für die Entwicklung der PARP-Inhibitoren zur Anwendung bei ischämischen Krankheitszuständen von großer Bedeutung (Kapitel 1.4.2). SGLT 2 wurde bisher in der Niere nachgewiesen [Kanai et al. 1994; You et al. 1995], wo dieser wie auch SGLT 1 für die Rückresorption von Glucose verantwortlich ist. SGLT 3 wurde für einen Aminosäuretransporter gehalten, weshalb auch heute noch die Bezeichnung *SAAT1* (*sodium-coupled amino acid transporter*) verwendet wird [Kong et al. 1993]. Er wurde erstmals in der Schweinenierenepithelzelllinie *LLC-PK1* nachgewiesen [Rabito 1981] und konnte im Schwein in Darm, Milz, Leber und Muskel [Kong et al. 1993] sowie im menschlichen Gehirn gefunden werden [Pope et al. 1997]. Wie oben erwähnt, ist dieser Transporter in der Lage, das neue Chemotherapeutikum *Glufosfamid* zu transportieren [Veyhl et al. 1998].

Auch die SGLT-Transporter können weitere Substrate erkennen [Hager et al. 1995], wobei Unterschiede in der Spezifität sowohl zwischen den Transportern [Hediger et al. 1995] als auch zwischen den Spezies zu erkennen sind [Hirayama et al. 1996]. Alle SGLT-Transporter sind in der Lage, α -Methylglucose [Mullin et al. 1980] zu transportieren und werden durch die Bindung von Phlorrhizin gehemmt [Misfeldt & Sanders 1981]. Desweiteren wurde die Hemmung durch 1-Octyl- β -D-glucose nachgewiesen [Vincenzine et al. 1987] und eine Struktur-Wirkungsbeziehung des inhibitorischen Effekts für verschiedene gesättigte und ungesättigte α - und β -Alkylglukoside beschrieben [Kipp et al. 1996]. Für verschiedene aromatisch-substituierte Glucose-Derivate hingegen konnte der Transport gezeigt werden, wobei in erster Linie Naphthyl- und Phenyl-Derivate, die zum Teil nitriert vorlagen, als Substrate angenommen wurden [Mizuma et al. 1993a; Lostao et al. 1994; Mizuma et al. 1994b]. Die Größe scheint nicht den limitierenden Faktor darzustellen, weil auch für ein glucosidiertes Tetrapeptid, das modellhaft für Medikamente mit Peptid-Struktur stehen sollte, ein durch Phlorrhizin hemmbarer Transport gezeigt werden konnte [Nomoto et al. 1998]. Für diese und weitere Verbindungen kann abgeleitet werden, daß schlecht absorbierbare Medikamente durch Gluco-Konjugation wasserlöslicher werden und nach oraler Applikation besser verfügbar sind [Mizuma et al. 1992]. Dieser Effekt wird beispielsweise auch für das β -Glucosid des Aciclovir beobachtet, jedoch ohne einen direkten Transport durch SGLT 1 zeigen zu können [Mizuma et al. 1999]. Homologe des SGLT 1 konnten in vielen Geweben detektiert werden, wobei auch ein Nucleosid-Transporter beschrieben wurde [Pajor & Wright 1992]. Ein solches Protein könnte insbesondere für das Targeting mittels nucleosidischer MGMT-Inhibitoren von Bedeutung sein (Kapitel 1.3.2).

2. Aufgabenstellung und Zielsetzung

2.1. Allgemein

Die Verknüpfung organischer Moleküle mit Zuckerstrukturen eröffnet eine Reihe von Vorteilen (Kapitel 1.6). Insbesondere spielen dabei die Verbesserung der Wasserlöslichkeit und die mögliche Anwendung in *Drug-Targeting*- Konzepten eine Rolle. Durch die Glycokonjugation entstehen bifunktionelle Moleküle, die über einen Glucosetransporter in die Zelle gelangen sollen, um dort mit dem zellulären Ziel zu interagieren. Im optimalen Falle zeigen die Glycokonjugate maximale biologische Aktivität und können über aktive Transportmechanismen in den Zielzellen akkumulieren. Die Glycokonjugation kann sich jedoch zuweilen nachteilig auf die Interaktion mit der biologischen Zielstruktur auswirken, weshalb es sinnvoll ist, die Substanzen schrittweise zu modifizieren. Dabei kann auf die biologischen Ergebnisse reagiert werden, um die gewünschten Eigenschaften zu optimieren. Ziel dieser Arbeit war es daher, zunächst Synthesevorschriften zur Darstellung von Glycokonjugaten der Struktur *Zucker-Spacer-Pharmakon* zu entwickeln. Die Verbindungen sollen die Möglichkeit bieten einzelne Molekülteile beliebig zu verändern, um somit vielfältige Variationen unter analogen Reaktionsbedingungen durchführen zu können. Ein weiterer Schwerpunkt sollte auf der Testung der biologischen Wirksamkeit der Verbindungen im Vergleich zu den entsprechenden freien Pharmaka liegen.



2.2. MGMT-Inhibitoren

Das Hauptgewicht der Arbeit sollte der Weiterentwicklung von MGMT-Inhibitoren gelten, wobei die Synthese und die Testung der biologischen Wirksamkeit der Glucokonjugate von Interesse sind. Aufgabe war es, eine Reihe von MGMT-Inhibitoren mit einem O⁶-substituierten Guanin-Grundgerüst zu glycosidieren. Dabei soll der Einfluß von der Spacerlänge auf die biologische Aktivität untersucht und eine Struktur-Wirkungsbeziehung abgeleitet werden. Die erarbeitete Synthesestrategie wird in weiteren Anwendungen zur Glucosidierung von PARP- und SWITCH-Inhibitoren eingesetzt. Auch diese Glucokonjugate werden bezüglich ihres biologischen Potentials untersucht.

Die biologische Testung der MGMT-Inhibitoren erfolgt mittels eines MGMT-Tests an Proteinextrakten von HeLaS3-Zellen sowie im Zelltest an HeLaS3-Zellen. Desweiteren wird anhand zweier Fotemustin-resistenter Melanom-Zelllinien im Vergleich zur sensitiven Ursprungszelllinie das mögliche Potential der Inhibitoren zur Aufhebung der Resistenz gezeigt. Ein Computermodell soll etabliert werden, das den Mechanismus der Protein-Substrat-Interaktion simulieren läßt. Die vielversprechendsten Substanzen werden darüberhinaus physikochemisch auf ihre Stabilität in wäßrigen Lösungen und biochemisch auf ihre Spaltbarkeit durch Glucosidasen getestet.

2.3. PARP-Inhibitoren

PARP-Inhibitoren sind ein weiteres Beispiel für das Anwendungspotential von DNA-Reparatur modifizierenden Substanzen. Eine Leitsubstanz mit Hydroxyphenyl-Benzimidazol-Grundgerüst wird nach der zuvor etablierten Glycosidierungsmethode umgesetzt. Es werden Glucokonjugate mit unterschiedlichen Spacerlängen dargestellt und charakterisiert. Um zu prüfen, ob die PARP-Hemmung im Vergleich zur Ausgangssubstanz erhalten bleibt, wird ein etablierter PARP-Assays an permeabilisierten und intakten C4I-Zellen angewendet.

2.4. SWITCH-Inhibitoren

SWITCH-Inhibitoren sind in der Lage, die Interaktion des HI-Virus mit den potentiellen Zielzellen der Infektion zu unterbinden. Die Substanzen müssen dazu im Plasma verfügbar sein, weshalb die Wasserlöslichkeit einen äußerst kritischen Punkt in der Entwicklung als Therapeutikum darstellt. In dieser Arbeit sollen potentielle SWITCH-Inhibitoren mit verschiedenen Isochinolindion-Grundgerüsten nach der zuvor entwickelten Methode zu Glucosiden umgesetzt werden, wobei die Spacerlänge und das Pharmakon variiert werden. Die Bestimmung der biologischen Aktivität erfolgt durch *Circular-Dichroismus-Messungen* und durch einen *gp120-CD4-Bindungsversuch* an HeLaT4-Zellen.

3. Ergebnisse

3.1. Synthese

Im Folgenden werden zusammenfassend die Ergebnisse aller durchgeführten Synthesen beschrieben. Die detaillierten Vorschriften sowie alle nicht aufgeführten analytischen Daten sind am Ende der Arbeit im experimentellen Teil zusammengestellt.

Zum besseren Verständnis einiger Begriffe sollen die zwei wichtigsten Methoden zur Glycosidierung kurz vorgestellt und deren Vor- und Nachteile erläutert werden. Da in dieser Arbeit lediglich β -D-Glycoside dargestellt wurden, werde ich bevorzugt die dafür geeigneten Reaktionsbedingungen beschreiben.

Schon 1901 eingeführt, ist die *Königs-Knorr*-Methode nach wie vor eines der zuverlässigsten Verfahren zur Glycosidsynthese [Koenigs & Knorr 1901, Paulsen 1982]. Sie beruht darauf, daß ein *Glycosyldonor* mit einem *Glycosylakzeptor* zu einem *Glycosid* reagiert. Als Glycosyldonoren für die Synthese von β -Verknüpfungen werden α -Glycopyranosyhalogenide eingesetzt, deren übrige OH-Gruppen durch Benzoyl- oder Acetyl-Schutzgruppen geschützt sind (**I**, Abbildung 3.1-1). Als Katalysatoren werden Schwermetallsalze verwendet, die entscheidenden Einfluß auf den Reaktionsverlauf haben. Unlösliche Silberkatalysatoren favorisieren in der Regel S_N2 -Reaktionen, die weitestgehend unter Inversion zum β -substituierten Glycosid führen. Lösliche Silber und Quecksilber-Salze (Abbildung 3-1) führen über Zwischenstufen (**II,III** Abbildung 3.1-1) auch bevorzugt zum β -Glucosid, jedoch haben diese Reaktionen in der Regel S_N1 -Charakter. Die Bildung des zyklischen Acetoxonium-Ions (**III**, Abbildung 3.1-1) wird durch den Nachbargruppeneffekt der Acetyl- und der Benzoyl-Schutzgruppe in Position 2 ermöglicht, worauf die Stereoselektivität des Verfahrens gründet [Paulsen 1982]. Da bei der Verwendung von Ag_2O und Ag_2CO_3 Wasser entsteht, sollten Trocknungsmittel wie z.B. *Drierite* zugesetzt werden. Eine mögliche Variante der Reaktion ist die Verwendung des *Helferich*-Katalysators $Hg(CN)_2$, der durch Zusatz von $HgBr_2$ aktiviert werden kann [Helferich & Weis 1956]. Eine hervorragende Alternative stellt auch die Verwendung von Trimethylsilyltrifluoromethansulfonat (TMS-triflat) als Katalysator dar. Anstelle der α -D-Glycopyranosyhalogenide kann wegen der hohen Aktivität des TMS-triflats auch das β -1-O-Acetyl-Derivat des Glycosyl-Donors eingesetzt werden [Ogawa et al. 1981, Kerekgyarto et al. 1989]. Ähnliche Konditionen wurden auch für Diethylether-Bortrifluorid- (Et_2O-BF_3) -Katalyse beschrieben, die ebenfalls vergleichsweise hohe Ausbeuten liefert [Mabic et al. 1993].

Geeignete Lösungsmittel für Umsetzungen nach *Königs-Knorr*-Bedingungen sind Systeme mittlerer Polarität. So werden diese oftmals in Dichlormethan, Dichlorethan, Diethylether oder Gemischen wie z.B. Toluol / Nitromethan durchgeführt. Die Wahl des Lösungsmittels kann entscheidenden Einfluß auf den Reaktionsverlauf, insbesondere auf die Stereoselektivität und die Ausbeute, haben [Paulsen 1982].

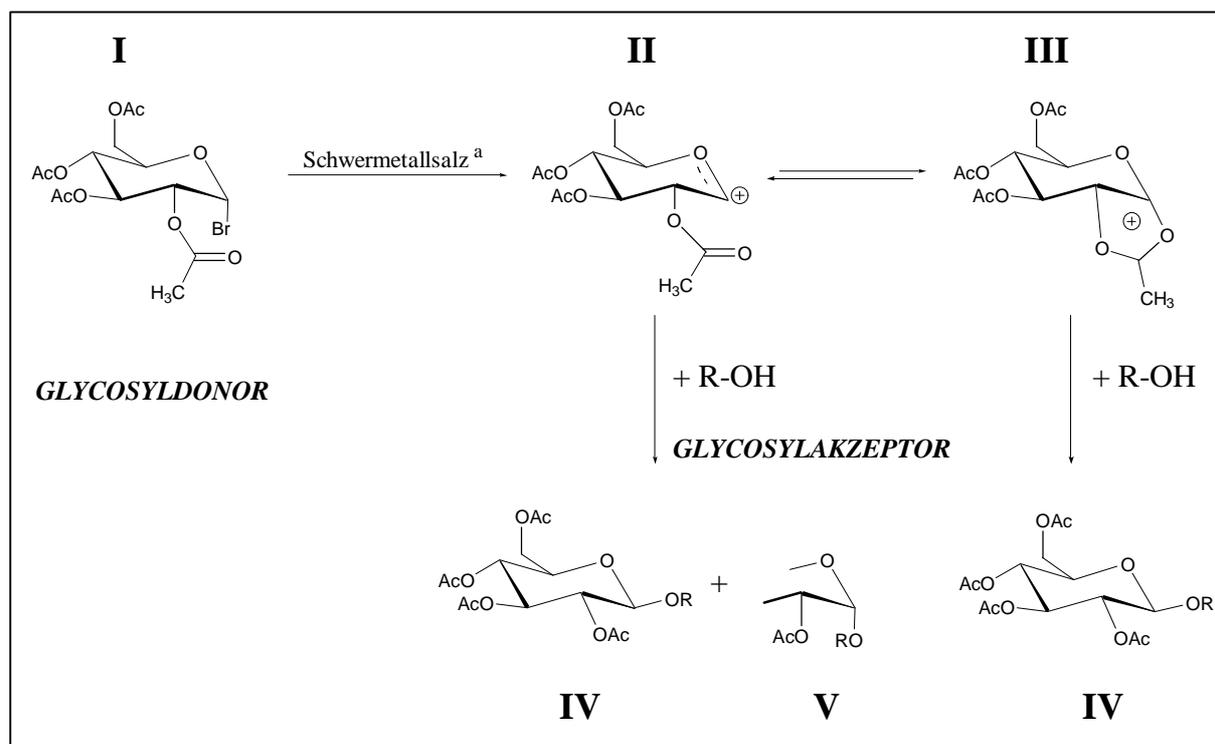


Abbildung 3.1-1 Schematische Darstellung der *Königs-Knorr*-Synthese [Paulsen 1982]. α -D-Acetobromglucose (I) wird mittels eines Schwermetallkatalysators (^a Hier ein lösliches Silbersalz, da dadurch ein S_N1 -Mechanismus favorisiert wird. Siehe auch Text) zu einem Glucosid (IV,V) umgesetzt. Der Angriff des Glycosylakzeptors kann sowohl am reaktiven Oxocarbenium-Ion (II) als auch am Dioxocarbenium-Ion (=Acetoxonium-Ion) (III) erfolgen. Es entstehen sowohl das β -Glucosid (IV) als auch das α -Glucosid (V).

Eine Alternative zur direkten Glycosidierung wurde von Schmidt und Mitarbeitern entwickelt, die sogenannte *Trichloracetimidat*-Methode oder *Imidat*-Synthese (Abbildung 3.1-2) [Schmidt & Michel 1980; Schmidt 1989]. Glycosyldonor hierbei ist ein O-Glycosyltrichloracetimidat (II) des entsprechenden Zuckers. Diese werden durch basenkatalysierte Umsetzung des am anomeren C-Atom ungeschützten Zuckers (I) mit Trichloracetonitril erhalten [Schmidt & Michel 1980, Grundler & Schmidt 1984]. Durch geeignete Wahl der Base kann die Darstellung des α - oder β -Glycosylimidates kontrolliert werden [Schmidt 1989]. Als Schutzgruppen werden in der Regel Acetyl- und Benzoylgruppen oder die hydrogenolytisch spaltbaren Benzylgruppen verwendet. Die α -Glycosylimidate reagieren unter Säurenkatalyse in hohen Ausbeuten zu den entsprechenden β -Glycosiden [Schmidt & Michel 1980]. Als Katalysatoren dienen Lewis-Säuren wie beispielsweise das

schon oben erwähnte Trimethylsilyltrifluoromethansulfonat (TMS-triflat) und Diethylether-Bortrifluorid ($\text{Et}_2\text{O}\cdot\text{BF}_3$). Interessanterweise erfolgt die Synthese des Glufosfamids (Kapitel 1.1 und 1.6) autokatalytisch durch direkte Umsetzung des Akzeptors mit dem Glycosylimidat bei höheren Temperaturen [Dickes 1988]. Als Lösungsmittel werden für das *Imidat*-Verfahren typischerweise die gleichen mittelpolaren Systeme wie für die *Königs-Knorr*-Synthese verwendet.

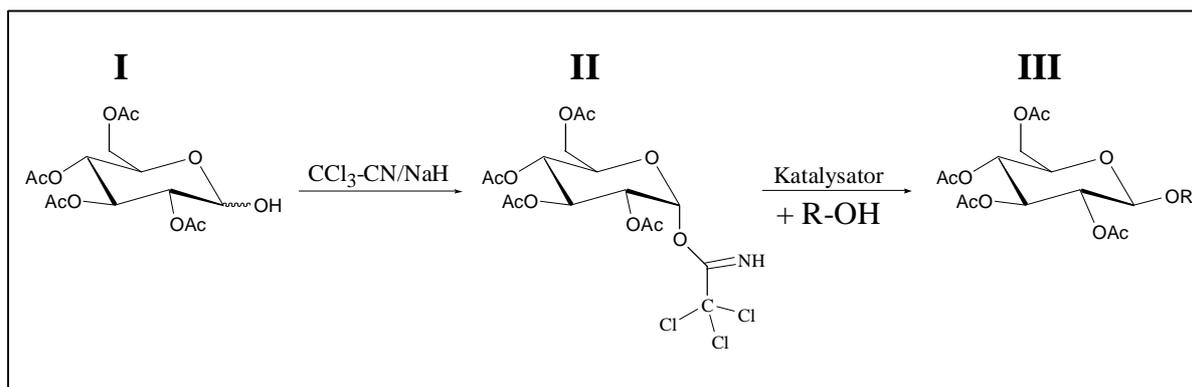


Abbildung 3.1-2 Schematische Darstellung des *Trichloracetimidatverfahrens*, beispielhaft an der Synthese eines Acetyl-geschützten β-D-Glucopyranosylkonjugates (**III**). Die C1-ungeschützte-2,3,4,6-tetra-O-acetyl-D-glucopyranose (**I**) wird mit Trichloracetonitril unter Natriumhydrid-Katalyse zum Tetra-O-acetyl-β-D-glucosetrichloracetimidat (**II**) umgesetzt. Das *Imidat* kann als Glycosyldonor mit einem Glycosylakzeptor (**R-OH**) zu **III** reagieren. Mögliche Katalysatoren werden im Text beschrieben.

Da beide Methoden gleiche Produkte liefern, sind Vor- und Nachteile bei der Wahl der Strategie gegeneinander abzuwägen. Die *Königs-Knorr*-Methode ist ein jahrzehntelang etabliertes Verfahren, das in zahlreichen Varianten beschrieben wurde. Es bietet ein breites Spektrum an Anwendungsmöglichkeiten für die Darstellung von Glykokonjugaten und ist aufgrund seiner Einfachheit nach wie vor eine sehr wertvolle Methode. Glykosyldonoren wie die Acetobromglucose und die Pentaacetylglucose sind kommerziell erhältlich, und insbesondere letztere ist sehr stabil [Paulsen 1982].

Die Glykosyldonoren des *Trichloracetimidatverfahrens* ermöglichen die α- oder β-selektive, gut reproduzierbare Synthese glycosidischer Bindungen. Sie sind sterisch uniform herstellbar, bei Raumtemperatur sehr stabil und können säulenchromatographisch gereinigt werden. Die Katalyse erfordert nicht die Anwendung von Schwermetallsalzen. Bei Verwendung der Imidate liegen die Ausbeuten in der Regel weit höher als die mit anderen Methoden erzielten. Das Verfahren eignet sich weiter zur Darstellung komplexerer Strukturen und bietet ein breiteres Anwendungsspektrum. Im Einzelfall muß abgewägt werden, welche Methodik sinnvoller ist.

In dieser Arbeit wurde in aller Regel die *Königs-Knorr*-Synthese angewandt, da die Edukte sehr gut zugänglich und preiswert sind und ausschließlich Monosaccharid-Konjugate

hergestellt wurden. Die Synthesen beschränkten sich außer in Einzelfällen auf die Glycosidierung von gesättigten, aliphatischen Bromoalkoholen, wobei einfache β -D-Glucopyranoside und ein β -D-Galactopyranosid dargestellt wurden. Durch teilweise Anwendung der oben beschriebenen Variationen mittels des *Helperich*-Katalysators oder der Verwendung von TMS-triflat in Verbindung mit β -D-Pentaacetylglucose konnten alle synthetischen Probleme befriedigend gelöst werden.

3.1.1. MGMT-Inhibitoren

3.1.1.1. O⁴-substituierte Pyrimidine

Wie in der Einleitung (Kapitel 1.3.2) beschrieben, wurden bis dato nicht nur Purine als MGMT-Inhibitoren getestet, sondern auch solche mit Pyrimidin-Grundgerüst sich als erfolgreiche Kandidaten herausstellten. Zur Darstellung von Glucosiden solcher Verbindungen wollte ich eine zweistufige Synthesestrategie verfolgen. Im ersten Schritt wird dabei ein *Spacer* mit dem Pyrimidin-Grundgerüst verknüpft.

In der Regel werden dazu Aminoalkohole verwendet, wobei eine nucleophile Substitution am Aromaten (S_NAr) durchgeführt wird. Es wird ein Halogen-substituiertes Pyrimidin eingesetzt, das für solche Reaktionen aufgrund seiner Eigenschaften als Elektronenmangel-Aromat sehr gut geeignet ist.

Der *Spacer* trägt eine freie Hydroxylgruppe, die in *Schritt 2* die *Glycosylakzeptor*-Funktion darstellt. Wie schon erwähnt sollen O-glucosidische Bindungen mittels der *Königs-Knorr*-Methode oder der *Imidat*-Synthese geknüpft werden (Abbildungen 3.1-1 und 3.1-2).

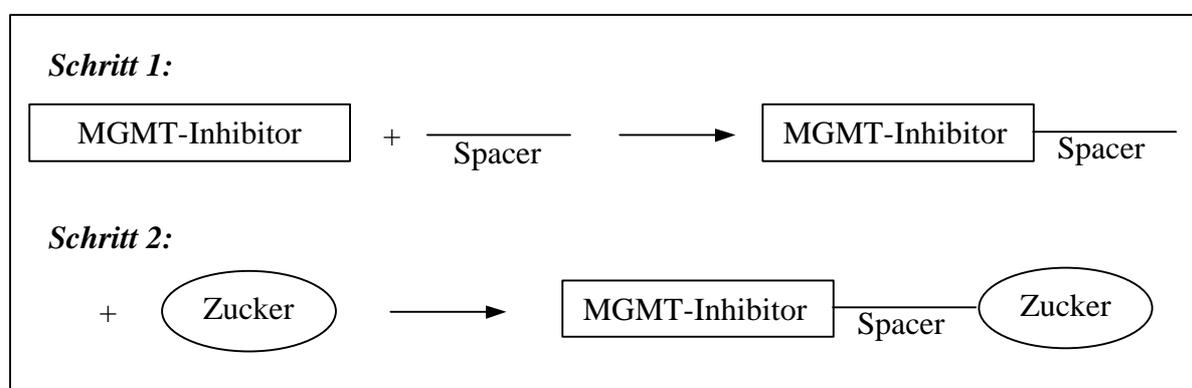


Abbildung 3.1-3 Schematische Darstellung der Synthesestrategie von MGMT-Inhibitoren mit Pyrimidin-Grundgerüst

Die Pyrimidine können desweiteren als Vorstufen der Purin-Synthese eingesetzt werden. Dazu wird ein Ringschluß zum Imidazol nach Einführung einer Aminofunktion durchgeführt. Auf diese Weise ließen sich neben den O⁴-substituierten Pyrimidinylglucosiden (**I**, Abbildung 3.1-4) auch entsprechende O⁶-substituierte Purinylglucoside (**II**) darstellen.

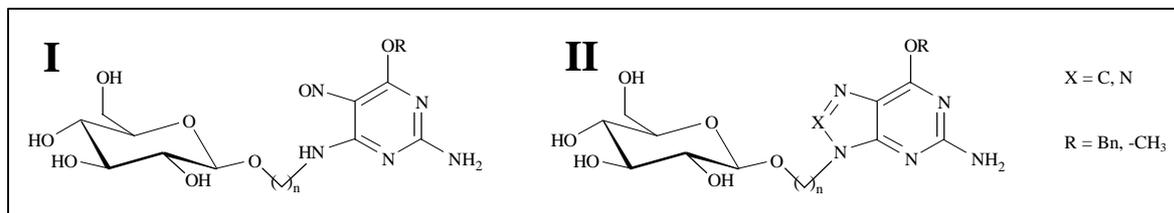


Abbildung 3.1-4 Strukturen der glucosidierten MGMT-Inhibitoren mit Pyrimidin- (**I**) und Purin-Grundgerüst (**II**)

Zur Synthese orientierte ich mich an zwei unterschiedlichen Vorschriften. Die beiden Strategien sind in Abbildungen 3.1-5 (Methode **A**) und 3.1-6 (Methode **B**) schematisch dargestellt.

Methode **A** folgt der von Shealy und Mitarbeitern sowie Vince und Hua vorgeschlagenen Route zur Synthese 2,6-disubstituierter Purin-Nukleoside als potentielle HIV-Therapeutika [Shealy et al. 1962, Vince & Hua 1990]. In unwesentlich modifizierter Form führte ich die Synthese mit 3-Aminopropanol, 5-Aminopentanol und 6-Aminohexanol (Edukt **I**, Abbildung 3.1-5) durch und erhielt unterschiedliche Ausbeuten (Tabelle 3.1-1). Nachteile der Methode **A** waren die niedrigen Ausbeuten der Stufe 6 und daß zur Darstellung der Nitroso-Verbindung ein weiterer Schritt erforderlich gewesen wäre. Da diese Verbindung jedoch aufgrund ihrer sehr hohen Aktivität als MGMT-Inhibitor von großem Interesse war, schien Strategie **B** eine gute Alternative zu sein.

In Methode **B** wird die O⁴-Substitution als zweiter Schritt und die Nitroso-Gruppe als oxidierte Vorstufe des zum Ringschluß notwendigen Amins eingeführt (Abbildung 3.1-6). Dadurch bietet sich die Möglichkeit, in einer Syntheseriehe drei Substanzen zur Verfügung zu stellen, die nach erfolgreicher Glykosidierung sehr gute Substrate für die MGMT darstellen sollten: O⁴-substituiertes 2-Amino-5-nitrosopyrimidin (**I**, Abbildung 3.1-4), O⁶-substituiertes 8-Azapurin (**II**), O⁶-substituiertes Purin (**III**).

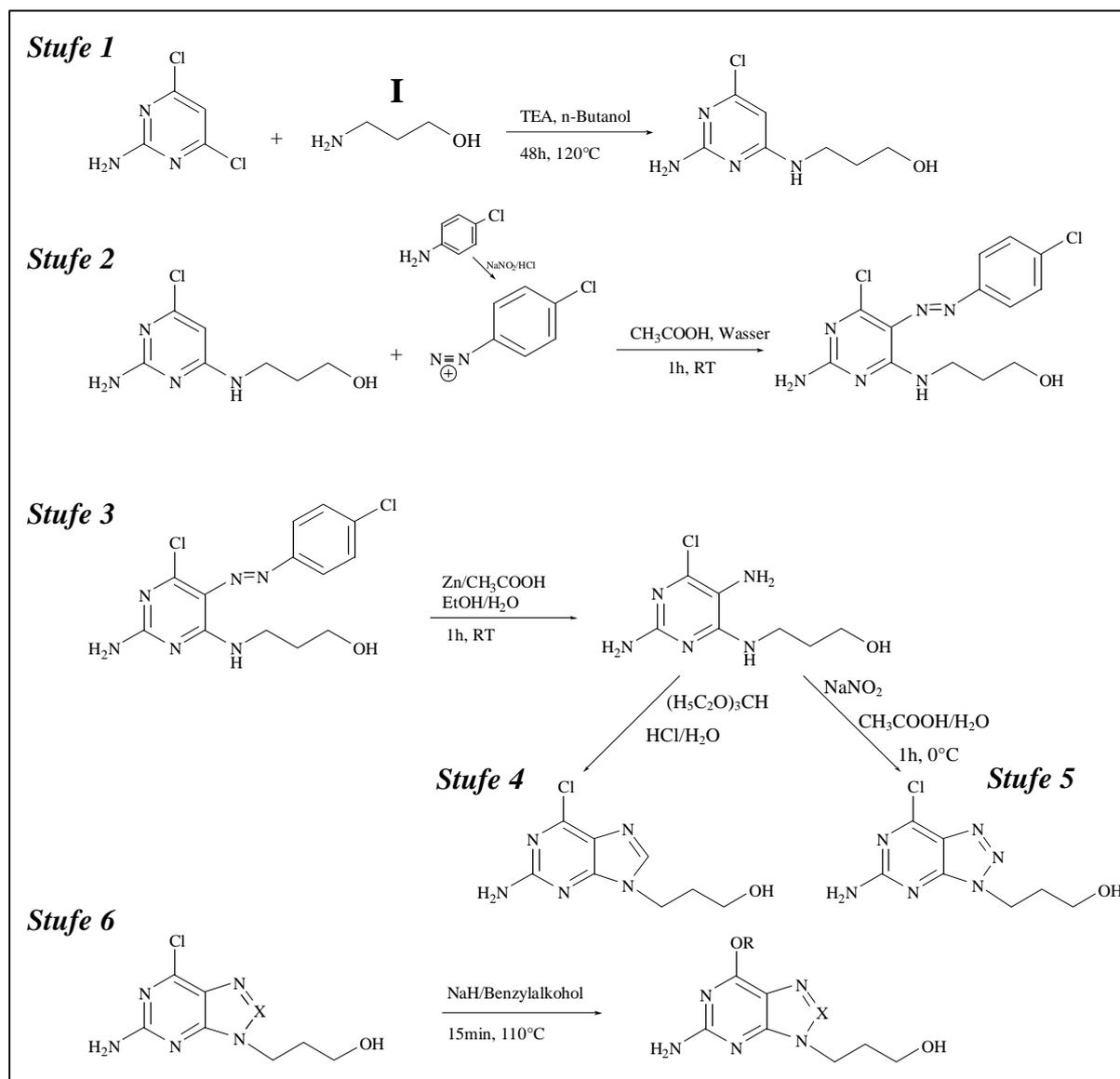


Abbildung 3.1-5 Syntheschema zur Darstellung der Vorstufen von MGMT-Inhibitoren mit Pyrimidin und Purin-Grundgerüst für die Glucosidierung (Methode A).

	Stufe 1	Stufe 2	Stufe 3	Stufe 4	Stufe 5	Stufe 6
3-Aminopropanol	12%	58%	20%	n.d.	56%	n.d.
5-Aminopentanol	58% (1)	93% (2)	29% (3)	35% (4)	70% (5)	18% (6)
6-Aminohexanol	> 99%	68%	50%	35%	64%	n.d.

Tabelle 3.1-1 Ausbeuten der Stufen 1-6 nach Methode A für verschiedene Aminoalkohole (Edukt I, Abbildung 3.1-5).

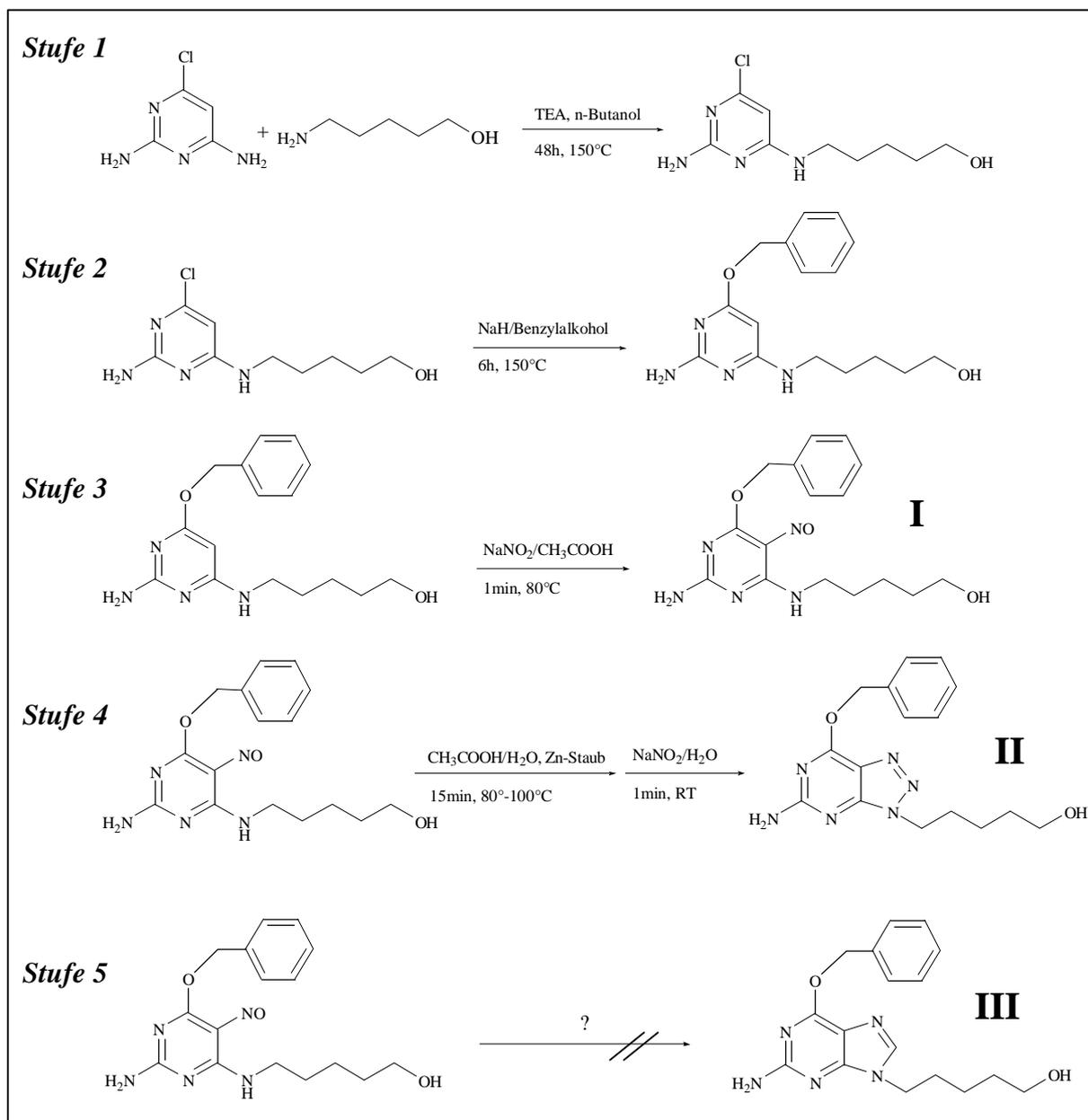


Abbildung 3.1-6 Syntheschema zur Darstellung der Vorstufen von MGMT-Inhibitoren mit Pyrimidin und Purin-Grundgerüst für die Glucosidierung (Methode **B**).

Die Stufe 1 wurde analog Methode **A** synthetisiert. Die Vorschriften für die Stufen 2 und 3 wurden bereits 1951 von Roth und Mitarbeitern und 1961 von Pfeleiderer und Lohrmann als Vorstufen für Pteroylglutaminsäure-Analoga publiziert und von mir in nur unwesentlich abgeänderter Form durchgeführt [Roth et al. 1951, Pfeleiderer & Lohrmann 1960]. Als Alkohole verwendete ich neben dem Benzylalkohol analog der Darstellung in Abbildung 3.1-6 auch Methanol und erhielt dementsprechend in Stufe 2 das O⁴-Methyl-Derivat und O⁴-Benzyl-Derivat, die beide in der weiteren Syntheseroute eingesetzt wurden. In Stufe 4 ließ sich die durch Reduktion gebildete Zwischenstufe (5-Aminopyrimidin) ohne Aufarbeitung lediglich nach Abfiltrieren des Zinkstaubes direkt weiter umsetzen. Ich orientierte mich dabei

an den in Methode **A**, Stufe 5 etablierten Bedingungen für den Ringschluß zur 8-Aza-Verbindung.

Stufe 5 lieferte in zahlreichen Versuchen kein nenneswertes Ergebnis. Verschiedene Versuche eines reduktiven Ringschlusses mit Natriumthiosulfat in Formamid / Essigsäure [Yamazaki 1962] schlugen ebenso fehl wie der Versuch einer Reduktion mit Zink/Essigsäure und anschließendem Ringschluß mit Ethoxymethylacetat [Robins & Robins 1969]. Da sich analoge Verbindungen auch auf anderem Wege darstellen lassen (siehe unten), beschränkte ich mich im folgenden auf die weitere Umsetzung der bis dahin erhaltenen Strukturen.

	Stufe 1	Stufe 2	Stufe 3	Stufe 4	Stufe 5
O ⁴ -benzyl	58% (Tab.3.1-1)	54% (7)	99,9% (8)	62% (6)	k.R.
O ⁴ -methyl	58% (Tab 3.1-1)	54%	81%	n.d.	n.d.

Tabelle 3.1-2 Ausbeuten der Stufen 1-5 nach Methode **B** (Abbildung 3.1-6). In Stufe 2 wurde neben Benzylalkohol auch Methanol als Edukt eingesetzt und lieferte das dem O⁴-Benzyl-Derivat entsprechende O⁴-Methyl-Derivat.

Die Synthesen der Methode **B** waren ansonsten problemlos durchführbar und lieferten sowohl für das Methyl- als auch für das Benzyl-Derivat gute Ausbeuten (Tabelle 3.1-2). Stufen 4 und 5 führte ich zuerst für das Benzyl-Derivat durch, da für diese Verbindungen eine höhere Potenz als MGMT-Inhibitoren zu erwarten war und diese dementsprechend auch als erste für die biologische Testung zur Verfügung stehen sollten.

Wie beim Vergleich der Tabellen 3.1-1 und 3.1-2 ersichtlich, verläuft die Benzylierung (Stufe 2) in Methode **B** mit besseren Ausbeuten als in Syntheseweg **A**. Darüberhinaus läßt sich die 5-Nitrosoverbindung in hervorragenden Ausbeuten und in sehr guter Reinheit darstellen.

Mit den gewonnenen Substanzen führte ich die ersten Glukosidierungsversuche durch, wobei verschiedene Methoden zur Anwendung kamen. In variiertes Form entsprechen diese alle der klassischen *Königs-Knorr-Synthese* oder der *Imidat-Synthese* nach Schmidt.

Zuerst sollten die 5-Nitroso-Verbindung (**I**, Abbildung 3.1-6) und die 8-Aza-Verbindung (**II**) umgesetzt werden. Wie oben bereits erwähnt, waren dies die aussichtsreichsten Kandidaten als MGMT-Inhibitoren und sollten als Orientierungshilfe für die Glucosidierung der weiteren Vorstufen dienen. Ziel der ersten Synthesen war die Darstellung von β -D-Glucosiden der Strukturen **I** und **II** (Abbildung 3.1-7). 2-Amino-8-aza-6-benzyloxy-9-(5-hydroxypentyl)-purin (**II**, Abbildung 3.1-7) lieferte durch Umsetzung unter einfachen *Königs-Knorr*-Bedingungen (Ag₂CO₃, Acetobromglucose, CH₂Cl₂, Raumtemperatur) niedrige Ausbeuten (17%) des Glucosids, das sich jedoch säulenchromatographisch gut reinigen ließ. Die oftmals

problematische Trennung des gewünschten β -Glucosids vom α -Isomer verlief komplikationslos.

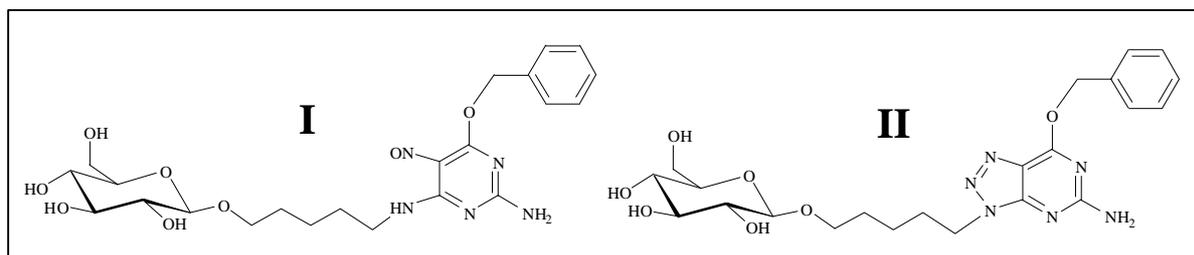


Abbildung 3.1-7 Strukturformeln der β -D-Glucoside der Vorstufen **I** und **II** aus Abbildung 3.1-6.

Im Gegensatz dazu erwies sich 2-Amino-4-benzyloxy-6-(5-hydroxypentylamino)-5-nitrosopyrimidin (**I**, Abbildung 3.1-7) als bedeutend schwieriger glucosidierbar. Insgesamt verwendete ich fünfzehn Varianten der *Königs-Knorr*-Synthese und der *Imidat*-Synthese, die allesamt nicht das erwünschte Ergebnisse lieferten. Am kritischsten zeigte sich die Wahl des Katalysators. Die recht schwach wirksamen Silber-Salze (Ag-Carbonat, Ag-triflat) führten auch nach langen Reaktionszeiten (>24h) nicht zum gewünschten Ergebnis. Stärker wirksame Lewis-Säuren wie TMS-triflat oder Bortriflourid-Etherat führten unabhängig von der Temperatur zu einer sofortigen Zersetzung der Nitroso-Verbindung. Dies ließ sich in einem Kontrollexperiment verifizieren, wo der Glycosyl-Donor auch nach Zusatz geringster Mengen Katalysator in wasserfreiem Lösungsmittel zerstört wird.

Weitere eher unkonventionelle Versuche führte ich unter anderem ohne Katalysator durch, wobei ich mich an der Synthesevorschrift für das Glufosamid orientierte (Kapitel 1.6) [Dickes 1988]. Auch ein Versuch in konzentrierter Lithiumperchlorat-Lösung, die von Waldmann und Mitarbeitern vorgeschlagen werden, brachten in diesem Falle nicht das gewünschte Ergebnis [Waldmann 1994]. Die einzig erfolgreichen Reaktionsbedingungen wurden mittels der *Helferich-Variante* der *Königs-Knorr*-Synthese [Helferich 1959] durch Einsatz von Quecksilber-(II)-cyanid in Dichlormethan bei 0°C erreicht. Das Glucosid konnte jedoch weder säulenchromatographisch noch mittels HPLC erfolgreich aufgereinigt werden.

Da zu diesem Zeitpunkt noch keine biologischen Ergebnisse für MGMT-Inhibitor-Glucoside vorlagen, wurde im weiteren der in 3.1.1.2 vorgeschlagenen Syntheseweg verfolgt (siehe auch Diskussion 4.1).

3.1.1.2. Bromoalkylglucoside und O⁶-substituierte Purine

Die direkte Umsetzung O⁶-substituierter Purine stellt eine zweite Möglichkeit zur Synthese einer größeren Anzahl potentieller MGMT-Inhibitoren dar. Die Glycosidierung verläuft in zwei Stufen. Zuerst wird der geschützte aktivierte Zucker mit einem funktionalisierten Spacer verknüpft. Dieser trägt endständig eine gute Abgangsgruppe, beispielsweise ein Halogen, so daß damit in Schritt 2 die nukleophile Substitution mit dem N-9 des Purin-Grundgerüsts durchgeführt werden kann.

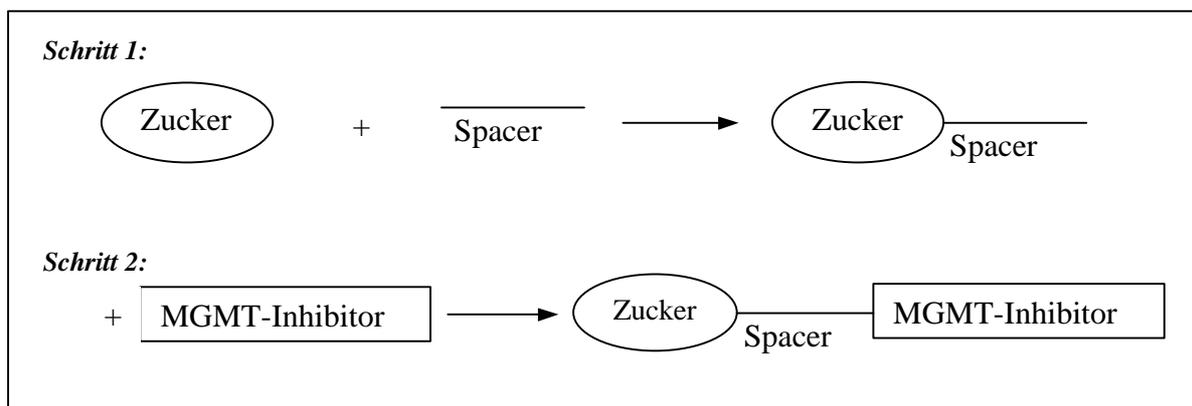


Abbildung 3.1-8 Schematische Darstellung der Synthesestrategie von MGMT-Inhibitoren mit Purin-Grundgerüst

Mitunter stellt die Glucosidierung einen kritischen Punkt in einer Synthesestrategie dar. Die Synthesen verlaufen oftmals mit unbefriedigenden Ausbeuten und sind nicht gut reproduzierbar. Daher ist es von Vorteil, daß nicht für jedes Konjugat geeignete Bedingungen gefunden werden müssen, sondern bereits glucosidierte Vorstufen an die purinischen Strukturen der MGMT-Inhibitoren eingebaut werden. Auch wird die oftmals problematische Trennung der α / β -Isomere dabei schon auf der ersten Stufe der aktivierten Alkylglucoside durchgeführt. Zwar müssen für jede Struktur des Schrittes 1 geeignete Konditionen etabliert werden, doch bieten diese zahlreiche weitere Einsatzmöglichkeiten (Kapitel 3.2, 3.3).

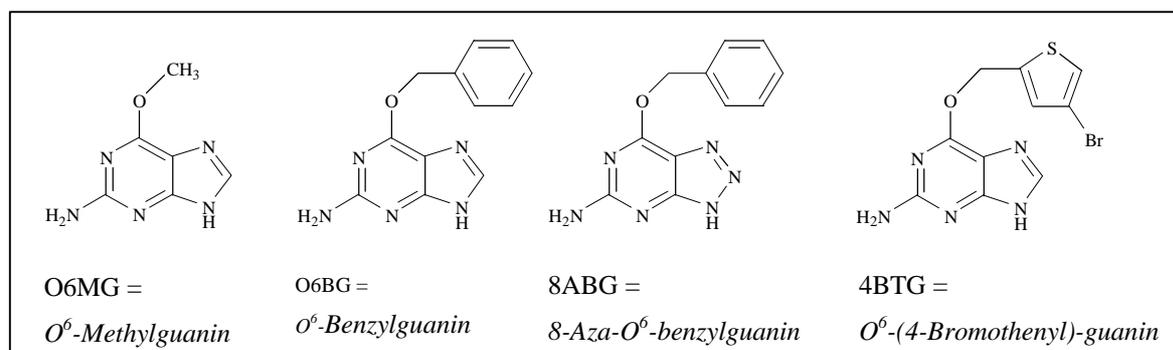


Abbildung 3.1-9 Strukturen der Purin-Grundstrukturen zur Synthese von glucosidierten MGMT-Inhibitoren. O⁶-Methylguanin (**O6MG**); O⁶-Benzylguanin (**O6BG**); 8-Aza-O⁶-benzylguanin (**8ABG**); O⁶-(4-Bromothienyl)-guanin (**4BTG**).

Als Ausgangssubstanzen in Stufe 2 dienten die vier Guanin-Derivate, die nach unterschiedlichen Vorschriften synthetisiert wurden (Abbildung 3.1-9).

O⁶-Methylguanin (O6MG) und O⁶-Benzylguanin (O6BG) wurden durch Umsetzung von Alkoholaten mit 6-Chlorguanin gewonnen (Abbildung 3.1-10) [Balsinger & Montgomery 1960, Bowles et al. 1963].

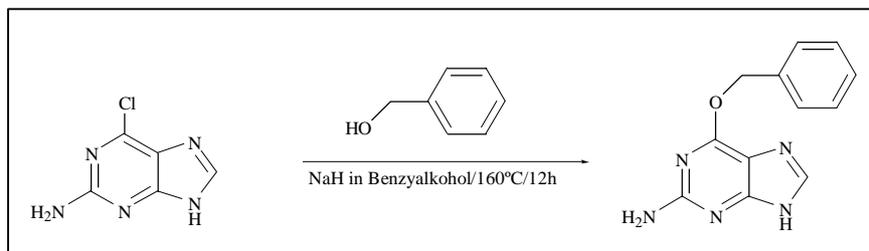


Abbildung 3.1-10 Umsetzung von 6-Chlorguanin mit Benzylalkoholat zu O⁶-Benzylguanin [Balsinger & Montgomery, 1960, Bowles et al. 1963]. Die Umsetzung zum O⁶-Methylguanin erfolgt analog mit Methanol, jedoch bei 120°C.

Nach dem Umkristallisieren lag die Ausbeute für O6MG bei 65%. O6BG hingegen wurde lediglich in 26% Ausbeute erhalten, da unter den angegebenen Reaktionsbedingungen wahrscheinlich auch N- Benzylierungen auftreten. Diese Reaktionsprodukte konnten nur mit hohen Verlusten über Säulenchromatographie abgetrennt werden.

Eine Alternative entspricht der oben beschriebenen Synthese über Pyrimidin-Zwischenstufen mit anschließendem Ringschluß (Kapitel 3.2.1). Als Ausgangssubstanz wurde 1-Chloro-3,5-diaminopyrimidin eingesetzt. Der letzte Schritt der Umsetzung zum O6BG erfolgte mittels Ethoxymethylacetat und anschließendem Ringschluß durch Zusatz von Natronlauge.

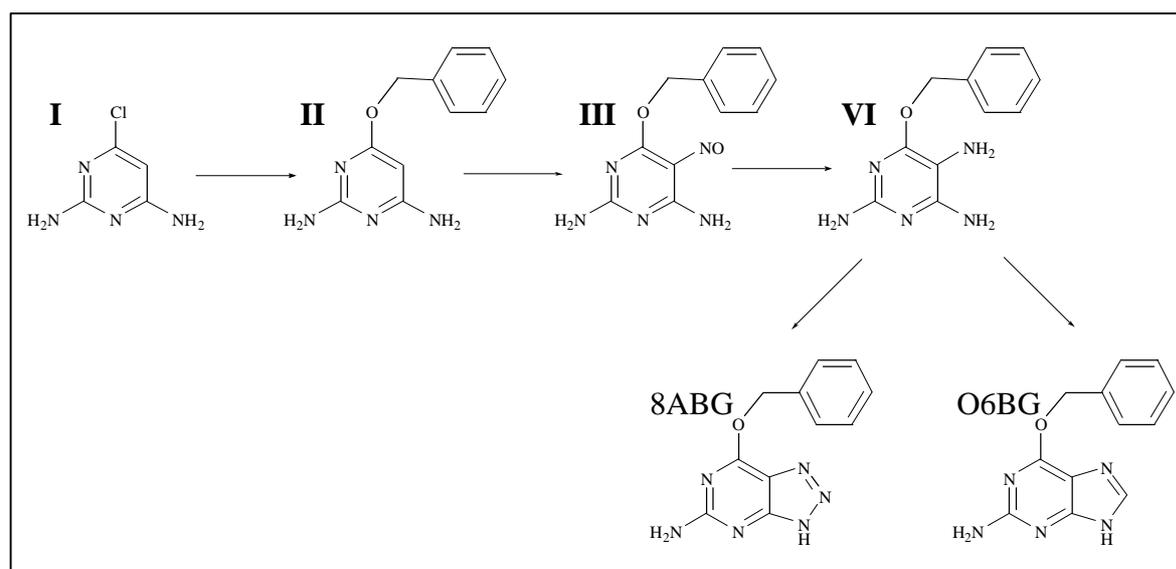


Abbildung 3.1-11 Synthese von O⁶-Benzylguanin (O6BG) und 8-Aza-O⁶-benzylguanin (8ABG) über Pyrimidin-Zwischenstufen [Roth et al. 1951]. Reaktionsbedingungen entsprechen den angegebenen in Abbildung 3.1-6.

Die Methode erwies sich trotz der geringen Ausbeute (22,8%) als sehr gute Alternative, da die Edukte kostengünstiger sind und die Reaktionen und Aufreinigungen aller Zwischenstufen unproblematisch verlaufen. Desweiteren läßt sich auf diese Weise auch das 8-Aza-O⁶-benzylguanin darstellen, welches in einer Ausbeute von 77,5 % durch Umkristallisation in ausgezeichnete Reinheit erhalten wird.

Ein neuer Weg zur O⁶-Substitution von Purinen wurde 1998 beschrieben [Mc Elhinney et al. 1998; Cancer Research Campaign Technology Limited 1997]. An der O⁶-Position des Guanins wird hierbei ein quartäres Aminium-Salz gebildet [MacCoss et al. 1985; Kiburis & Lister 1971]. Im Vergleich zum Chlor stellt dies eine bessere Abgangsgruppe dar, so daß sich die Reaktion bei Raumtemperatur durchführen läßt.

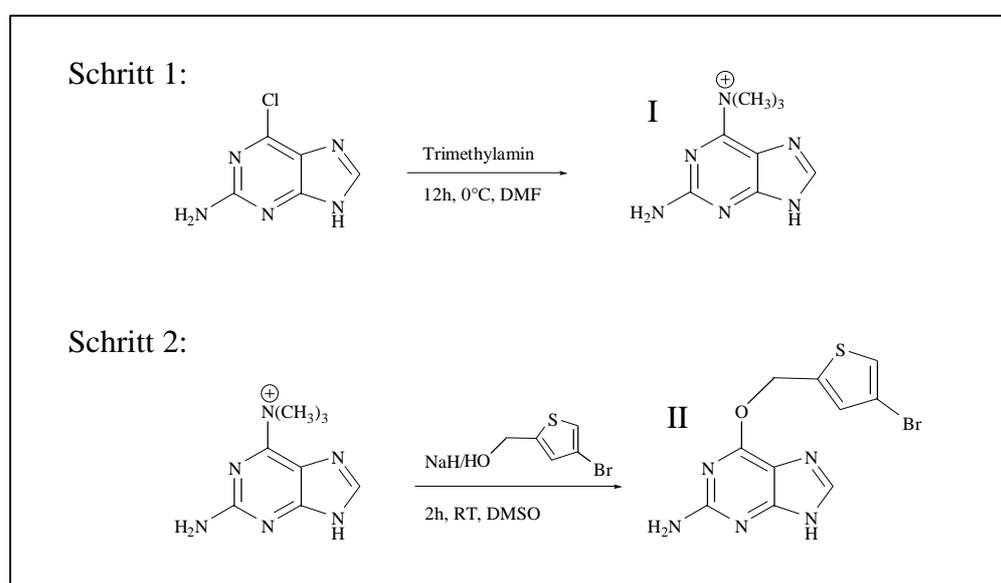


Abbildung 3.1-12 Alternative Darstellung von O⁶-substituierten Guanin-Derivaten [nach McElhinney et al. 1999]. Schritt 1 zur Synthese von Trimethylpurin-6-ylammoniumchlorid (I) [Kiburis & Lister 1971]. Schritt 2 führt zu O⁶-(4-Bromophenyl)-guanin (II).

Die Synthese zeichnet sich durch deutlich höhere Ausbeuten gegenüber den bis dahin etablierten Methoden aus und eröffnet die Möglichkeit, aufgrund der moderaten Reaktionsbedingungen auch labilere Alkohole zu verwenden. Da auf diese Weise keine Produkte durch N-Substitutionen entstehen, kann die Reinigung durch Umkristallisation erfolgen. Die mit 73 % angegebene Ausbeute der Literatur bei der Darstellung des O⁶-(4-Bromophenyl)-guanins konnte mit 80 % noch übertroffen werden [Cancer Research Campaign Technology Limited 1997].

Die Strategie wurde hier nur für 4BTG verfolgt, da dies die einzige O⁶-substituierte Ausgangsverbindung war, die zum Zeitpunkt der Publikation von McElhinney und Mitarbeitern Ende 1998 noch nicht zur Verfügung stand. O⁶-Methylguanin, O⁶-Benzylguanin

und 8-Aza-O⁶-Benzylguanin wurden bereits in ausreichenden Mengen nach den beschriebenen Vorschriften synthetisiert.

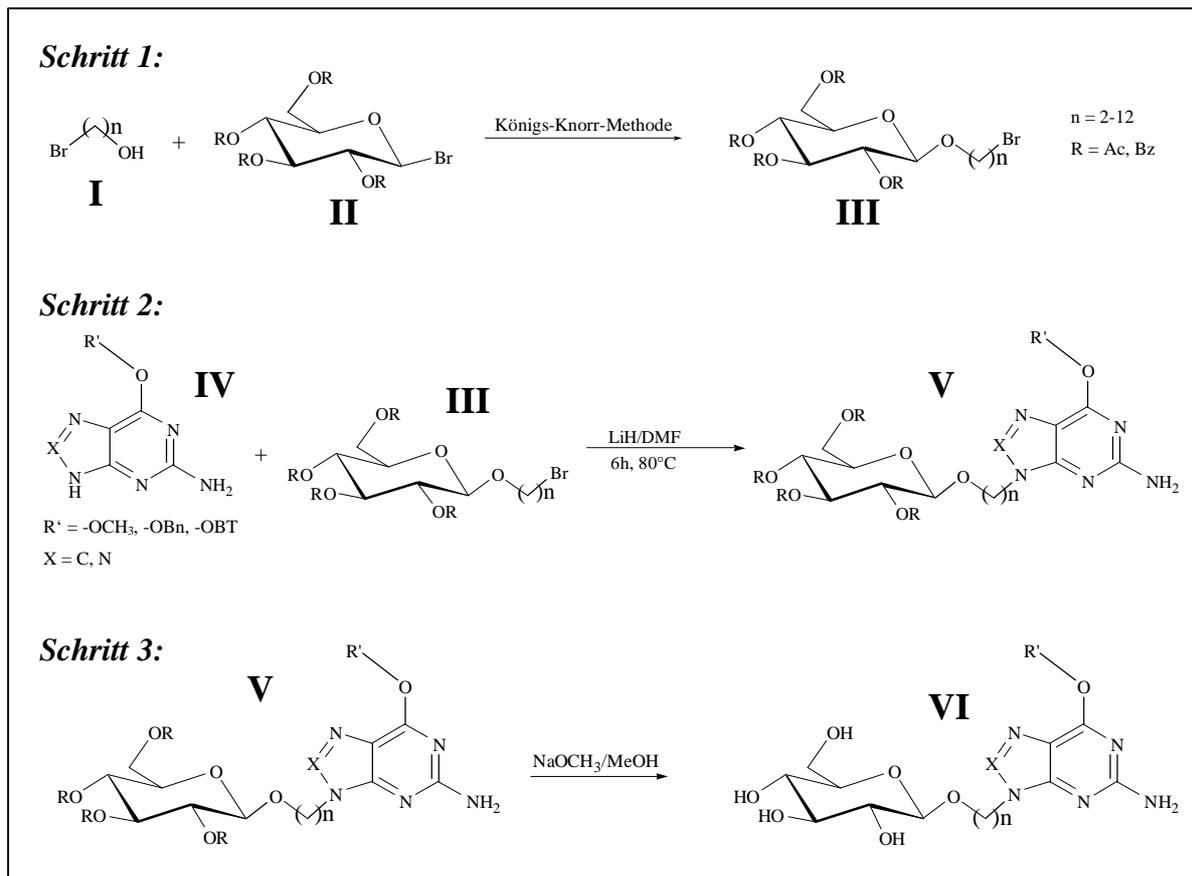


Abbildung 3.1-13 Schematische Darstellung der Synthesestrategie für MGMT-Inhibitorglucoside mit Purin-Grundgerüst. Schritt 1 = *Glycosidierung*: Der Glycosyldonor (**II**) wird mit einem Glycosylakzeptor (**I**) zum geschützten Bromoalkyl- β -D-glycosid umgesetzt. Schritt 2 = *Knüpfung der nukleosidanalogen Verbindung*: Das O⁶-substituierte Guanin-Derivat (**IV**) wird mit **III** basenkatalysiert zum geschützten Glycosid (**V**) verknüpft. Schritt 3 = *Entschützung*: Umesterung durch Verseifung der Schutzgruppen mit Methanolat zum Glycosid (**VI**).

3.1.1.3. Darstellung der MGMT-Inhibitor-Glucoside

Der nächste Schritt sollte die Bereitstellung der funktionalisierten Alkylglucoside sein. Die Möglichkeiten zur Darstellung von β -Glycosiden wurden bereits in Kapitel 3.1 beschrieben. Wie dort erwähnt, wurden mit einer Ausnahme (Tabelle 3.1-3) alle Bromoalkylglucoside nach *Königs-Knorr*-Bedingungen oder Varianten davon synthetisiert. Das Syntheschema (Abbildung 3.1-13) zeigt die drei Schritte, die zu den gewünschten Glucosiden mit Purin-Grundgerüst führen sollten. Für Schritt 1 ist der maßgebliche Einfluß einer Reihe von Faktoren auf Reaktionsverhalten und Ausbeuten bekannt. Dementsprechend wurden unterschiedliche Parameter, insbesondere Lösungsmittel und Katalysator, variiert, bis akzeptable Ausbeuten erzielt wurden. Für die acetylgeschützten Glucoside wurden die niedrigen Ausbeuten in Kauf genommen, da die Anschaffungskosten für die Edukte sehr

gering sind und die Verbindungen durch direkte Umkristallisation aus dem Reaktionsgemisch gewonnen werden können.

Für die längerkettigen (C6-C12) Bromalkohole konnten durch Einsatz von Silberphosphat als Katalysator und mit 1-Bromo-2,3,4,6-tetra-O-benzoyl- β -D-glucopyranosid als Glycosyldonor mit Ausbeuten von 48% bis 62% deutlich bessere Ergebnisse erzielt werden, doch ist die Aufarbeitung mittels Säulenchromatographie aufwendiger.

Die einzige Verbindung, deren Synthesevorschrift direkt aus der Literatur übernommen werden konnte, ist das auf unkonventionellem Wege dargestellte 4-Bromobutyl-tetra-O-acetyl- β -D-glucopyranosid (**12**, Abbildung 3.1-14) [Helferich & Zirner 1962]. Hierbei erfolgt die Glucosidierung durch Ringöffnung von Tetrahydrofuran nach Quecksilber-katalysiertem Angriff von Acetobromglucose zu **12**.

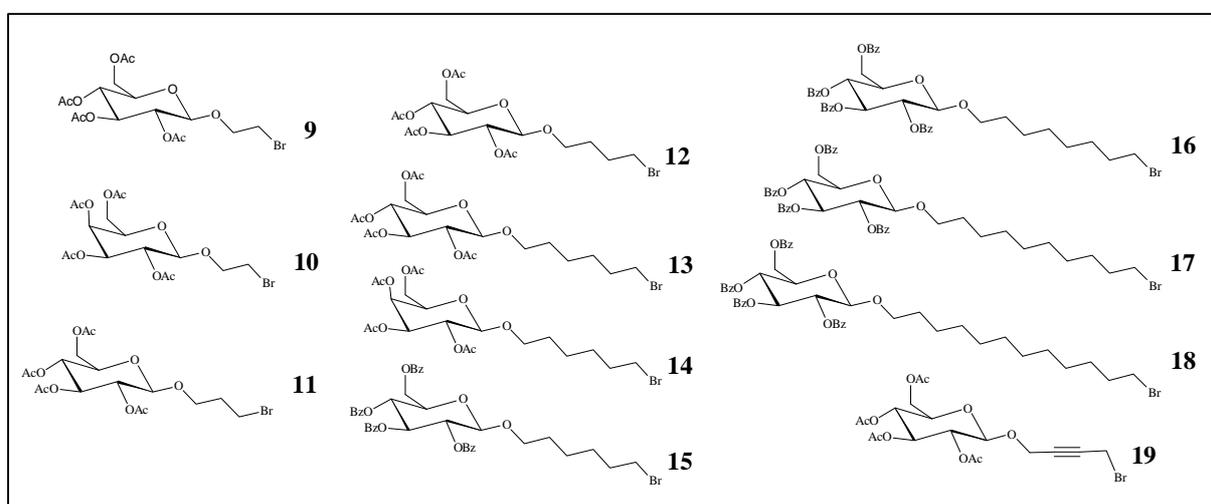


Abbildung 3.1-14 Strukturformeln der nach Schritt 1 (Abbildung 3.1-13) synthetisierten Bromoalkylglycoside.

Für die weiteren Synthesen orientierte ich mich an der Literatur, doch wurden für alle Bromoalkylglycoside neue Vorschriften etabliert. In Tabelle 3.1-3 werden die Reaktionsbedingungen und die Ergebnisse im einzelnen aufgelistet sind. Es sind die in Bezug auf Ausbeute, Aufreinigung und erreichbare Reinheit praktikabelsten Varianten dokumentiert. Alle Synthesen wurden mindestens zweifach wiederholt.

Glykosid		Glykosyl -donor ^a	Glykosyl -akzeptor	Aktivator	Solvens	Temperatur /Zeit	Ausbeute [%]
2-Bromoethyl-tetra-O-acetyl- β -D-glucopyranosid	9	ABG	2-Bromethanol	Ag-Triflat/TMH	CH ₂ Cl ₂	RT/2h	22
2-Bromoethyl-tetra-O-acetyl- β -D-glucopyranosid	9	ABG	2-Bromethanol	Ag ₂ CO ₃	Et ₂ O	RT/2h	11
2-Bromoethyl-tetra-O-acetyl- β -D-glucopyranosid	9	PAG	2-Bromethanol	TMS-Triflat	CH ₂ Cl ₂	RT/1,5h	36
2-Bromoethyl-tetra-O-acetyl- β -D-glucopyranosid	9	PAG	2-Bromethanol	Bortrifluorat-Etherat	CH ₂ Cl ₂	RT/1,5h	12
2-Bromoethyl-tetra-O-acetyl- β -D-galactopyranosid	10	ABGa	2-Bromethanol	Ag-Triflat/TMH	CH ₂ Cl ₂	RT/2h	21
2-Bromoethyl-tetra-O-acetyl- β -D-galactopyranosid	10	ABGa	2-Bromethanol	Ag ₂ CO ₃	Et ₂ O	RT/2h	10
3-Bromopropyl-tetra-O-acetyl- β -D-glucopyranosid	11	ABG	3-Bromopropanol	Ag ₂ CO ₃	Et ₂ O	RT/12h	13
3-Bromopropyl-tetra-O-acetyl- β -D-glucopyranosid	11	ABG	3-Bromopropanol	Hg(CN) ₂	Et ₂ O	RT/12h	10
3-Bromopropyl-tetra-O-acetyl- β -D-glucopyranosid	11	PAG	3-Bromopropanol	TMS-Triflat	CH ₂ Cl ₂	RT/3h	39
3-Bromopropyl-tetra-O-acetyl- β -D-glucopyranosid	11	PAG	3-Bromopropanol	Ag-Triflat/TMH	CH ₂ Cl ₂	RT/2h	37
4-Bromobutyl-tetra-O-acetyl- β -D-glucopyranosid	12	ABG	THF	HgBr	THF	35°C/15h	10
6-Bromohexyl-tetra-O-acetyl- β -D-glucopyranosid	13	ABG	6-Bromhexanol	Hg(CN) ₂ /HgBr	CH ₂ Cl ₂	RT/72h	16
6-Bromohexyl-tetra-O-acetyl- β -D-glucopyranosid	13	PAG	6-Bromhexanol	TMS-triflat	CH ₂ Cl ₂	RT/3h	20
6-Bromohexyl-tetra-O-acetyl- β -D-galactopyranosid	14	GLI	6-Bromhexanol	Bortrifluorat-Etherat	CH ₂ Cl ₂	RT/15h	48
6-Bromohexyl-tetra-O-benzoyl- β -D-glucopyranosid	15	BBG	6-Bromhexanol	Ag ₃ PO ₄	CH ₃ NO ₃	RT/4h	58
8-Bromooctyl-tetra-O-benzoyl- β -D-glucopyranosid	16	BBG	8-Bromoctanol	Ag ₃ PO ₄	CH ₃ NO ₃	RT/4h	48
10-Bromodecyl-tetra-O-benzoyl- β -D-glucopyranosid	17	BBG	10-Bromdecanol	Ag ₃ PO ₄	CH ₃ NO ₃	RT/4h	46
12-Bromododecyl-tetra-O-benzoyl- β -D-glucopyranosid	18	BBG	12-Bromdodecanol	Ag ₃ PO ₄	CH ₃ NO ₃	RT/4h	62
4-Bromobut-2-in-yl-tetra-O-acetyl- β -D-glucopyranosid	19	PAG	4-Brombut-2-in-1-ol	TMS-triflat	CH ₂ Cl ₂	RT/2,5h	36

Tabelle 3.1-3 Ergebnisse der Synthese glycosidierter Bromoalkylhalogenide. Vgl. auch Schritt 1/Abbildung 3.1-13. ^a ABG = 1-Bromo-2,3,4,6-tetra-O-acetyl- β -D-glucopyranosid; ABGa = 1-Bromo-2,3,4,6-tetra-O-acetyl- β -D-galactopyranosid; BBG = 1-Bromo-2,3,4,6-tetra-O-benzoyl- β -D-glucopyranosid; PAG = Penta-O-acetyl- α -D-glucopyranosid; GLI = Tetra-O-benzoyl- α -galactosetrichloracetimidat.

Die Bromoalkylglycoside sollten gemäß Schritt 2 (Abbildung 3.1-13) über eine basenkatalysierte nukleophile Substitution mit der Purinstruktur verknüpft werden. Maßgabe dabei war, Bedingungen zu etablieren, unter denen alle Purine mit allen Glukosiden reagieren würden.

Im Imidazol-Anteil des Heterozyklus können beide Stickstoff-Atome auf gleiche Weise als Nukleophile reagieren (Positionen 7 und 9, Abbildung 3.1-15; **A**). Da jedoch bekannt ist, daß lediglich N-9-substituierte Guanin-Derivate (Nukleosidanaloga) (**III**, Abbildung 3.1-15) von der MGMT als Substrate akzeptiert werden [Moschel et al. 1992], mußten geeignete Reaktionsbedingungen gefunden werden unter denen nur ein geringstmöglicher Teil an N-7-Substitution (**IV**, Abbildung 3.1-15) entsteht. Es existieren eine Reihe von Möglichkeiten zur

Darstellung N-9-substituierter Guanin-Derivate. Man macht sich dabei die Azidität des Imidazol-Ringes zunutze: Mittels einer Base wird das Proton abstrahiert und das entstehende Nukleophil (**II**, Abbildung 3.1-15) anschließend mit einem polarisierten Substrat beispielsweise einem Alkylhalogenid (**X-R**, Abbildung 3.1-15) zum Nucleosidanalogen umgesetzt.

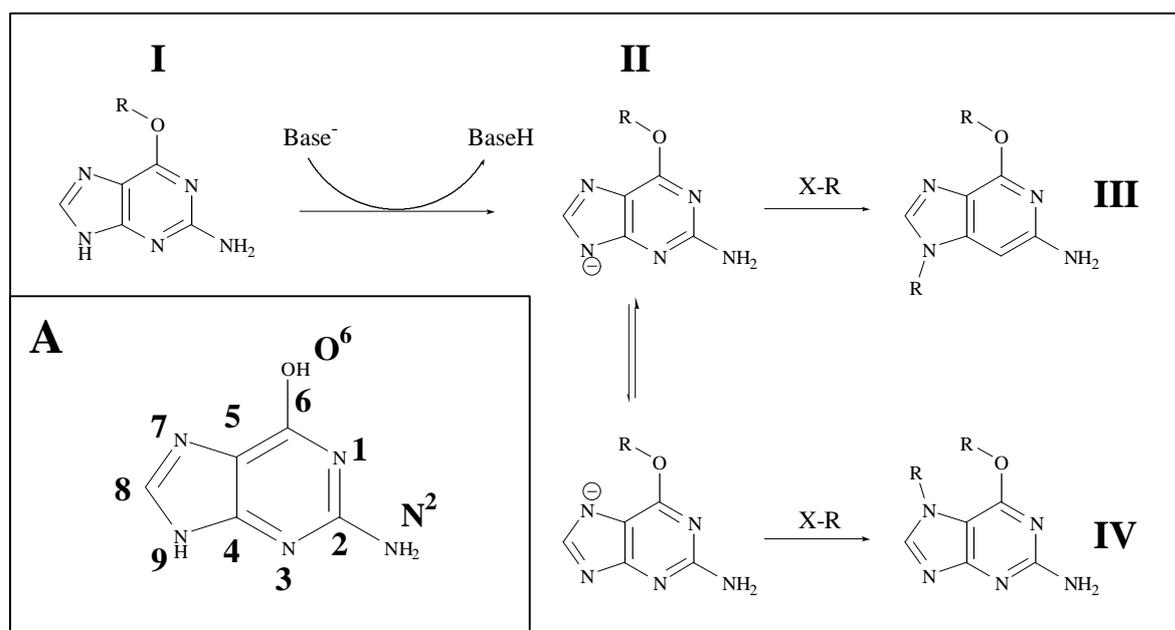


Abbildung 3.1-15 Basenkatalysierte Darstellung Imidazol-substituierter Guanin-Derivate. Im Imidazol-Ring des Guanin-Derivats (**I**) wird aufgrund der Azidität ein Proton extrahiert, was zum Nukleophil mit den beiden mesomeren Strukturen (**II**) führt. Ein polarisiertes Substrat (**X-R**) wird angegriffen, wobei die 7-substituierte (**IV**) oder die 9-substituierte Verbindung (**III**) entsteht. In Feld **A** ist die Nomenklatur des Guanins dargestellt.

1986 wurde von Kjellberg und Liljenberg untersucht, wie sich die Ausbeuten der Substitution von Guanin-Derivaten bezüglich des N-9-Produktes optimieren lassen. Wird ein O^6 -substituiertes Guanin-Derivat eingesetzt ist die N-7-Position sterisch abgeschirmt. Das Ausmaß der Abschirmung ist von der Größe des O^6 -Substituenten und der Reaktionstemperatur abhängig. Durch Erhöhung der Temperatur führt der O^6 -Substituent stärkere Molekularbewegungen aus und behindert durch die Rotation den Angriff an der Position 7 des Guaningerüsts. Durch Verwendung von Lithiumhydrid kann darüberhinaus das Verhältnis der N-9- zur N-7-Substitution günstig beeinflusst werden.

Dementsprechend orientierte ich mich bei der Wahl der Standardbedingungen weitestgehend nach diesen Vorgaben. Die Reaktionen erfolgten in DMF unter Lithiumhydrid-Katalyse, wobei 2 h bei 80 °C gerührt wird.

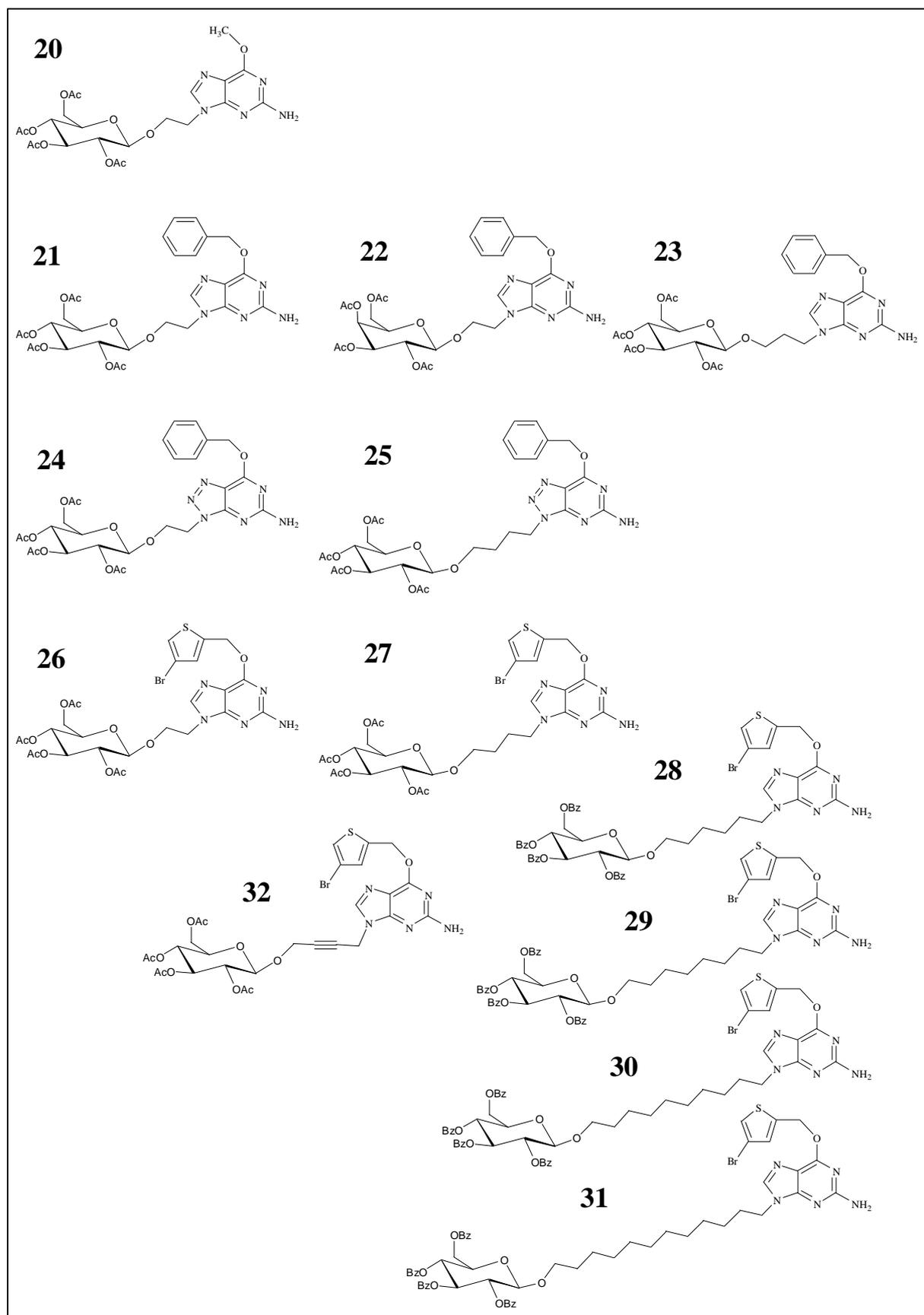


Abbildung 3.1-16 Strukturformeln der synthetisierten, geschützten Glucoside der O⁶-substituierten Glycoside. Die Darstellung verdeutlicht, daß eine homologe Reihe von Substanzen aufgebaut wurde, die der Bestimmung einer Struktur-Wirkungs-Beziehung dienen soll.

Zur Ableitung einer Struktur-Wirkungsbeziehung wurde eine Reihe von MGMT-Inhibitor-Glucosiden synthetisiert, die in jeweils einem Molekülteil variieren (Abbildung 3.1-14). So wurden beispielsweise die Ethylglucoside des O6MG, des O6BG, des 8ABG und des 4BTG dargestellt sowie das Butylglucosid, das Hexylglucosid, das Octylglucosid usw. des 4BTG dargestellt. Dadurch wurde gewährleistet, daß bei der vergleichenden Betrachtung der biologischen Aktivität Unterschiede zu anderen Molekülen durch jeweils nur eine strukturelle Veränderung hervorgerufen werden können. Desweiteren bot sich die Möglichkeit, die Glucoside schrittweise bezüglich der MGMT-Hemmung zu optimieren, da auf die biologische Ergebnisse reagiert werden konnte (Kapitel 3.2.1 und 3.2.2).

Glucosid		Purin	Bromoalkylglucosid	Ausbeute [%] ^a
2-(O ⁶ -Methylguan-9-yl)-ethyl-β-D-tetraacetylglucosid	20	O ⁶ -Methylguanin	1	55
2-(O ⁶ -Benzylguan-9-yl)-ethyl-β-D-tetraacetylglucosid	21	O ⁶ -Benzylguanin	1	33
2-(O ⁶ -Benzylguan-9-yl)-ethyl-β-D-tetraacetylglucosid	21	O ⁶ -Benzylguanin	11	15
2-(O ⁶ -Benzylguan-9-yl)-ethyl-β-D-tetraacetylgalactosid	22	O ⁶ -Benzylguanin	5	13
3-(O ⁶ -Benzylguan-9-yl)-propyl-β-D-tetraacetylglucosid	23	O ⁶ -Benzylguanin	7	18
2-(8-Aza-O ⁶ -Benzylguan-9-yl)-ethyl-β-D-tetraacetylglucosid	24	8-Aza-O ⁶ -benzylguanin	1	20
4-(8-Aza-O ⁶ -Benzylguan-9-yl)-butyl-β-D-tetraacetylglucosid	25	8-Aza-O ⁶ -benzylguanin	11	21
2-[O ⁶ -(4-Bromotheryl)-guan-9-yl]-ethyl-β-D-tetraacetylglucosid	26	O ⁶ -(4-Bromotheryl)-guanin	1	35
4-[O ⁶ -(4-Bromotheryl)-guan-9-yl]-butyl-β-D-tetraacetylglucosid	27	O ⁶ -(4-Bromotheryl)-guanin	11	25
4-[O ⁶ -(4-Bromotheryl)-guan-9-yl]-but-2-in-yl-β-D-tetraacetylglucosid	28	O ⁶ -(4-Bromotheryl)-guanin	19	37
6-[O ⁶ -(4-Bromotheryl)-guan-9-yl]-hexyl-β-D-tetra-benzoylglucosid	29	O ⁶ -(4-Bromotheryl)-guanin	15	30
8-[O ⁶ -(4-Bromotheryl)-guan-9-yl]-octyl-β-D-tetra-benzoylglucosid	30	O ⁶ -(4-Bromotheryl)-guanin	16	35
10-[O ⁶ -(4-Bromotheryl)-guan-9-yl]-decyl-β-D-tetra-benzoylglucosid	31	O ⁶ -(4-Bromotheryl)-guanin	17	36
12-[O ⁶ -(4-Bromotheryl)-guan-9-yl]-dodecyl-β-D-tetra-benzoylglucosid	32	O ⁶ -(4-Bromotheryl)-guanin	18	22

Tabelle 3.1-4 Ergebnisse der Substitutionsreaktion der O⁶-substituierten Guanin-Derivate mit den Bromoalkylglycosiden (Vgl. Schritt 2 Abbildung 3.1-13). ^a Die Ausbeute beschreibt hierbei den in Abbildung 3.1-13 dargestellten Schritt 2.

Der kritischste Punkt bei der Durchführung war die Notwendigkeit absoluter Wasserfreiheit. Der Einsatz der Base H⁻, machte die Verwendung basisch verseifbarer Schutzgruppen

schwierig. Die anfänglich auftretenden Probleme durch teilweise Abspaltung der Acetyl- oder Benzoylschutzgruppen konnten durch Einsatz des Lithiumhydrids im Unterschluß und sehr vorsichtiges Arbeiten in Bezug auf die Wasserfreiheit des Systems vermieden werden.

Die geschützten Vorstufen **20** bis **32** konnten mit Natriummethanolat in Methanol entschützt werden. Es erfolgte in alle Fällen eine letzte Aufreinigung mittels Flash-Chromatographie, bevor die Reinheit mittels HPLC ermittelt wurde.

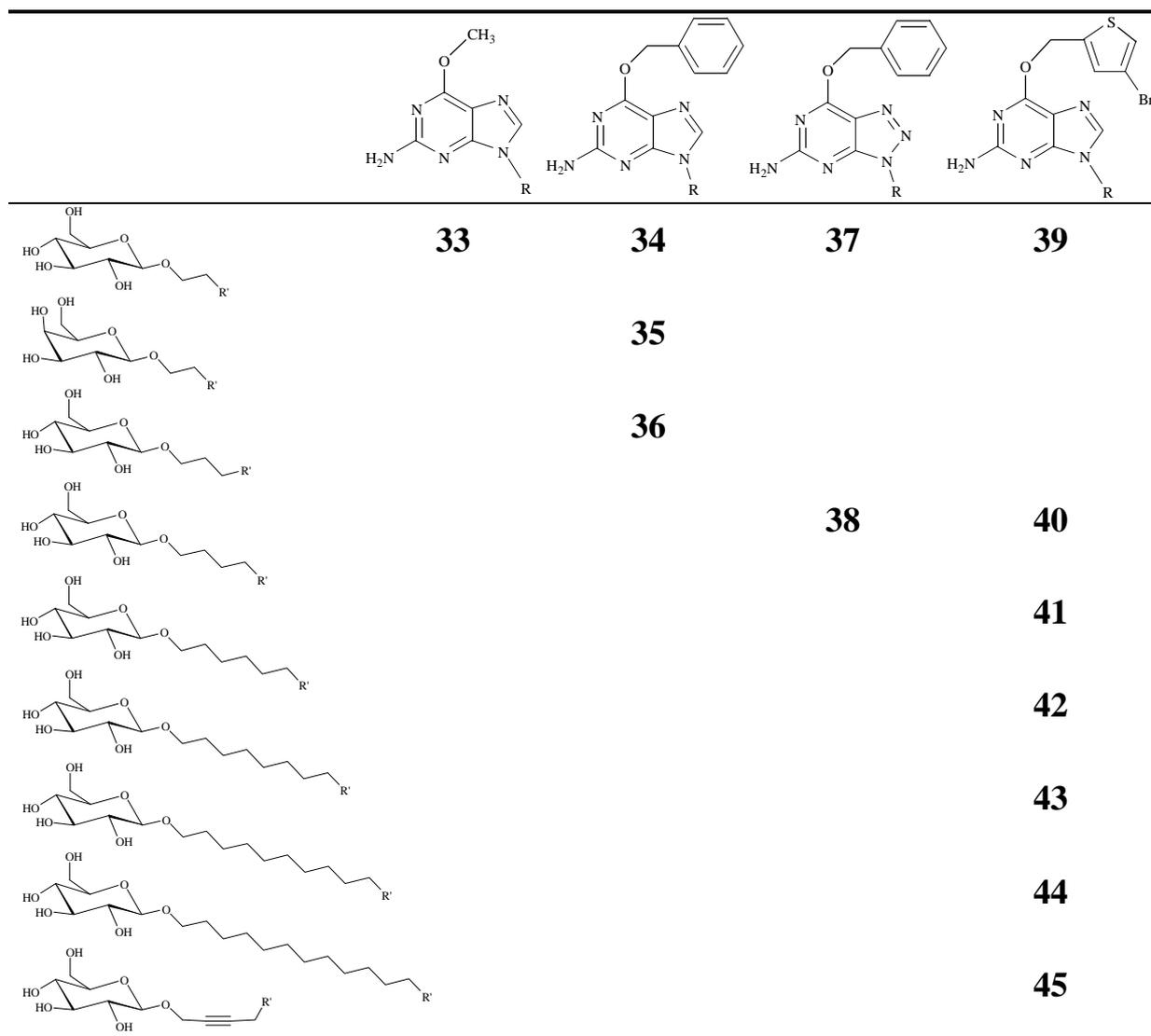


Abbildung 3.1-17 Ungeschützte Glycoside der O⁶-substituierten Guanin-Derivate. Die Purin-Derivate der Kopfzeile sind an Position **R** mit den Bromoalkylglycosiden der ersten Spalte an der mit **R'** gekennzeichneten Stelle substituiert. Die Anzahl der C-Atome der Verbindung zwischen N-9 des Purins und der O-glycosidischen Bindung entspricht der Anzahl der C-Atome des Spacers der Bromoalkylglycoside. Die Ziffern entsprechen den Konjugaten, die sich aus der Verknüpfung des Moleküls der Zeile mit dem der Spalte ergeben.

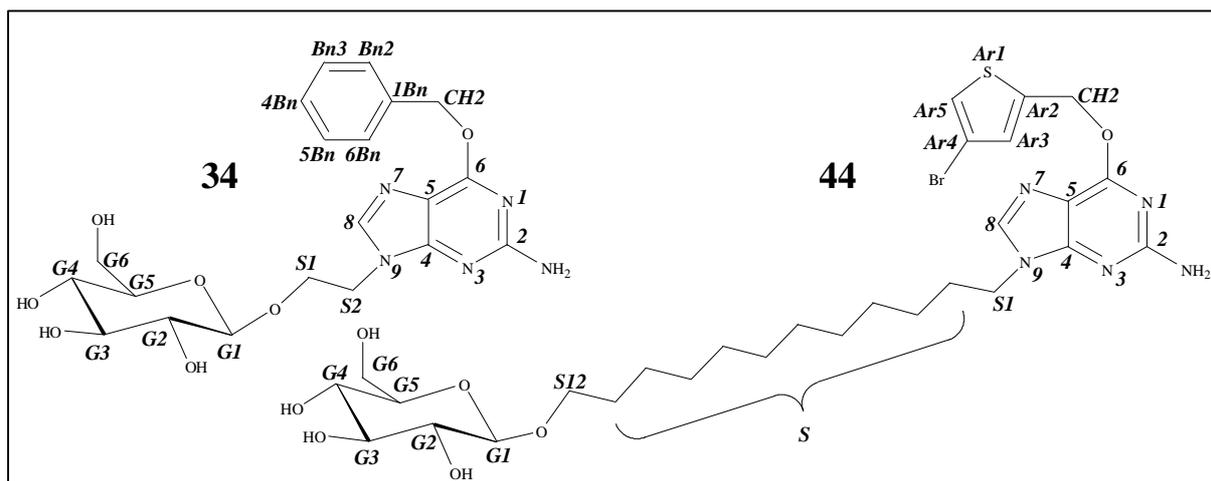


Abbildung 3.1-18 Nomenklatur der einzelnen Atome innerhalb der MGMT-Inhibitorglucoside am Beispiel der Substanzen **34** und **44**. Alle anderen sind analog benannt. Der Spacer ist an der C-N-Bindung mit *S1* und an der O-glycosidischen Bindung mit *SX* benannt, wobei *X* der Anzahl der C-Atome entspricht. Dazwischen werden alle CH_2 -Gruppen mit *S* zusammengefaßt.

Bei vergleichender Betrachtung der geschützten und der entschützten Zwischenstufen mittels Dünnschichtchromatographie, zeigte sich, daß die Reinigung nach Schritt 2 (Abbildung 3.1-13) ab einer gewissen Größe (Spacer > C6, Benzoyl-Schutzgruppen) nicht zwangsläufig notwendig ist. Exemplarisch wurde im Falle des Dodecyl-Glucosids gezeigt, daß das Gemisch nach Schritt 2 direkt in Schritt 3 (Abbildung 3.1-13) umgesetzt werden, und die Trennung der N-7 / N-9-substituierten Produkte auch im letzten Schritt erfolgen kann.

Auf den folgenden Seiten werden tabellarisch die analytischen Daten und die Ausbeuten der wichtigsten MGMT-Inhibitor-Glucoside aufgelistet. Zur Prüfung der Reinheit wurden für alle Verbindungen jeweils zwei unterschiedliche HPLC-Systeme etabliert.

Seite 62 :Tabelle 3.1-5 Analytische Daten der MGMT-Inhibitor-Glycoside. ^a HR-Fabs berechnet für ⁷⁹Br and ⁸¹Br. ^b Kein Fab ermittelt. ^c UV Spektren in Methanol; Signifikante Maxima > 240nm werden angegeben. ^d ¹H NMR Spektren in $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ bei 500MHz; *j* Werte (Hz) in Klammern.

Seite 63: Tabelle 3.1-6 Analytische Daten der Glucoside nach der Entschützung (Schritt 3, Abbildung 3.1-13). ^a ¹³C NMR Spektren in $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ bei 125 MHz. ^c Schritt 3 wurde ohne säulenchromatographische Aufreinigung nach Schritt 2 durchgeführt. ^d Reinheit >98%. ^e Sp: 208-210°C. ^f Sp: 170-172°C. ^g Sp: 95-97 ¹Methanol/Wasser 40/60 (vol/vol) in 15 min zu 55/45 (vol/vol). ^h Acetonitril/Wasser 10/90 (vol/vol) in 20 min zu 100% Acetonitril. ⁱ Methanol/Wasser 30/70 (vol/vol) in 15 min zu 55/45 (vol/vol). ^{iv} Methanol/Wasser 40/60 (vol/vol) in 15 min zu 60/40 (vol/vol). ^v Chloroform/Methanol 98/2 (vol/vol) in 15 min to 80/20 (vol/vol) for 5 min 80/20 (vol/vol). ^{vi} Methanol/Wasser 50/50 (vol/vol) in 15 min zu 65/35 (vol/vol). ^{vii} Methanol/Wasser 55/45 (vol/vol) in 15 min zu 65/35 (vol/vol). ^{viii} Methanol/Wasser 60/40 (vol/vol) in 15 min zu 72/28 (vol/vol). ^{ix} Chloroform/Methanol 95/5 (vol/vol) isokratisch. ^x Methanol/Wasser 60/40 (vol/vol) in 15 min zu 80/20 (vol/vol). ^{xi} Acetonitril/Wasser 30/70 (vol/vol) in 20 min to 100% Acetonitril. ^{xii} Methanol/Wasser 45/55 (vol/vol) in 15 min zu 65/35 (vol/vol).

	Summenformel	M_r	HR-Fab	UV-max [nm] ^c	¹ H- NMR [ppm von TMS], J [Hz] ^d														
					CH ₂	(J _{Ar3/Ar5})	H8	-NH ₂	G1 (J _{G1/G2})	G2 (J _{G2/G3})	G3 (J _{G3/G4})	G4 (J _{G4/G5})	G5 (J _{G5/G6a})	G6a (J _{G6a/G6b})	G6b (J _{G5/G6b})	S1 (J _{S1a/S1b})	S _n	S	
34	C ₂₀ H ₂₅ N ₅ O ₇	448,1928 [M+H ⁺]	448,1880 [M+H ⁺]	249; 283	5,50	7,49-7,36 [Bn2-Bn6]	7,91	6,37	4,22 (7,7 d)	2,96 (8,8 dd)	3,15 (9,0 dd)	3,04 (9,2 dd)	3,11 (2,2 dd)	3,43 (11,5dd)	3,67 (6,2 dd)	4,20	S2 3,99; 3,85 (5,4ddd)		
37	C ₁₉ H ₂₄ N ₆ O ₇	449,1785 [M+H ⁺]	449,1790 [M+H ⁺]	249; 284	5,57	7,54-7,40 [Bn2-Bn6]	--	7,10	4,19 (7,7 d)	2,91 (8,7 dd)	3,12 (8,9 dd)	3,01 (9,2 dd)	3,09 (2,2 dd)	3,41 (11,8dd)	3,64 (5,9 dd)	4,54 4,21	S2 4,14; 4,00 (6,2ddd)		
4BTG	C ₁₀ H ₈ N ₅ OBrS	326,2 M _R ^b	327,8 [M+H ⁺]	239; 284	5,67	7,19 [Ar3] (1,5d)	7,37 [Ar5]	7,83	6,48										
39	C ₁₈ H ₂₂ N ₅ OBrS	532,0552 532,0559 [M+H ⁺] ^a	532,0527 534,0540 [M+H ⁺]	245; 285	5,63	7,32 [Ar3] (1,5d)	7,65 [Ar5]	7,92	6,43	4,21 (7,7 d)	2,95 (8,4 dd)	3,14 (8,8 dd)	3,03 (9,0 dd)	3,10 (1,9 dd)	3,42 (11,6dd)	3,66 (5,9 dd)	4,20	S2 3,99; 3,84 (5,4ddd)	1,43- 1,81
40	C ₂₀ H ₂₆ N ₅ O ₇ BrS	560,0820 562,0846 [M+H ⁺] ^a	560,0817 562,0820 [M+H ⁺]	245; 284	5,63	7,31 [Ar3] (1,5d)	7,66 [Ar5]	7,87	6,43	4,09 (7,7 d)	2,93 (8,3 dd)	3,12 (8,9 dd)	3,04 (9,3 dd)	3,05	3,42 (11,8dd)	3,65 (6,0 dd)	4,03	S4 3,77; 3,45 (6,5ddd)	1,48- 1,82
41	C ₂₂ H ₃₀ N ₅ O ₇ BrS	588,1187 590,1194 [M+H ⁺] ^a	588,1157 590,1151 [M+H ⁺]	244; 285	5,62	7,31 [Ar3] (1,5d)	7,66 [Ar5]	7,86	6,42	4,08 (8,0 d)	2,92 (8,8 dd)	3,12 (8,8 dd)	3,02 (9,5 dd)	3,07 (1,8 dd)	3,39 (11,8dd)	3,65 (5,8 dd)	3,99	S6 3,72; 3,41 (6,6ddd)	1,23- 1,74
42	C ₂₄ H ₃₄ N ₅ O ₇ BrS	616,1455 618,1470 [M+H ⁺] ^a	616,1448 618,1445 [M+H ⁺]	245; 285	5,62	7,31 [Ar3] (1,5d)	7,65 [Ar5]	7,86	6,42	4,09 (7,7 d)	2,93 (8,5 dd)	3,13 (8,5 dd)	3,04 (9,0 dd)	3,08 (1,8 dd)	3,39 (11,8dd)	3,66 (5,9 dd)	3,98	S8 3,73; 3,43 (6,6ddd)	1,24- 1,74
43	C ₂₆ H ₃₈ N ₅ O ₇ BrS	644,1779 646,1839 [M+H ⁺] ^a	644,1766 646,1786 [M+H ⁺]	246; 285	5,62	7,31 [Ar3] (1,5d)	7,65 [Ar5]	7,85	6,41	4,08 (8,1 d)	2,92 (8,5 dd)	3,12 (8,5 dd)	3,05 (9,6 dd)	3,07 (1,8 dd)	3,39 (11,6dd)	3,65 (5,7 dd)	3,98	S10 3,72 ; 3,43 (6,8ddd)	1,21- 1,74
44	C ₂₈ H ₄₂ N ₅ O ₇ BrS	672,2017 674,2028 [M+H ⁺] ^a	672,2042 674,2037 [M+H ⁺]	244; 285	5,62	7,31 [Ar3] (1,5d)	7,65 [Ar5]	7,85	6,41	4,08 (7,7 d)	2,93 (8,5 dd)	3,12 (8,7 dd)	3,03 (9,2 dd)	3,07 (1,8 dd)	3,39 (11,8dd)	3,65 (5,9 dd)	3,98	S12 3,73 ; 3,45 (6,9ddd)	1,23- 1,71
45	C ₂₀ H ₂₂ N ₅ O ₇ BrS	556,0551 558,0598 [M+H ⁺] ^a	556,0526 558,0540 [M+H ⁺]	245; 285	5,63	7,31 [Ar3]	7,66 [Ar5]	7,92	6,55	4,21 (7,7 d)	2,94	3,14	3,06	3,06	3,41	3,65	4,43	4,29	

Tabelle 3.1-5

	Ausbeute [%] ^A Schritt 2 ^B Schritt 3	HPLC-System R _t [min]	¹³ C-NMR [ppm von TMS]																
			C2	C6	C5	C4	C8	-CH ₂	Ar2 ¹ Bn1 ²	Ar3 ¹ Bn2-Bn6 ²	Ar4	Ar5	S-1	S	G1	G2-5	G6		
34	^A 14,6 ^B 88	^I 10,98 ^d ^{III} 14,65 ^d	^{II} 8,43 ^d	159,97	159,52	113,48	154,29	140,54	66,75	136,68 ²	127,89- 128,30 ²			42,77	S-2 66,85		102,96	70,01 73,33 76,56 76,89 69,91 73,14 76,52 76,83	61,04
37	^A 19,8 ^B 99	^{III} 15,66	^{II} 9,07	162,03	160,64	120,33	153,26		67,72	135,72 ²	128,21- 128,57 ²			45,68	S-2 65,96		102,96		60,98
4BTG	93			159,32	159,01	112,41	155,37	137,97	60,48	140,63 ¹	130,58	107,90	124,96 ¹						
39	^A 35 ^B 96	^{IV} 13,17 ^V 18,29	^{II} 9,69	159,30	159,18	113,32	154,50	140,56	60,77	140,06 ¹	130,64	107,92	125,00 ¹	42,80	S-2 66,55		102,94	69,74 73,06 76,29 76,61 70,04 73,34 76,65 76,74	60,35
40	^A 24,8 ^B 95	^{VI} 10,63	^{II} 10,06	159,30	159,22	113,52	154,47	140,79	61,03	140,47 ¹	130,64	107,91	125,01 ¹	42,39	S-4 67,84	26,04; 26,14	102,74	70,06 73,36 76,71	60,56
41	^A 29,8 ^B 99	^{VI} 13,75 ^d	^{II} 10,68	159,30	159,20	113,52	154,50	140,55	61,03	140,09 ¹	130,64	107,90	125,01 ¹	42,55	S-6 68,24	25,71; 28,96 29,01	102,74	70,06 73,36 76,71	60,55
42	^A 35 ^B 96	^{VII} 17,47	^{II} 11,59	159,30	159,19	113,54	154,52	140,56	61,06	140,06 ¹	130,64	107,92	125,00 ¹	42,61	S-8 68,43	25,29 S6 ; 25,85 S3 28,34 S5 ; 28,64 S4 29,03 S2 ; 29,17 S7	102,76	70,08 G4 73,37 G2 76,70 G5 76,73 G3	60,56
43	^A 35,8 ^B 99	^{VIII} 13,23 ^{IX} 13,08	^{II} 12,94	159,30	159,19	113,54	154,54	140,58	61,07	140,07 ¹	130,65	107,92	125,01 ¹	42,61	S-10 68,45	25,90; 28,63 28,74; 28,78 29,03; 29,17	102,75	70,09 73,38 76,72 76,74	60,56
44	^{AB} 22 ^c	^X 18,54	^{XI} 14,27	159,29	159,17	113,53	154,52	140,56	61,05	140,56 ¹	130,62	107,98	124,98 ¹	42,59	S-12 68,46	25,40; 25,88 28,63; 28,76 28,78; 28,83 28,88; 29,01 29,17; 31,94	102,75	70,07 73,36 76,71 76,73	60,53
45	^A 37,3 ^B 63	^{XII} 11,13	^{II} 9,84	159,50	159,30	113,31	154,05	140,46	61,04	139,21 ¹	130,70	107,92	125,05 ¹	32,20	S-4 55,07	80,60 80,31	101,10	76,90 76,58 73,17 69,97	60,68

Tabelle 3.1-6

3.1.2. PARP-Inhibitoren

Auch im Falle der PARP-Inhibitoren waren die primären Ziele der Glucokonjugation, eine Verbesserung der Wasserlöslichkeit, eine aktive Aufnahme zur Erhöhung der Selektivität und eine günstigere Pharmakokinetik zu erreichen (Kapitel 1.6). Es sollte ein Hydroxyphenyl-Benzimidazol-Derivat glucosidiert werden, da sich diese Strukturen durch eine hohe Aktivität als PARP-Inhibitoren auszeichnen, jedoch eine geringe Wasserlöslichkeit besitzen [White 1996]. Die bereits zur Glucosidierung der MGMT-Inhibitoren verwendeten Bromoalkylglycoside können ebenfalls in nukleophilen Substitutionsreaktionen mit der phenolischen Hydroxyfunktion des 2-(4'-Hydroxyphenyl)-1-*H*-benzimidazol-4-carboxamid umgesetzt werden (Abbildung 3.1-17). Daß die Bromoalkylglycoside ebenfalls zum Einsatz in Ethersynthesen geeignet sind und auch hier den Vorteil bieten, daß keine aufwendige Trennung der α - / β -Glucoside auf dieser Stufe mehr erfolgen muß, zeigt das breite Anwendungsspektrum dieser Synthesestrategie (siehe auch Kapitel 3.1). Als Base zur

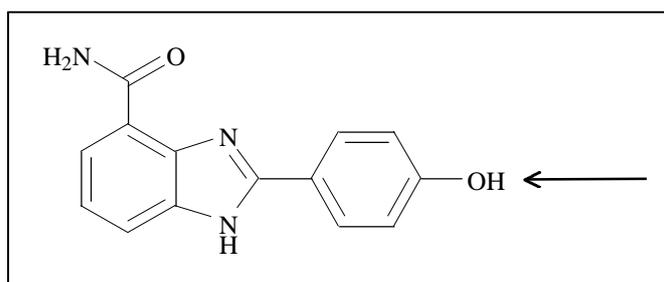


Abbildung 3.1-17 Struktur des 2-(4'-hydroxyphenyl)-1-*H*-benzimidazol-4-carboxamid. Die Substitution erfolgt an der mit dem Pfeil gekennzeichneten phenolischen OH-Gruppe.

Abstraktion des phenolischen H^+ verwendete ich analog einer *Williamson*-Ethersynthese K_2CO_3 [Becker et al. 1986]. Die Reaktivität des Nukleophils, des in diesem Falle entstehenden Phenolat-Anions, wird maßgeblich durch die Dissoziation des bei der Salzbildung entstehenden Ionenpaares beeinflusst. Kalium ist

aufgrund seiner hohen Polarisierbarkeit gut geeignet, da das entstehende Kaliumsalz stärker als beispielsweise das Natriumsalz in dissoziierter Form vorliegt. Trotz der vergleichsweise niedrigen Reaktivität sollte THF als Lösungsmittel verwendet werden, da die Edukte gut darin löslich sind. Der Zusatz ausreichender Mengen Molekularsieb sollte entstehendes Reaktionswasser abfangen, um dadurch die Abspaltung der basisch verseifbaren Schutzgruppen zu verhindern.

Die Synthese wurde mit zwei verschiedenen Bromoalkylglucosiden durchgeführt, um die Vergleichbarkeit zweier Glucoside (2-[(1'-*H*-benzimidazol-4'-carboxamidyl)-4'-phenyl]-oxoethyl- β -D-glucosid (**56**) 4-[(1'-*H*-benzimidazol-4'-carboxamidyl)-4'-phenyl]-oxobutyl- β -D-glucosid (**57**); Abbildung 3.1-19) in den biologischen Systemen zu gewährleisten. Beide

Bromoalkylglucoside wurden nach dem gleichen Schema mit dem Hydroxyphenyl-Benzimidazol-Grundgerüst umgesetzt (Abbildung 3.1-18).

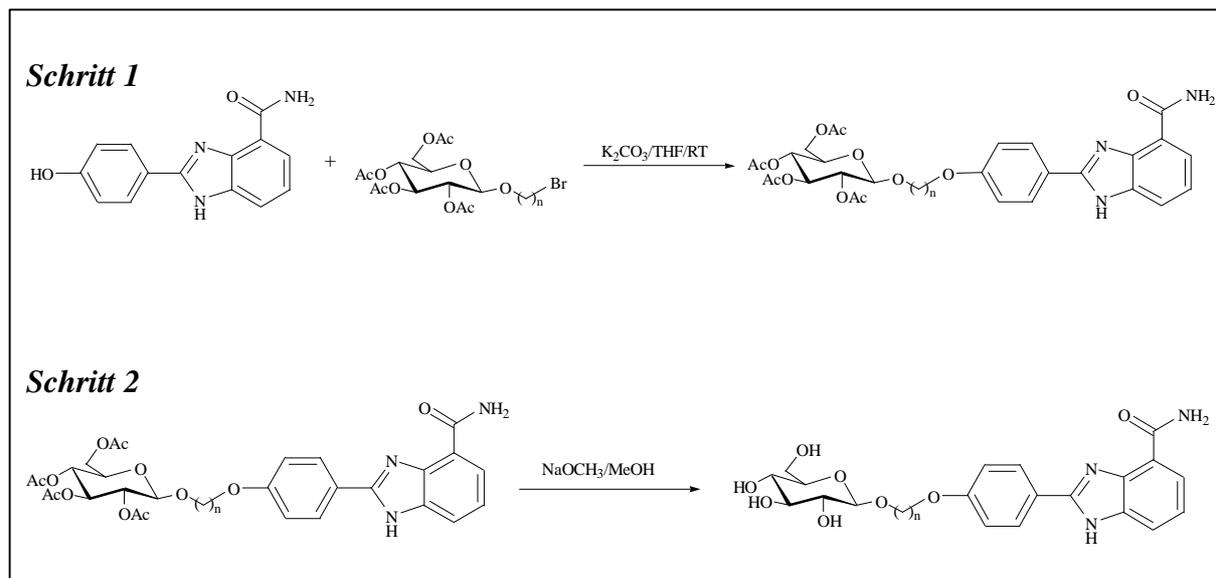


Abbildung 3.1-18 Schematische Darstellung der Syntheseschritte zur nukleophilen Substitution von 2-(4'-hydroxyphenyl)-1-*H*-benzimidazol-4-carboxamid an das Bromoalkylglucosid (Schritt 1) und Entschützung (Schritt 2).

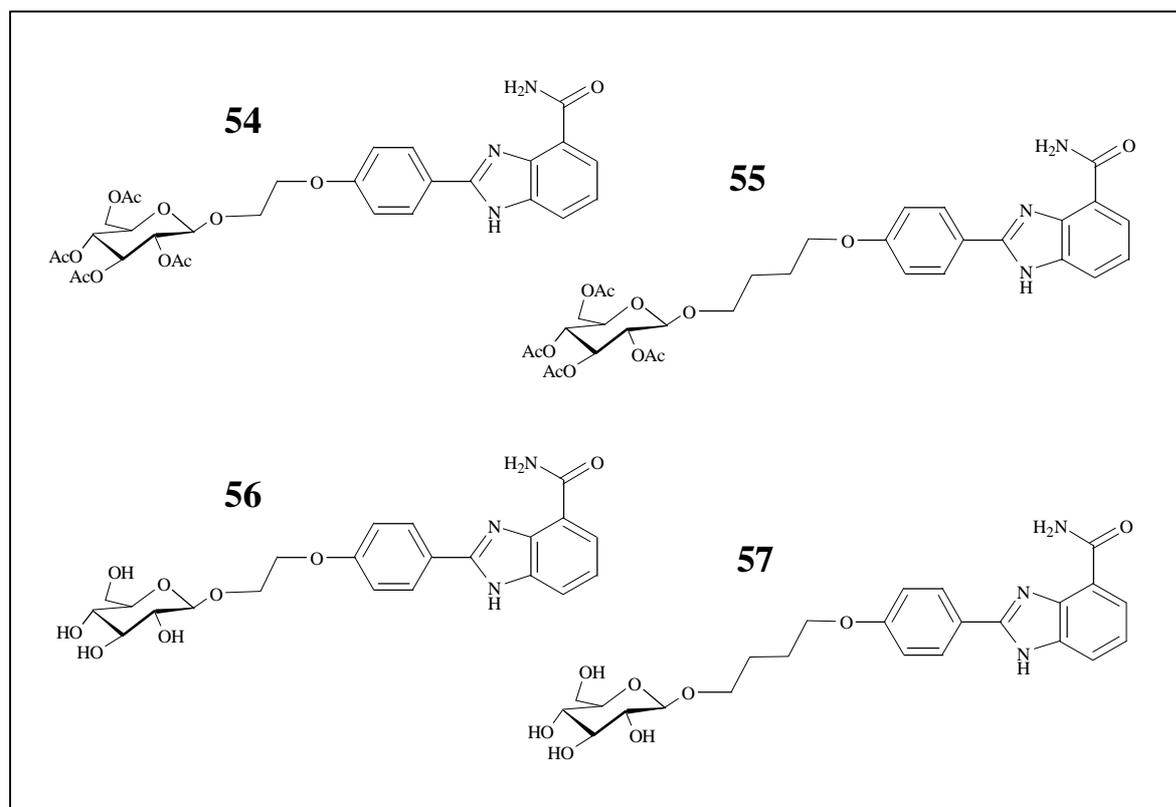


Abbildung 3.1-19 Strukturformeln der geschützten PARP-Inhibitor Glycoside (2-[(1'-*H*-benzimidazol-4'-carboxamidyl)-4'-phenyl]-oxoethyl-tetra-O-acetyl- β -D-glucosid (**54**) 4-[(1'-*H*-benzimidazol-4'-carboxamidyl)-4'-phenyl]-oxobutyl-tetra-O-acetyl- β -D-glucosid (**55**) und der ungeschützten PARP-Inhibitor Glycoside 2-[(1'-*H*-benzimidazol-4'-carboxamidyl)-4'-phenyl]-oxoethyl- β -D-glucosid (**56**) 4-[(1'-*H*-benzimidazol-4'-carboxamidyl)-4'-phenyl]-oxobutyl- β -D-glucosid (**57**).

Das geschützte Zwischenprodukt (**54**, **55**; Abbildung 3.1-19) wurde nicht aufgereinigt und charakterisiert, da Vorversuche zeigten, daß die Reinigung auf der Stufe der entschützten Endprodukte (**56**, **57**; Abbildung 3.1-19) sinnvoller ist. Die R_f -Werte unterscheiden sich nach Schritt 2 (Abbildung 3.1-18) maßgeblicher von dem chromatographischen Verhalten des Benzimidazol-Eduktes als nach Schritt 1, so daß eine säulenchromatographische Trennung nach der Entschützung deutlich einfacher ist.

Die Ausbeuten liegen bei 35 % (**56**) und 30 % (**57**), wobei sich die Zahlen auf die Gesamtausbeute nach zwei Schritten beziehen.

Beide Glucoside zeigen eine verbesserte Wasserlöslichkeit gegenüber dem 2-(4'-hydroxyphenyl)-1-*H*-benzimidazol-4-carboxamid. Es konnten Stammlösungen für die biologischen Experimente bis 10 mM in Wasser (**56**), bzw. Wasser und 2 % DMSO hergestellt werden.

3.1.3. SWITCH-Inhibitoren

Das größte Problem bei der Weiterentwicklung der SWITCH-Inhibitoren stellt bislang die mangelnde Wasserlöslichkeit der bekannten Strukturen mit Isochinolin-Grundgerüst dar (Abbildung 3.1-20; siehe auch Kapitel 1.5).

Wie für die MGMT-Inhibitoren (Kapitel 3.1.1) und die PARP-Inhibitoren (Kapitel 3.1.2) sollte auch für die SWITCH-Inhibitoren ein System entwickelt werden, mit dem eine Reihe von Glycosiden synthetisiert und auf ihre modifizierten Eigenschaften getestet werden können. Die Verwendung der Bromoalkylglycoside bietet auch in diesem Fall die Möglichkeit, mittels nukleophiler Substitution in zwei Reaktionsschritten zum gewünschten

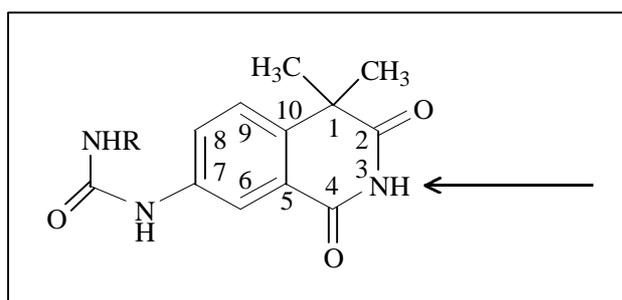


Abbildung 3.1-20 Strukturformel des Isochinolin-Grundgerüsts der SWITCH-Inhibitoren. Die Substitution erfolgt an der mit dem Pfeil gekennzeichneten phenolischen OH-Gruppe.

Produkt zu gelangen. Auch hier lassen sich die Edukte beliebig variieren, ohne daß die Reaktionsbedingungen jeweils neu etabliert werden müssen. Zur nukleophilen Substitution bietet sich der NH-acide Stickstoff in Position 3 der Isochinolin-1,3-dion-Struktur an (Abbildung 3.1-20). Durch Abstraktion des Protons wird ein starkes Nucleophil

dargestellt, das mit einem polarisierten Kohlenstoffatom in einer aliphatischen Struktur unter geeigneten Bedingungen reagieren kann. Es läßt sich eine Analogie zur *Gabriel*-Synthese erkennen, bei der Phthalimid mit Alkalihydroxiden aktiviert und anschließend mit

Alkylhalogeniden zur Reaktion gebracht wird [Gabriel 1886, Becker et al. 1986]. Die Verwendung von Alkalihydroxiden ist hier jedoch nicht möglich, da die alkalisch verseifbaren Acetyl- und Benzoyl-Schutzgruppen den Bedingungen nicht standhalten würden. Der alternative Einsatz von Alkalihydriden ermöglicht wasserfreies Arbeiten, doch zeigt die Erfahrung, daß schon Spuren von Wasser eine teilweise Entschützung zur Folge haben können, die die Aufreinigung der Produkte mittels Säulenchromatographie mitunter unmöglich machen.

Das Vorliegen freier Ionen erhöht die Reaktivität des Nukleophils, weshalb Natriumhydrid verwendet wurde. Die Dissoziation des bei der Salzbildung entstehenden Ionenpaares wird aufgrund der guten Polarisierbarkeit des Natriums erleichtert. Ein polares aprotisches Lösungsmittel wie DMF sollte gut geeignet sein, da eine hohe Reaktivität gegeben ist und Vorversuche zeigten, daß alle Edukte darin gut gelöst werden können.

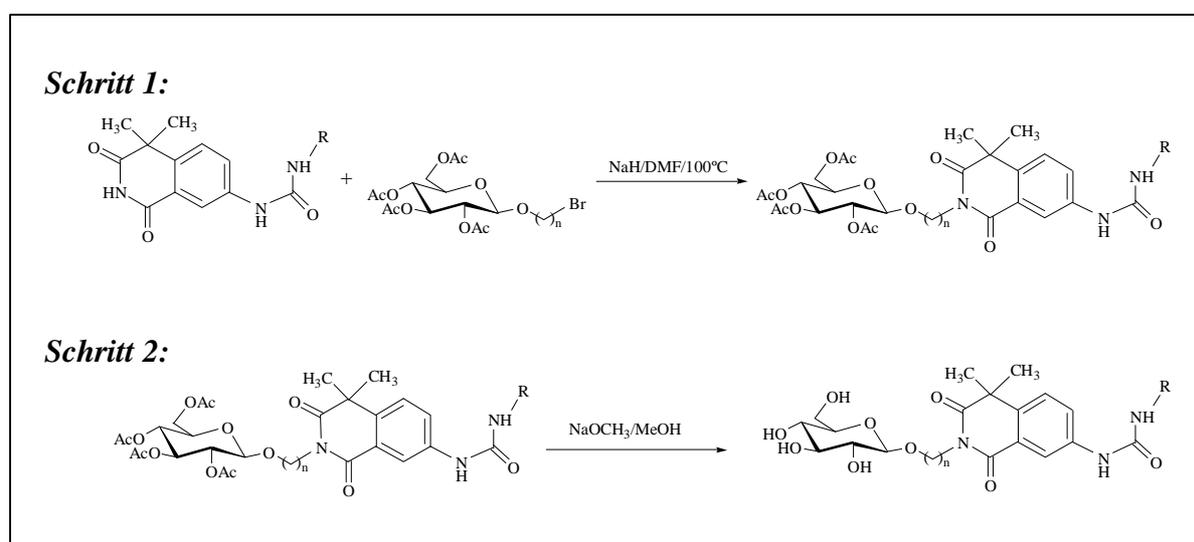


Abbildung 3.1-21 Syntheschema zur Darstellung glycosidierter SWITCH-Inhibitoren. Nucleophile Substitution des Isochinolindion-Derivates an ein geschütztes Bromoalkylglycosid (Schritt 1) und Entschützung (Schritt 2).

Es wurden vier Glucose-Konjugate von SWITCH-Inhibitoren synthetisiert. Diese sollten Aufschluß über die Wirkung und Toxizität in den beschriebenen Testsystemen liefern und zeigen, inwieweit die Wasserlöslichkeit im Vergleich zum jeweiligen Aglykon verbessert wird. Die Auswahl der Grundstrukturen erfolgte anhand der bis dato erzielten Ergebnisse im *gp120-CD4-Bindungsversuch* (Kapitel 3.6). Die vielversprechendsten dabei waren im einzelnen das N-Methyl-, das N-Phenyl- und das N-Naphthyl-Derivat des N'-(4,4-dimethyl-1,2,3,4-tetrahydro-1,3-dioxo-7-isochinolinyl)-harnstoff.

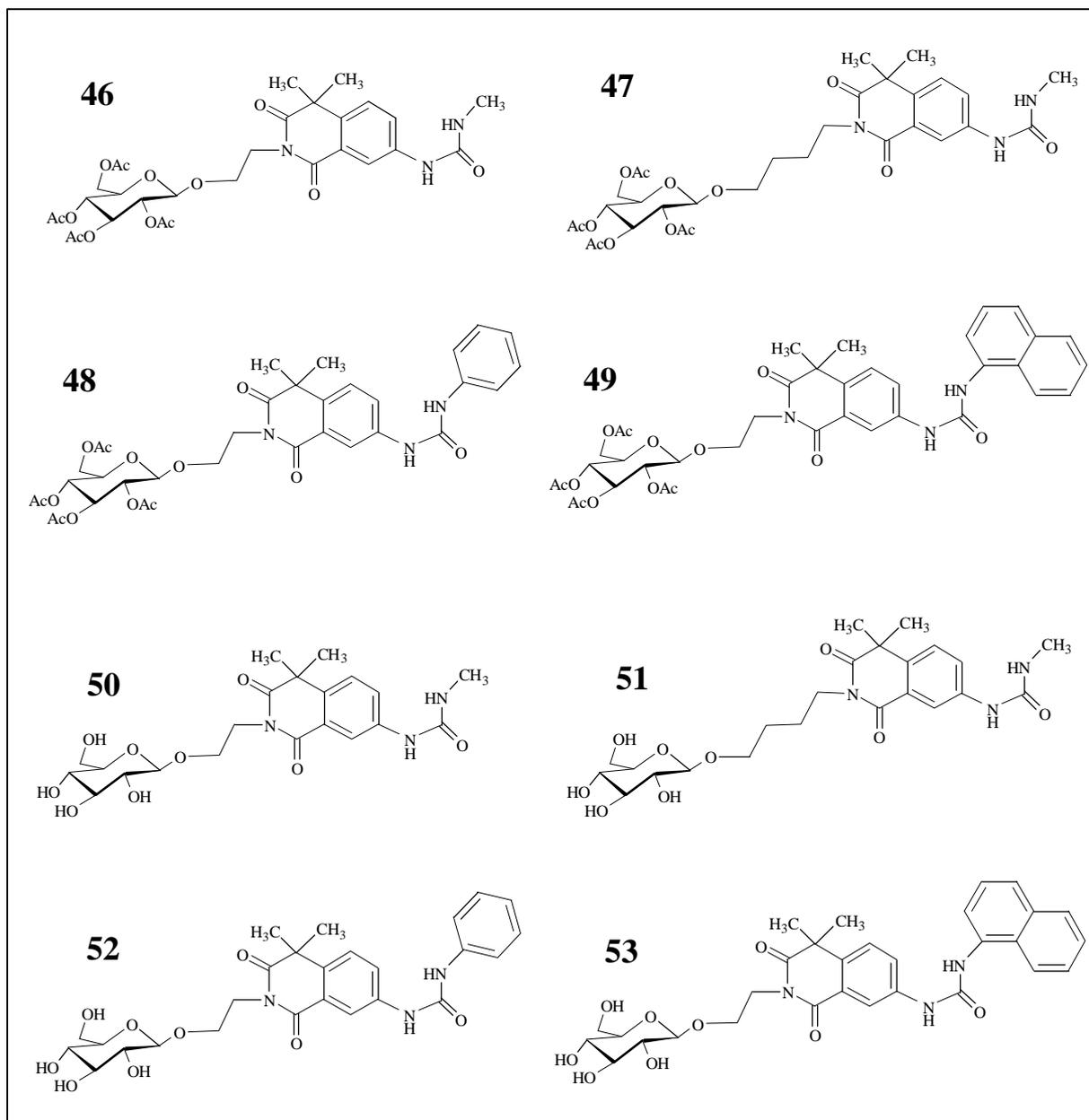


Abbildung 3.1-22 Strukturformeln der geschützten SWITCH-Inhibitor Glycoside 2-[2'-(N-Methyl-N'-(4,4-dimethyl-1,2,3,4-tetrahydro-1,3-dioxo-7-isochinolyl)-harnstoff)]-ethyl-tetra-O-acetyl-1-β-D-glucosid (**46**), 4-[2'-(N-Methyl-N'-(4,4-dimethyl-1,2,3,4-tetrahydro-1,3-dioxo-7-isochinolyl)-harnstoff)]-butyl-tetra-O-acetyl-1-β-D-glucosid (**47**), 2-[2'-(N-Phenyl-N'-(4,4-dimethyl-1,2,3,4-tetrahydro-1,3-dioxo-7-isochinolyl)-harnstoff)]-ethyl-tetra-O-acetyl-1-β-D-glucosid (**48**) und 2-[2'-(N-α-Naphthyl-N'-(4,4-dimethyl-1,2,3,4-tetrahydro-1,3-dioxo-7-isochinolyl)-harnstoff)]-ethyl-tetra-O-acetyl-1-β-D-glucosid (**49**) und der ungeschützten SWITCH-Inhibitor Glycoside 2-[2'-(N-Methyl-N'-(4,4-dimethyl-1,2,3,4-tetrahydro-1,3-dioxo-7-isochinolyl)-harnstoff)]-ethyl-1-β-D-glucosid (**50**), 4-[2'-(N-Methyl-N'-(4,4-dimethyl-1,2,3,4-tetrahydro-1,3-dioxo-7-isochinolyl)-harnstoff)]-butyl-1-β-D-glucosid (**51**), 2-[2'-(N-Phenyl-N'-(4,4-dimethyl-1,2,3,4-tetrahydro-1,3-dioxo-7-isochinolyl)-harnstoff)]-ethyl-1-β-D-glucosid (**52**) und 2-[2'-(N-α-Naphthyl-N'-(4,4-dimethyl-1,2,3,4-tetrahydro-1,3-dioxo-7-isochinolyl)-harnstoff)]-ethyl-1-β-D-glucosid (**53**).

	Ausbeute [%]		Ausbeute [%]
46	82	50	98
47	n.d.	51	60 ^a
48	71	52	94
49	73	53	99

Tabelle 3.1-7 Ausbeuten der Darstellung glucosidierter SWITCH-Inhibitoren.^a Schritt 2 wurde direkt nach Schritt 1 durchgeführt ohne Aufreinigung der geschützten Zwischenstufe.

Anfängliche Verwendung des Natriumhydrid im deutlichen Überschuß führte zu einem sehr hohen Verbrauch des entsprechenden Bromoalkylglucosids, das zu nicht definierten Abbauprodukten zersetzt wurde. Es wurde mit Silikonöl stabilisierte Handelsware verwendet, wobei der Natriumhydrid-Gehalt, bezogen auf das Gesamtgewicht, mit 55 - 65 % angegeben ist (Sigma-Aldrich). Durch Einsatz von lediglich 1 Äquivalent der Base, berechnet auf einem Gehalt von 65 %, wurde sichergestellt, daß kein Überschuß im Reaktionsgemisch vor dem Zusatz des Bromoalkylglucosids vorhanden ist. Die Synthesen ließen sich im folgenden problemlos reproduzieren.

50 - 52 sind im Konzentrationsbereich, der als Ausgangsverdünnungen für die Zelltests verwendet wird [10mM], gut wasserlöslich. Das Problem der Wasserlöslichkeit des Naphthyl-Derivates **53** konnte durch Konjugation an Glucose nicht hinreichend beseitigt werden. Ein großer Teil von **53** scheint solvatisiert zu werden, doch bleibt eine Trübung bestehen, die wahrscheinlich auf einen fein verteilten Bodensatz zurückzuführen ist. In Methanol lassen sich bis zu 10 mM Lösungen von **53** zubereiten.

3.2. Biologische Aktivität der MGMT-Inhibitoren

Die Evaluation der biologischen Aktivität von MGMT-Inhibitoren *in vitro* kann grundsätzlich nach zwei unterschiedlichen Methoden erfolgen:

Zum einen kann die konzentrationsabhängige Wirkung auf die MGMT-Aktivität gezeigt werden, indem nach Inkubation mit dem Inhibitor die verbleibende MGMT-Aktivität im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle bestimmt wird. Dieser Test kann mit gereinigtem rekombinantem Protein, mit intakten Zellen (Kapitel 3.2.1) oder mit Protein-Gesamtextrakten dieser Zellen (Kapitel 3.2.2) durchgeführt werden. Die direkte Messung der MGMT-Aktivität besitzt den Vorteil, daß dadurch in erster Linie die Interaktion Pseudosubstrat-Protein gemessen wird. Insbesondere wenn eine Struktur-Wirkungsbeziehung ermittelt werden soll, ist der Ausschluß zellulärer Nebeneffekte von Bedeutung.

Die andere Variante zur Bestimmung der Potenz von MGMT-Inhibitoren beinhaltet die simultane Inkubation mit alkylierenden Agenzien (Kapitel 3.2.3). MGMT-Inhibitoren sollen klinisch eingesetzt werden, um die Wirkung von Alkylantien zu verstärken oder sogar die Überwindung von Resistenzen zu ermöglichen, da durch MGMT-Hemmung die Wirkung bestimmter Alkylantien verstärkt werden kann (siehe Kapitel 1.3). Die notwendige Konzentration eines alkylierenden Agens, um beispielsweise 50 % des Zellwachstums zu hemmen (IC_{50}), kann nach MGMT-Hemmung deutlich unter der IC_{50} des alkylierenden Agens ohne MGMT-Hemmung liegen. Dies ist darauf zurückzuführen, daß die MGMT einen Teil des alkylierenden Agens "verbraucht", indem durch MGMT-Aktivität DNA-Addukte repariert werden, wodurch die zytotoxische Wirkung erst bei deutlich höheren Dosen auftritt. Es kann ein *DMF* (*dose modifying factor*) ermittelt werden, der bei einer bestimmten Konzentration die Verstärkung der Toxizität durch Zusatz eines MGMT-Inhibitors im Vergleich zur nur mit Alkylans behandelten Kontrolle widerspiegelt. Dieser ergibt sich aus dem Quotienten der IC_{50} eines Alkylans ohne und der IC_{50} eines Alkylans mit MGMT-Inhibitor. Zahlenwerte um 1 zeigen, daß keine Modulation der zytotoxischen Wirkung durch MGMT-Hemmung erreicht werden kann, und Werte über 1 sprechen dafür, daß die Zellen durch Hemmung der MGMT sensibilisiert werden.

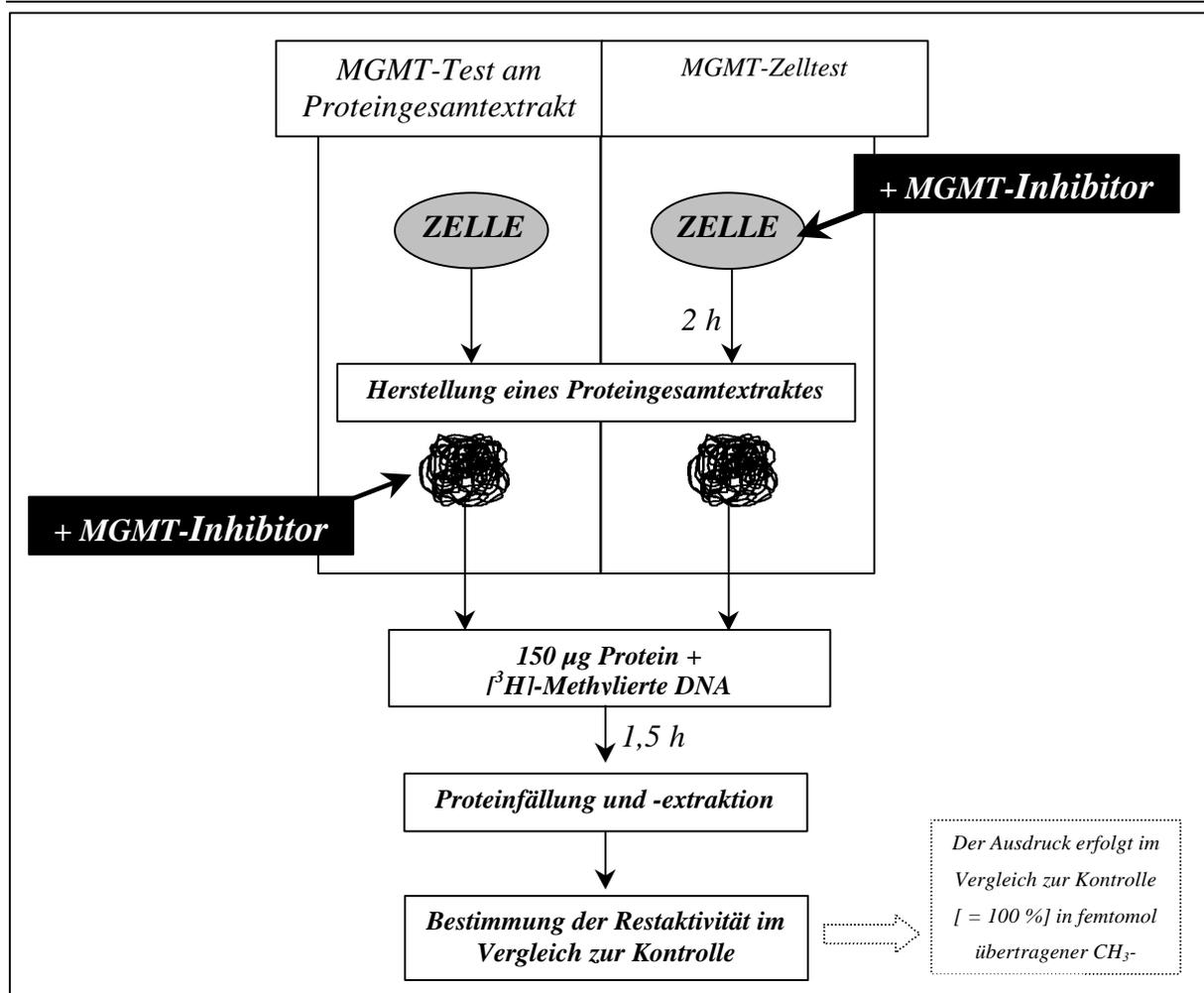


Abbildung 3.2-1 Schematische Darstellung des MGMT-Tests am Gesamtproteinextrakt oder in intakten Zellen zur Bestimmung der Aktivität von MGMT-Inhibitoren. Bei den Zellen handelt es sich in dieser Arbeit um HeLaS3-Zellen, es können jedoch prinzipiell alle Zelllinien verwendet werden, die ausreichende Mengen MGMT exprimieren.

Abbildung 3.2-1 zeigt, daß die Durchführung des MGMT-Tests am Gesamtproteinextrakt weitestgehend dem MGMT-Test an intakten Zellen entspricht. Während der Test am Gesamtproteinextrakt geeignet ist, die Interaktion zwischen MGMT und MGMT-Inhibitor weitestgehend isoliert zu betrachten, läßt der Test an intakten Zellen zusätzlich erkennen, ob ausreichende Mengen des MGMT-Inhibitors aufgenommen wurden.

Methylierte DNA stellt das optimale Substrat der MGMT dar und ist im Überschuß in der Lage, MGMT vollständig in die methylierte Form zu überführen. Eine bestimmte Menge des Gesamtproteinextraktes wird mit [³H]-methylierter DNA versetzt, wodurch das radioaktive *Label* auf alle aktiven MGMT-Moleküle übertragen wird. Nach der erneuten Proteinfällung und mehreren Waschschrinen wird im Szintillationszähler ausschließlich die an das Enzym gebundene Radioaktivität erfaßt. Die MGMT-Aktivität der Kontrolle wird als 100 % - Wert angenommen. Die mit Inhibitor inkubierten Proben liegen im Bereich zwischen vollständiger Hemmung (= 0 % MGMT-Aktivität) und keiner meßbaren Inhibition (= 100 % Aktivität).

Alle Versuche zur Bestimmung der MGMT-Hemmung wurden in Zusammenarbeit mit der Abteilung für Angewandte Toxikologie des Instituts für Toxikologie der Universität Mainz durchgeführt.

3.2.1. MGMT-Test an zellfreien Proteinextrakten von HeLaS3-Zellen

Als erstes Screening wurde ein breites Spektrum an Substanzen bei zwei Konzentrationen (0,5 μM und 5 μM) im MGMT-Test an zellfreien Proteinextrakten getestet. Folgende Verbindungen wurden untersucht: die vier O⁶-substituierten Purine (O6MG, O6Bg, 8ABG und 4BTG), sowie deren Ethylglucoside (**33**, **34**, **37**, **39**; Abbildung 3.1-17). Desweiteren kamen das Ethylgalactosid (**35**) und das Propylglucosid (**36**) des O6BG, sowie das Butylglucosid- des 8ABG (**38**) und des 4BTG (**40**) in die Testreihe. Die beiden Derivate des 4BTG wurden darüberhinaus auch in der noch geschützten Form eingesetzt (**26**, **27**; Abbildung 3.1-14), ebenso die tetraacetylierte Vorstufe des Ethyl-Derivates des O6BG (**21**) und das Glucose-Analogon des O⁶-Benzylguanosins (2-Amino-6-benzyloxy-N⁹- β -D-glucopyranosidyl-purin).

4BTG und 8ABG depletieren die MGMT-Aktivität schon bei einer Konzentration von 0,5 μM . O6BG zeigt bei 0,5 μM 50 % und bei 5 μM annähernd 100 % MGMT-Inaktivierung. O6MG ist bei beiden Konzentrationen unwirksam.

Die entsprechenden Glycoside verhalten sich analog. Das Ethylglucosid des O6MG (**33**) ist bei 5 μM unwirksam, mit dem Ethylglucosid des O6BG (**34**) werden bei gleicher Konzentration 5 % Hemmung erreicht. Das Ethyl-Galactosid (**35**), das geschützte Ethylglucosid (**21**) und das Propylglucosid (**36**) des O6BG liegen mit 16 %, 15 % und 33 % deutlich höher. Für die Glucoside des 8ABG und des 4BTG werden schon bei 0,5 μM Effekte meßbar, die konzentrationsabhängig ansteigen. Das Ethylglucosid des 8ABG (**37**) zeigt 14 % (0,5 μM), bzw. 69 % (5 μM) Hemmung, das Butylglucosid (**38**) liegt mit 12 % (0,5 μM), bzw. 33 % (5 μM) darunter. Das Ethylglucosid (**39**) sowie die beiden geschützten Glucoside (**26** und **27**) des 4BTG sind die wirksamsten Konjugate. Sie hemmen die MGMT-Aktivität zu 37 % – 40 % bei 0,5 μM und zu mehr als 90 % bei 5 μM . Das Butylglucosid (**40**) des 4BTG hemmt mit 18 % (0,5 μM) bzw. 71 % (5 μM) deutlich geringer.

Anhand der Ergebnisse lassen sich einige Kernaussagen treffen, die das weitere Vorgehen bestimmten. Am wichtigsten scheint, daß eine Glycosidierung wie erwartet in jedem Falle zu einer geringeren inhibitorischen Aktivität führt und daß sich erhebliche Unterschiede zwischen den einzelnen Purinen erkennen lassen.

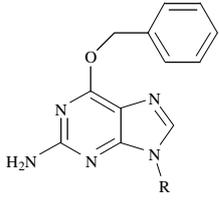
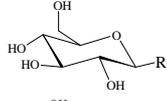
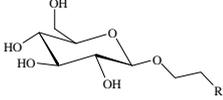
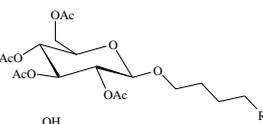
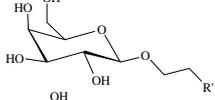
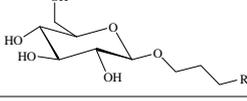
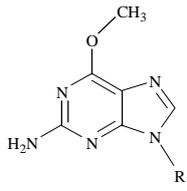
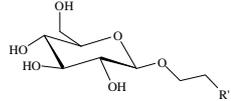
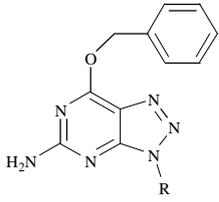
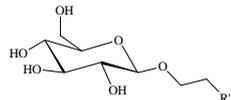
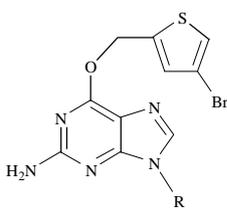
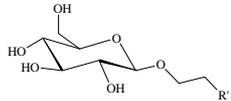
R' =	Inhibitor	R =	MGMT-Hemmung [%] ^a	
			Inhibitorkonzentration 0,5µM	Inhibitorkonzentration 5µM
	O6BG	H	50	97
	2-Amino-6-benzyloxy- N9-β-D- glucopyranosidyl-purin		3	11
	34		4	15
	21		0	16
	35		0	15
	36		1	33
	O6MG	H	0	0
	2-Amino-6-methyl- N9-β-D- glucopyranosidyl-purin		0	0
	33		0	0
	8ABG	H	97	n.d.
	2-Amino-6-benzyloxy- N9-β-D- glucopyranosidyl-purin		14	69
	37		12	33
	4BTG	H	100	n.d.
	2-Amino-6-(4-bromophenyl)- N9-β-D- glucopyranosidyl-purin		37	90
	39		18	71
	40		40	97
	26		38	94
	27			

Tabelle 3.2-1 MGMT-Test an HeLaS3-Gesamtproteinextrakten nach Inkubation mit den angegebenen Inhibitoren; n.d. = nicht durchgeführt. ^a Im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (=100 % Wachstum).

An den MGMT-Tests bei zwei Konzentrationen der MGMT-Inhibitoren können jedoch lediglich Tendenzen erkannt werden. Um qualifiziertere Aussagen treffen zu können, mußten Messungen bei einer größeren Anzahl von Konzentrationen durchgeführt werden. Der Konzentrationsbereich der notwendig ist, um die IC_{50} zu ermitteln, ließ sich anhand der ersten Ergebnisse sinnvoll eingrenzen.

Die IC_{50} wurden von den drei Purinen O6BG, 4BTG und 8ABG und den entsprechenden Ethyl- bzw. Butylglucosiden bestimmt. Das O6MG wurde wegen der niedrigen Aktivität nicht berücksichtigt.

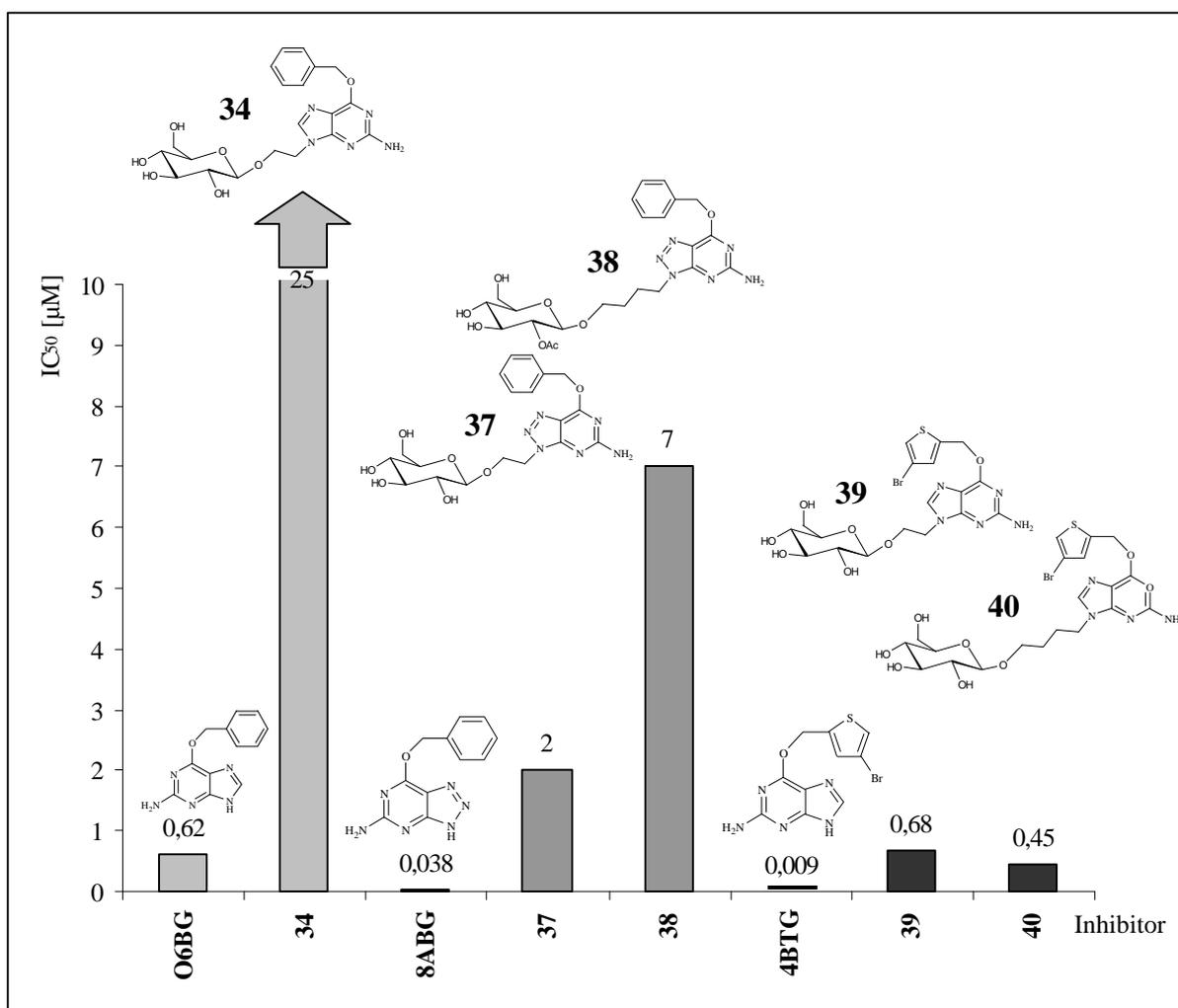


Abbildung 3.2-2 IC_{50} [μ M] der MGMT-Inhibitoren ermittelt an zellfreien Proteinextrakten von HeLaS3-Zellen Mittelwerte aus $n = 3$.

Die Glucosidierung führt wie erwartet in allen drei Fällen zu einem massiven Wirkungsverlust. Keines der Glucoside ist wirksamer als das entsprechende O⁶-substituierte Purin.

Die IC_{50} wird im Falle der 8ABG-Derivate mit steigender Spacer-Länge größer. Das Ethylglucosid (**37**) besitzt eine IC_{50} von 2 μ M, das Butylglucosid (**38**) von 7 μ M.

Im Gegensatz dazu, zeigt das Butylglucosid (**40**) des BTG mit 0,45 μM eine niedrigere IC_{50} als das entsprechende Ethylglucosid (**39**) mit 0,68 μM . Die IC_{50} der Glucoside des 4BTG liegen demnach in einem vergleichbaren Bereich wie die des O6BG (0,62 μM). Mit 38 nM und 9 nM sind 8ABG und 4BTG jedoch noch deutlich wirksamer als deren Glucoside.

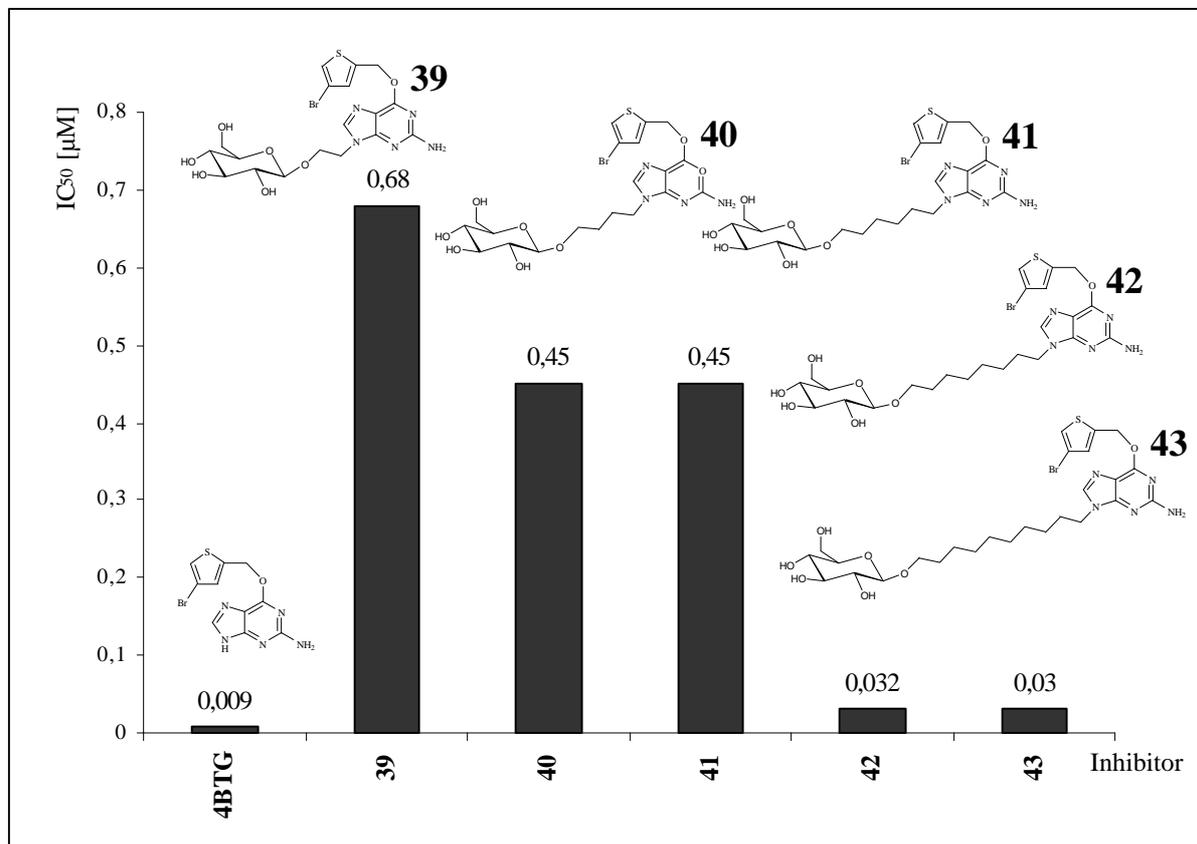


Abbildung 3.2-3 IC_{50} [μM] der Glucoside des 4BTG ermittelt an zellfreien Proteinextrakten von HeLaS3-Zellen Mittelwerte aus $n = 3$.

Im Folgenden wurde untersucht, ob durch weitere Kettenverlängerung des Spacers im Falle des 4BTG eine noch bessere inhibitorische Aktivität erreicht werden kann. Hierzu wurden das Hexyl- (**41**), das Octyl- (**42**) und das Decylglucosid (**43**) des 4BTG synthetisiert und deren IC_{50} nach gleichem Schema ermittelt.

Anhand Abbildung 3.2-3 ist ersichtlich, daß mit steigender Spacer-Länge die IC_{50} der MGMT-Hemmung sinkt. Lediglich das Butylglucosid (**40**) und das Hexylglucosid (**41**) weisen mit 0,45 μM eine identische IC_{50} auf. Zwischen dem Hexylglucosid und dem Octylglucosid (**42**) mit einer IC_{50} von 0,032 μM findet sich ein beachtlicher Anstieg der inhibitorischen Potenz. Die IC_{50} des Octyl- (**42**) und des Decylglucosid (**43**) liegen um Faktor 2,1 bzw. 2,0 über der des 4 BTG (0,009 μM). Die IC_{50} dieser beiden Glucoside liegen mit 32 nM (**42**), bzw. 30 nM (**43**) sehr nahe beieinander, woraus sich die Frage ergibt, ob mit dem Decylglucosid ein Grenzwert erreicht wird oder ob eine weitere Steigerung der MGMT-Inhibition durch Verlängerung des Spacers möglich ist. Es wurde ein weiteres Glucosid mit

einem Dodecyl-Spacer synthetisiert, um dies im gleichen Testsystem zu untersuchen. Darüberhinaus wurde ein auf einem But-2-in-ol-Spacer beruhendes Glucosid eingesetzt, um Auswirkungen von Mehrfachbindungen auf die Pseudosubstrat-MGMT-Interaktion zu verstehen.

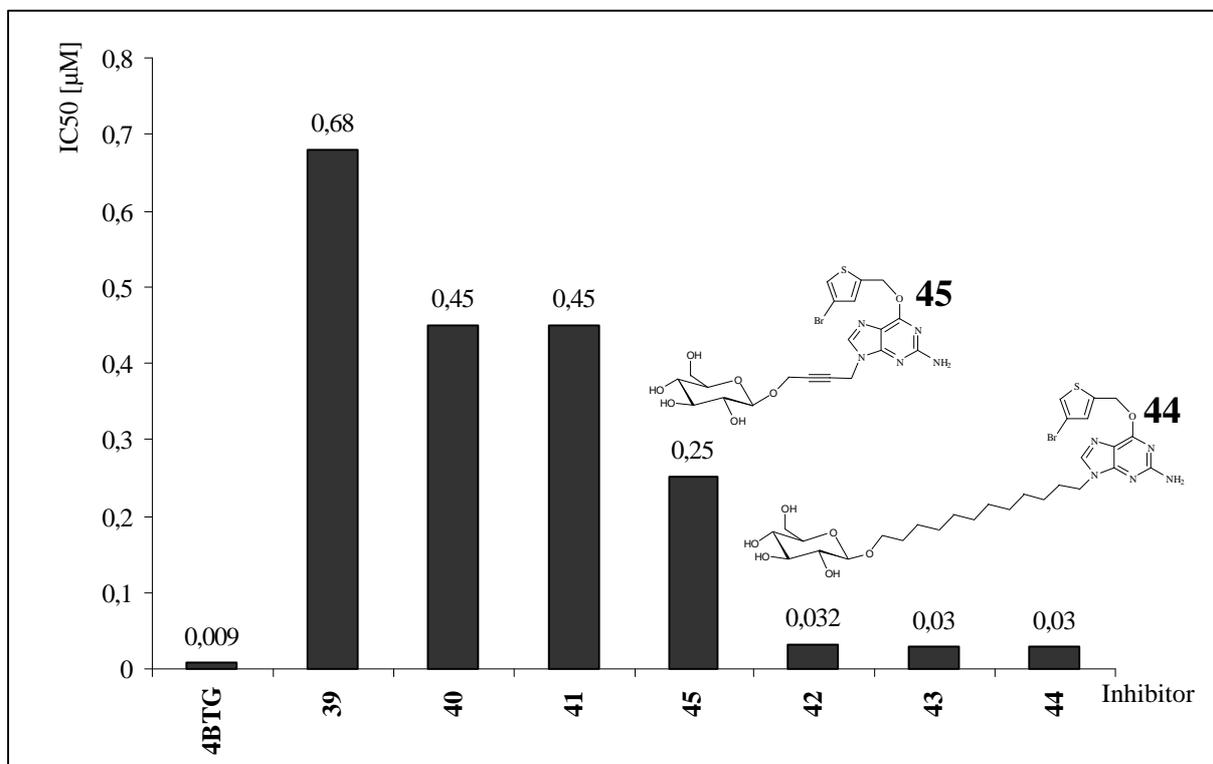


Abbildung 3.2-4 IC₅₀ [µM] der Glucoside des 4BTG ermittelt an zellfreien Proteinextrakten von HeLaS3-Zellen Mittelwerte aus n = 3.

Auch das Dodecylglucosid des 4BTG (**44**) besitzt eine IC₅₀ von 30 nM (Abbildung 3.2-4). Durch die Kettenverlängerung des Spacers konnte keine weitere Aktivitätserhöhung erreicht werden. Es scheint den Erwartungen entsprechend einen Grenzwert zu geben.

Die Dreifachbindung im But-2-in-1-olglucosid (**45**) bringt im Vergleich zu den Werten für das Butyl- (**40**, IC₅₀ = 0,45 µM) und das Hexylglucosid (**41**, IC₅₀ = 0,45 µM) des 4BTG eine verbesserte IC₅₀ von 0,25 µM.

Es ergeben sich zwei entscheidende Fragen aus diesen Ergebnissen: (1) Besteht ein Zusammenhang zwischen der Struktur der MGMT-Inhibitoren und der biologischen Aktivität im MGMT-Test? (2) Ist dieser bezüglich gewisser Moleküleigenschaften quantifizierbar? Mittels *Molecular Modeling* und *QSAR* wurde dies im weiteren näher untersucht (Kapitel 3.4).

3.2.2. MGMT-Test an HeLaS3-Zellen

Die an Zell-Extrakten gewonnenen Daten sollten für einige repräsentative Inhibitoren in der Zellkultur verifiziert werden (siehe Kapitel 3.2.1). Hierzu wurden O6BG und dessen Ethylglucosid (**34**), 8ABG und dessen Ethyl- (**37**) und Butylglucosid (**38**), sowie 4BTG und dessen Ethyl- (**39**) und Octylglucosid (**42**) getestet. Der Ablauf des Zelltests ist in Kapitel 3.2 schematisch dargestellt. HeLaS3-Zellen werden hierzu für 2 h mit den MGMT-Inhibitoren inkubiert und anschließend die Rest-Aktivität der MGMT im Vergleich zur Kontrolle ermittelt.

Wie aus Abbildung 3.2-5 ersichtlich, zeigen die Versuche insgesamt eine hohe Reproduzierbarkeit (geringe Standardabweichungen) und machen nochmals den direkten Zusammenhang zwischen Konzentration an MGMT-Inhibitor und MGMT-Hemmung deutlich. Aus den Kurven, die sich aus den Einzelwerten bei bestimmten Konzentrationen für den jeweiligen Inhibitor ergaben (Abbildung 3.2-5), können logarithmische Regressionsgleichungen berechnet werden, anhand derer die IC_{50} -Werte ermittelt wurden.

Die Werte betragen für die O^6 -substituierten Purine $0,0037 \mu\text{M}$ (4BTG), $0,018 \mu\text{M}$ (8ABG) und $0,065 \mu\text{M}$ (O6BG). Für die Ethylglucoside berechneten sich IC_{50} -Werte von $5,58 \mu\text{M}$ (O6BG, **34**), $2,79 \mu\text{M}$ (8ABG, **37**) und $1,72 \mu\text{M}$ (4BTG, **39**). Das Butylglucosid des 8ABG weist eine IC_{50} von $5,49 \mu\text{M}$ auf, das Octylglucosid des 4BTG eine IC_{50} von $0,011 \mu\text{M}$.

Es ergeben sich demnach ähnliche Verhältnisse wie bei den Ergebnissen, die im Gesamtproteinextrakt ermittelt wurden. Die O^6 -substituierten Purine steigen in der Aktivität vom O6BG über 8ABG zum 4BTG. Die Glucoside sind allesamt weniger wirksam als die entsprechenden nicht glucosidierten Inhibitoren. Für die Ethylglucoside ergibt sich die gleiche Reihenfolge wie für die Purine:

O6BG-Ethylglucosid (**34**) < 8ABG-Ethylglucosid (**37**) < 4BTG-Ethylglucosid (**39**).

Die Wirksamkeit nimmt mit Verlängerung des Spacers im Falle des 8ABG ab, das Octylglucosid des 4BTG (**42**) weist jedoch eine deutlich höhere Aktivität als das Ethylglucosid auf (**34**).

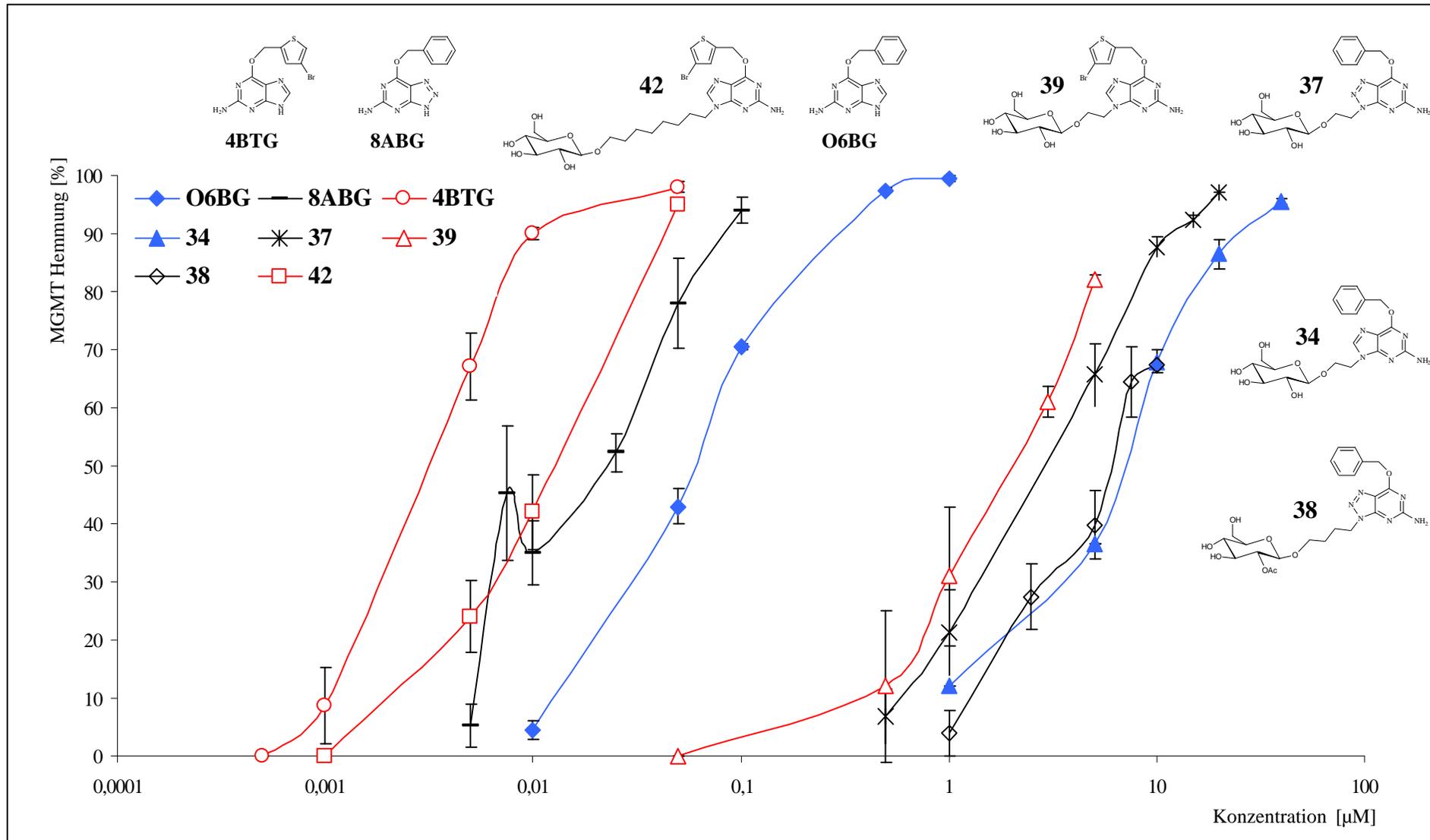


Abbildung 3.2-5 Bestimmung der MGMT-Hemmung bei unterschiedlichen Konzentrationen verschiedener MGMT-Inhibitoren. Angegeben sind die Mittelwerte aus $n = 3$ +/- SD im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle.

3.2.3. Untersuchungen an MeWo-, MeWo_{Fote4}- und MeWo_{Fote40}-Zellen

Die humane Melanomzelllinie MeWo wurde aus einer Lymphknotenmetastase eines Melanompatienten am *Memorial Sloan Kettering Cancer Center* (New York) gewonnen. Durch Dauerinkubation mit verschiedenen Zytostatika und Selektionierung wurden davon chemoresistente Zellklone abgeleitet. Es konnten Klone mit verschiedenen Resistenzstufen isoliert werden, die sich durch die Überlebensfähigkeit bei einer definierten Zytostatikakonzentration auszeichnen. Die hier verwendeten resistenten MeWo- (MeWo_{Fote4} und MeWo_{Fote40}) werden unter Standardkulturbedingungen kontinuierlich einer bestimmten Fotemustin-Konzentration ausgesetzt [Kern et al. 1997], für MeWo_{Fote4} 4 µg/ml Fotemustin und für MeWo_{Fote40} 40 µg/ml Fotemustin.

Gegenüber den nicht-resistenten MeWo-Zellen wurden bei beiden Klonen erhöhte MGMT-Spiegel festgestellt [Lage et al. 1999]. Um die Frage zu klären, ob es möglich ist, die Resistenz durch Hemmung der MGMT zu umgehen, wurden Versuche mit einer gleichzeitigen Behandlung der Zellen mit MGMT-Inhibitoren und Fotemustin durchgeführt. Dabei wurde der Einfluß von MGMT-Inhibitoren auf die Toxizität bei variierender Fotemustin-Konzentration und bei variierender MGMT-Inhibitor-Konzentration untersucht. Desweiteren interessierte, welcher der eingesetzten MGMT-Inhibitoren den größten Einfluß auf die Überlebensrate zeigt. Die Versuche sollten die klinische Situation simulieren und demonstrieren, ob resistente Zellen durch DNA-Reparatur-Modulation resensibilisiert werden können. Alle Untersuchungen an MeWo-, MeWo_{Fote4}- und MeWo_{Fote40}-Zellen wurden in Zusammenarbeit mit der klinischen Kooperationseinheit für Dermato-Onkologie des Deutschen Krebsforschungszentrum in Heidelberg durchgeführt.

3.2.3.1. Untersuchungen mit variierenden Fotemustin-Konzentrationen

Bei den Versuchen mit variierender Fotemustin-Konzentration sollte für die drei Zelllinien MeWo, MeWo_{Fote40} und MeWo_{Fote4} gezeigt werden, ob durch MGMT-Inhibition die Toxizität dieses monofunktionellen alkylierenden Agens moduliert werden kann.

Hierzu wurden die MGMT-Inhibitoren [10 µM] für 2 h zugesetzt, um die MGMT-Aktivität zu depletieren. Nach anschließender 3 stündiger Exposition mit einer Fotemustin-Konzentrationsreihe wurden die Zellen 96 h unter Standardbedingungen in normalem Medium kultiviert, bevor die Überlebensraten im MTT-Test ermittelt wurden (siehe Kapitel 5.1.2.2). Neben unbehandelten Zellen als Kontrolle (entspricht 100% Überleben) wurden

Zellen nur mit MGMT-Inhibitor oder nur mit Fotemustin behandelt. Letztere dienten dazu, eine Toxizität des MGMT-Inhibitor bei der eingesetzten Konzentration auszuschließen, bzw. die Fotemustin-Toxizität alleine im Vergleich zur Behandlung mit Fotemustin und MGMT-Inhibitor betrachten zu können. Aus den gewonnenen Daten errechnen sich die Fotemustin-Konzentrationen, bei denen genau 25 % (= IC₂₅), 50 % (= IC₅₀) und 75 % (= IC₇₅) des Zellwachstums gehemmt sind. Als Kennzahl für den Einfluß der MGMT-Inhibition wird der Quotient aus der IC₅₀ für Fotemustin alleine und der IC₅₀ für die Behandlung mit Fotemustin und MGMT-Inhibitor gebildet, der sogenannte *DMF* (*dose modifying factor*). Der *DMF* läßt erkennen, inwiefern die Resistenz durch MGMT-Inhibition umgangen werden kann, und spiegelt die Potenz des Inhibitors wider (siehe Kapitel 3.2). Sowohl in diesen, als auch in den Versuchen mit variierender MGMT-Inhibitor-Konzentration (siehe Kapitel 3.2.3.2) wurden 4BTG, dessen Ethylglucosid (**39**) und das Octylglucosid (**42**) eingesetzt.

3.2.3.1.1. Untersuchungen an der sensitiven MeWo-Zelllinie

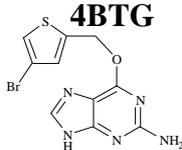
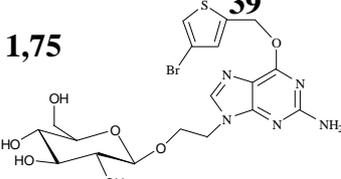
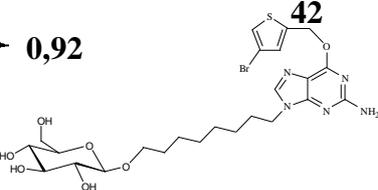
	IC ₂₅ [µg/ml]	IC ₇₅ [µg/ml]	IC ₅₀ [µg/ml]	DMF	
Fotemustin	0,9 (0,8-1,0)	91,7 (86,6-96,8)	9,0 (8,4-9,6)	0,65	 4BTG
Fotemustin + 4BTG ^a	1,7 (1,3-2,2)	112,2 (97,7-126,8)	13,9 (11,2-16,6)		
Fotemustin	1,1	127,4	11,6	1,75	 39
Fotemustin + 39 ^b	0,5	91,4	6,6		
Fotemustin	1,5 (0,4-3,3)	109,0 (76,5-161,5)	12,5 (5,7-23,2)	0,92	 42
Fotemustin + 42 ^c	1,8 (0,4-2,8)	110,2 (71,2-140,6)	13,6 (5,1-20,0)		

Tabelle 3.2-2 IC₂₅, IC₅₀ und IC₇₅ für Fotemustin und Fotemustin + MGMT-Inhibitor an MeWo-Zellen. O⁶-(4-Bromophenyl)-guanin (**4BTG**), 2-[O⁶-(4-Bromophenyl)-guan-9-yl]-ethyl-β-D-glucosid (**39**) und 8-[O⁶-(4-Bromophenyl)-guan-9-yl]-octyl-β-D-glucosid (**42**) wurden mit 10 µM, Fotemustin mit neun Konzentrationen von 7,8 µg/ml bis 2 mg/ml eingesetzt. ^a Die Werte ergeben sich aus den logarithmischen Regressionen der Überlebensraten gegen die Fotemustin-Konzentrationen. Sie repräsentieren die rechnerisch ermittelten Konzentrationen an Fotemustin, bei denen die Zellen um 25 % im Wachstum gehemmt sind (= IC₂₅), bzw. 50 % (= IC₅₀) und 75 % (= IC₇₅). Mittelwert aus ^a n = 2, ^b n = 1 und ^c n = 3. Maximalwerte in Klammern. *DMF* = IC₅₀ (Fotemustin) / IC₅₀ (Fotemustin + MGMT-Inhibitor).

Die ermittelten IC_{50} liegen im Bereich von 9,0 $\mu\text{g/ml}$ – 12,5 $\mu\text{g/ml}$ für die Behandlung mit Fotemustin und im Bereich von 6,6 $\mu\text{g/ml}$ – 13,9 $\mu\text{g/ml}$ für die Behandlung mit Fotemustin und MGMT-Inhibitor. Die IC_{25} variieren von 0,9 $\mu\text{g/ml}$ - 1,5 $\mu\text{g/ml}$, bzw. 0,5 $\mu\text{g/ml}$ – 1,8 $\mu\text{g/ml}$ und die IC_{75} von 91,7 $\mu\text{g/ml}$ – 127,4 $\mu\text{g/ml}$, bzw. von 91,4 $\mu\text{g/ml}$ – 112,4 $\mu\text{g/ml}$ (Tabelle 3.2-2). IC_{25} , IC_{50} und IC_{75} weisen bei allen Versuchen nur geringe Abweichungen auf.

Die daraus errechneten *DMF*-Werte liegen bei 0,65 für 4BTG, 1,75 für **39** und 0,92 für **42**. Zahlenwerte um 1 lassen erkennen, daß die IC_{50} für Fotemustin weitestgehend der IC_{50} bei Behandlung von Fotemustin und MGMT-Inhibitor entspricht. Durch MGMT-Hemmung wird demnach keine Sensibilisierung erreicht.

Auch bei Betrachtung der Überlebenskurven wird deutlich, daß keine Erhöhung der Toxizität durch zusätzliche MGMT-Inhibition erreicht werden kann (Abbildung 3.2-7). Obwohl die Einzelmessung mit **39** (Tabelle 3.2-2) für eine um Faktor 1,75 erhöhte Toxizität zu sprechen scheint, ist dies wahrscheinlich auf systematische Schwankungen zurückzuführen, die mit MeWo-Zellen oftmals zu beobachten sind.

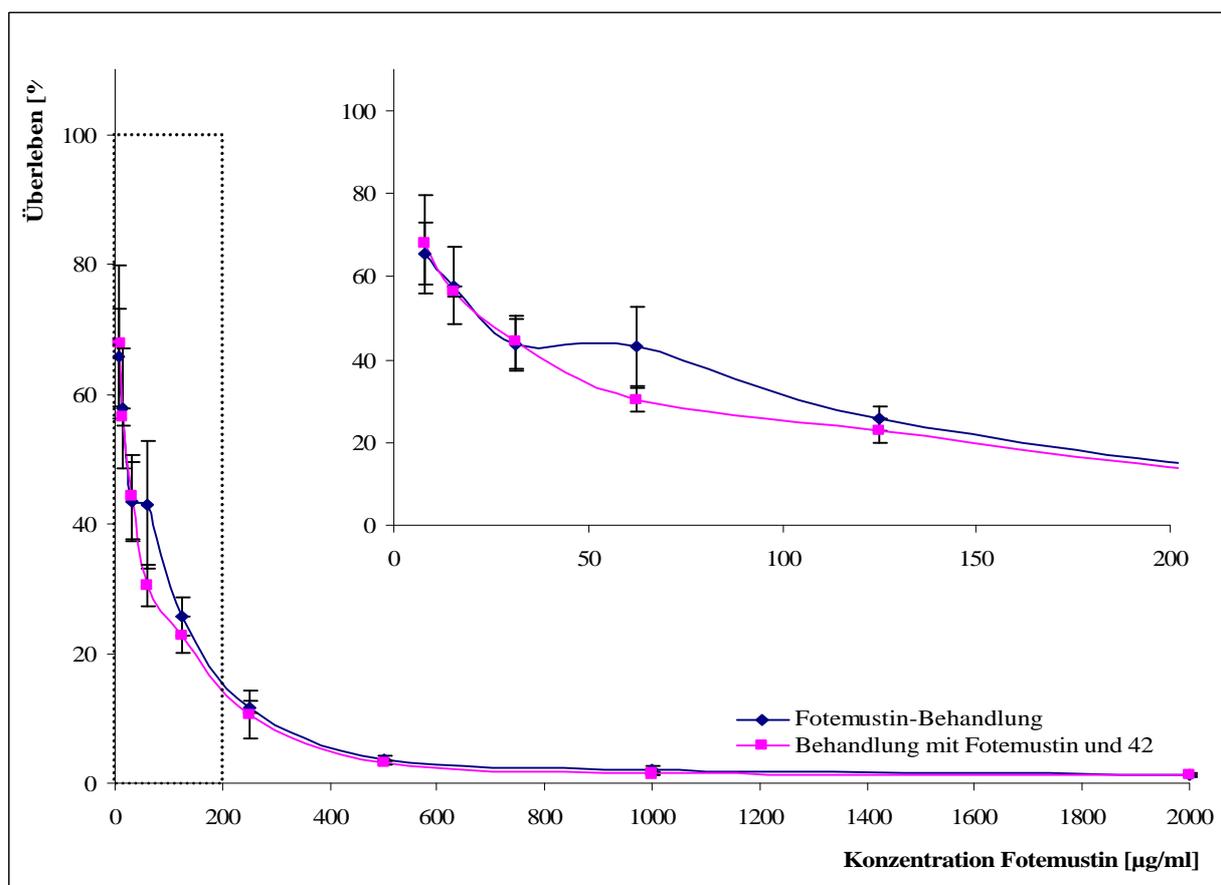


Abbildung 3.2-6 Exemplarische Darstellung der Überlebenskurven von MeWo-Zellen. Die Zellen wurden mit Fotemustin für 3 h oder mit **42** für 2 h und anschließend mit Fotemustin für 3 h behandelt. Nach Inkubation für weitere 96 h mit normalem Medium wurden die Überlebensraten mit dem MTT-Test ermittelt. Mittelwerte aus $n = 4 \pm \text{SD}$. Der markierte Bereich des Diagramms ist im Ausschnitt vergrößert dargestellt.

3.2.3.1.2. Untersuchungen an der resistenten MeWo_{Fote4}-Zelllinie

	IC ₂₅ [µg/ml]	IC ₇₅ [µg/ml]	IC ₅₀ [µg/ml]	DMF
Fotemustin	16,8	265,4	66,7	} 15,51
Fotemustin + 42	0,3	68,1	4,3	

Tabelle 3.2-3 IC₂₅, IC₅₀ und IC₇₅ für Fotemustin und Fotemustin + **42** an MeWo_{Fote4}-Zellen. Details siehe Tabelle 3.2-2. DMF = IC₅₀ (Fotemustin) / IC₅₀ (Fotemustin + MGMT-Inhibitor).

MeWo_{Fote4}-Zellen lassen sich im Gegensatz zur Ursprungszelllinie sensibilisieren. Sowohl die IC₂₅ mit 16,8 µg/ml als auch die IC₅₀ mit 66,7 µg/ml und die IC₇₅ mit 265,7 µg/ml werden deutlich durch den Zusatz von 8-[O⁶-(4-Bromothienyl)-guan-9-yl]-octyl-β-D-glucosid (**42**) gesenkt.

Die Werte nach der Behandlung mit beiden Substanzen liegen bei (=IC₂₅) 0,3 µg/ml (=IC₂₅), 4,3 µg/ml (=IC₅₀) und 68,1 µg/ml (=IC₇₅), womit eine mit den sensitiven MeWo-Zellen vergleichbare Toxizität des Fotemustins wiederhergestellt ist.

3.2.3.1.3. Untersuchungen an der resistenten MeWo_{Fote40}-Zelllinie

	IC ₂₅ [µg/ml]	IC ₇₅ [µg/ml]	IC ₅₀ [µg/ml]	DMF
Fotemustin	82,6 (21,7-143,4)	613,0 (404,7-821,3)	218,5 (93,7-343,2)	} 1,82
Fotemustin + 4BTG^a	37,5 (17,2-57,8)	402,2 (347,6-456,7)	119,9 (77,4-162,4)	
Fotemustin	144,2 (38,9-249,5)	2760,6 (807,5-4713,7)	630,8 (177,2-1084,4)	} 2,21
Fotemustin + 39^a	60,1 (43,5)	1367,6 (733,2-2001,9)	285,1 (178,6-391,5)	
Fotemustin	48,5 (36,1-63,5)	637,3 (386,2-816,7)	175,4 (180,4-227,8)	} 1,77
Fotemustin + 42^b	23,1 (10,1-33,2)	427,4 (221,2-577,8)	99,2 (47,3-138,6)	

Tabelle 3.2-4 Bestimmung der IC₂₅, IC₅₀ und IC₇₅ für Fotemustin, bzw. Fotemustin plus MGMT-Inhibitor an MeWo_{Fote40}-Zellen. Details siehe Tabelle 3.2-2. Mittelwert aus ^a n = 2, ^b n = 3. Maximalwerte in Klammern. DMF = IC₅₀ (Fotemustin) / IC₅₀ (Fotemustin + MGMT-Inhibitor).

Es ist zu beobachten, daß die MeWo_{Fote40}-Zellen nach Behandlung mit Fotemustin und MGMT-Inhibitor sensibler reagieren als nach Fotemustin alleine.

Die sich daraus ergebenden *DMF*-Werte liegen bei 1,82 für **4BTG**, 2,21 für **39** und 1,77 für **42**. Obwohl diese Werte gering scheinen, zeigen die absoluten Differenzen der IC-Werte für die Fotemustin Behandlung im Vergleich zur den IC-Werten der Doppelbehandlung eine deutliche gesteigerte Toxizität.

3.2.3.2. *Untersuchungen mit variierenden MGMT-Inhibitor-Konzentrationen*

Aus den Daten in 3.2.3.1 war zu erkennen, daß bei den Fotemustin resistenten MeWo_{Fote4-} und MeWo_{Fote40}-Zellen durch Behandlung mit Fotemustin und MGMT-Inhibitoren eine Erhöhung der Toxizität gegenüber der Behandlung mit Fotemustin alleine zu beobachten war. Im weiteren war es von Interesse, die Konzentrationsabhängigkeit auch in Bezug auf den MGMT-Inhibitor zu zeigen, um Aussagen bezüglich der Qualität der synthetisierten MGMT-Inhibitor-Glucoside treffen zu können.

Im ersten Versuch wurden MeWo und MeWo_{Fote40} mit 150 µg/ml Fotemustin behandelt und die MGMT-Inhibitoren O⁶-(4-Bromothienyl)-guanin (**4BTG**), sowie dessen Ethylglucosid (**39**) und das Octylglucosid (**42**) eingesetzt. Der Konzentrationsbereich lag zwischen 0,375 µM und 100 µM.

Im zweiten Versuch wurden die Konzentrationen auf 0,019 µM bis 5 µM der MGMT-Inhibitoren erniedrigt, um den sinnvollen Bereich weiter einzugrenzen.

Als Kontrollen dienten wie in 3.2.3.1 unbehandelte Zellen und Zellen, die nur mit Fotemustin behandelt wurden. Desweiteren wurde eine Kontrolle nur mit den entsprechenden Konzentrationen des MGMT-Inhibitors ohne Fotemustin behandelt, um daran die Eigentoxizität dieser Substanzen zu bestimmen (siehe Kapitel 5.1.2.2).

3.2.3.2.1. *Toxizität der MGMT-Inhibitoren*

Die verwendeten MGMT-Inhibitoren sind in den verwendeten Konzentrationen bis 5 µM nicht toxisch (Tabelle 3.2-5). Die Mittelwerte liegen teilweise unter 100 %, doch wird aufgrund der Standardabweichungen deutlich, daß kein signifikanter Unterschied zu den Kontrollen besteht.

Die Überlebensraten der MeWo-Zellen in Abbildung 3.2-8 zeigten, daß auch in höheren Konzentrationen bis 100 µM keine Hemmung des Zellwachstums durch einen der MGMT-

Inhibitoren zu erkennen ist. Die Mittelwerte der Überlebensraten liegen im Bereich bis 100 μM bei 85,6 % (+/- 14,5) für 4BTG, bei 89,7 % (+/- 10,5) für **39** und bei 102,9 % (+/- 16,0) für **42**.

MGMT-Inhibitor	Zelllinie	Überlebensrate [%] ^a									Mittelwert	SD
		Inhibitor-Konzentration [μM]										
		0,019	0,039	0,078	0,16	0,31	0,62	1,25	2,5	5		
4BTG	MeWo	106	100	99	98	98	93	93	98	99	98,1	(10,1)
4BTG	MeWo _{Fote4}	90	105	112	108	101	101	101	110	121	105,4	(19,4)
4BTG	MeWo _{Fote40}	111	97	101	101	104	102	93	103	114	103,0	(10,3)
39	MeWo	90	94	115	97	77	90	91	86	100	93,4	(13,5)
39	MeWo _{Fote4}	101	104	107	106	93	97	99	99	91	99,6	(8,9)
39	MeWo _{Fote40}	114	106	108	101	103	106	101	110	114	107,1	(13,8)
42	MeWo	96	97	88	84	94	87	94	98	104	93,6	(8,3)
42	MeWo _{Fote4}	94	93	90	83	91	92	91	94	99	91,9	(10,5)
42	MeWo _{Fote40}	94	94	88	90	92	98	86	95	106	93,6	(7,8)

Tabelle 3.2-5 Mit dem *MTT*-Test ermittelte Überlebensraten den MGMT-Inhibitoren **4BTG**, **39** und **42**. Die Zellen wurden 5 h mit dem MGMT-Inhibitor inkubiert und anschließend für 72 h kultiviert. Angabe des Mittelwertes +/- SD aus den angegebenen Überlebensraten der einzelnen MGMT-Inhibitor Konzentrationen. ^a Mittelwerte der Überlebensraten aus n = 4.

3.2.3.2.2. Untersuchungen an der sensitiven MeWo-Zelllinie

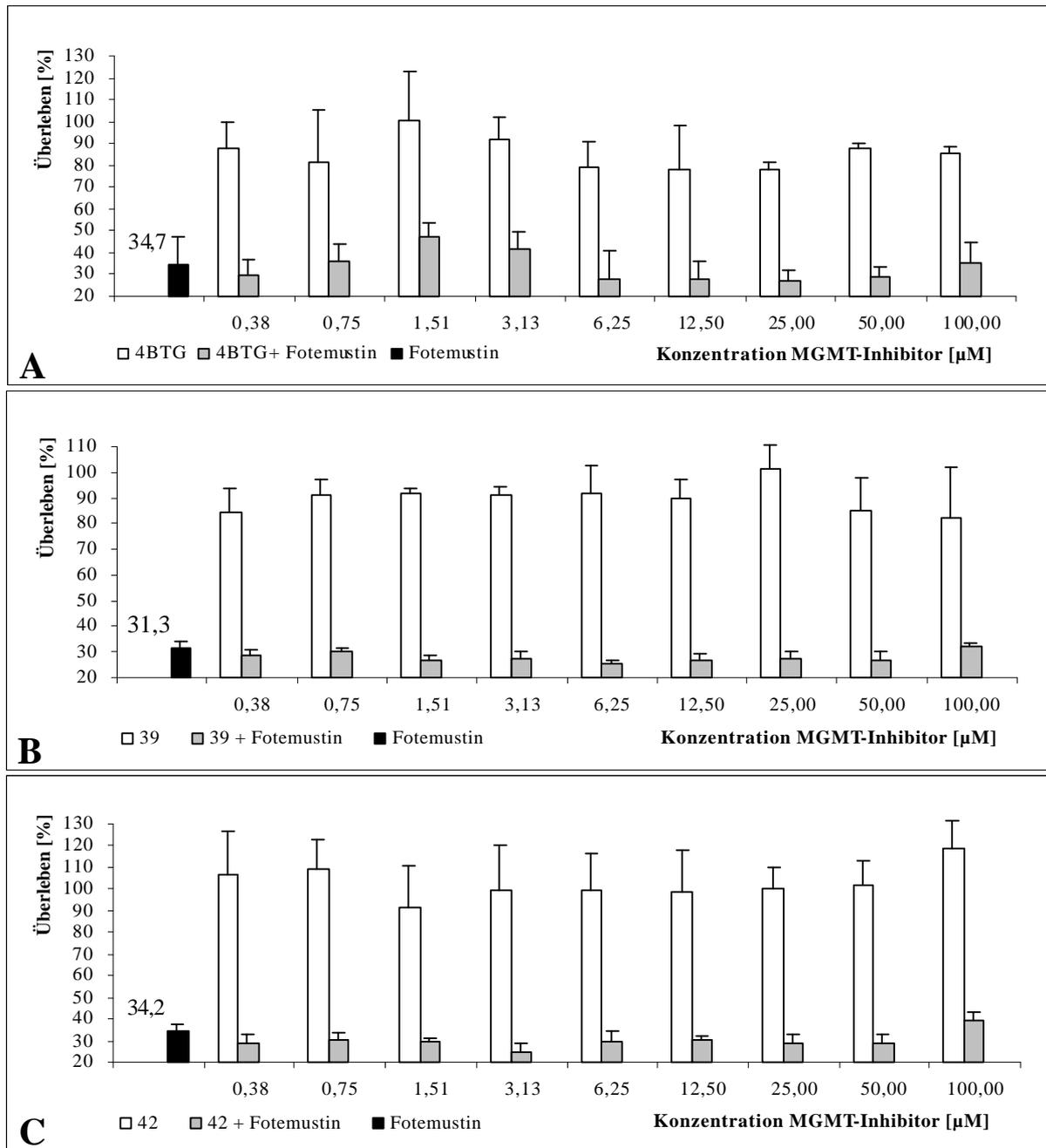


Abbildung 3.2-7 Darstellung der Überlebensraten von MeWo-Zellen nach Behandlung mit verschiedenen Konzentrationen von **A: 4BTG**, **B: 39** und **C: 42**. Die Zellen wurden mit 150 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Fotemustin für 3 h, mit MGMT-Inhibitor für 5 h, oder mit dem MGMT-Inhibitor für 2 h und anschließend mit Fotemustin 150 $\mu\text{g}/\text{ml}$ für 3 h behandelt. Nach Inkubation für weitere 72 h wurden die Überlebensraten mit dem MTT-Test ermittelt. Angegeben ist der Mittelwert aus $n = 4 \pm$ SD.

Betrachtet man die Überlebensraten von MeWo-Zellen nach Behandlung mit den MGMT-Inhibitoren und Fotemustin im Vergleich zur Überlebensrate für die Behandlung mit Fotemustin alleine, ist das gleiche Ergebnis wie in den Versuchen mit variierender Fotemustin-Konzentration erkennbar (Abbildung 3.2-7).

Die Fotemustin-Toxizität wird durch MGMT-Inhibition nicht moduliert. Die mittleren Überlebensraten aller Werte differieren nur unwesentlich vom Mittelwert der Überlebensraten mit Fotemustin.

Auch für die hohen Konzentrationen von bis zu 100 μM der MGMT-Inhibitoren kann keine erhöhte Hemmung des Zellwachstums festgestellt werden.

3.2.3.2.3. Untersuchungen an der resistenten *MeWo_{Fote4}*-Zelllinie

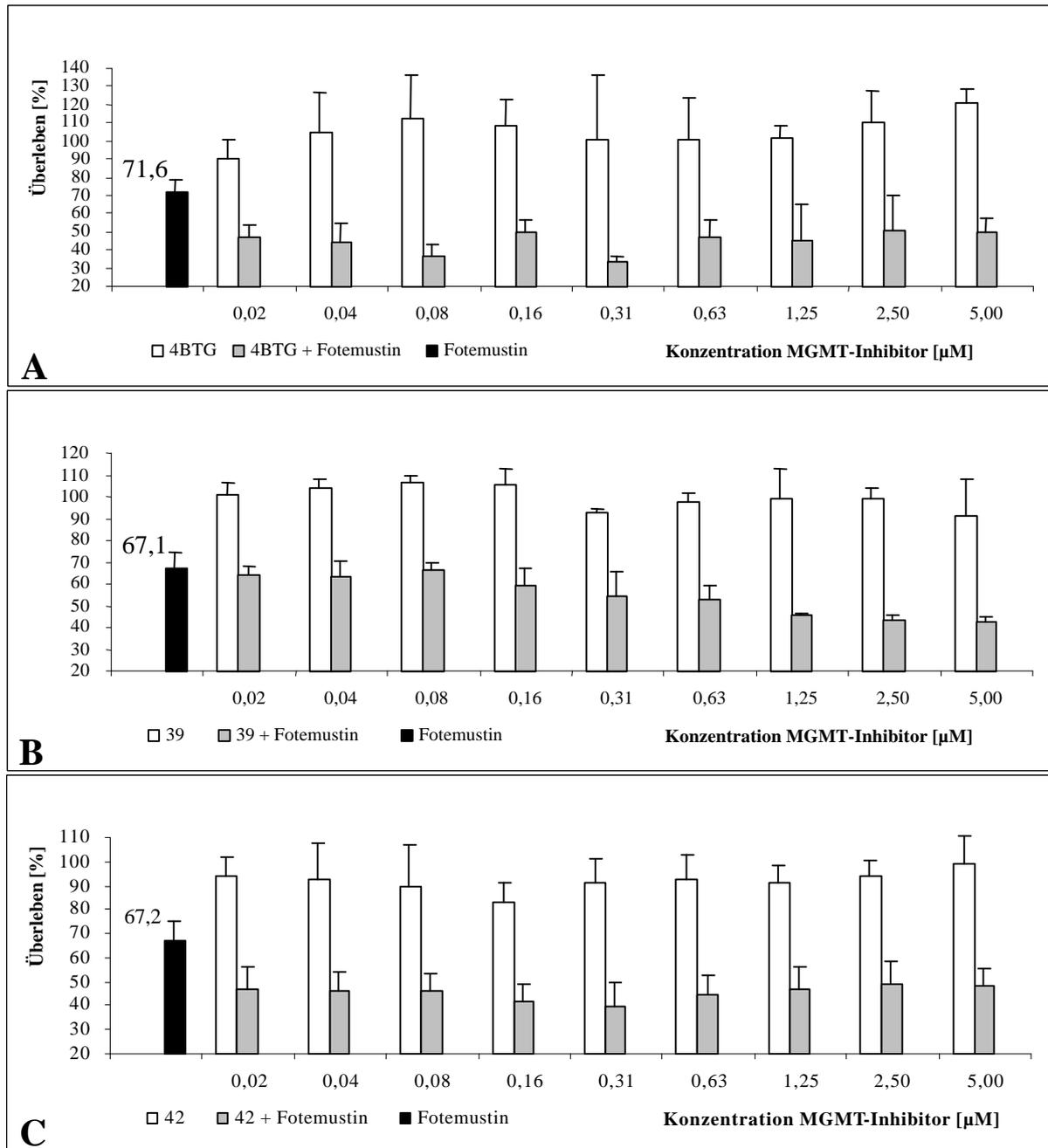


Abbildung 3.2-8 Darstellung der Überlebensraten von *MeWo_{Fote4}*-Zellen nach Behandlung mit verschiedenen Konzentrationen von A: 4BTG, B: 39 und C: 42. Details siehe Abbildung 3.2-7.

Durch Behandlung mit MGMT-Inhibitor und Fotemustin werden für resistente MeW_OFote4⁻-Zellen niedrigere Überlebensraten im Vergleich zur Behandlung mit Fotemustin alleine gemessen.

Mit 4BTG wird die Überlebensrate der Fotemustin-Kontrolle (71,6 % +/- 6,6 %) auf durchschnittlich 43,8 % +/- 10,8 % gesenkt. Eine Konzentrationsabhängigkeit ist im Bereich bis 0,019 µM 4BTG nicht zu erkennen.

Die Behandlung mit **42** und Fotemustin führt zu einem mittleren Zellwachstum von 43,7 % +/- 7,4 % gegenüber einer Überlebensrate von 67,2 % +/- 8,0 % der Fotemustin-Kontrolle. Die Steigerung der Toxizität wird auch bei den niedrigsten Konzentrationen von 0,019 µM **42** noch erreicht.

Durch die Doppelbehandlung mit **39** wird die Überlebensrate nach Behandlung mit Fotemustin alleine (= 67,1 % +/- 7,0 %) bei 5 µM, 2,5 µM und 1,25 µM des MGMT-Inhibitors auf Überlebensraten von durchschnittlich 43,1 % +/- 2,3 % gesenkt.

Wie auch bei den MeW_OFote4₀ (Abbildung 3.2-9) ist bei den geringeren Konzentrationen von **39** ein langsamer Anstieg der Überlebensraten zu erkennen. Die Mittelwerte liegen bei 52,9 % mit 0,63 µM **39**, bei 54,3 % mit 0,31 µM **39**, bei 58,9 % mit 0,16 µM **39** bis zu 66,4 % mit 0,08 µM **39**.

3.2.3.2.4. Untersuchungen an der resistenten MeW_OFote4₀-Zelllinie

Auch auf die MeW_OFote4₀-Zellen hat die Inhibition der MGMT einen deutlichen Einfluß (Abbildung 3.2-9).

Vergleicht man die Überlebensraten von MeW_OFote4₀-Zellen nach der Behandlung mit **4BTG** (**A**) oder **42** (**C**) und Fotemustin mit der Toxizität von Fotemustin alleine, so zeigt sich, daß die Doppelbehandlung bei allen Konzentrationen zu einer erhöhten Hemmung des Zellwachstums führt.

Während die Werte der Fotemustin-Kontrollen bei 87,7 % +/- 11 % (4BTG), bzw 84,9 % +/- 4,9 % (**42**) Zellwachstum liegen, werden für die Behandlung mit Fotemustin und MGMT-Inhibitor Überlebensraten von durchschnittlich 54,7 % +/- 7,6 % (4BTG), bzw. 55,0 % +/- 7,8 % (**42**) gemessen.

Für 4BTG ist ab 0,04 µM keine weitere Verbesserung des Effekts bei ansteigender Konzentration zu erkennen. Bei **42** liegt diese Grenze bei 0,08 µM. Im Gegensatz dazu wird für **39** erst ab 1,25 µM **39** der maximale Effekt der Steigerung der Fotemustin-Toxizität beobachtet. Bei der Behandlung mit **39** und Fotemustin werden für 1,25 µM, 2,5 µM und 5

μM **39** Überlebensraten von 63,5 % \pm 6,3 %, gegenüber 92,7 % \pm 5,9 % der Fotemustin-Kontrolle erzielt. Von 0,63 μM bis 0,8 μM **39** steigen die Werte auf über 85 % und liegen auch bei weiterer Verdünnung des MGMT-Inhibitors im Bereich der reinen Fotemustin-Toxizität. Es werden demnach mindestens 1,25 μM **39** benötigt, um die MGMT-Aktivität wirksam zu unterbinden und einen maximalen Effekt zu erzielen.

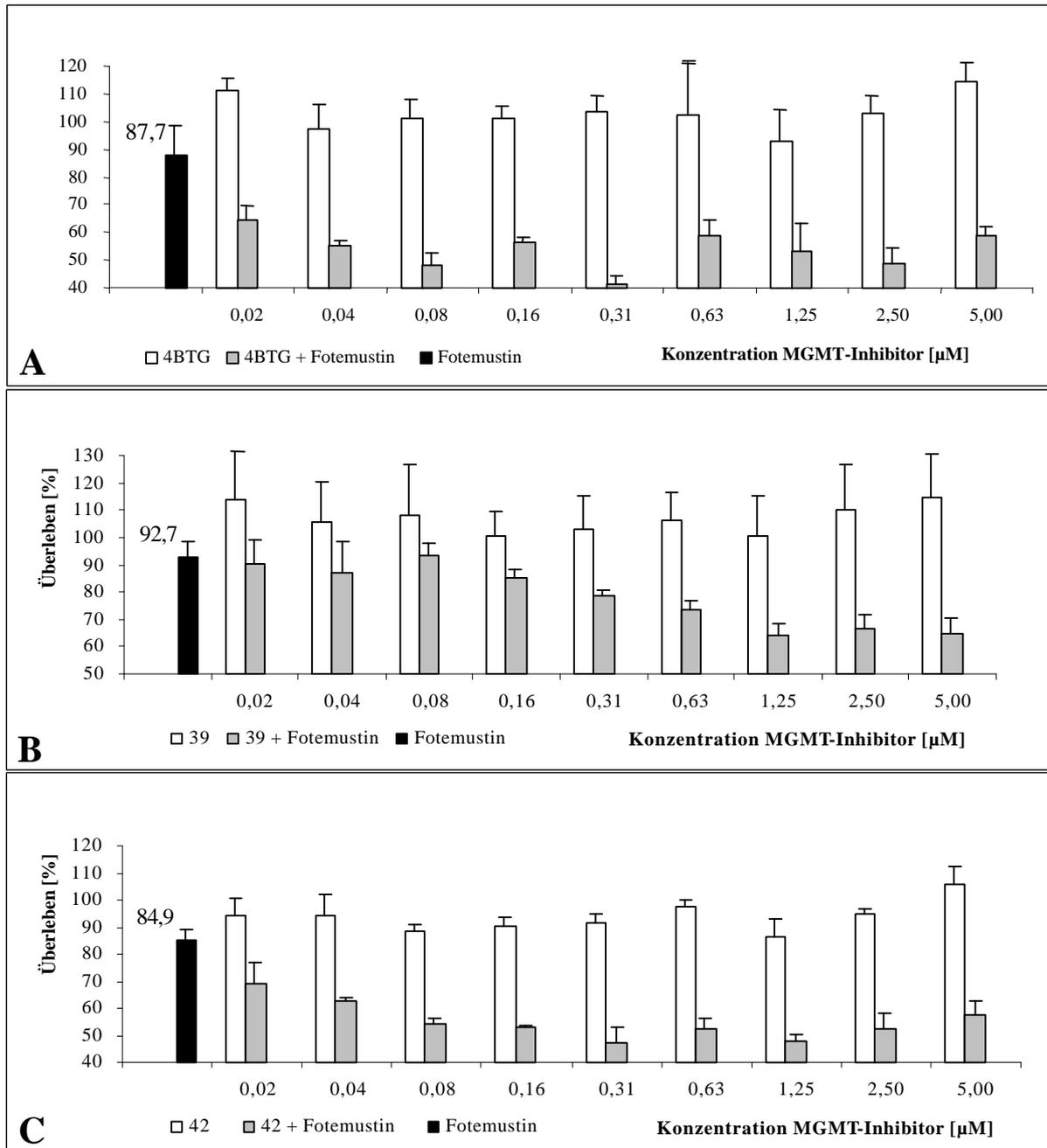


Abbildung 3.2-9 Darstellung der Überlebensraten von $\text{MeWo}_{\text{Fote40}}$ -Zellen nach Behandlung mit verschiedenen Konzentrationen von A: **4BTG**, B: **39** und C: **42**. Details siehe Abbildung 3.2-7

3.3. Eigenschaften der MGMT-Inhibitoren

Das Anwendungspotential von Wirkstoffen wird mitunter maßgeblich durch deren Stabilität geprägt. Aus diesem Grund wurden 8-[O⁶-(4-Bromothienyl)-guan-9-yl]-octyl-β-D-glucosid (**42**) und 2-[O⁶-(4-Bromothienyl)-guan-9-yl]-ethyl-β-D-glucosid (**39**) exemplarisch auf deren physikochemische Haltbarkeit in wäßrigen Lösungen untersucht. Es sollte demonstriert werden, daß die Substanzen unter den Bedingungen der verwendeten *in vitro* Testsysteme und der Zellkultur ausreichend stabil sind. Auch wenn die Versuche nicht die Komplexität eines biologischen Systems widerspiegeln, liefern solche Daten auch erste Anhaltspunkte für das Verhalten *in vivo*.

3.3.4. Stabilitätsuntersuchungen in wäßrigen Lösungen

Die Stabilitätsuntersuchungen sollten mittels HPLC-Untersuchungen nach einem vorgegebenem Zeitschema durchgeführt werden.

Um die Leistungsfähigkeit des analytischen Systems unter Beweis zu stellen, wurden eine Reihe von Vorversuchen durchgeführt, in denen die Linearität und Reproduzierbarkeit des HPLC-Systems geprüft wurden. Hierbei wird gefordert, daß für die Retentionszeit und die Integrale der UV-Detektorsignale bei gleichbleibenden Bedingungen in mehreren Messungen identische Ergebnisse erhalten werden. Desweiteren wurden für unterschiedliche Aufgabemengen die Integrale der Flächen der Detektorsignale graphisch gegen die Aufgabemengen dargestellt. Die Beziehung der beiden Größen sollte linear sein, mit einem Korrelationskoeffizient größer als 0,990. Um die Aufgabemengen zu variieren wurden verschiedene Volumina einer Konzentration, sowie ein definiertes Volumen verschiedener Konzentrationen gemessen.

Wie man anhand Abbildung 3.3-1 erkennen kann, wurden die Forderungen an das System erfüllt. Der lineare Zusammenhang ist sowohl für die Aufgabe verschiedener Volumina einer Konzentration, als auch die Aufgabe eines konstanten Volumens einer Konzentrationsreihe gezeigt worden. Die Korrelationskoeffizienten liegen mit 0,9997 und 0,9958 nahe dem Idealwert. Die Retentionszeiten wichen bei allen Messungen ($n > 30$) nur um $\pm 0,06$ s um den Mittelwert ab und qualifizieren demnach das System zur Verwendung für die Stabilitätsmessung. Auch für das Octylglucosid (**42**) zeigte sich die Analysemethode als geeignet.

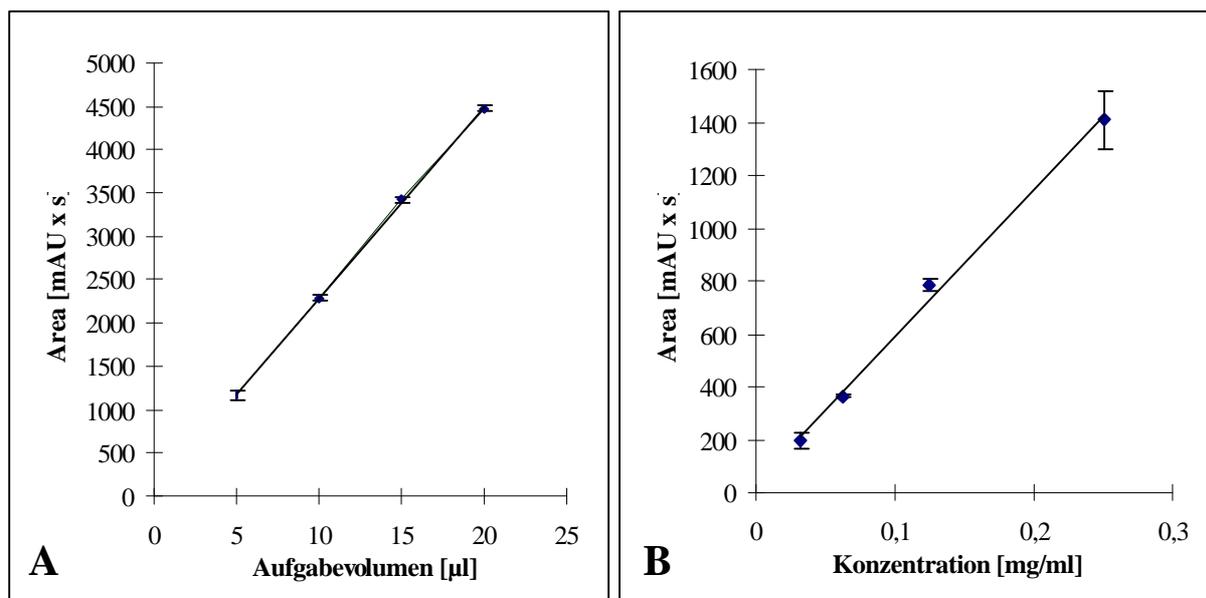


Abbildung 3.3-1 Validierung des HPLC-Systems für die Stabilitätsmessungen von 2-[O⁶-(4-Bromothienyl)-guan-9-yl]-ethyl-β-D-glucosid (**39**). **A**: Aufgabe von 5 µl, 10 µl, 15 µl und 20 µl einer 1 mg/ml Lösung. **B**: Aufgabe von jeweils 20 µl folgender Lösungen: 0,25 mg/ml; 0,125 mg/ml; 0,061 mg/ml; 0,031 mg/ml. Mittelwerte aus n = 3, +/-SD. **A**: r = 0,9997; **B**: r = 0,9958.

Der Versuchsaufbau wurde im folgenden für alle Untersuchungen standardisiert. Die Substanzen wurden in Phosphat-Puffer (pH 6,0 oder pH 7,4), oder Zellkulturmedium bei 37 °C in sterilen Behältnissen inkubiert. Die Quantifizierung erfolgte mittels HPLC durch direkte Aufgabe der Proben und Auswertung der Signalflächen gegen die Zeit. Um ein repräsentatives Ergebnis zu erhalten wurden drei unabhängige Messreihen durchgeführt. Aus jeder Meßreihe wurde jede Probe dreimal vermessen und die Resultate graphisch dargestellt. Anhand der Regressionsgleichungen wurden zur besseren Vergleichbarkeit die Zeiten bestimmt, bei denen theoretisch noch 90 % der Probe intakt sind ($T_{90\%}$), bzw. 50 % ($T_{1/2}$ = Halbwertszeit). Im Falle von **42** wurde aus folgendem methodischen Grund das Verhältnis der Fläche des Signals bei 7,3 min und des Integrals des Signals bei 3 min aufgetragen. Die Qualifizierung des HPLC-Systems erfolgte mit Lösungen höherer Konzentration von **42** in Methanol und brachte sehr gute Ergebnisse. Die Messungen der wäßrigen Lösungen von **42** bei 0,1 mg/ml waren hingegen nicht ausreichend reproduzierbar, wahrscheinlich wegen einer zu geringen Löslichkeit nach dem Auftauen der Proben. Weder durch veränderte Probenvorbereitung (Zentrifugation, Ultrafiltration) noch durch eine Verringerung der Konzentration um den Faktor 10 konnte das Problem gelöst werden, weshalb sich die graphische Auswertung des Signalverhältnisses (Signalfläche 7,3 min / Summe Signalfläche 3 min) als sinnvoller Weg zur Berechnung von $T_{90\%}$ und $T_{1/2}$ erwies.

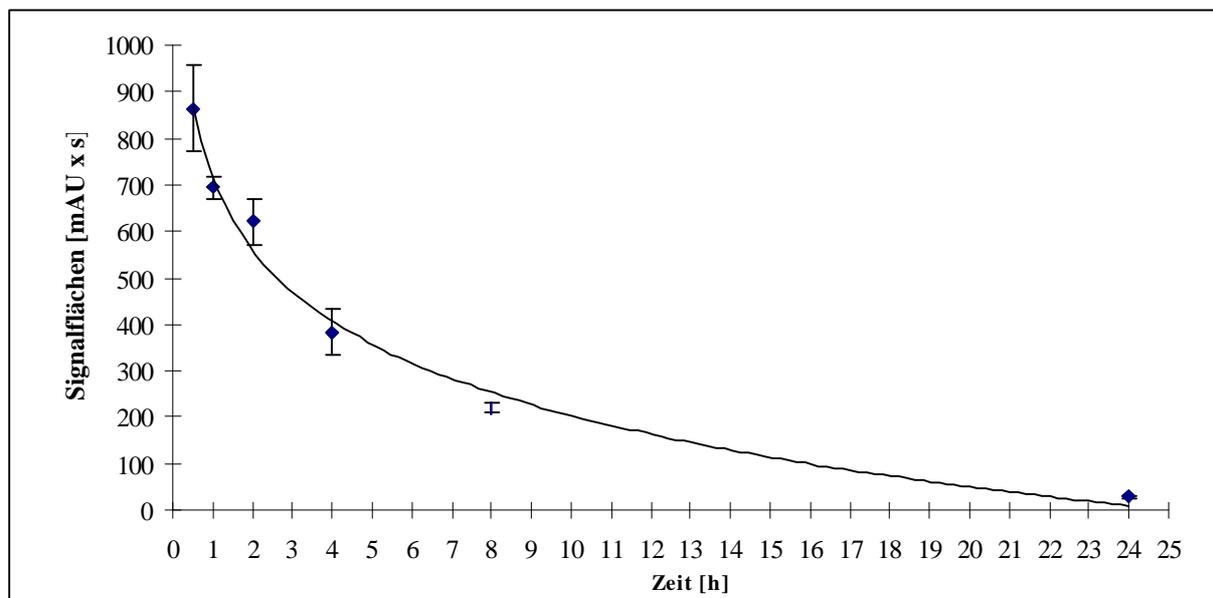


Abbildung 3.3-2 Stabilitätsmessung von **39** ($c^\circ = 0,1 \text{ mg/ml}$) in Phosphat-Puffer pH 6,0 bei 37°C bei 0,5 h, 1 h, 2 h, 4 h, 8 h, 24 h. Mittelwert aus $n = 3 \pm \text{SD}$. $r = 0,9878$.

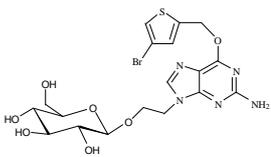
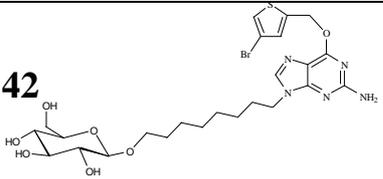
MGMT-Inhibitor	$T_{1/2}^a$	$T_{90\%}^a$
39 	4,3 h (4,0 h – 4,9 h)	0,63 h (0,6 h - 0,7 h)
42 	31,4 h (24,2 h – 39,8 h)	4,8 h (3,7 h - 6,1 h)

Tabelle 3.3-1 Ergebnisse der Stabilitätsmessung von **39** und **42** bei 37°C in Phosphat-Puffer pH 6. $^a T_{1/2}$ ($T_{90\%}$) entspricht der Zeit, zu der 50 % (90 %) intakte Ausgangssubstanz vorliegen. Berechnet aus den Regressionsgleichungen der Funktionen [Zeit] gegen [Signalfäche (intakte Substanz)] **39** und [Zeit] gegen [Signalfäche (intakte Substanz) / Fläche des Signals bei 3 min] **42**. Mittelwerte aus $n = 3$; niedrigster und höchster Wert (in Klammern).

Die Ergebnisse für beide MGMT-Inhibitor-Glucoside sind in Tabelle 3.3-1 zusammengefaßt. Bei pH 6,0 / 37°C weist **42** eine $T_{90\%}$ von 4,8 h und eine $T_{1/2}$ von 31,4 h auf. Für **39** liegen die Zeiten mit durchschnittlich 0,63 h und 4,8 h deutlich niedriger.

Die Messungen bei physiologischem pH-Wert 7,4 / 37°C erfolgten über den Zeitraum einer Woche, da davon auszugehen war, daß im Vergleich zu pH 6,0 längere Halbwertszeiten ermittelt werden. Die Probenentnahme erfolgte dementsprechend bei $t = 0,5 \text{ h}, 1 \text{ h}, 2 \text{ h}, 4 \text{ h}, 8 \text{ h}, 24 \text{ h}, 48 \text{ h}, 72 \text{ h}, 168 \text{ h}$.

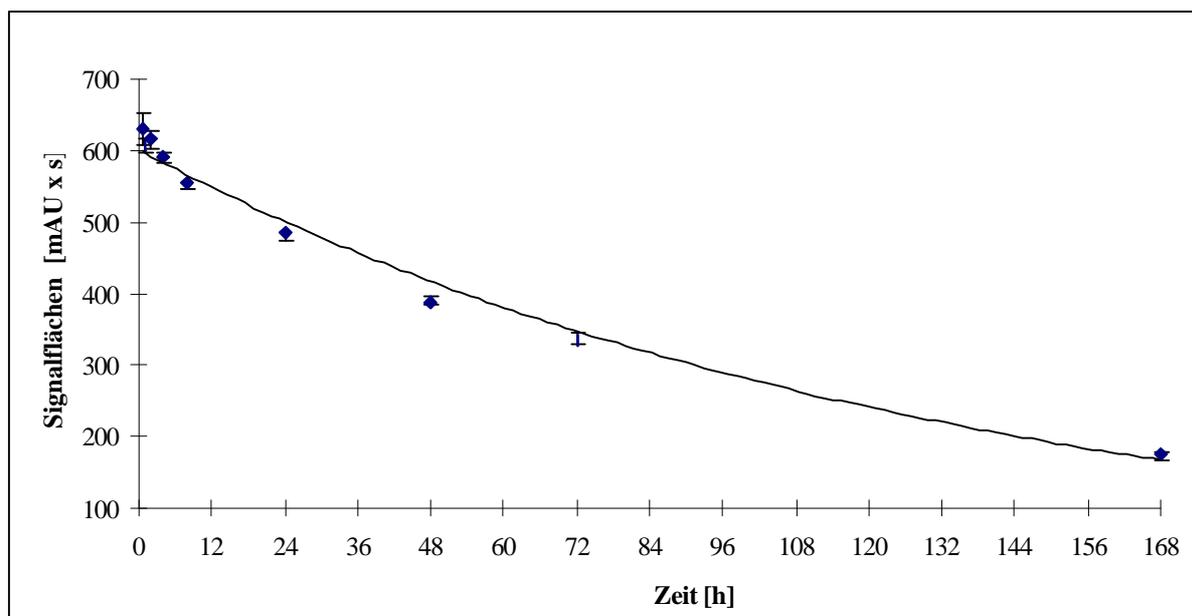


Abbildung 3.3-3 Stabilitätsmessung von **39** ($c^{\circ} = 0,1 \text{ mg/ml}$) in Phosphat-Puffer pH 7,4 bei 37°C bei 0,5 h, 1 h, 2 h, 4 h, 8 h, 24 h. Mittelwert aus $n = 3 \pm \text{SD}$. $r = 0,9899$.

Die Ergebnisse für das **39** und **42** lassen erkennen, daß die Verbindungen bei pH 7,4 / 37°C in wäßriger Lösung sehr stabil sind (Abbildung 3.3-3; Tabelle 3.3-2).

39 weist eine $T_{1/2}$ von 85,7h auf und eine $T_{90\%}$ von 13,0 h. **42** besitzt deutlich höhere Werte mit einer $T_{1/2}$ von 710,6 h und einer $T_{90\%}$ von 108,0 h.

Beide Substanzen sind dementsprechend für die *in vitro* Inkubationen des MGMT-Tests am Gesamtproteinextrakt geeignet (siehe Kapitel 3.2.1).

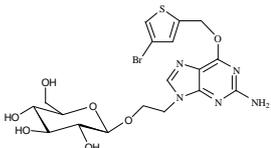
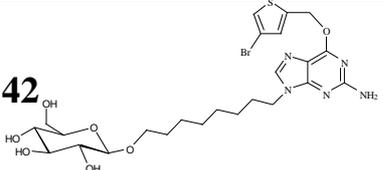
MGMT-Inhibitor	$T_{1/2}^a$	$T_{90\%}^a$
39 	85,7 h (73,7 h – 92,4 h)	13,0 h (11,2 h – 14,0 h)
42 	710,6 h (495,1 h – 866,4 h)	108,0 h (75,2 h – 131,7 h)

Tabelle 3.3-2 Ergebnisse der Stabilitätsmessung von **39** und **42** bei 37°C in Phosphat-Puffer pH 7,4. Details siehe Tabelle 3.3-1. Mittelwerte aus $n = 3$; niedrigster und höchster Wert (in Klammern).

Zur Bewertung der MGMT-Tests an intakten HeLaS3-Zellen und den Untersuchungen an MeWO-Zellen waren Stabilitätsversuche in Zellkulturmedium notwendig (siehe Kapitel 3.2.2 und 3.2.3).

Die Messungen erfolgten nach dem gleichen Zeitschema wie für die Experimente in Phosphatpuffer pH 7,4. In Vorversuchen zeigte sich, daß die Proben direkt auf die HPLC gegeben werden können, wobei eine Vorsäule die Hauptsäule schützt. Alle Messungen (über 500 HPLC-Läufe) konnten mit einer Säule und einer Vorsäule durchgeführt werden, ohne daß größere Probleme auftraten.

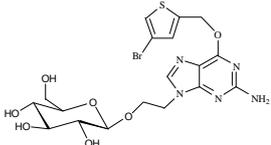
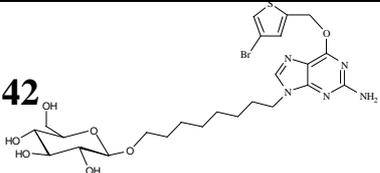
MGMT-Inhibitor	$T_{1/2}^a$	$T_{90\%}^a$
39 	172,9 h (154,0 h – 182,4 h)	26,3 h (23,4 h – 27,7 h)
42 	1636,6 h (577,6 h – 3465,7 h)	252,1 h (87,8 h – 536,8 h)

Tabelle 3.3-3 Ergebnisse der Stabilitätsmessung von **39** und **42** bei 37°C in *RPMI*-Vollmedium mit Zusatz von 5 % *Fötalem Kälberserum*. Details siehe Tabelle 3.3-1. Mittelwerte aus $n = 3$; niedrigster und höchster Wert (in Klammern).

Sowohl **42**, als auch **39** sind unter den Inkubationsbedingungen mit Zellkulturmedium sehr stabil.

39 zeigt nach einem Tag noch Werte um 90 % der anfänglich eingesetzten Konzentration und nach einer Woche noch durchschnittlich über 50 % unmodifizierte Substanz. Die Mittelwerte aus drei Messungen liegen für die $T_{1/2}$ bei 172,9 h und die $T_{90\%}$ bei 26,3 h.

42 zeigt deutlich höhere Werte und scheint in Medium fast keiner Degradation unterworfen zu sein. Der extrapolierte Mittelwert der $T_{90\%}$ liegt bei 251,1 h und der $T_{1/2}$ bei 1636,6 h.

3.3.5. β -Glucosidase-Stabilität der MGMT-Inhibitoren

Auch die Stabilität gegenüber β -Glucosidasen sollte für die zwei MGMT-Inhibitoren **39** und **42** exemplarisch untersucht werden. Die Auswahl erfolgte zum einen, aufgrund der sehr unterschiedlichen sterischen und lipophilen Eigenschaften beider Substanzen und zum anderen da **39** und **42** am vielversprechendsten für eine therapeutische Anwendung erschienen.

Als Testenzym wurde eine aus Mandeln (*Prunus amygdalarum*, *Rosaceae*) gewonnene β -Glucosidase verwendet, die kommerziell erhältlich ist (Sigma, Deisenhohen: G4511; E 3.2.1.2.1.).

Bei den β -Glucosidasen handelt es sich um eine Gruppe von Hydrolasen, die in der Lage sind β -glucosidische Bindungen zu spalten. β -Glucoside kommen ubiquitär in allen Organismen vor und weisen große strukturelle und funktionelle Analogien auf, weshalb die Verwendung einer pflanzlichen β -Glucosidase als sinnvolles Modell dient [Conn 1993; Seker 1998].

Die Firmenangabe zur Aktivität ist 22 U/mg Protein bei pH 5, wobei 1U der Freisetzung von 1 μ mol/min des Aglykons entspricht. Die verwendete Enzym-Lösung wurde auf eine theoretische Aktivität von 1U/100 μ l eingestellt. Wegen des pH Optimums der β -Glucosidase bei pH 5 sollten die Versuche bei möglichst niedrigem pH-Wert durchgeführt werden. Da die Stabilität bei pH 6 zuvor bestimmt wurde, sollte die Aktivität des Enzyms unter diesen Bedingungen bestimmt werden. Als Vergleichssubstanz zur Bestimmung der enzymatischen Hydrolyse dient 4-Nitrophenyl- β -D-glucosid (**4-NPG**).

In mehreren Versuchsreihen bei variierenden Enzymkonzentrationen und variierenden 4-NPG-Konzentrationen konnte bei pH 6 die Freisetzung des Aglykons des 4-NPG anhand der Extinktionszunahme bei 420 nm im Photometer gezeigt werden. Da in erster Linie von Interesse war, ob die synthetisierten MGMT-Inhibitor-Glucoside potentielle Substrate für β -Glucosidasen darstellen, wurde die Hydrolyserate nicht quantifiziert.

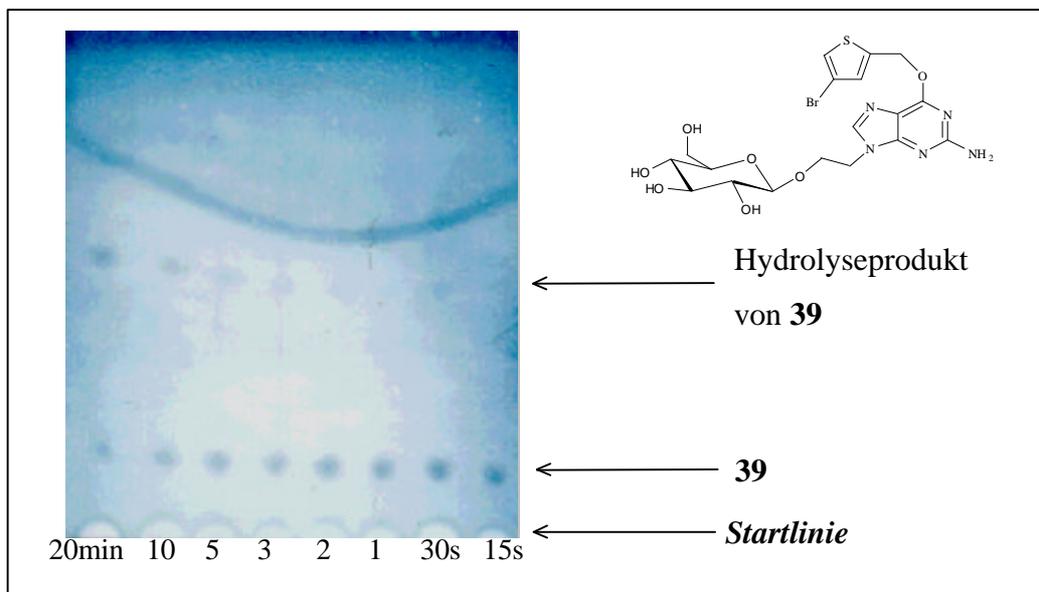


Abbildung 3.3-4 Dünnschichtchromatographie einer Inkubation von **39** (99 μ l; c° 1,93 mg /ml) mit 1 μ l β -Glucosidase Lösung (c° = 1,15 mg Protein / 2,53 ml Phosphat-Puffer pH 6) bei Raumtemperatur. Laufmittel: Chloroform/Methanol 5/1. Detektion mittels Cer-Molybdän-Sprühreagens.

In ersten Versuchen wurden Lösungen der MGMT-Inhibitoren mit verschiedenen Konzentrationen der β -Glucosidase inkubiert. Die Detektion der Freisetzung des Aglykon erfolgte per DC. Auf dem Kieselgel der DC-Platte wurde die Reaktion direkt nach dem Aufbringen durch Lufttrocknung der wässrigen Lösungen unterbrochen.

Die Zeitabhängigkeit der Reaktion wurde im weiteren mittels HPLC genauer quantifiziert (Abbildung 3.3-5 A).

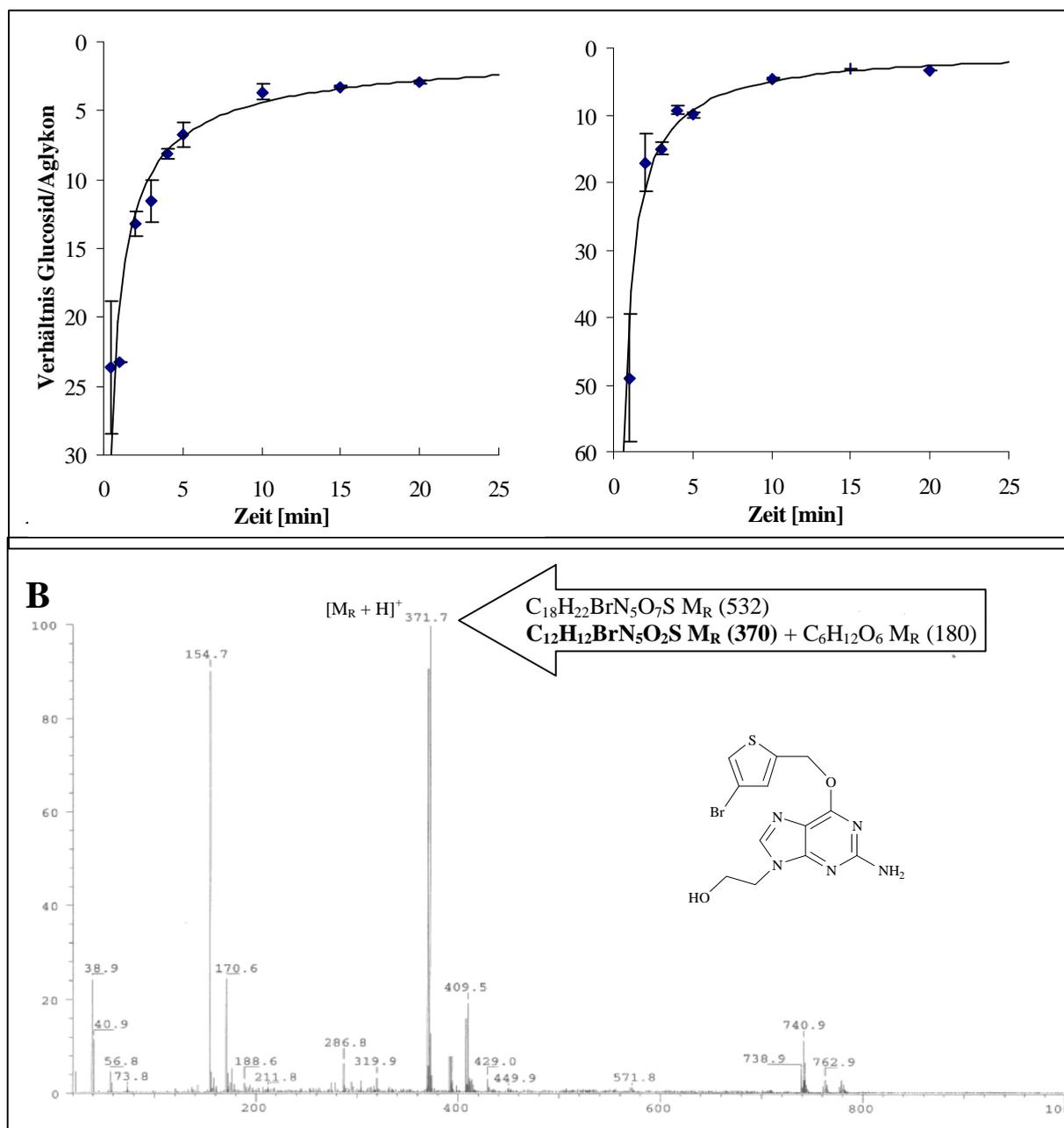


Abbildung 3.3-5 A: Enzymatische Spaltung von **39** mit einer Mandel- β -Glucosidase nach 0,5 min, 1 min, 2 min, 3 min, 4min, 5 min, 10, min, 15 min und 20 min. Auswertung der Signalverhältnisse bei 7 min im Verhältnis zum Produktsignal bei 3,5 min. Mittelwerte aus $n = 3 \pm$ SD. **B:** MS (ESI)-Spektrum des 20 min Wertes.

Anhand Abbildung 3.3-5 A wird deutlich, daß die maximale Geschwindigkeit der Hydrolyse von **39** während der ersten 4 min vorliegt und die Reaktion nach 10 min eine Sättigung zeigt.

Um das entstehende Produkt zu identifizieren wurde eine Probe des 20 min –Wertes mittels Massenspektrometrie (ESI) analysiert (Abbildung 3.3-5 B). **39** mit einer Molmasse von 532 konnte nicht mehr detektiert werden, wohingegen als Hauptsignal das Hydrolyseprodukt zu erkennen ist ($M_r = 370$).

Die Identifizierung des Produktes der Reaktion der β -Glucosidase mit **42** mußte aufgrund der niedrigen Wasserlöslichkeit von **42** nach einem modifizierten Schema erfolgen. Hierzu wurde eine Probe **42** mit einer Konzentration von 10 mg/ml in DMSO vorgelöst und in Phosphat-Puffer pH 6,0 verdünnt, bevor die β -Glucosidase zugesetzt wurde. Das Gemisch wurde mit Chloroform unterschichtet und sehr vorsichtig gerührt. Nach einer Stunde wurden die Phasen getrennt, das Lösungsmittel entfernt und die Rückstände der organischen Phase mittels ESI analysiert. Das Spektrum (Abbildung 3.3-6) läßt erkennen, daß auch hier das Hydrolyseprodukt detektiert werden kann. Im Vergleich zu **39** scheint jedoch ein geringerer Anteil des Produktes zu entstehen, da das Signal des Glucosides **42** weiterhin im Gesamtspektrum des ESI zu erkennen ist. In Abbildung 3.3-6 ist zur Verdeutlichung nur der Ausschnitt von 400 bis 500 m/ dargestellt.

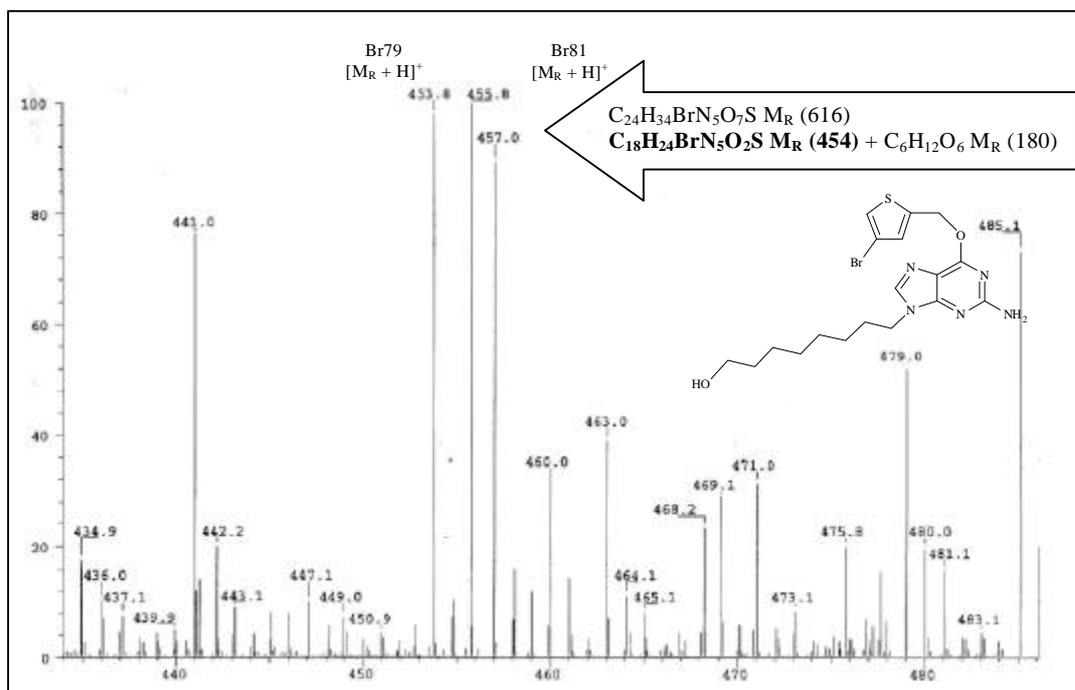


Abbildung 3.3-6 ESI-Spektrum der Hydrolyseprodukte von **42** nach Inkubation mit der Mandel- β -Glucosidase

3.4. *Molecular Modeling* der MGMT-Inhibitoren

Aus den *in vitro* Experimenten der MGMT-Inhibitoren ergaben sich einige interessante Fragestellungen, die mittels *Molecular Modeling* näher untersucht werden sollten. Der Ausdruck *Molecular Modeling* beschreibt "die Berechnung, Darstellung und Bearbeitung von dreidimensionalen Molekülstrukturen und ihren physikochemischen Eigenschaften" [Böhm et al. 1996]. In dieser Arbeit kamen verschiedene Methoden aus dem breiten Spektrum der Möglichkeiten des *Molecular Modeling* zur Anwendung. Es wurden geometrische Parameter der MGMT-Inhibitoren mittels *Moleküldynamik-Simulationen* berechnet, um damit einen *Molekülvergleich* durchzuführen (Kapitel 3.4.1). Mit Hilfe eines *Protein-Homologiemodells* (Kapitel 3.4.2) und später einer Kristallstruktur wurden die Protein-Ligand-Wechselwirkungen der MGMT-Inhibitoren mit der MGMT untersucht (Kapitel 3.4.3).

Bei allen Berechnungen wurden die Glucoside des O⁶-(4-Bromothienyl)-guanins betrachtet (**39** – **45**), da das Purin und das Monosaccharid in allen Fällen gleich sind, so daß Unterschiede der biologischen Aktivität auf die variierenden Spacer zurückzuführen sind.

Die Untersuchungen wurden in Zusammenarbeit mit Dr. C.W. von der Lieth der Molecular Modeling Gruppe der Abteilung Zentrale Spektroskopie des DKFZ durchgeführt.

3.4.1. Bestimmung der QSAR bezogen auf den Abstand Glucose-Purin

Die Unterschiede der Potenz der MGMT-Inhibitor-Glucoside (**39** - **45**) im MGMT-Test am Gesamtproteinextrakt zeigten eine Beziehung zwischen der Spacer-Länge und der MGMT-Hemmung. Mit steigender Spacer-Länge nahm die biologische Aktivität der Verbindungen deutlich zu. Da der Spacer den Abstand zwischen Purin und Glucose vermittelt, sollte im folgenden für jede Struktur die mittlere Distanz der beiden Molekülteile berechnet werden, um diese dann in Relation mit den entsprechenden IC₅₀-Werten zu setzen. Wegen der hohen Flexibilität der Alkyl-Spacer ist es notwendig, mögliche Faltungen des jeweiligen Moleküls zu berücksichtigen. Aus diesem Grund wurden Moleküldynamiksimulationen mit expliziten Wassermolekülen zum Abtasten des konformationellen Raums, den die jeweiligen Moleküle einnehmen können, durchgeführt.

Im Programm *HyperChem* (Hypercube Inc. 419 Phillip Street, Waterloo, Ont. N2L3X2, Canada) wird eine Startkonformation jeder Struktur generiert. Zur Berechnung der mittleren Abstände der Moleküle wurden zwei *Pseudoatome* im Zentrum des Purin-Ringsystems und im Zentrum des Glucopyranose definiert (**A**, Abbildung 3.4-1). Die Dateiformate werden in *Babel* umgewandelt, so daß diese von *Insight II* (MSI, Biosym, 9685 Scrabton Road, San

Diego, California, USA, 92121-3752) gelesen werden können und in einer tetragonalen Box [50 x 40 x 50 Å] plaziert, die mit 2740 Wassermolekülen gefüllt ist. Das Molekül bewegt sich frei über 1 ns bei einer Temperatur von 400 K und einer Dielektrizitätskonstante von 1 und einem *Cutoff* von 10 Å für die nicht bindenden Wechselwirkungen. Als Kraftfeld wurde *CFF91* verwendet. Nach einer *Minimierungsphase* mit maximal 1000 Schritten folgte eine *Equilibrierungsphase* von 50.000 Schritten, an die sich die sogenannten *Produktionsphase*

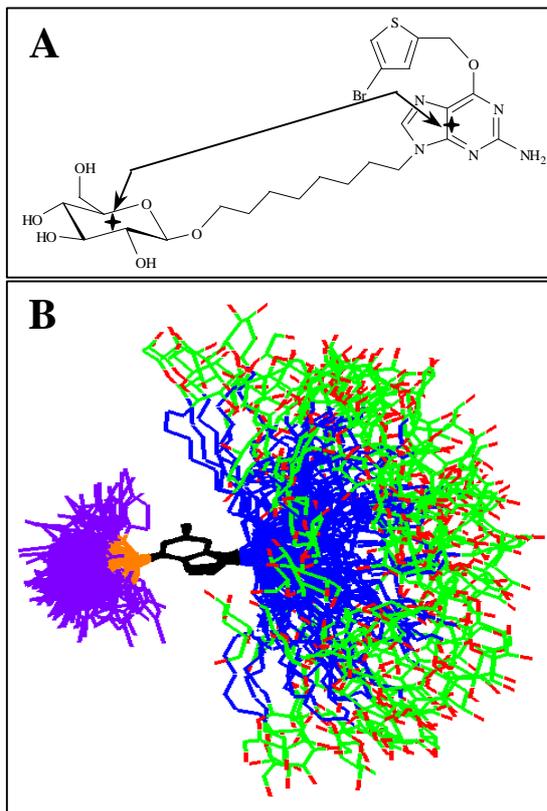


Abbildung 3.4-1 A: Darstellung des Abstands zwischen Purin und Glucose am Beispiel von **42**. Die Spitzen der Pfeile signalisieren die Pseudoatome, die der Abstandsberechnung (Tabelle 3.4-1) zu Grunde liegen. **B**: Überlagerung von 100 der Aufnahmen der Molekuldynamiksimulation.

anschloß, bei der in 1 fs langen Integrationsschritten 1.000.000 Bewegungen durchgeführt wurden.

Jede 1.000. Struktur wurde in einem Archiv gespeichert und anschließend für alle enthaltenen Konformationen des Archivs der Abstand zwischen den drei Pseudoatomen und die dazugehörigen statistischen Parameter bestimmt (Abbildung 3.4-1; Tabelle 3.4-1).

Die wichtigsten Kennzahlen der Abstandsberechnung waren der maximale- und der minimale Abstand sowie der Mittelwert aus $n = 1.000$. Darüberhinaus werden Varianz und Standardabweichung angegeben.

Bei Betrachtung der Mittelwerte fällt eine erstaunliche Parallele zu den biologischen Daten der Glucoside auf, da auch hier zwei große Stufen in der Reihe der Zahlenwerte gefunden werden.

Das Ethylglucosid (**39**) besitzt einen mittleren Abstand zwischen Purin und Glucose von 7,4 nm und eine IC_{50} im MGMT-Test am Proteinextrakt von HeLaS3-Zellen von 0,68 μM . Das Butyl- (**40**) und das Hexylglucosid (**41**), die beide eine IC_{50} von 0,45 μM aufweisen, besitzen mittlere Purin-Glucose-Abstände von 9,3 nm (**40**) und 9,2 nm (**41**). Die deutlich wirksameren Glucoside **42** und **43**, mit IC_{50} -Werte von 0,032 μM und 0,03 μM , ergaben mittlere Abstände von 13,2 nm und 12,8 nm.

Stellt man das Verhältnis der biologischen Aktivität gegenüber dem berechneten mittleren Abstand dar, so erhält man einen linearen Zusammenhang der Größen (Abbildung 3.4-2). Der Korrelationskoeffizient der Regressionsgleichung beträgt 0,9962.

MGMT-Inhibitor	Minimum [nm]	Maximum [nm]	Mittelwert [nm]	Varianz	Standardabweichung [nm]
39	3,8	8,7	7,4	0,8	0,9
40	4,1	11,2	9,3	1,8	1,4
41	4,0	13,7	9,2	6,6	2,6
42	8,2	16,3	13,2	2,2	1,5
43	4,8	17,3	12,8	6,4	2,5

Tabelle 3.4-1 Berechnung des Abstands Glucose-Purin basierend auf Molekulardynamiksimulationen mit *Discover* im *CCF91-Kraftfeld* bei 400 K in Wasser.

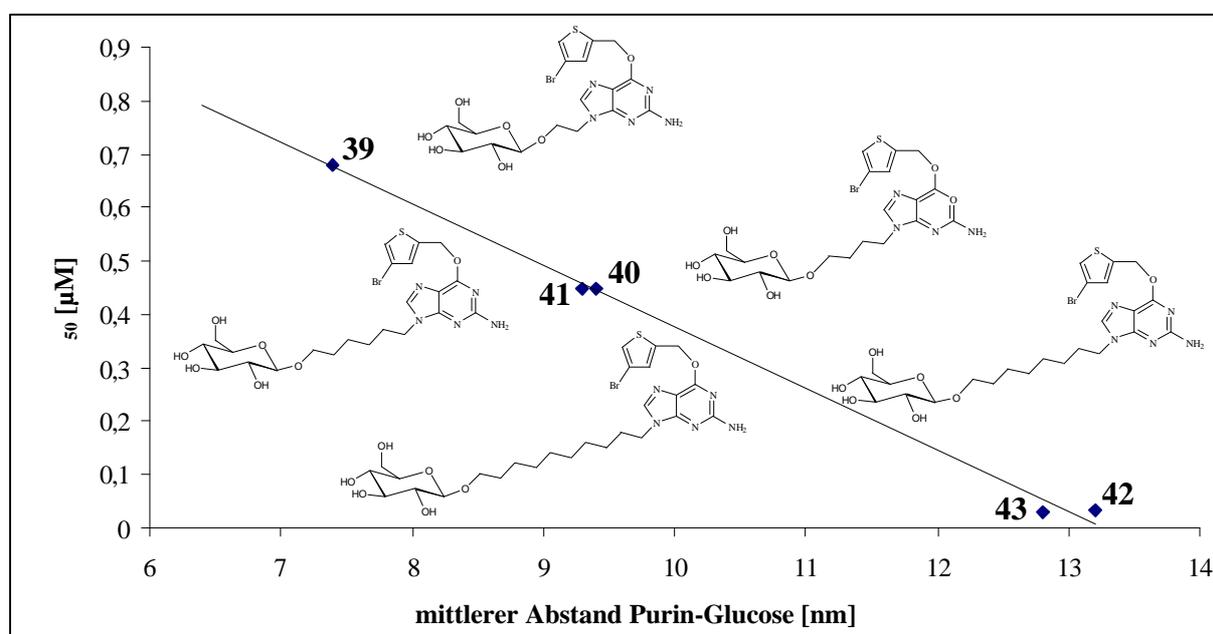


Abbildung 3.4-2 Korrelation IC_{50} im MGMT-Test am Proteinextrakt von HeLaS3-Zellen mit den berechneten mittleren Abständen der MGMT-Inhibitor-Glucoside **39** – **43**. Der Korrelationskoeffizient der linearen Regression beträgt 0,9962

3.4.2. Studien am Homologiemodell der humanen MGMT

Wegen der schlechten Zugänglichkeit des aktiven Zentrums, wurde die Hypothese aufgestellt, daß die N9-Substituenten der Glucoside (**33** – **45**) verantwortlich für die niedrigere Wirkung der substituierten gegenüber den nicht substituierten MGMT-Inhibitoren sind. Die gering wirksamen Glucoside mit den Ethyl-, Butyl- und Hexyl-Spacern (**33** – **41** und **45**) wären demnach sterisch anspruchsvoller, als die Glucoside mit den längeren Spacern (**41** – **44**). Die Glucose als äußerst polarer Molekülbestandteil hemmt die Affinität gegenüber der MGMT, jedoch kann ab einer bestimmten Spacerlänge der Saccharidteil weit genug aus dem Protein

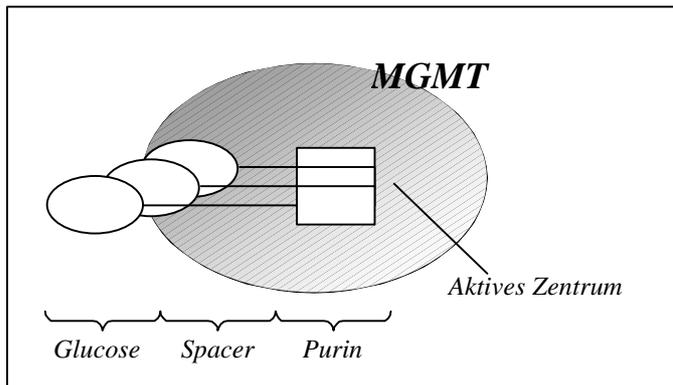


Abbildung 3.4-3 Schematische Darstellung der Interaktion des Homologiemodells der MGMT mit verschiedenen Glucosiden der MGMT-Inhibitoren. Die Verlängerung des Spacers führt zu Molekülen, bei denen die Glucose aus dem Protein "herausragt".

ragen, so daß die Interaktion nicht mehr negativ beeinflusst wird (Abbildung 3.4.3). Das einzige Modell der humanen MGMT, das zu diesem Zeitpunkt für *Docking-Experimente* zur Verfügung stand, war ein Homologiemodell [Wibley et al. 1995], das aufgrund der Kristallstruktur des C-terminalen Endes des Ada-Proteins von *Escherichia coli* abgeleitet wurde

[Moore et al. 1994]. Anhand dieses Modells erklärten Wibley und Mitarbeiter verschiedene ortsspezifische Mutagenese-Experimente (*site-directed mutagenesis*) und weiteten das Bild des molekularen Mechanismus des Alkyltransfers, sowie von Struktur-Wirkungsbeziehungen mit den MGMT-Inhibitoren aus. Vora und Mitarbeiter veröffentlichten auf dieser Basis 1998 ein Modell für die MGMT-DNA-Interaktion [Vora et al. 1998], das Veränderungen sowohl der MGMT- als auch der DNA-Struktur implizierte, die zum Alkyltransfer notwendig sind [Federwisch et al. 1997].

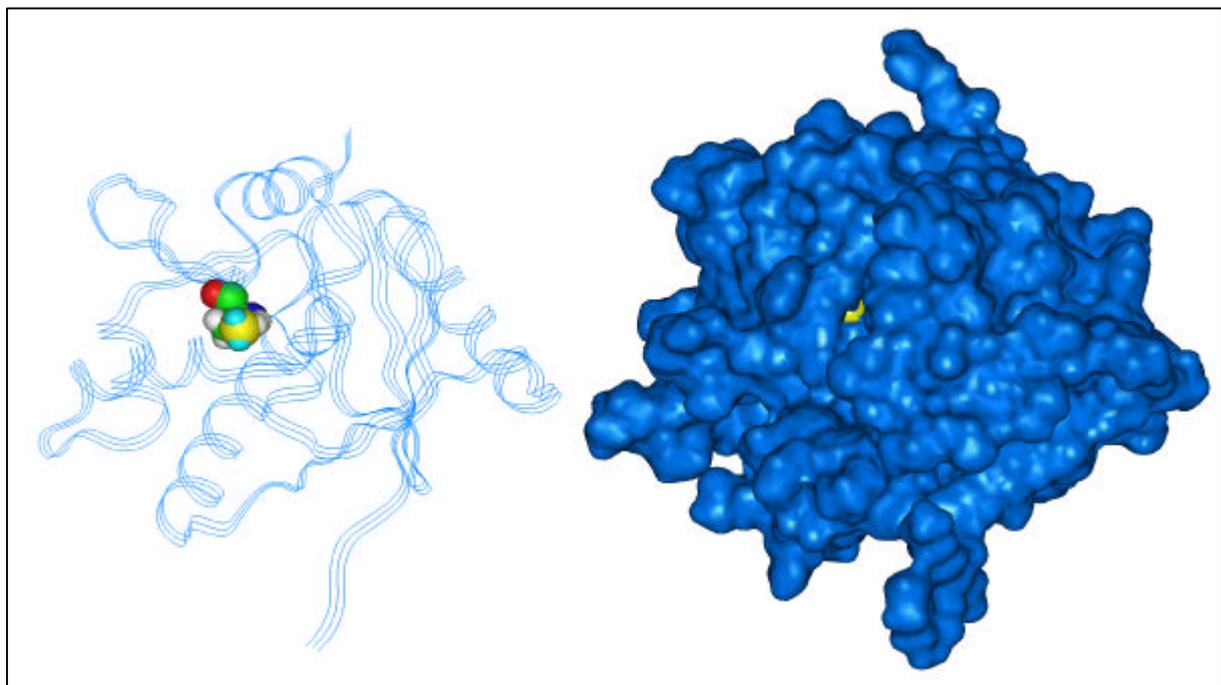


Abbildung 3.4-4 Rechts: Darstellung der wasserzugänglichen Oberfläche des Homologiemodells der humanen MGMT. Cys 145 gelb eingefärbt [Wibley et al. 1995]. Links: Rückgrat der Tertiärstruktur. Cys145 hervorgehoben

Wasser zugänglichen Oberfläche (*water accesible surface*, Erläuterung s.u.) läßt nur eine äußerst begrenzten Zugang zu Cys145 an dem der Alkylgruppentransfer stattfindet (Abbildung 3.4-4).

Dies schien die Hypothese zu bestätigen, daß der Abstand zwischen Purin und Spacer eine entscheidende Rolle spielt. Um die Annahme zu prüfen, sollten die unterschiedlichen Liganden in das Protein modelliert und mit diesen Komplexen Moleküldynamiksimulationen durchgeführt werden. Wegen der schlechten Zugänglichkeit wurde der Radius der Kugel zur Bestimmung der *water accesible surface* (s.o.) um 0,4 Å auf 1,0 Å gesenkt. Dadurch wird ein möglicher Eintrittskanal für die Pseudosubstrate sichtbar (Abbildung 3.4-4), durch den per Hand 4BTG in das aktive Zentrum modelliert wurde (Abbildung 3.4-5). An die gleichen Stelle wurden das Ethylglucosid (**39**) und Octylglucosid (**42**) des 4BTG plaziert und Moleküldynamiksimulationen entsprechend oben beschriebenen Protokoll durchgeführt. Um die Tertiärstruktur des Homologiemodells zu erhalten, wurde ein zusätzliches Potential angelegt, daß die Atome des Protein-Rückgrats mit einer Kraftkonstanten von 100 kcal/Å in seine ursprüngliche Lage zurückzwingt.

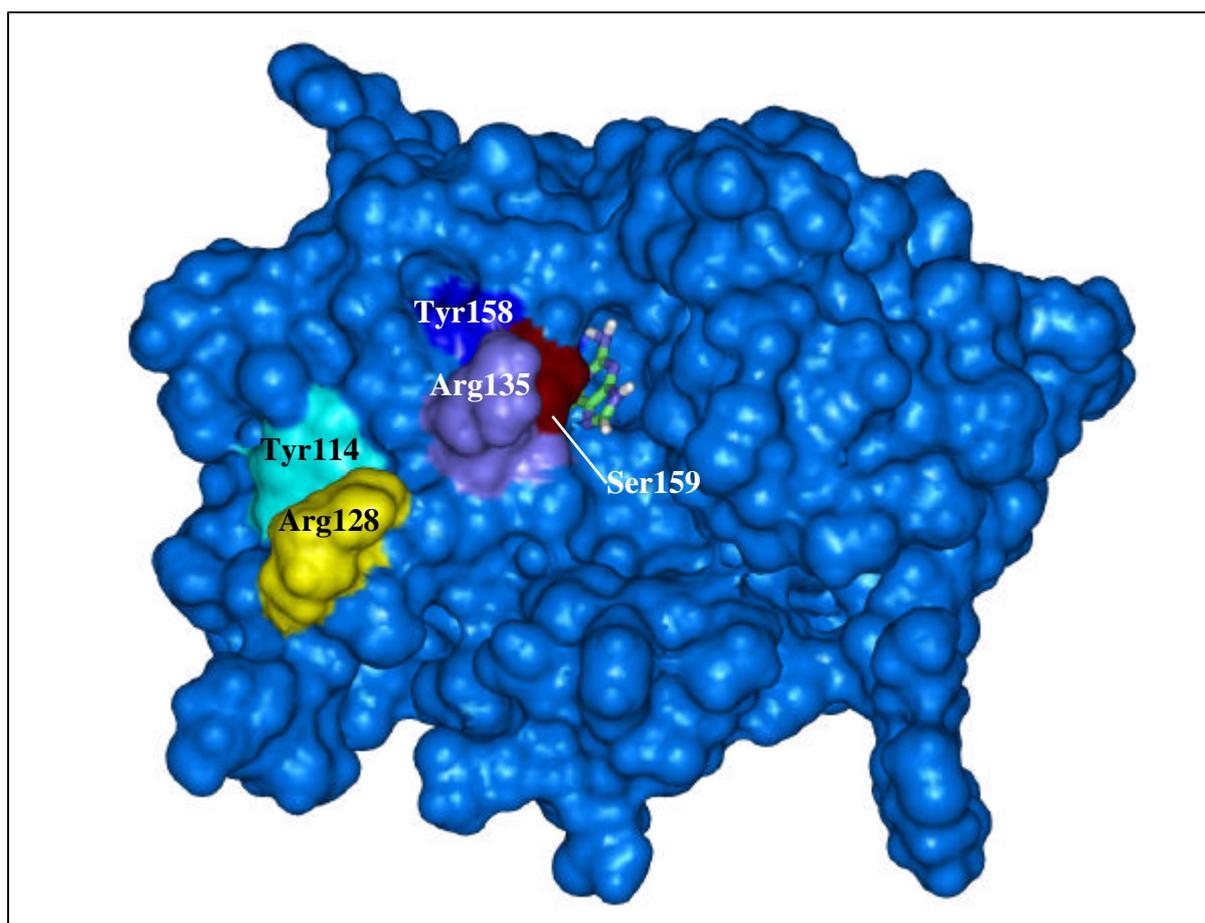


Abbildung 3.4-5 Darstellung des Komplexes des Homologiemodells der MGMT mit O⁶-(4-Bromophenyl)-guanin (4BTG).

Für den $\text{MGMT}_{\text{Homolgiemodell}}$: **39** – Komplex wird deutlich, daß der Glucoseteil sterisch gehindert im Eintrittskanal der Bindungstasche liegt. Beim $\text{MGMT}_{\text{Homolgiemodell}}$: **42** – Komplex hingegen ragt der Glucoseanteil weit aus dem Protein heraus. Der Purinteil besetzt hierbei die Bindungstasche, der Spacer den Eintrittskanal und die Glucose hat keinen nennenswerten Kontakt mit der MGMT.

Das Modell ist nicht in der Lage die Bedeutung gewisser Aminosäuren wie beispielsweise Tyr114 für die Interaktion der MGMT mit den Pseudosubstraten zu erklären [Goodtzova et al. 1998] und warum Substituenten am N7 der Guanin-Derivate zu einem vollständigen Wirkungsverlust führen können [Moschel et al. 1992].

Die gewonnenen Daten schienen trotzdem die These zu bestätigen, daß die Einführung eines Spacers mit einer optimierten Länge geeignet sei, die durch polare Substituenten entstehenden Nachteile zu umgehen

Die **“Wasser zugängliche Oberfläche“** (**water accesible surface**) wurde bereits 1973 von Lee und Richards eingeführt [Lee & Richards 1973]. Einfache Molekülmodelle orientieren sich an den Van der Waals-Radien der beteiligten Atome und stellen diese als Verbund von Kugeln dar. Bei kleinen Molekülen können solche Darstellungen zur Abschätzung der Molekülgröße dienen, geben jedoch nur unzureichend den Zusammenhang für makromolekulare Strukturen wieder, bei denen insbesondere auch Oberflächen im Inneren der Gesamtstruktur von Bedeutung sein können. Zur Betrachtung der Zugänglichkeit aller Oberflächen in komplexeren Systemen wird deshalb oftmals die **“Lösungsmittel zugängliche Oberfläche“**

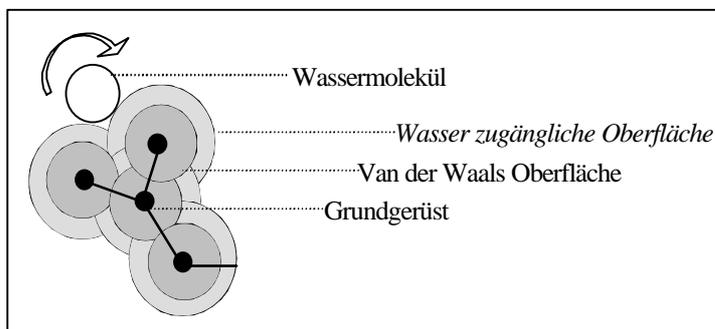


Abbildung 3.4-6 Bestimmung der Wasser zugänglichen Oberfläche (= *water accesible surface*). Ein Wassermolekül wird über die anhand der van der Waals-Radien dargestellte Molekülstruktur gerollt. Schwarz = Molekülstruktur definiert durch Lage der Atomkerne und Bindungen. Dunkelgrau = Van der Waals-Radien. Hellgrau = *Water accesible surface*.

(= *solvent accesible surface*) verwendet. Hierbei werden Lösungsmittelmoleküle als Kugeln mit einem bestimmten Radius dargestellt und über das zu untersuchende Molekül gerollt (Abbildung 3.4-7). Die Kugeln dringen entsprechend ihrer Größe nur bis zu einer gewissen Tiefe in das Molekül ein, wodurch sich anhand der Lage des Kugelzentrums eine neue Oberfläche definieren läßt. Soll Wasser als Lösungsmittel dienen, wird der Kugel ein Radius von 1,4 Å zugewiesen und die Oberfläche als *Wasser zugängliche Oberfläche* (= *water accesible surface*) bezeichnet [Böhm et al. 1996].

3.4.3. Studien an Kristallstrukturen der humanen MGMT

Anfang 2000 publizierten Wibley und Mitarbeiter die Röntgenstruktur der kristallisierten humanen MGMT [Wibley et al. 2000] und kurze Zeit später Daniels und Mitarbeiter die Röntgenstrukturen der methylierten- (MGMT_{Met}) und der benzylierten ($\text{MGMT}_{\text{Benz}}$) Form der MGMT [Daniels et al. 2000]. Die Koordinaten aller Strukturen wurden in der *PDB*-

Datenbank (*Protein Data Bank*) veröffentlicht, so daß im folgenden mit diesen Daten an der Beurteilung der Ergebnisse aus 3.4.1 und 3.4.2 weitergearbeitet wurde.

Die Röntgenstruktur zeigte, daß das aktive Zentrum im Gegensatz zum Homologiemodell von zwei Seiten zugänglich ist. Die Autoren schlagen einen Bindungsmodus für O6BG vor, der auf der systematischen Suche nach möglichen Bindungsstellen mittels einer *multiple copy simulation search* basierte.

Die 4BTG-Glucoside (**39** - **45**) wurden nach den Vorgaben von Wibley und Mitarbeitern in das aktive Zentrum modelliert und entsprechend dem in 3.4-2 beschriebenem Protokoll (Kapitel 3.4-2) für alle Liganden eine Simulation der MGMT(*IQNT*):Inhibitor-Komplexe durchgeführt. Um die Rechenzeiten zu verkürzen wurde lediglich das C-terminale Ende der MGMT (Residuen 83 – 176) verwendet, da das aktive Zentrum und alle für die Reaktion bedeutenden Aminosäuren innerhalb dieser Sequenz liegen. In den Koordinaten nicht vorhandene H-Atome wurden einem pH von 7,0 entsprechend ergänzt und die Atomtypen sowie Partialladungen für das *CFF91* Kraftfeld über automatisierte Vorgänge zugeordnet. Während der *Produktionsphase* wurde jede 1.000. Aufnahme in einem Archiv gespeichert, um anhand dieser Daten im folgenden alle Berechnungen durchzuführen.

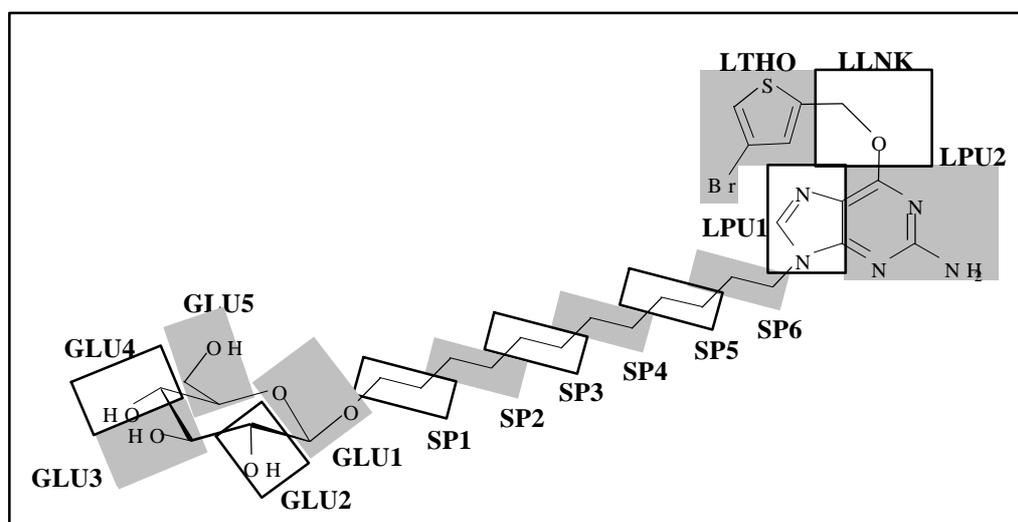


Abbildung 3.4-7 Unterteilung der Molekülgruppen für die Interaktionsanalyse am Beispiel des 12-[O⁶-(4-Bromothienyl)-guan-9-yl]-dodecyl-β-D-glucoside (**44**). Alle Glucoside (**39** - **45**) sind analog aufgeteilt, wobei **SP1** immer die der Glucose benachbarte Ethylenbrücke des Spacer ist.

Die Liganden (**39** - **45**) wurden dazu in Molekülgruppen unterteilt, um eine detaillierte Interaktionsanalyse zu erhalten (Abbildung 3.4-7) Mittels der *Enclose*-Option von *Discover* wurden die nicht-bindenden Interaktionen der Molekülgruppen mit der MGMT und den Wassermolekülen innerhalb eines Radius von 5 Å um das aktive Zentrum (Cys145) ermittelt. Alle 1.000 Strukturen wurden auf diese Weise untersucht und die Daten in eine Protokoll-

Datei abgelegt. Nach Beendigung der Simulation wurden aus dieser Datei mittels des Programms *Pavado* die wichtigsten Informationen automatisch extrahiert [Frank 2000]. Die *CAT*-Software ist in der Lage aus diesen tabellarischen Ergebnissen Interaktionsmatrizes und statistische Werte zu generieren [Frank 2000].

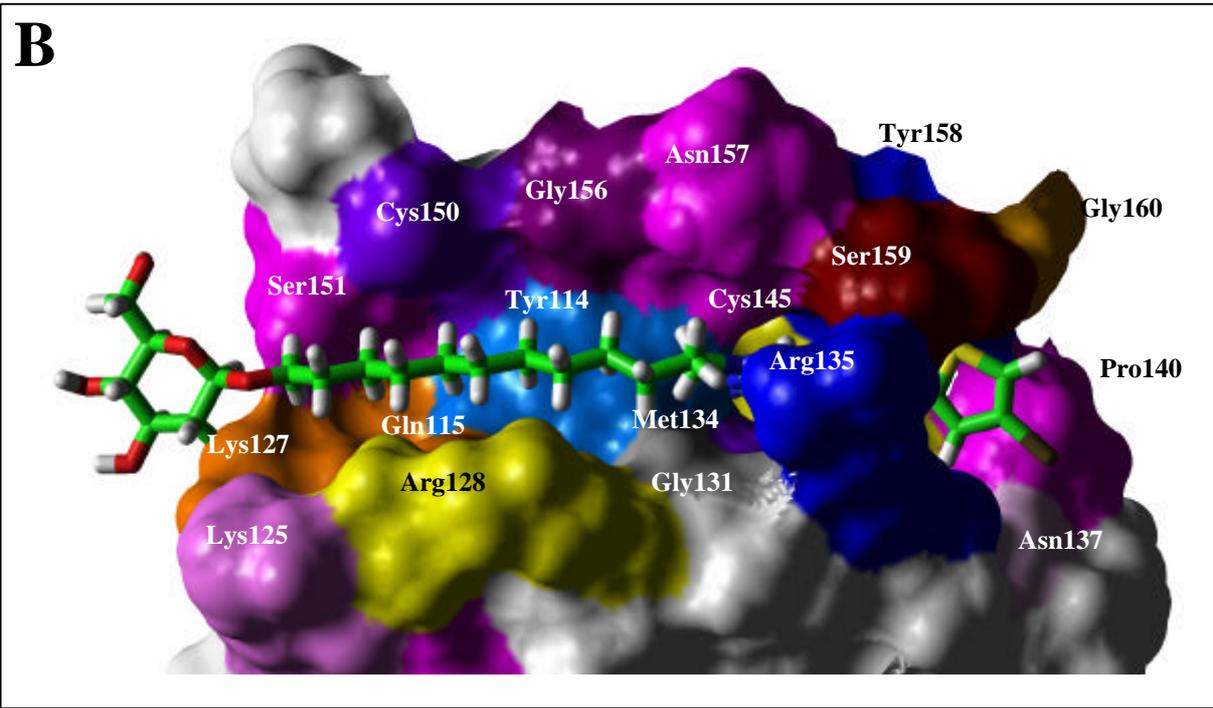
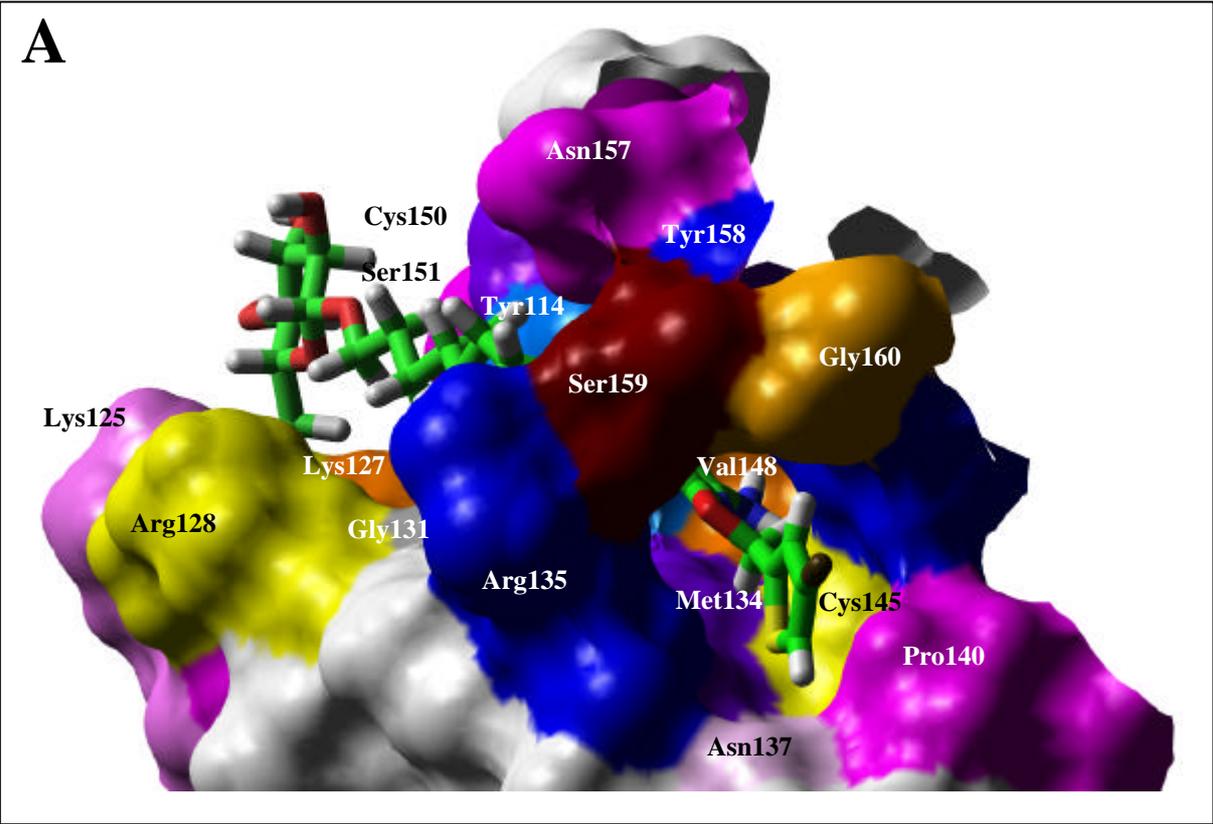
Die Auswertung gab einige entscheidenden Anhaltspunkte über die an der Interaktion der Pseudosubstrate mitbeteiligten Residuen und über den Charakter der Struktur-Wirkungsbeziehung. Aufgrund der entstandenen Datenfülle soll jedoch im folgenden lediglich auf die wichtigsten Phänomene eingegangen werden. Die detaillierten Tabellen mit allen Interaktionsenergien sind im experimentellen Teil dieser Arbeit (Kapitel 5.4) aufgeführt. Im ersten Teil der Betrachtungen wurden die Einzelwerte der Molekülgruppen jedes Glucosids (**39** - **45**) in Summen zusammengefaßt, die dem O⁶-substituierten Purin (^a Summe 1 - 4), dem Spacer (^b Summe 5 - 10), dem Spacerglucosid (^d Summe 5 - 15) und dem Gesamtmolekül (^c Summe 1 -15) entsprechen (Tabelle 3.4-2).

Mit 57,3 % (**43**) bis 87 % (**45**) von der berechneten Gesamtsumme, besitzt das O⁶-substituierte Purin den größten Anteil an der berechneten Interaktionsenergie. Im Ethylglucosid (**39**) und im Butinylglucosid (**45**) wurden die niedrigsten Werte mit -15,7 kcal und -16,6 kcal gemessen, wohingegen alle anderen Glucoside im Bereich von -21,3 kcal bis -23,7 kcal liegen. Die Summen der berechneten Interaktionsenergien für den Spacer, das Spacerglucosid und das Gesamtmolekül steigen vom Ethylglucosid **39** bis zum Decylglucosid **43** kontinuierlich an, während das Dodecylglucosid (**44**) und das Butinylglucosid (**45**) in allen Fällen niedrigere Werte besitzen. Der Spacer besitzt mit Werten von -2,1 kcal (**39**) bis -9,1 kcal (**43**), bzw. -7,5 kcal (**44**) und -1,6 kcal (**45**) einen Anteil von 8,4 % (**45**) bis 24,5 % (**43**) an der berechneten Gesamtinteraktionsenergie. Gemeinsame Betrachtung der Glucose und des Spacers, läßt ein ähnliches Bild entstehen, mit Werten von -5,8 kcal (**39**) bis -15,8 kcal (**43**), bzw. -9,1 kcal (**44**) und -2,5 kcal (**45**).

Auch die für den Glucosemolekülteil ermittelten Werte nehmen für **39** bis **43** zwischen -3,7 kcal und -6,7 kcal zu, wohingegen **44** und **45** lediglich -1,7 kcal, bzw. -1,0 kcal aufweisen.

Seite 105: Tabelle 3.4-2 Interaktionsanalysen der 4BTG-Glucoside 39 – 45 mit dem C-terminalen Ende der MGMT (*IQNT*). Alle Werte in kcal. Aufteilung in Molekülgruppen gemäß Abbildung 3.4-7. ^{a-d} Ergebnisse zusammengefaßt für das O⁶-substituierte Protein^a, den Spacer^b, das Gesamtmolekül^c und den Spacer + Glucose^d.

	LTHO (1)	LLNK (2)	LPU1 (3)	LPU2 (4)	^a Σ 1-4	SP6 (5)	SP5 (6)	SP4 (7)	SP3 (8)	SP2 (9)	SP1 (10)	^b Σ 5-10	GLU1 (11)	GLU2 (12)	GLU3 (13)	GLU4 (14)	GLU5 (15)	^c Σ 1-15	^d Σ 5-15
(39) 	-5,5	-2,3	-4,2	-3,8	-15,7						-2,1	-2,1	-0,8	-0,2	-0,3	-0,4	-2,1	-21,5	-5,8
(40) 	-6,5	-3,9	-5,9	-5,1	-21,5					-1,7	-2,3	-4,0	-0,8	-1,1	-0,3	-0,3	-2,0	-30,0	-8,5
(41) 	-8,6	-3,6	-6,2	-5,0	-23,4				-2,1	-1,6	-1,9	-5,7	-1,1	-0,9	-0,4	-0,3	-1,5	-33,2	-9,8
(42) 	-7,2	-4,4	-6,3	-5,8	-23,7				-1,5	-1,3	-2,0	-6,4	-2,0	-0,4	-0,2	-0,3	-2,0	-34,9	-11,3
(43) 	-6,7	-3,8	-6,0	-4,8	-21,3	-2,1	-1,9	-2,3	-1,9	-0,9		-9,1	-2,5	-2,1	-1,1	-0,3	-0,8	-37,2	-15,8
(44) 	-7,5	-3,7	-4,9	-4,6	-20,7	-1,2	-1,5	-1,6	-1,1	-1,1	-1,0	-7,5	-0,5	-0,7	-0,0	0,0	-0,4	-29,3	-8,7
(45) 	-6,8	-2,5	-3,8	-3,6	-16,6					-0,7	-0,9	-1,6	-0,3	-0,2	-0,0	-0,0	-0,5	-19,1	-2,5



Da sich auf diese Weise kein quantitativer Zusammenhang finden ließ, der die biologische Aktivität hinreichend erklären konnte, wurden die Werte auf andere Weise zusammengefaßt. Die Molekülteile der Glucoside wurden dazu in zwei Gruppen unterteilt: Die zum Spacer und der Glucose zugehörigen Teile (*SPI-6*, *GLU1-5* = **b**, Abbildung 3.4-8) und das Gesamtmolekül (**a**). Es wurden einige Residuen herausgegriffen, auf die sich die

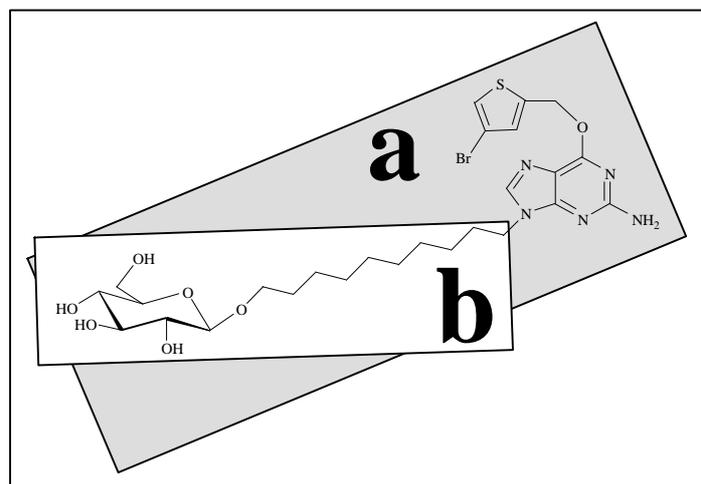
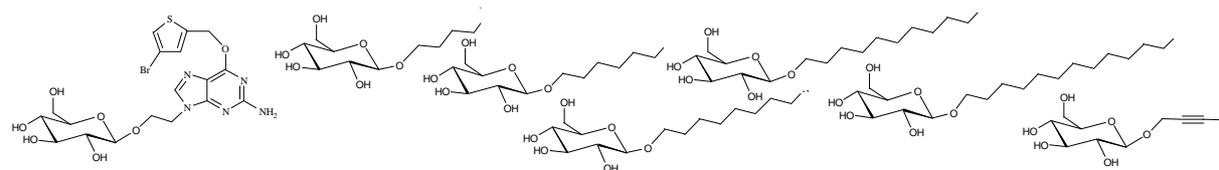


Abbildung 3.4-9 Zusammenfassung der Molekülteile zur Berechnung der Interaktionsenergien (Tabelle 3.4-3) von **43** mit der MGMT.

Betrachtungen fokussieren sollten.

In Abbildung 3.4-9 sind für das Octylglucosid (**A**) und das Dodecylglucosid (**B**) exemplarisch zwei Aufnahmen der Komplexe dargestellt. Sie verdeutlichen, welche Aminosäuren an der Interaktion beteiligt sind und veranschaulichen wie die MGMT-Inhibitoren mit der MGMT interagiert.

In Tabelle 3.4-3 sind alle Aminosäuren aufgenommen, die in einer der Interaktionsanalysen für eine der Interaktionen einen Zahlenwert größer 1,0 kcal aufwiesen (Tabelle 3.4-3). Die Tabelle macht deutlich, welche Residuen maßgeblich für die Interaktion der MGMT mit dem Gesamtmolekül **a** und den Molekülteilen **b** verantwortlich sind. Mit -3,9 kcal bis -6,8 kcal hat Tyr158 die größten Interaktionsenergien mit den Glucosiden, Arg135 mit -2,1 kcal bis -4,7 kcal und Tyr114 mit -0,6 kcal bis 5,0 kcal die zweitgrößten- gefolgt von Asn157 und Arg128 mit Werten von -0,9 kcal bis -3,8 kcal. Darüber hinaus spielen für die Affinität Gly131 und Met134 bei allen Glucosiden, Gln115 und Ala127 bei den Glucosiden **40** bis **44**, bzw. **45** eine Rolle. Von Ser152 wurden lediglich Interaktionsenergien mit den Glucosiden **43** und **44** gemessen. Die Interaktionen der Molekülteile **b** mit den aufgeführten Aminosäuren sind deutlich geringer. Während Tyr158, Asn157, Arg 135, Met134 und Gly131 in erster Linie mit dem O⁶-substituierten Purin interagieren, sind die weiter vom reaktiven Zentrum entfernten Aminosäuren wie Tyr114 und Arg128 hauptsächlich, Gln115, Ala127 und Ser 152 ausschließlich mit dem Spacer oder dem Glucoseteil in Kontakt. Die Summen der Interaktionsenergien steigen kontinuierlich für die Substanzen **39** bis **43**, von -5,5 kcal bis 1,3 kcal an und liegen für das Dodecylglucosid (**44**) und das Butinylglucosid (**45**) bei -7,8 kcal, bzw. -2,3 kcal.



	39		40		41		42		43		44		45	
	(a)	(b)	(a)	(b)	(a)	(b)	(a)	(b)	(a)	(b)	(a)	(b)	(a)	(b)
TYR 114	-0,6	-0,3	-3,6	-2,7	-2,6	-2,0	-3,7	-3,1	-4,3	-3,3	-5,0	-3,9	-1,0	-0,3
GLN 115			-0,7	-0,7	-0,6	-0,6	-1,1	-1,1	-2,8	-2,8	-1,5	-1,5		
ALA 127			-1,3	-1,3	-1,4	-1,4	-1,6	-1,6	-0,7	-0,7	-0,5	-0,5	-0,1	-0,1
ARG 128	-1,4	-1,4	-1,4	-1,6	-3,0	-3,0	-3,8	-3,8	-1,8	-1,8	-0,9	-0,9	-0,9	-0,9
GLY 131	-0,6	-0,5	-1,8	-0,1	-0,5	-0,4	-1,2	-0,4	-1,4	-0,7	-1,1	-0,1	-1,1	-0,4
MET 134	-0,4		-2,5		-2,7		-2,6		-2,2		-1,9		-2,1	
ARG 135	-4,7	-2,6	-3,0	-0,1	-2,3	-0,5	-3,9		-2,1	-0,1	-2,8		-2,2	-0,6
SER 152									-1,3	-1,3	-0,2	-0,2		
ASN 157	-1,0	-0,3	-2,1	-1,0	-0,9	-0,2	-2,9	-0,7	-1,0	-0,3	-2,0	-0,7	-1,4	
TYR 158	-5,4	-0,4	-6,4	-0,4	-6,8	-0,5	-6,0		-5,6	-0,3	-5,7		-3,9	
Σ	-14,1	-5,5	-23,0	-7,9	-20,9	-8,6	-27,0	-10,8	-23,3	-11,3	-21,6	-7,8	-12,7	-2,3

Tabelle 3.4-3 Summen der berechneten Interaktionsenergien ausgewählter Residuen von MGMT (*IQNT*) mit den zusammengefaßten Molekülteilen gemäß Abbildung 3.4-9. Alle Werte in kcal.

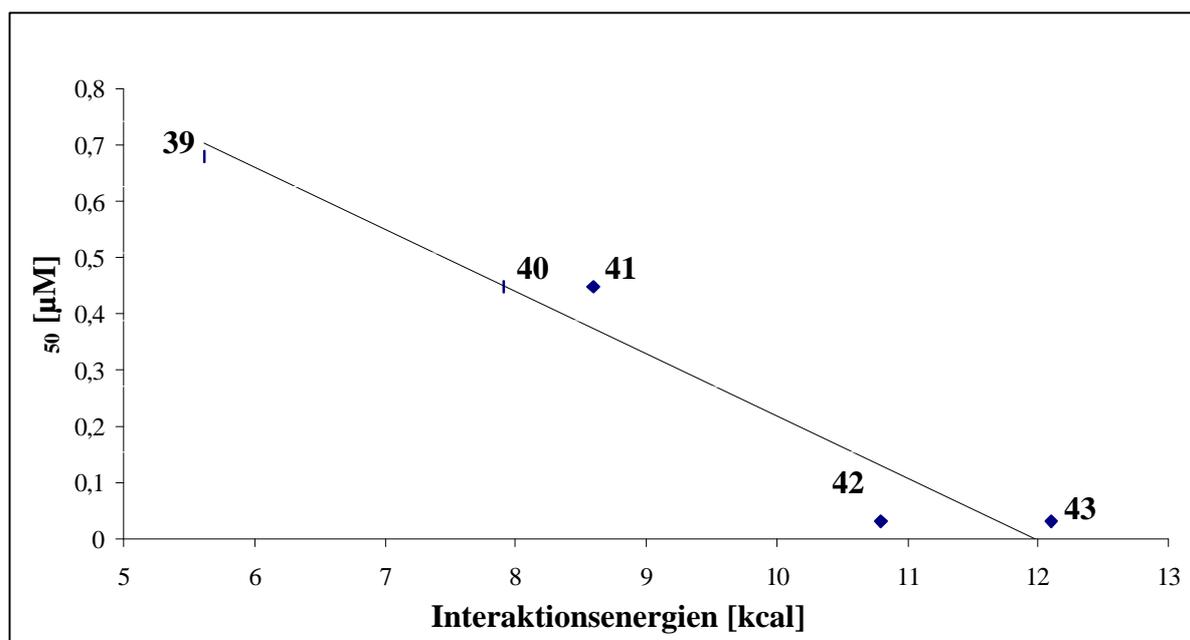


Abbildung 3.4-10 Korrelation der Summen b der 4BTG-Glucoside 39 - 44 aus Tabelle 3.4-3 mit den IC₅₀ für die MGMT-Hemmung ermittelt am Gesamtproteinextrakt von HeLaS3-Zellen. Der Korrelationskoeffizient der linearen Regression beträgt 0,9457.

Auch bei dieser Analyse wird eine Tendenz erkenntlich, die der biologischen Aktivität entspricht und in einer linearen Beziehung ausgedrückt werden kann. Berücksichtigt man lediglich die Substanzen **39** bis **43**, so liegt der Korrelationskoeffizient bei 0,9547. Das Dodecylglucosid des 4BTG (**44**) interagiert aufgrund seiner Länge nur noch teilweise mit den untersuchten Aminosäuren im Abstand von 5 Å um Cys145. Das Butinylglucosid (**45**) weist aufgrund der dreifach ungesättigten Bindung im Spacer vollkommen andere Eigenschaften auf.

Während diese Simulationen durchgeführt wurden, publizierten Daniels und Mitarbeiter die Koordinaten der Kristallstrukturen des benzylierten und des methylierten Produkts der MGMT [Daniels et al. 2000] (siehe oben).

Dadurch bot sich die Möglichkeit die Zuverlässigkeit des Simulationsprotokolls zu prüfen. Das Rückgrat (*backbone*) der 1.000 Strukturen des Archivs wurde hierzu über die Kristallstruktur des benzylierten Produkts gelegt (*superimposed*) und der mittlere Abstand zwischen dem Thiophenring des 4BTG und dem Benzylring des Benzylethers der MGMT berechnet. Der Wert von 1.02 Å (Standardabweichung 0.33, Min: 0.29 Å, Max: 1,71 Å) zeigt, daß der Ligand 4BTG mit großer Wahrscheinlichkeit eine mit O6BG vergleichbare Orientierung innerhalb der Bindungstasche einnimmt. Deutlicher wird dies anhand Abbildung 3.4-11, in der das Rückgrat einer Aufnahme des Archivs des **39**:MGMT-Komplexes mit dem Rückgrat der benzylierten MGMT (*PDB-Entry 1EH8*) überlagert ist.

Zur genaueren Charakterisierung wurde der Abstand zwischen dem Benzylring und den Aminosäuren Pro140, Thr158, Ser159 und Gly160 und der Abstand des Thiophenrings mit diesen Residuen bestimmt (Tabelle 3.4-4).

	<i>Benzyl</i> :MGMT ^a	<i>Thiophen</i> :MGMT ^b
Pro 140	4.50	5.90 (0.83)
Thr 158	5.11	5.44 (0.42)
Ser 159	4.70	5.77 (0.46)
Gly 160	5.20	5.67 (0.83)

Tabelle 3.4-4 Abstände [Å] zwischen ^a dem an Cys145 gebundenen Benzylring in der Kristallstruktur (PDB-entry 1EG8) und ^b dem Thiophenring des 4BTG während der Moleküldynamiksimulation des **39**:MGMT Komplexes (Standardabweichungen in Klammern).

Anhand des Vergleichs in Tabelle 3.4-4 wird deutlich, das die Position des Thiophenrings des 4BTG weitestgehend mit den experimentell ermittelten Daten für den Benzylether

übereinstimmt. Die Abweichungen sind mitunter darauf zurückzuführen, daß der Aromat des Thioethers eine Position einnehmen kann, die für den Aromaten des O⁶-substituierten Purin nicht möglich ist.

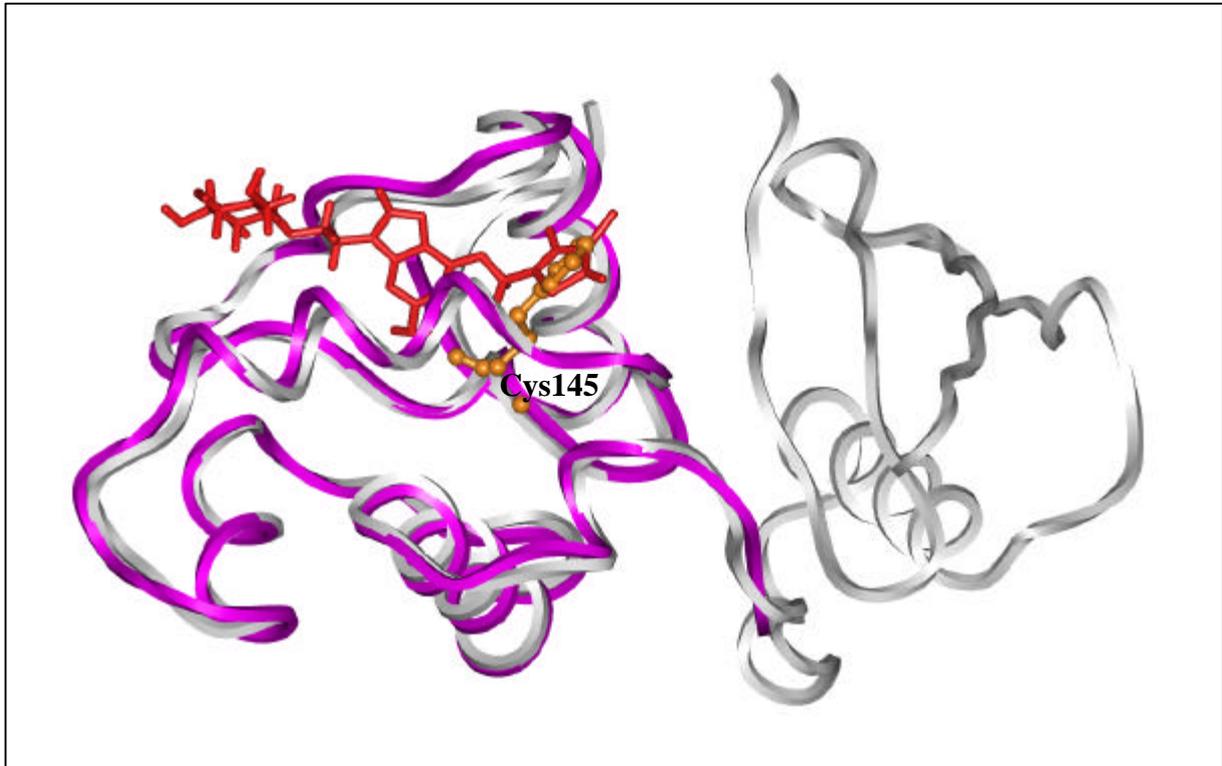


Abbildung 3.4-11 Überlagerung des Rückgrats des benzylierten MGMT-Produkts (= weiß; Benzylether = orange)(PDB-Entry: 1EH8), mit dem Rückgrat der MGMT des 39:MGMT-Komplex einer Aufnahme des Archivs der Moleküldynamiksimulation (= pink; 39 = rot)

3.5. Biologische Aktivität der PARP-Inhibitoren

PARP-Inhibitoren besitzen zahlreiche mögliche experimentelle und therapeutische Anwendungen (siehe Kapitel 1.4.2). Zur Evaluation ihrer biologischen Aktivität wird eine auf Immunfluoreszenz basierende Methode eingesetzt, die an lebenden Zellen oder an Zellysaten durchgeführt werden kann. Sowohl der Test an perforierten Zellen, als auch der Zelltest beruhen auf der Verwendung zweier Antikörper (Abbildung 3.5-1).

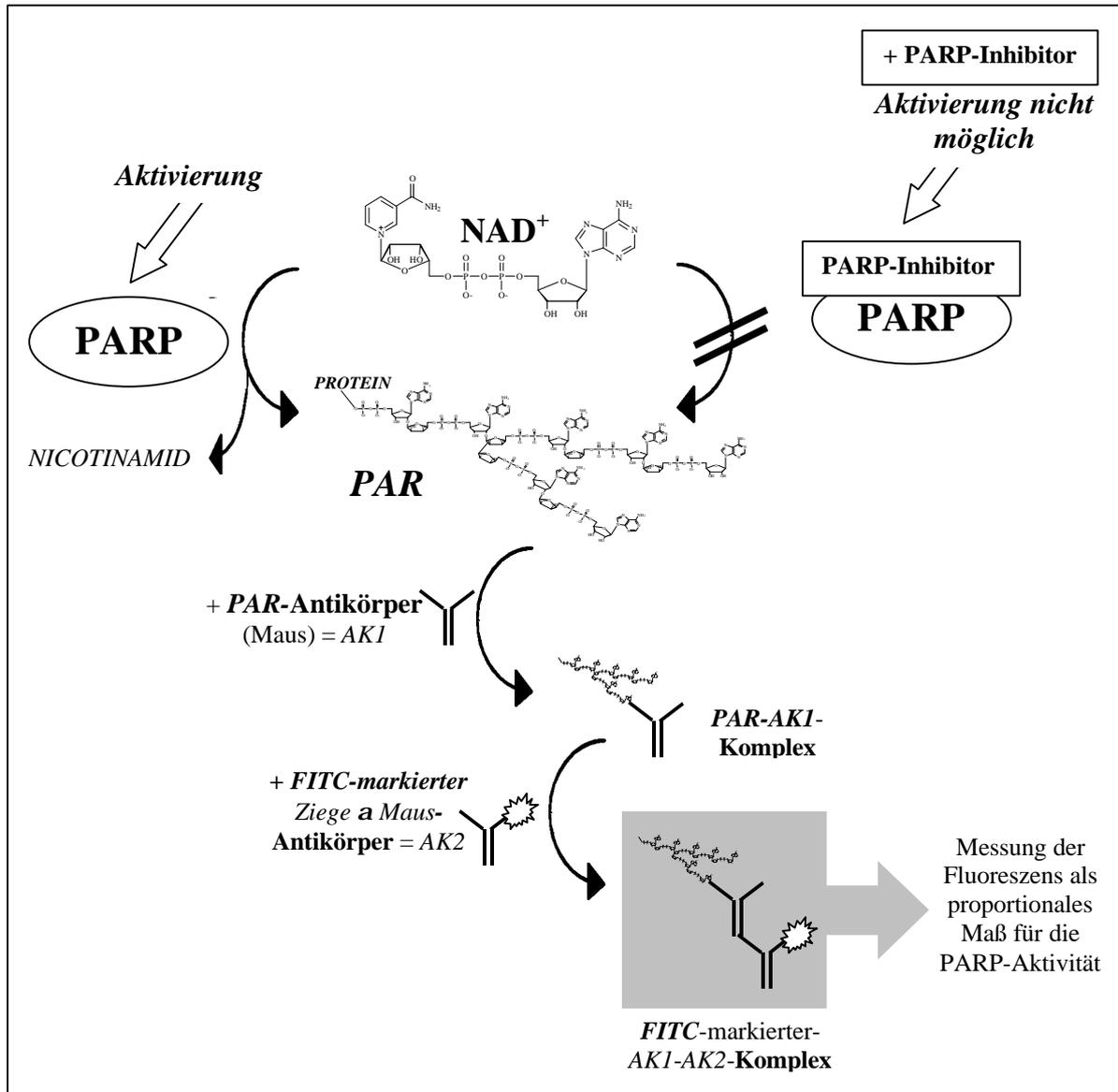


Tabelle 3.5-1 Schematische Darstellung des Tests zur Messung der PARP-Aktivität. Ohne Inhibitor wird nach Aktivierung das Substrat NAD⁺ (Nicotinamid-adenin-dinucleotid) von der PARP zu Poly-(ADP-Ribose) (= PAR) polymerisiert, wobei Nicotinamid freigesetzt wird. PAR kann mittels des ersten aus der Maus gewonnenen monoklonalen Antikörpers (= AK1) gebunden werden. Gegen diesen ist ein zweiter Antikörper (= AK2) aus der Ziege gerichtet, der eine Fluoreszenzmarkierung (FITC= Fluoresceinisothiocyanat) trägt. Nach mehreren Waschschrinen wird die gebundene Fluoreszenz gemessen.

Die beiden Antikörper werden sequentiell nach Aktivierung der PARP eingesetzt, um das gebildete Produkt photometrisch zu quantifizieren. Der Erstantikörper komplexiert mit den durch PARP-Aktivität gebildeten Poly-(ADP-Ribose) = **PAR**-Polymeren (= **AKI**). Der Zweitantikörper (= **AK2**) trägt einen Fluoreszenzmarker (**FITC** = Fluoresceinisothiocyanat) und ist gegen **AKI** gerichtet. Nach einer Reihe von Waschschritten wird die Fluoreszenz gemessen und dient als Maß für die Aktivität der PARP. Zur Bestimmung der Potenz von PARP-Inhibitoren wird deren Fähigkeit zur Hemmung des Enzyms in Relation zur nicht mit PARP-Inhibitor behandelten Kontrolle ausgewertet werden.

Die Untersuchungen zur Bestimmung der biologischen Aktivität der PARP-Inhibitoren wurden in Zusammenarbeit mit dem Steinbeistransferzentrum für Angewandte Biologische Chemie, Heidelberg/Mannheim durchgeführt.

3.5.1. Untersuchungen an permeabilisierten C4I-Zellen

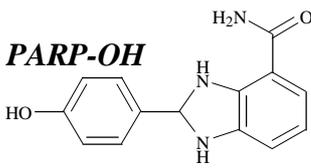
Bei C4I-Zellen handelt es sich um eine adhärent wachsende Zervixkarzinomzelllinie, die über die ATCC (American Tissue Culture Corporation) bezogen wurde.

Für den PARP-Test an perforierten Zellen werden diese mit eiskaltem Ethanol fixiert und an der Luft getrocknet. Nach der Rehydratisierung mit PBS wird mit den PARP-Inhibitoren und NAD^+ für 1 h inkubiert. Aktive PARP bildet während dieses Zeitraumes aus NAD^+ Poly-(ADP-Ribose). Nach Zusatz des **AKI** für 1 h und **AK2** für 1 h erfolgt die Messung der Fluoreszenz. Die IC_{50} entspricht der Konzentration des PARP-Inhibitors, bei der 50 % der PARP-Aktivität in den unbehandelten Zellen gehemmt werden.

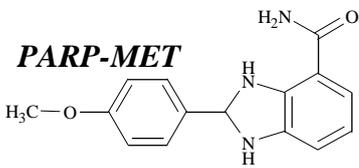
In den Versuchen wurden das Ethylglucosid (**56**) und Butylglucosid (**57**) des PARP-Inhibitors 2-(4'-hydroxyphenyl)-1-*H*-benzimidazol-4carboxamid (**PARP-OH**) sowie der entsprechende Methylether 2-(4'-hydroxyphenyl)-1-*H*-benzimidazol-4carboxamid (**PARP-MET**) mit jeweils fünf Konzentrationen von 100 μM bis 10 nM eingesetzt.

Der potenteste Inhibitor in diesem Versuch (Abbildung 3.5-2) war **PARP-MET** mit einer IC_{50} von 3,9 μM . **PARP-OH** und dessen Butylglucosid liegen in einem vergleichbaren Bereich mit IC_{50} -Werten von 11,8 μM , bzw. 11,2 μM . Das Ethylglucosid besitzt die höchste IC_{50} von 15,3 μM . Die IC_{50} -Werte weichen nur geringfügig voneinander ab, insgesamt liegen allesamt im gleichen Größenordnungsbereich.

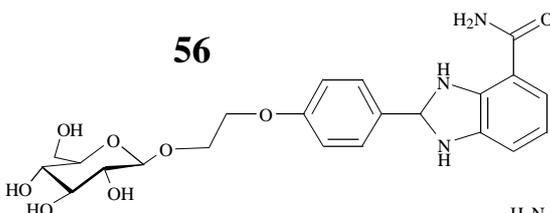
PARP-Inhibitor	IC ₅₀ [μM]
<i>PARP-OH</i>	11,8
<i>PARP-MET</i>	3,9
56	15,3
57	11,2



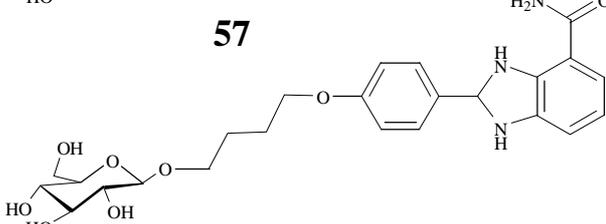
PARP-OH



PARP-MET



56



57

Tabelle 3.5-2 IC₅₀ [μM] der PARP-Inhibitoren *PARP-OH*, *PARP-MET*, **56** und **57** an permeabilisierten C4I-Zellen.

3.5.2. Untersuchungen an intakten C4I-Zellen

Nachdem die Fähigkeit der Glucoside (**56** und **57**) zur Hemmung der PARP-Aktivität gezeigt werden konnte, sollte ein weiterer Versuch beweisen, ob die deutlich wasserlöslicheren Substanzen in der Lage sind, auch in lebenden Zellen über Zellmembranen hinweg an ihren Wirkort zu gelangen. Konfluent wachsende C4-I Zellen wurden hierzu für 30 min mit den PARP-Inhibitoren präinkubiert. Anschließend wird die PARP mittels Wasserstoffperoxid für 10 min aktiviert. Durch die Einwirkung des oxidativen Stresses, werden DNA-Schädigungen induziert, die eine gesteigerte PARP-Aktivität zur Folge haben. Die Zellen werden fixiert und analog dem Versuch an perforierten Zellen die gebildete *PAR* quantifiziert (siehe Abbildung 3.5-1). Die Auswertung erfolgt im Vergleich zur nicht mit Inhibitor behandelten Kontrolle wobei die IC₅₀ als Ausdruck der PARP-Inhibition berechnet wird.

Als Inhibitoren wurden die beiden Glucoside **56** und **57** in fünf Konzentrationen von 10 nM bis 100 μM eingesetzt. Neben dem üblicherweise verwandten Vollmedium wurde ein analoger Versuch mit glucosefreiem Medium durchgeführt, um den Zuckertransportern das natürliche Substrat (β-D-Glucose) zu entziehen. Dadurch kann möglicherweise ein stärkerer Transport der Glucoside, bzw. niedrigere IC₅₀-Werte beobachtet werden [Schaper 1997].

PARP-Inhibitor	Medium ^a	IC ₅₀ [μM]
56	+	15,6
57	+	8,0
56	-	8,4
57	-	7,0

Tabelle 3.5-1 IC₅₀ der PARP-Inhibitoren **56** und **57** an C4I-Zellen [μM]. ^a RPMI-Medium = “ + “; RPMI-Medium, glucosereduziert = “ - “.

Die IC₅₀-Werte der beiden PARP-Inhibitoren **56** und **57** an lebenden C4I-Zellen liegen im Bereich der entsprechenden IC₅₀-Werte an perforierten C4I-Zellen. **56** hat in diesem Versuch eine IC₅₀ von 15,6 μM gegenüber 15,3 μM an permeabilisierten C4I-Zellen. Die IC₅₀ von **57** lag im ersten Versuch bei 11,2 μM und beträgt hier 8,0 μM. In glucosefreiem Medium werden IC₅₀ von 8,4 μM (**56**) bzw. 7 μM (**57**) gemessen, die demzufolge lediglich geringfügig niedriger sind.

3.6. Biologische Aktivität der SWITCH-Inhibitoren

Die Aktivität von SWITCH-Inhibitoren wird mittels *CD*-Messungen (siehe Kapitel 7.1.) oder einem Zelltest an HeLaT4-Zellen (siehe Kapitel 7.2.) evaluiert.

Bei *SWITCH* handelt es sich um eine Konformationsänderung des HIV-Hüllproteins gp120 von einer β -Faltblatt-Struktur zu einer Helix, die notwendig ist, damit HIV an den CD4-Rezeptor der potentiellen Zielzellen binden kann. Ohne den kooperativen, fast stufenlosen Übergang des *SWITCH*, vergleichbar mit einem Schalter, ist keine Bindung an den Rezeptor und somit auch keine Inkorporation und Infektion der Zelle möglich. Im Normalfalle findet der *SWITCH* bei Überschreitung einer bestimmten Polaritätsgrenze statt, was physiologisch der Annäherung des Virus an die lipophile Zellmembran entspricht. Experimentell wird diese Situation durch kontinuierliche Verringerung der Polarität des Solvens simuliert, wodurch mit geeigneten Methoden der kooperative, nicht stufenweise Übergang von β -Faltblatt in die helikale Konformation gemessen werden kann. Als Modell für den *SWITCH* können anstelle des vollständigen gp120-Proteins ein 44-meres Peptid (LAV44), ein 38-meres Peptid (LAV38) oder ein 15-meres Peptid (LAV15) aus der Primärstruktur von gp120 eines HIV-Stammes verwendet werden [Reed & Kinzel 1991]. Diese beinhalten den Teil des Hüllproteins, durch den der *SWITCH* vermittelt wird und mit dem die entscheidenden Strukturmerkmale hinreichend dargestellt werden können.

Sowohl die *CD*-Messungen, als auch die gp120-CD4-Bindungsstudien wurden in Zusammenarbeit mit der Abteilung Pathochemie des Deutschen Krebsforschungszentrums in Heidelberg durchgeführt.

3.6.1. CD-Messungen der SWITCH-Inhibitoren

Die *CD* (= engl.: *CIRCULAR-DICHROISM*)-Messungen erlauben eine erste Einschätzung der Potenz der SWITCH-Inhibitoren. Es handelt sich dabei um ein Verfahren, bei dem die Absorption von zirkulär polarisiertem Licht in einer Probe gemessen wird. *CD*-Messungen werden in der Analytik von Proteinen eingesetzt, um die Verteilung bestimmter struktureller Merkmale in einer Probe zu bestimmen. Der Ausdruck erfolgt als mittlere Elliptizität der Residuen (= engl.: mean residue ellipticity [θ_{mr}]) gegen die Wellenlänge (Abbildung 3.6-1) und ist ein Maß für den Anteil der Sekundärstrukturen der Probe.

Abbildung 3.6-1 verdeutlicht, daß *CD*-Messungen eine valide Methodik sind, um den *SWITCH* auf einfache Weise darzustellen. Während bis 60 % TFE ausschließlich die β -

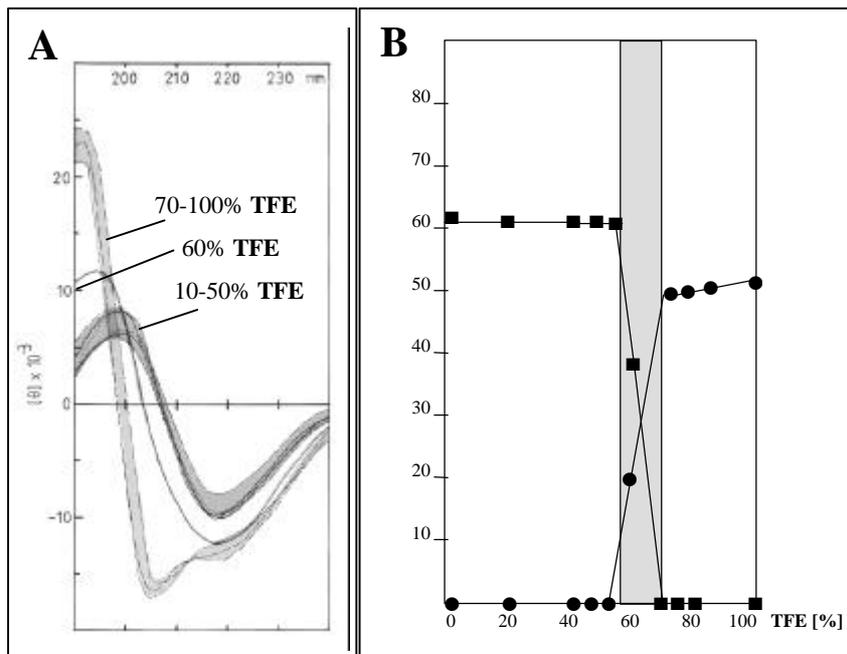


Abbildung 3.6-1 CD-Messung des LAV15-Peptides in Mischungen von Trifluorethanol (TFE) und Wasser [0 % bis 100 % TFE]. **A:** 0 % - 50 % TFE = β -Faltblatt-Struktur; 60 % TFE = SWITCH 70 % - 100 % helikale Struktur. **B:** Reed & Kinzel 1993: Sekundär-Struktur [%]. (■) β -Faltblatt; (●) Helix. Grau unterlegter Bereich = SWITCH.

Faltblatt-Struktur vorliegt wird ab etwa 70 % TFE nur noch die helikale Struktur gefunden. Lediglich der schmale Bereich zwischen 60 % und 70 % TFE ist durch Übergangszustände gekennzeichnet.

Bei Inhibition des SWITCH in einer CD-Messung mit LAV15 wird ein Verlust des kooperativen Charakters beobachtet (Abbildung 3.6-2) [Reed & Kinzel 1991 und 1993]. Die CD-Spektren machen deutlich, daß eine Reihe von Übergangszuständen der Konformationen zwischen 20 % und 80 % TFE eingegangen werden. Ist die Konzentrationen zur Inhibition nicht ausreichend oder die Struktur des Inhibitors ungeeignet, wird weiterhin der SWITCH

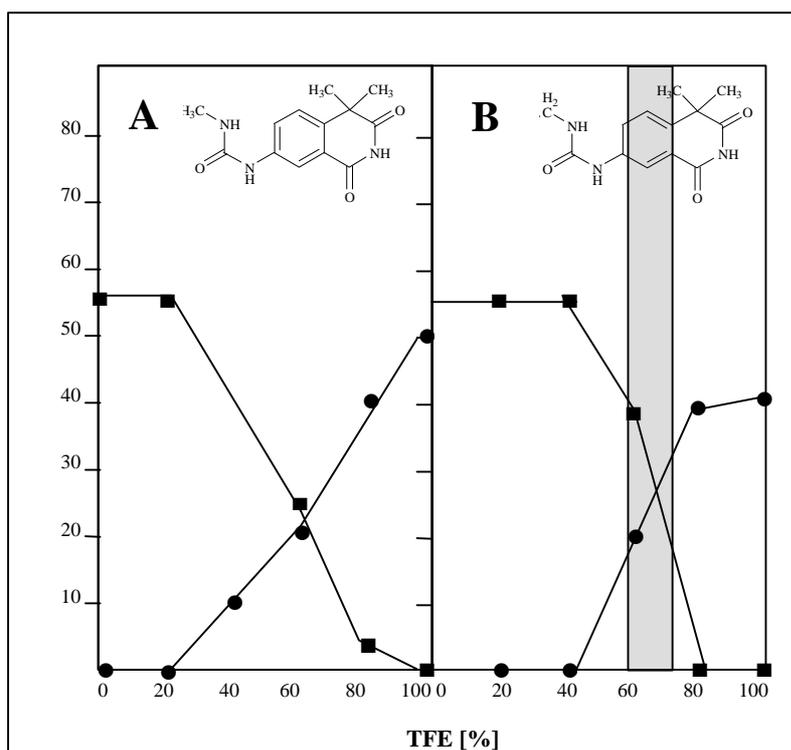


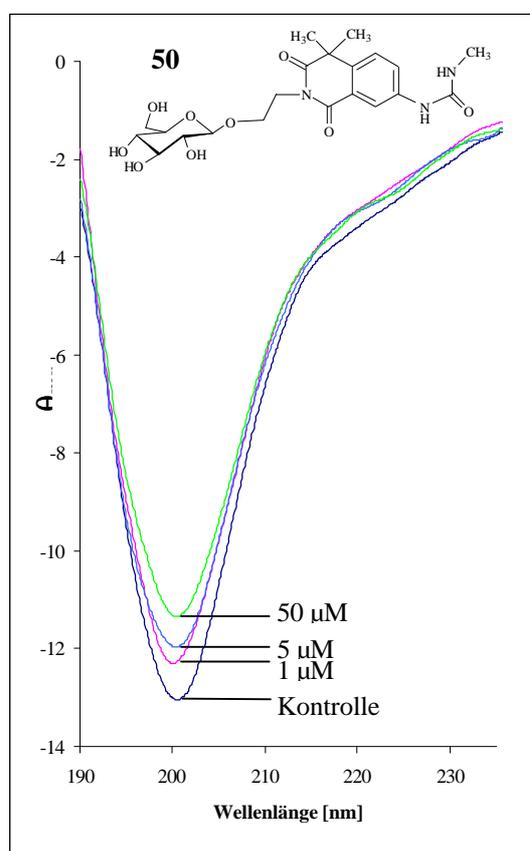
Abbildung 3.6-2 Auswertungen der CD-Spektren des LAV15-Peptides – Wasser-TFE (Trifluorethanol)-Mischungen nach Zusatz der SWITCH-Inhibitoren N-Methyl-N'-(4,4-dimethyl-1,2,3,4-tetrahydro-1,3-dioxo-7-isoquinoliny)-harnstoff (**A**) und N-Ethyl-N'-(4,4-dimethyl-1,2,3,4-tetrahydro-1,3-dioxo-7-isoquinoliny)-harnstoff (**B**). Sekundärstrukturen dargestellt durch: (■) β -Faltblatt; (●) Helix. Während **A** in der eingesetzten Konzentration in der Lage ist, den kooperativen Charakter der Konformationsänderung bei Erhöhung des TFE-Gehalts zu hemmen, wird bei **B** weiterhin das Auftreten der SWITCH im Bereich von 60 % TFE beobachtet (grau unterlegt).

(Abbildung 3.6-2 **B**) anstelle des fließenden Übergangs beobachtet (Abbildung 3.6-2 **A**) [Reed & Kinzel 1991].

Das Verfahren wurde anfangs mit LA15 durchgeführt, doch mußten verschiedene Konzentrationen des SWITCH-Inhibitors in allen Wasser-TFE-Mischungen gemessen werden, um eine quantitative Aussage treffen zu können. Die Verwendung des LAV44-Peptid und des LAV38-Peptides hingegen erlauben auch nach wenigen Messungen einer Konzentrationsreihe des SWITCH-Inhibitors eine Dosis-Wirkungs-Beziehung abzuleiten [von Stosch et al. 1996].

Durch Zusatz potenter SWITCH-Inhibitoren wird hierbei eine Verschiebung des Absorptionsminimums des LAV44-Peptides beobachtet, ohne daß die Polarität des Lösungsmittels schrittweise verändert werden muß, da der Einfluß auf das Rotationsvermögen mit der Fähigkeit zur Hemmung des *SWITCH* korreliert. Durch Auftragen der Verschiebungen des Absorptionsminimums des LAV44-Peptides nach Zusatz verschiedener Konzentrationen eines SWITCH-Inhibitors kann die Konzentrationsabhängigkeit der Wirkung abgeleitet werden. Die Methode eignet sich sehr gut als erstes Screening, um unterschiedliche SWITCH-Inhibitoren bezüglich ihrer Potenz auf einfache Weise zu vergleichen.

In den ersten Versuchen wurden die Inhibitoren 2-[2'-(N-Methyl-N'-(4,4-dimethyl-1,2,3,4-



tetrahydro-1,3-dioxo-7-isochinoliny)-harnstoff)]-ethyl-1-β-D-glucosid (**50**) und 4-[2'-(N-Methyl-N'-(4,4-dimethyl-1,2,3,4-tetrahydro-1,3-dioxo-7-isochinoliny)-harnstoff)]-butyl-1-β-D-glucosid (**51**) eingesetzt, um zu prüfen, ob die Glucosidierung einen entscheidenden Einfluß auf die Interaktion mit LAV38 besitzt. In einer ersten Messung von 100 µM **50** wurde eine Verschiebung des Minimums bei 200 nm um 10 % beobachtet. Der Vergleichswert mit 100 µM des nicht glucosidierten Harnstoff-Derivates liegt bei 11 %.

Abbildung 3.6-3 Fourier-Transformiertes CD-Spektrum von LAV38 [100µg/ml] nach Zusatz von 1 µM, 5µM, 50 µM **50** in Wasser. Zur besseren Übersichtlichkeit sind nur die Werte von drei Konzentrationen dargestellt.

50 ist demnach in der Lage, mit LAV38 in ähnlicher Weise wie bereits bekannte Inhibitoren zu interagieren. Im Gegensatz zu den nicht glucosidierten Substanzen wurde **50** jedoch nicht in Methanol aufgenommen, sondern auch die 10 mM Stammlösung konnte mit Wasser hergestellt werden. Durch Verdünnung von **50** zu Konzentrationen von 100 μM , 50 μM , 10 μM , 5 μM und 1 μM und anschließender CD-Messung konnte die Konzentrationsabhängigkeit der Konformationsänderung von LAV38 gezeigt werden (Abbildung 3.6-3).

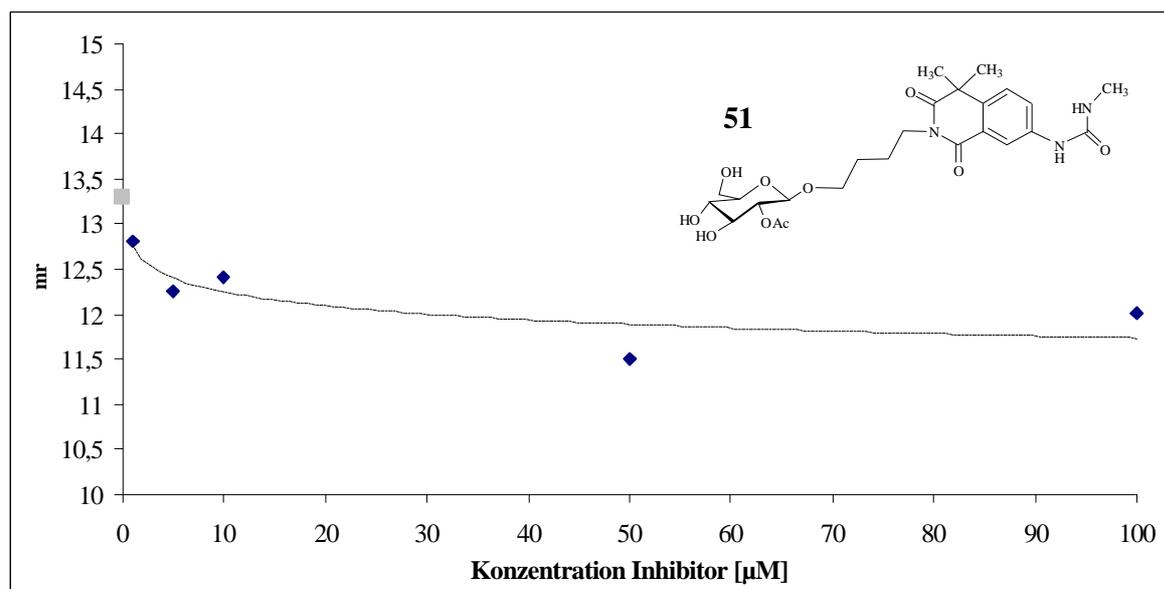


Abbildung 3.6-4 Graphische Darstellung der entsprechenden Daten aus Abbildung 3.6-2 für **51**.

Stellt man die Verschiebungen graphisch gegen die Konzentration dar, so läßt sich die Potenz zur besseren Vergleichbarkeit der Inhibitoren quantifizieren. Hierzu wird eine logarithmische Regression der Daten durchgeführt und deren Funktionsgleichung im weiteren zur Berechnung der Kenngröße verwendet (Abbildung 3.6-4). Gegenüber der Verschiebung der unbehandelten Kontrolle wird der $\text{IC}(\text{CD})_{50}$ -Wert als Ausdruck der Konzentration bei der die halbmaximale Aktivität theoretisch erreicht wird, errechnet.

Für **50** ergibt sich ein $\text{IC}(\text{CD})_{50}$ -Wert von 1 μM für **51** von 2 μM . Diese Werte liefern einen ersten Anhaltspunkte darauf, daß **50** und **51** eine Affinität gegenüber dem 38-mer-LAV-Peptid besitzen und **50** dabei wirksamer als **51** ist. Um genauere Daten bezüglich der SWITCH Hemmung zu erhalten, wurden für diese und die zwei weiteren Glucoside der *gp120-CD4* Bindungsversuch an HeLaT4-Zellen durchgeführt.

3.6.2. *gp120-CD4-Bindungsversuch mit HeLaT4-Zellen*

Zur Evaluation der Potenz der SWITCH-Inhibitoren kann außer den CD-Messungen (s.o.) ein *gp120-CD4-Bindungsversuch* eingesetzt werden. CD4-exprimierende-Zellen (HeLaT4) werden dazu mit dem [^{14}C]-LAV-Peptid (siehe Kapitel 1.6.4) und einem potentiellen SWITCH-Inhibitor inkubiert. Durch Hemmung des kooperativen Charakters der Konformationsänderung des Peptides wird die Bindung an den CD4-Rezeptor der HeLa-Zellen verhindert. Nach einer Reihe von Waschschrinen kann die gebundene Radioaktivität im Szintillationszähler quantifiziert werden. In den Kontrollen wird die höchste Radioaktivität zu messen sein, da in diesen Proben die maximale Bindung des [^{14}C]-LAV-Peptid stattfindet. In Abhängigkeit von der Potenz und der Konzentration des Inhibitors wird eine der Hemmung proportional verringerte Radioaktivität in den weiteren Proben gemessen. In Abbildung 3.6-5 ist der Ablauf schematisch dargestellt.

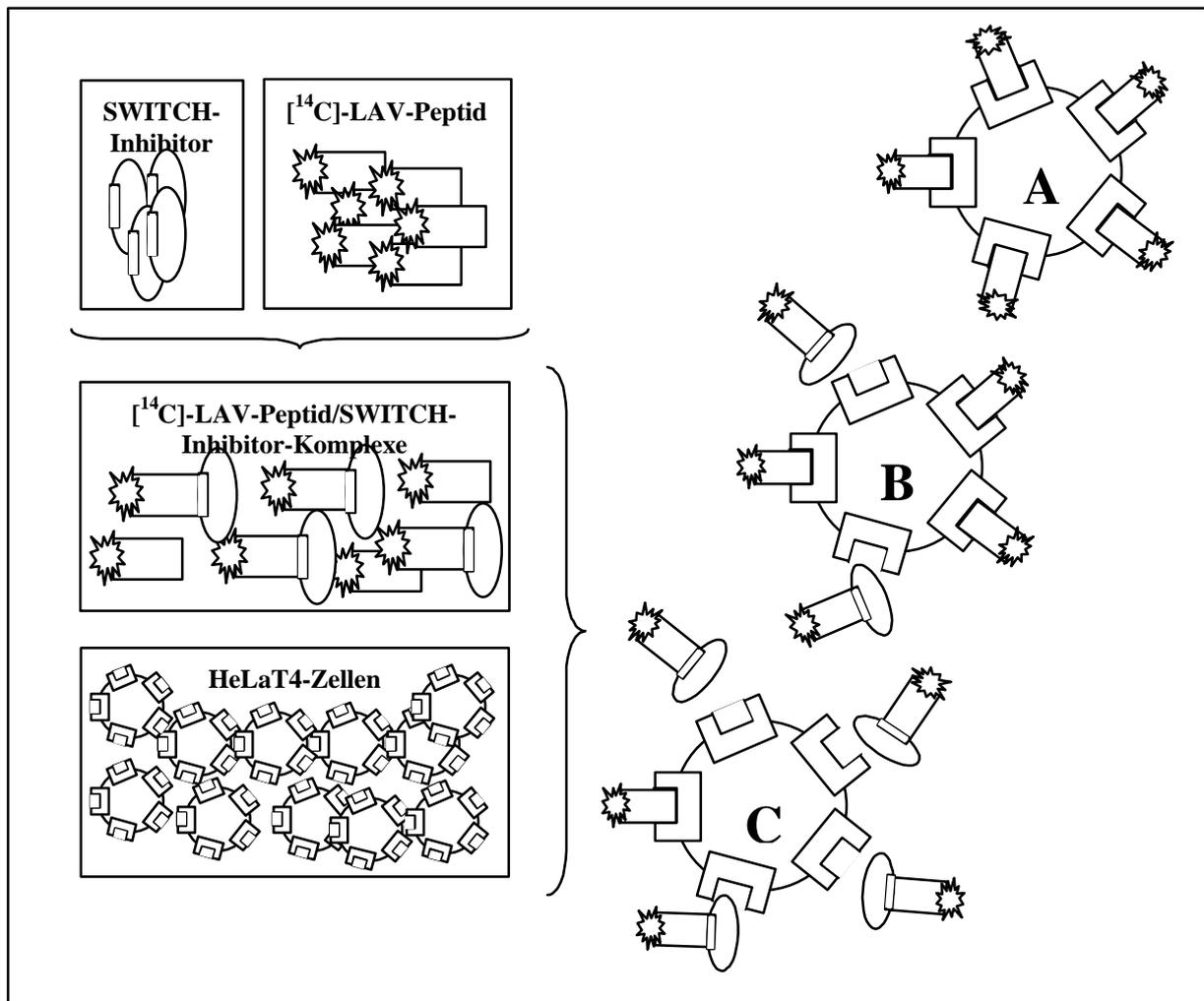


Abbildung 3.6-5 Schematische Darstellung des *gp120-CD4-Bindungsversuches*. Durch Bindung an den Inhibitor kann das [^{14}C]-LAV-Peptid nicht an den CD4-Rezeptor der HeLaT4-Zellen binden. Gegenüber dem Kontrollwert (A) wird in Abhängigkeit von der Potenz und der Konzentration des Inhibitors eine proportional verringerte Bindung gemessen (B und C). Siehe auch Erläuterungen im Text.

Das LAV-Peptid und der Inhibitor bilden Komplexe, die nicht mehr an den Rezeptor der Zellen binden können. Gegenüber der Kontrolle (**A**) kann der SWITCH-Inhibitor den zur Bindung notwendigen *SWITCH* des [¹⁴C]-LAV15-Peptids teilweise verhindern. In Abhängigkeit von Konzentration und Affinität des SWITCH-Inhibitors wird ein vergleichsweise geringer Teil (**B**) oder ein größerer Teil (**C**) der Bindung des [¹⁴C]-LAV15-Peptids gehemmt. Die Radioaktivität wird erfaßt und gegen die Konzentration des Inhibitors aufgetragen. Aus dem Kontrollwert und der maximal inhibierten Probe kann die Konzentration ermittelt werden, bei der die halbmaximale Wirkung erzielt wird (**IC₅₀**) [Reed & Kinzel 1994].

Für die Messungen wurden die vier Glucoside 2-[2'-(N-**Methyl**-N'-(4,4-dimethyl-1,2,3,4-tetrahydro-1,3-dioxo-7-isoquinolinyloxy)-harnstoff)]-**ethyl-1-β-D-glucosid** (**50**), 4-[2'-(N-**Methyl**-N'-(4,4-dimethyl-1,2,3,4-tetrahydro-1,3-dioxo-7-isoquinolinyloxy)-harnstoff)]-**butyl-1-β-D-glucosid** (**51**), 2-[2'-(N-**Phenyl**-N'-(4,4-dimethyl-1,2,3,4-tetrahydro-1,3-dioxo-7-isoquinolinyloxy)-harnstoff)]-**ethyl-1-β-D-glucosid** (**52**) und 2-[2'-(N-**α-Naphthyl**-N'-(4,4-dimethyl-1,2,3,4-tetrahydro-1,3-dioxo-7-isoquinolinyloxy)-harnstoff)]-**ethyl-1-β-D-glucosid** (**53**) verwendet.

Der *gp120-CD4-Bindungsversuch* wurde zuerst mit **50** durchgeführt. Die Zellen werden hierzu auf 4°C gekühlt und zweimal mit kaltem PBS gewaschen, bevor mit einer Konzentrationsreihe des SWITCH-Inhibitors und anschließend mit 40 µg des [¹⁴C]-LAV-Peptids für 1 h inkubiert wird. Nach zwei Waschschrritten mit PBS werden die Zellen lysiert und die Lysate im Szintillationszähler gemessen.

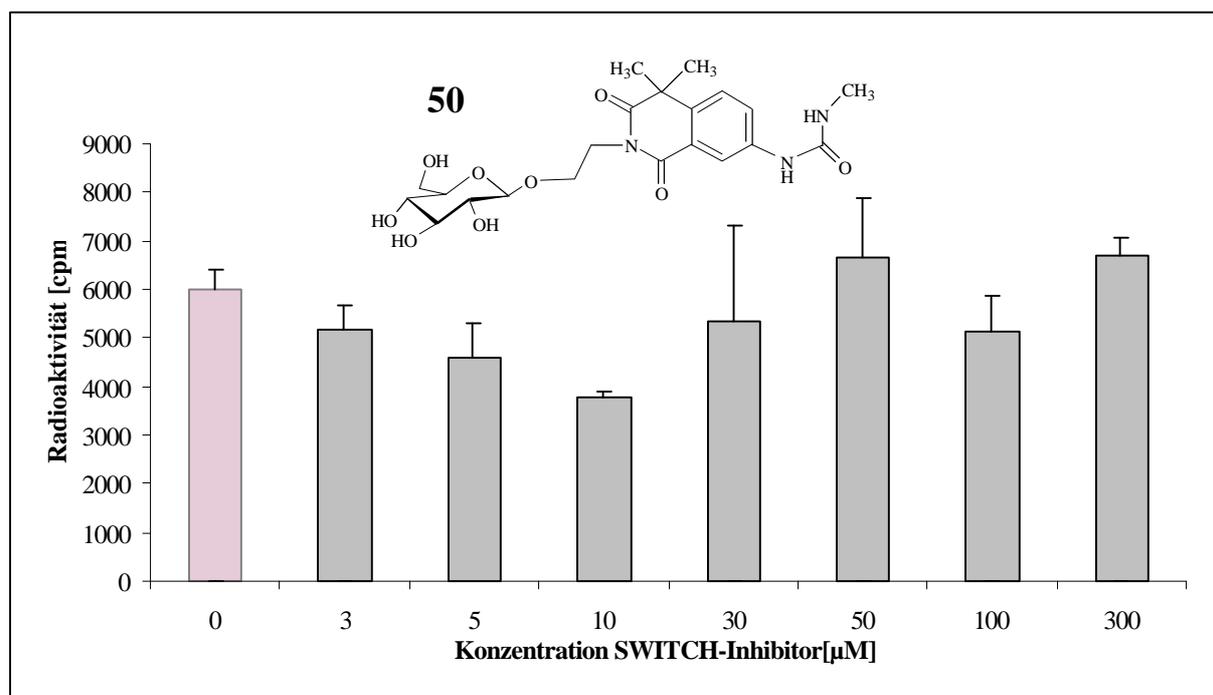


Abbildung 3.6-6 Ergebnis des *gp120-CD4*-Bindungsversuchs mit **50**. Mittelwerte aus $n = 3 \pm$ SD.

Trotz der positiven Ergebnisse der CD-Messungen konnte mit **50** im Vergleich zur Kontrolle keine Hemmung des Bindungsverhalten des [14 C]-LAVs an den CD4-Rezeptor erreicht werden. Um einen systematischen Fehler auszuschließen, wurde der schon bekannte SWITCH-Inhibitor N-Methyl-N'-(4,4-dimethyl-1,2,3,4-tetrahydro-1,3-dioxo-7-isochinolinyl)-harnstoff als Kontrolle getestet. Im Gegensatz zu **50** konnte eine Konzentrationsabhängigkeit festgestellt werden, die mit zuvor ermittelten Daten übereinstimmte. Da auch eine Wiederholung des Versuchs zum gleichen Ergebnis führte mußten die unerwarteten Beobachtungen für **50** einen anderen Ursprung haben.

Würde das Glucokonjugat eine Affinität gegenüber Bindungsstellen für Glucose zeigen, so könnte es möglich sein, daß der SWITCH-Inhibitor vollständig immobilisiert vorläge. Dementsprechend würde kein freier Inhibitor zur Interaktion mit dem LAV-Peptid zur Verfügung stehen, weshalb keine Inhibition der Bindung beobachtet würde. Insbesondere aufgrund der ausschließlichen Verwendung von PBS im *gp120-CD4*-Bindungsversuch, d.h. in vollständiger Abwesenheit von Glucose, schien dies eine mögliche Erklärung.

Zur Prüfung der These wurde das ursprüngliche Protokoll modifiziert. Der SWITCH-Inhibitor wurde dazu mit dem [14 C]-LAV-Peptid präinkubiert und erst nach kurzer Zeit gleichzeitig auf die vorbereiteten Zellen gegeben. Die Interaktion des SWITCH-Inhibitors mit dem [14 C]-LAV-Peptid sollte vor der Exposition der Zellen stattfinden, um die Immobilisierung des SWITCH-Inhibitors zu vermeiden.

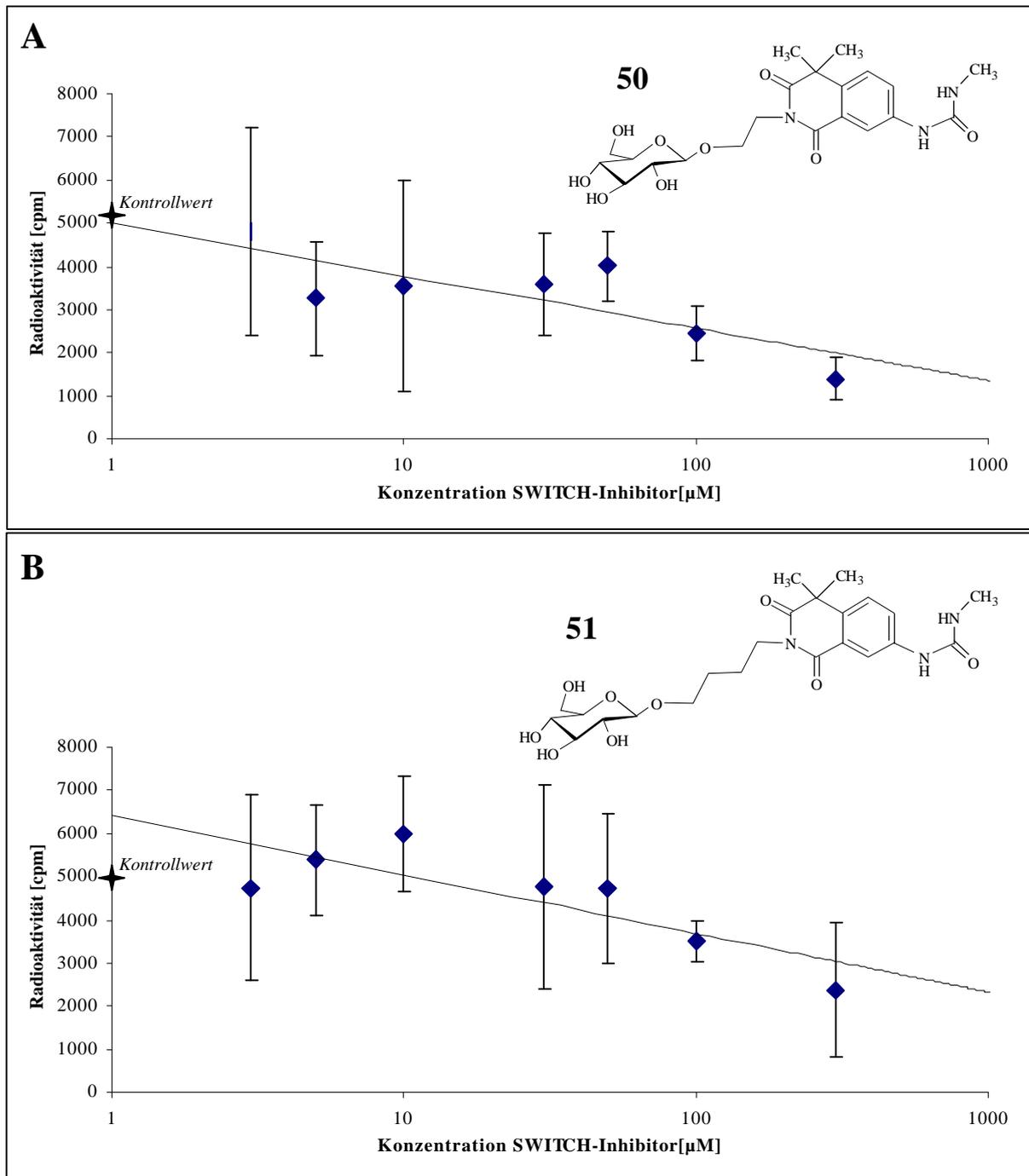


Abbildung 3.6-7 Ergebnis des modifizierten *gp120-CD4-Bindungsversuchs* mit **A: 50** und **B: 51**. Der SWITCH-Inhibitor wurde hierbei mit dem [¹⁴C]-LAV-Peptid präinkubiert. Mittelwerte aus n = 3 +/- SD.

Im modifizierten *gp120-CD4-Bindungsversuch* wird sowohl mit **50** als auch mit **51** eine konzentrationsabhängige Hemmung der Bindung des [¹⁴C]-LAV-Peptides beobachtet. Die berechneten IC₅₀-Werte für die SWITCH-Inhibitor-Konzentration, bei der ein halbmaximaler Effekt erreicht wird, liegen bei 31,6 µM (**50**) und 32,3 µM (**51**). Die Ergebnisse sprechen dafür, daß das Glucosid in den ersten Bindungsversuchen zur Bindung des LAV-Peptids nicht zur Verfügung stand und dementsprechend keine Inhibition der [¹⁴C]-LAV-CD4-Interaktion beobachtet werden konnte.

Um weiter zu untersuchen, ob die Glucosekonjugation eine Immobilisierung durch Bindung an zelluläre Strukturen vermittelt, wurde dem verwendeten PBS 3 mM Glucose zugesetzt und damit der *gp120-CD4-Bindungsversuch* durchgeführt. Vermeintliche Bindungsstellen des Glucokonjugates würden durch Glucose abgesättigt werden, so daß der SWITCH-Inhibitor vollständig zur Interaktion mit dem LAV-Peptid zur Verfügung stehen würde.

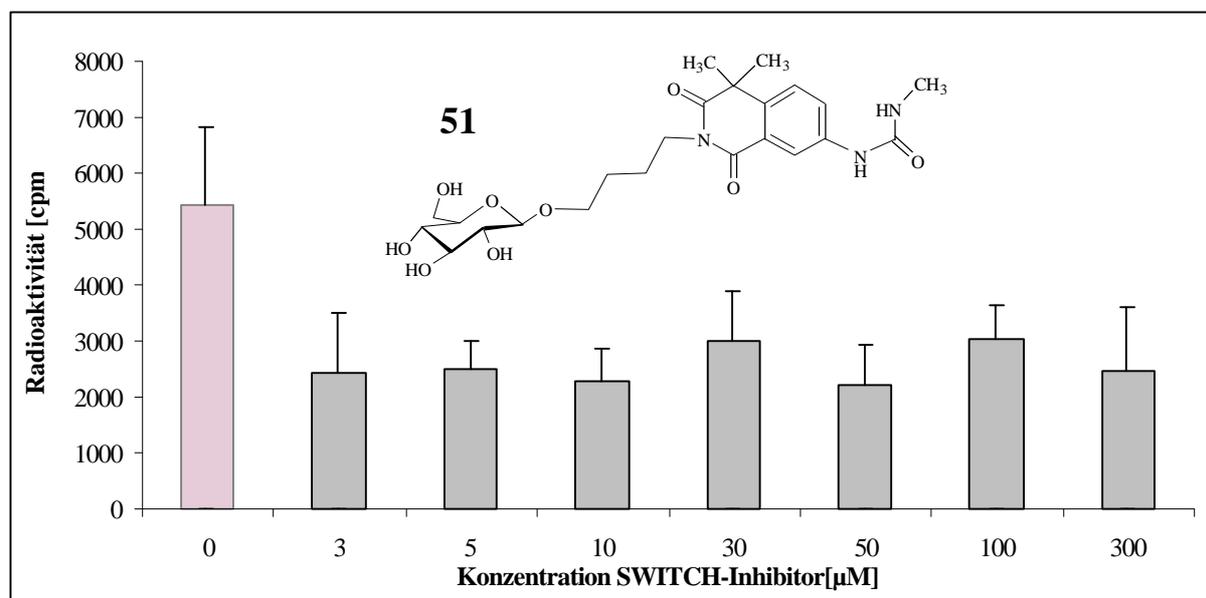


Abbildung 3.6-8 gp120-CD4-Bindungsversuch modifiziert durch Zusatz von 3 mM Glucose zum verwendeten PBS. Dargestellt ist das Ergebnis für **51**. Mittelwerte aus $n = 3 \pm$ SD.

Wie in Abbildung 3.6-8 zu erkennen ist, wurde bei allen Konzentrationen von **51** die Bindung des [14 C]-LAV-Peptids an die HeLaT4-Zellen verringert. Der maximale Effekt wird bei 3 µM erreicht und bewegt sich bis 300 µM im selben Bereich. Auch die Wiederholung des Versuches zeigte das gleiche Ergebnis.

Um eine Konzentrationsabhängigkeit zu zeigen, wurden die Konzentrationen in den darauffolgenden Versuchen verringert. Die SWITCH-Inhibitoren **50** und **51** wurden in Konzentrationen von 0,1 µM, 0,5 µM, 1 µM, 5 µM, 10 µM, 50 µM und 300 µM im modifizierten Versuchsaufbau (3 mM Glucose in PBS) eingesetzt (Abbildung 3.6-9).

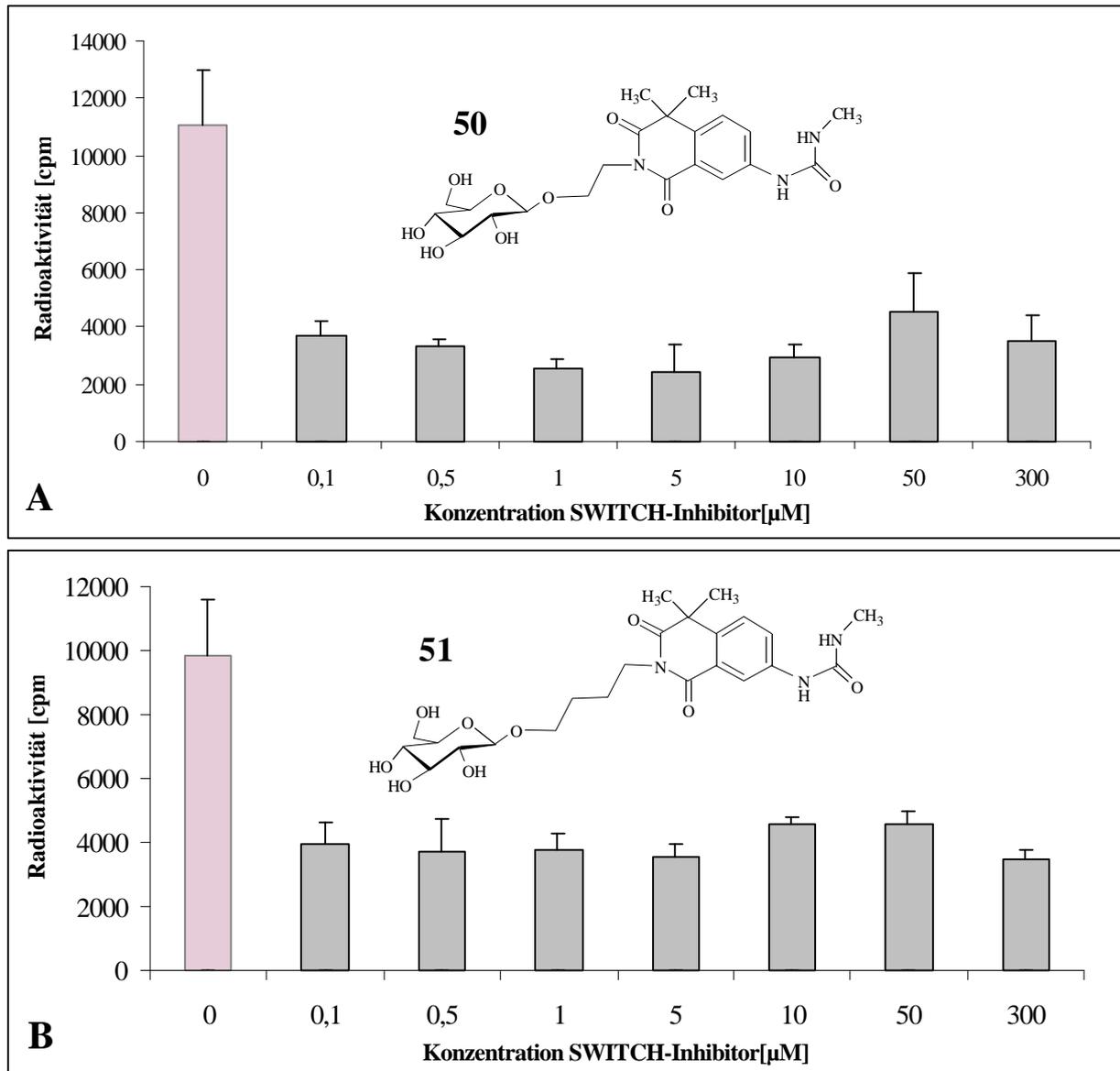


Abbildung 3.6-9 Ergebnis des modifizierten *gp120-CD4*-Bindungsvrsuches durch Verwendung von PBS mit 3 mM Glucose-Zusatz. **A: 50** und **B: 51**. Alle Werten wurden dreifach gemessen. Angegeben sind Mittelwert und Standardabweichung.

Auch in diesen Versuchen konnte keine Dosis-Wirkungsbeziehung erkannt werden. Beide Inhibitoren zeigen auch bei der niedrigster Konzentration von 0,1 μM noch die maximale Inhibition der Bindung des [¹⁴C]-LAV-Peptids an die HeLaT4-Zellen. Die Angabe einer IC₅₀ ist demzufolge nicht möglich, doch ist davon auszugehen, daß diese unterhalb der eingesetzten Konzentrationen liegen würde.

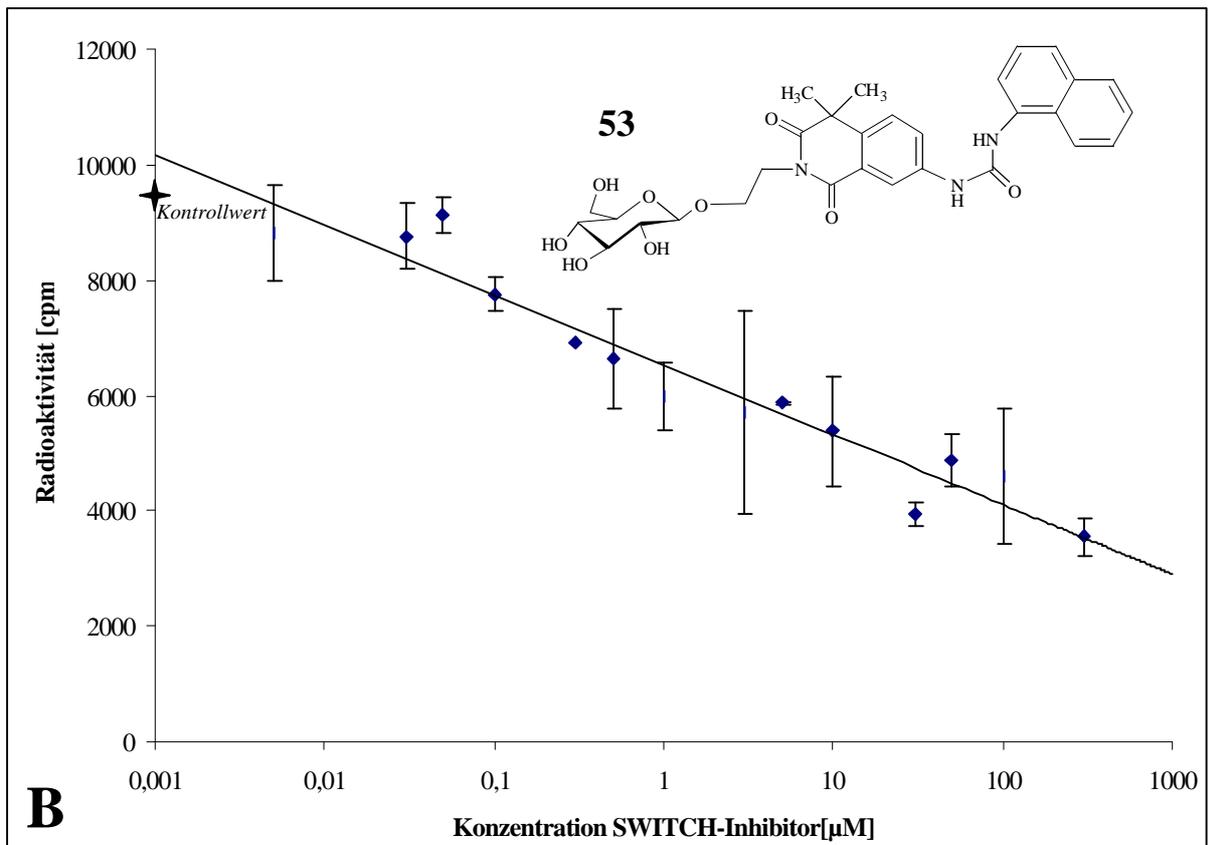
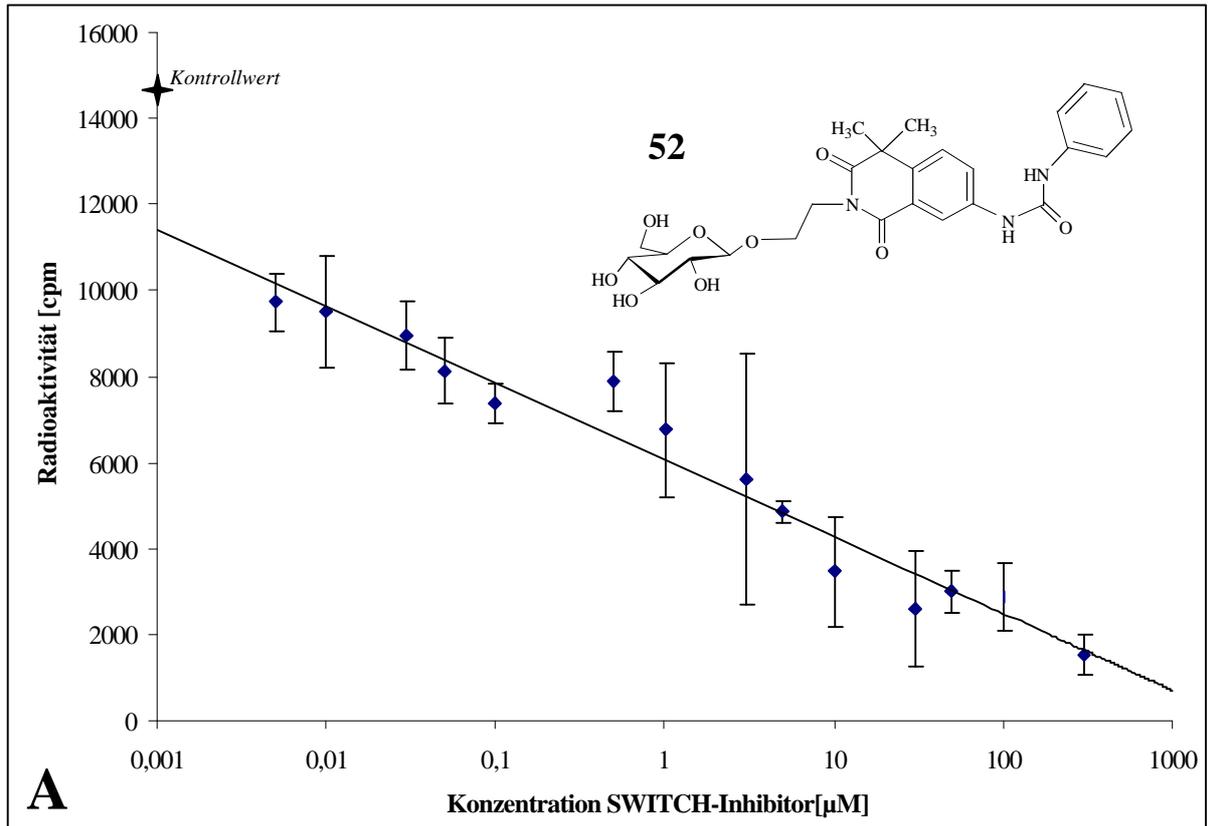


Abbildung 3.6-10 Ergebnis des modifizierten *gp120-CD4*-Bindungsversuches durch Verwendung von PBS mit 3 mM Glucose-Zusatz. A: 52 und B: 53 wurde in 14 Konzentrationen von 0,005 µM bis 300 µM eingesetzt. Mittelwerte aus $n = 3 \pm$ SD; $r = 0,9584$ (52); $r = 0,9252$ (53).

Um eine Konzentrationsabhängigkeit der Wirkung zu prüfen, wurden **52** und **53** in vierzehn Konzentrationen von 0,005 μM – 300 μM in den modifizierten *gp120-CD4-Bindungsversuch* eingesetzt.

Der gewählte Konzentrationsbereich lässt sehr gut eine Dosis-Wirkungsbeziehung erkennen (Abbildung 3.6-10), wobei sich aus den logarithmischen Regressionen für **52** eine IC_{50} von 0,068 μM (Abbildung 3.6-10 A; $r = 0,958$) und für **53** eine IC_{50} von 6 μM (Abbildung 3.6-10 B; $r = 0,9292$) ergibt.

4. Diskussion

4.1. Synthese

Im Vordergrund des synthetischen Teils dieser Arbeit stand die Darstellung einer Reihe glycosidierter MGMT-Inhibitoren, anhand derer genauere Erkenntnisse bezüglich der Substratspezifität des Enzyms gesammelt werden sollten.

Dazu sollten O⁶-substituierte Purine und O⁴-substituierte Pyrimidine mit unterschiedlichen Spacern, die ein Monosaccharid tragen, substituiert werden. Die ersten Versuche über Pyrimidin-Zwischenstufen, die in der letzten Stufe glycosidiert werden sollten (Abbildungen 3.1-5 und 3.1-6), wurden aus verschiedenen Gründen nicht weiterverfolgt: 2,6-diamino-4-benzyloxy-5-nitrosopyrimidin ist ein sehr potenter MGMT-Inhibitor *in vitro*, doch zeigte die Substanz in Modellen zur Bestimmung pharmakokinetischer Parameter nur eine sehr kurze Halbwertszeit *in vivo* [Roy et al. 1996]. Die Labilität des Moleküle und dessen Anfälligkeit für oxidative Einflüsse stellt seine Eignung für therapeutische Anwendungen in Frage. Es zeigte sich auch in den Glycosidierungsversuchen, wie empfindlich 2,6-diamino-4-benzyloxy-5-nitrosopyrimidin gegenüber den eingesetzten Katalysatoren reagiert, so daß die geprüften fünfzehn Varianten der *Königs-Knorr*- oder *Imidat*-Synthese nicht zum erwünschten Ergebnis führten (siehe auch Kapitel 3.1). Da zu diesem Zeitpunkt noch keinerlei Daten für Glucoside der MGMT-Inhibitoren vorlagen, sollte das weitere Vorgehen anhand der biologischen Ergebnisse der glycosidierten Purin-Derivate entschieden werden. Aus zwei Gründen sollte zur Darstellung N⁹- und O⁶-substituierter Purine jedoch ein anderer Syntheseweg als Methode **A** oder **B** (Abbildungen 3.1-5 und 3.1-6) gewählt werden. Zum einen ließ sich die Purin-Vorstufe (**III**, Abbildung 3.1-6) und das Glucosid des 2-Amino-8-aza-6-benzyloxy-9-(5-hydroxypentyl)-purin (**II**, Abbildung 3.1-7) nicht in der gewünschten Weise oder mit nur geringen Ausbeuten darstellen. Zum anderen bietet die Synthese über den in Kapitel 3.1.1.2 beschriebenen Weg die Möglichkeit, mit weniger Syntheseschritten eine größere Anzahl an Verbindungen aufzubauen.

Für diese Reaktion wählte ich eine nukleophile Substitution mit aktivierten Alkylglycosiden (Abbildung 3.1-13). Im ersten Schritt wurden insgesamt neun geschützte Bromoalkylglycoside synthetisiert (Abbildung 3.1-14), wobei abgesehen vom 4-Bromobutyl-tetra-O-acetyl- β -D-glucoopyranosid in allen Fällen neue Reaktionsvorschriften entwickelt werden mußten. Es kamen dazu variierte *Königs-Knorr*-Bedingungen oder im Einzelfall das *Trichloracetimidat*-Verfahren zum Einsatz.

Tabelle 3.1-3 läßt erkennen, daß für die kurzketigen Bromoalkohole 2-Bromethanol und 3-Bromopropanol die höchsten Ausbeuten (36 % - 39 %) bei Verwendung von Pentaacetylglucose und TMS-Triflat in Dichlormethan erzielt werden. Weitere Vorteile der Methode liegen in der einfachen und preiswerten Zugänglichkeit der Edukte und der einfachen Aufarbeitung. Die β -Glucoside kristallisieren direkt aus dem Reaktionsgemisch und können durch Umkristallisation in Methanol gereinigt werden. 4-Brombut-2-in-1-ol konnte auf die gleiche Weise glycosidiert werden, worin sich das große Potential der Methode zeigt: Aufgrund der Verwendung von TMS-triflat als Katalysator wird auch die Umsetzung von Substanzen mit Mehrfachbindungen ermöglicht, da die bei der *Königs-Knorr*-Synthese üblicherweise verwendeten Schwermetallkatalysatoren an diese anlagern.

Die längerketigen Bromoalkanole (Hexyl-, Octyl-, Decyl-, Dodecyl-) konnten in besseren Ausbeuten (46 % - 62 %; Tabelle 3.1-3) durch Anwendung von Silberphosphat und Benzoylierter 1-Bromglucose in Nitromethan dargestellt werden. Die Benzoylschutzgruppen sind stabiler als Acetylschutzgruppen zu sein und besitzen den praktischen Vorteil, daß diese aufgrund der Chromophore UV-aktiv sind. Die acetylierten Glycoside kristallisieren jedoch deutlich besser, was die Handhabung insbesondere bei großen Ansätzen erleichtert. Benzobromglucose als Glycosyldonor ist im Gegensatz zur Acetobromglucose und zur Pentaacetylglucose nicht kommerziell erhältlich, kann jedoch in einer 3-stufigen Synthese in größeren Mengen hergestellt werden.

Es konnten Standardbedingungen etabliert werden, unter denen die Bromoalkylglycoside mit zuvor dargestellten O⁶-substituierten Guanin-Derivaten zu den gewünschten N9-substituierten Nucleosid-Analoga reagierten. In DMF wurde mittels Lithiumhydrid ein Proton im aziden Imidazolring abstrahiert und anschließend das Anion mit dem Bromoalkylglycosid zur nukleophilen Substitution gebracht (Abbildung 3.1-13). Die Ausbeuten lagen zwischen 13 % und 33 % (Tabelle 3.1-6), wobei niedrigere Werte wahrscheinlich auf Spuren von Wasser und hierdurch verursachte Entschützung zurückzuführen waren. Die nachfolgende Abspaltung der Schutzgruppen verlief ohne weiteres in sehr guten Ausbeuten (88 % - 99 %), wobei lediglich im Falle des Dodecyl-Derivates nur 63 % erzielt wurden.

Zwei der Bromoalkylglycoside (Ethyl- und Butyl-) wurden im weiteren eingesetzt, um PARP-Inhibitoren mit einer Benzimidazol-Struktur an der phenolischen OH-Gruppe zu verethern (Abbildungen 3.1-17 und 3.1-20). Die Umsetzung erfolgte analog einer *Williamson*-Synthese nach basenkatalysierter Darstellung des Phenolat-Anions mit Kaliumcarbonat (Abbildungen 3.1-18). Die Gesamtausbeuten lagen nach der Entschützung insgesamt zwischen 30 % und 35 %, wobei die Aufreinigung der geschützten Zwischenstufe nicht notwendig war.

In ähnlicher Weise konnte analog einer *Gabriel*-Synthese der NH-Azide Stickstoff in einem Isochinolindion-System mit Natriumhydrid aktiviert und anschließend mit den Bromoalkylhalogeniden in einer nukleophilen Substitution umgesetzt werden (Abbildung 3.1-21). Auf diese Weise konnten drei sogenannte SWITCH-Inhibitoren mit dem Bromoethylglucosid und dem Bromobutylglucosid modifiziert werden (Abbildung 3.1-22). Die Ausbeuten für die vier SWITCH-Inhibitorglucoside lagen zwischen 56 % und 99 % für die Substitution und zwischen 92 % und 95 % für die Entschützung (Tabelle 3.1-7).

Insgesamt bleibt als Ergebnis festzuhalten, daß die Bromoalkylglycoside sehr breite Anwendungsmöglichkeiten zur Modifikation verschiedenster funktioneller Gruppen besitzen. Sie sind einfach in größeren Mengen herzustellen und zur längeren Lagerung ausreichend stabil. Auch bei basenkatalysierten nukleophilen Substitutionen (hier mit LiH, NaH und K_2CO_3) sind die alkalisch verseifbaren Acetyl- und Benzoylschutzgruppen kein Ausschlußkriterium für den Einsatz solcher Moleküle.

Das hohe Anwendungspotential konnte durch die Darstellung von insgesamt zwanzig glycosidierten Strukturen mit unterschiedlichen Grundgerüsten unter Beweis gestellt werden. Die Vorschriften können nach der Etablierung von Standardbedingungen von einem Bromoalkylglycosid auf weitere übertragen werden, was einen großen Vorteil bei der Erstellung von Substanzbibliotheken bietet.

4.2. Biologische Aktivität der MGMT-Inhibitoren

4.2.1. MGMT-Tests

Mit den Tests zur Aktivität der MGMT-Inhibitoren sollten die wirksamsten Glucoside identifiziert werden, um diese in den folgenden Experimenten näher zu charakterisieren.

Die Bestimmungen an Proteinextrakten dienen im weiteren zur Erstellung einer Struktur-Wirkungs-Beziehung mit Hilfe von *Molecular Modeling* Experimenten (siehe Kapitel 3.4). Anhand der Zelltests sollte die inhibitorische Aktivität innerhalb eines komplexeren Systems untersucht werden, um zu zeigen, daß die Inhibitoren von Zellen aufgenommen werden. Da es sich bei der MGMT um ein DNA-Reparatur-Enzym handelt, liegt der größte Teil des funktionell aktiven Proteins im Kern vor, weshalb zwei Barrieren (Zell- und Kernmembran) überwunden werden müssen [Pegg 2000].

Die erste Reihe des MGMT-Tests wurde am Gesamtproteinextrakt von HeLaS3-Zellen durchgeführt. Das O6MG und dessen Ethylglucosid (**33**) waren vollständig inaktiv, weshalb diese im folgenden nicht weiter berücksichtigt wurden.

Das O6BG zeigte konzentrationsabhängig 50 % Hemmung (0,5 μM), bzw. fast vollständige Hemmung der MGMT-Aktivität (5 μM), wohingegen 8ABG und 4BTG schon bei 0,5 μM in der Lage waren, 100 % der MGMT-Aktivität zu hemmen. Die Glucoside verhielten sich analog, daß heißt die Wirkung des Ethylglucosids des 4BTG (**39**) war am ausgeprägtesten, gefolgt vom Ethylglucosid des 8ABG (**37**) und dem Ethylglucosid des O6BG (**34**). Eine Verlängerung des Spacers hatte im Falle des 8ABG vom Ethylglucosid (**37**) zum Butylglucosid (**38**) eine geringere, im Falle des 4BTG vom Ethylglucosid (**39**) zum Butylglucosid (**40**) und des O6BG vom Ethylglucosid (**34**) zum Propylglucosid (**36**) jedoch eine höhere Wirkung zur Folge. Der Einsatz der geschützten Glucoside (**21**, **26**, **27**) wurde nicht weiter verfolgt, da diese extrem schlecht wasserlöslich waren. Da das Ethylgalactosid des O6BG (**35**) und dessen Ethylglucosid (**34**) eine vergleichbare Wirkung aufwiesen, wurden im folgenden lediglich die Glucoside eingesetzt.

Bei der Bestimmung der IC_{50} im gleichen System kam es darauf an, die Beobachtungen zu verifizieren und durch schrittweises Vorgehen gezielt die Synthese potenterer Substanzen zu steuern. Es zeigte sich erwartungsgemäß das gleiche Bild, wie oben beschrieben. Die Glucosidierung führt zu einem Verlust an inhibitorischer Aktivität. 4BTG und die getesteten Derivate sind wirksamer als die entsprechenden 8ABG-Konjugate. O6BG und dessen Ethylglucosid weisen vergleichsweise die schwächste Inhibition auf. Da sich ein Trend abzuzeichnen schien, daß die Spacer-Verlängerung im Falle des 4BTG zu einer stärkeren Wirkung führte, wurde in zwei Schritten zuerst das Hexyl- (**41**), das Octyl- (**42**) und das Decylglucosid (**43**) und anschließend das Dodecyl- (**44**) und das But-2-ynylglucosid (**45**) des 4BTG synthetisiert und getestet. Obwohl die Verlängerung von 4 C-Atomen auf 6 C-Atome keine Verbesserung der Wirkung erbrachte ($\text{IC}_{50} = 0,45 \mu\text{M}$), konnte durch Einführung des Octyl-Spacer ein Sprung um das 14-fache zu einer IC_{50} von 0,032 μM erreicht werden. Es scheint damit ein Grenzwert erreicht zu sein, da sowohl das Decyl- als auch das Dodecylglucosid nur noch um 6 % wirksamer waren und eine IC_{50} von 0,03 μM aufwiesen. Worauf diese bessere Interaktion der Inhibitorglucoside mit längeren Alkylketten zurückzuführen ist, wurde im weiteren durch Computer-Simulationen untersucht.

Mit O6BG, 8ABG, 4BTG und insgesamt 5 Glucosiden (**34**, **37**, **38**, **39**, **42**) wurde der MGMT-Test an HeLaS3 Zellen durchgeführt. Zum Vergleich der MGMT-Testung am Gesamtproteinextrakt (MGMT-GP-Test) und in intakten Zellen (MGMT-Zelltest) kann der Quotient dieser Zahlenwerte herangezogen werden (**III**, Tabelle 4.2-1) Darüberhinaus ist es zur Ableitung von Struktur-Wirkungs-Beziehungen von Bedeutung, die Werte der Glucoside in Relation zu den reinen Purinen zu betrachten (**I** und **II**, Tabelle 4.2-1). Sowohl im MGMT-

GP-Test als auch im MGMT-Zelltest wird deutlich, daß die Gluco-Konjugation sich negativ auf das Potential zur MGMT-Inhibition auswirkt. Alle Konjugate weisen höhere IC_{50} -Werte als die entsprechenden Purine auf (**I** und **II**). 4BTG ist in intakten Zellen mit einer IC_{50} von 0,0011 μM der stärkste MGMT-Inhibitor und demnach 2,4 mal wirksamer im MGMT-GP-Test (**III**). Auch für die anderen O^6 -substituierten Purine wird eine höhere Aktivität im MGMT-Zelltest, als im MGMT-GP-Test gefunden. Für 8ABG entspricht der Quotient **III** 2,1 und für O6BG 9,5.

<i>MGMT-Inhibitor</i>	IC_{50} <i>GP-Test</i> [μM]	IC_{50} <i>intakte Zellen</i> [μM]	I	II	III
O6BG	0,62	0,065			9,5
34	25	5,58	40	85	4,5
8ABG	0,038	0,018			2,1
37	2,0	2,8	53	156	0,7
38	7,0	5,5	184	306	1,3
4BTG	0,009	0,0037			2,4
39	0,68	1,7	76	459	0,4
42	0,03	0,011	3,3	3,0	2,7

Tabelle 4.2-1 Darstellung der IC_{50} -Bestimmungen für verschiedene MGMT-Inhibitoren. **I** = IC_{50} *GP-Test* Glucosid / IC_{50} *GP-Test* O^6 -substituiertes Purin. **II** = IC_{50} *intakte Zellen* Glucosid / IC_{50} *intakte Zellen* O^6 -substituiertes Purin. **III** = IC_{50} *GP-Test* / IC_{50} *intakte Zellen* für die entsprechende Datenreihe.

Der Anstieg der Werte im MGMT-Zelltest gegenüber dem MGMT-Test an isoliertem Protein wird von Pegg und Mitarbeitern [1997] mit der Affinitätserhöhung der MGMT durch DNA-Bindung begründet. Eine Konformationsänderung führt zu einer Öffnung des aktiven Zentrums der MGMT, was den Angriff der Pseudo-Substrate erleichtert [Vora et al. 1998]. Trotz der Tatsache, daß die Zellmembran als zusätzliche Barriere überwunden werden muß, zeigten deshalb die bislang getesteten lipophilen Inhibitoren durchweg niedrigere IC_{50} im MGMT-Zelltest als im MGMT-GP-Test [Chae et al. 1994; 1995; Moschel et al. 1992].

Die entsprechenden Ethylglucoside zeigten eine Besonderheit beim Vergleich der Daten. Sowohl im MGMT-GP-Test, als auch MGMT-Zelltest nimmt die inhibitorische Potenz der

Ethylglucoside von 4BTG (**39**) über 8ABG (**37**) zu O6BG (**34**) ab. Erstaunlicherweise sind jedoch das Ethylglucosid des 4BTG (**39**) und das Ethylglucosid des 8ABG (**37**) zwei Ausnahmen, bei denen die IC_{50} im MGMT-Zelltest um die Faktoren 2,5 bzw 1,4 niedriger sind, als im MGMT-GP-Test (**III**, Tabelle 4.2-1). Eine mögliche Begründung für diese Tatsache ist die sehr hohe Hydrophilie der Substanzen. Die Membranpermeabilität wird dadurch soweit gesenkt, daß nur geringe intrazelluläre Konzentrationen erreicht werden. Dieser Nachteil überwiegt, so daß dieser nicht mehr durch den DNA-Bindungseffekt (s.o.) kompensiert werden kann.

Zusätzlich zu den Ethylglucosiden wurde für die beiden wirksameren und vielversprechenderen MGMT-Inhibitoren 8ABG und 4BTG noch zwei weitere Glucoside im MGMT-Zelltest untersucht: das Butylglucosid des 8ABG (**38**) und das Octylglucosid des 4BTG. Letzteres wurde aus der Reihe der 4BTG-Glucoside gewählt, da dies mit einer IC_{50} *in vitro* von 0,032 μ M bereits nahe dem vermeintlichen Grenzwert (s.o.) der Glucoside von 0,03 μ M liegt, im Vergleich zum Decyl- (**43**) und zum Dodecylderivat (**44**) des 4BTG jedoch die höchste Hydrophilie aufweist (Strukturformeln Abbildung 3.1-1/).

Das Butylglucosid des 8ABG (**38**) ist 184 mal unwirksamer als das 8ABG und zeigt geringere inhibitorische Aktivität als das Ethylglucosid des 8ABG (**37**). Im Gegensatz dazu wirkt sich die Kettenverlängerung bei den 4BTG-Derivaten positiv auf deren Potential zur MGMT-Inhibition aus. Das Octylglucosid des 4BTG (**43**) ist mit einer IC_{50} von 0,011 ca. 150 mal wirksamer als das entsprechende Ethylglucosid. Mit einem Faktor von 3,3 ist der Unterschied zwischen glucosidiertem und nicht glucosidiertem 4BTG nur noch unwesentlich.

Die Effekte der Spacerverlängerung könnten aus den unterschiedlichen Ladungsverteilungen im Purin-Grundgerüst des 8ABG im Vergleich zum O6BG resultieren. Die höhere Aktivität des 8ABG wird auf den elektronenziehenden Effekt durch den zusätzlichen Stickstoff im Imidazolring zurückgeführt. Das durch die nukleophile Substitution mit der MGMT entstehende 8-Azaguanin liegt an der O⁶-Position als Anion vor und ist schwächer basisch als das nach der Benzylübertragung entstehende Guanin des O6BG. Deshalb kann eine höhere Dealkylierungsrate und folglich eine niedrigere IC_{50} erreicht werden. Dieser elektronenziehende Effekt wird durch die N9-Substitution abgeschwächt. Die Spacer besitzen einen elektronenschiebenden (+I-) Effekt, der mit ansteigender Länge stärker wird. Dementsprechend ist das an der O⁶-Position dealkylierte Produkt des Butylglycosid stärker basisch als das analoge Dealkylierungsprodukt des Ethylglucosids. Die Kettenverlängerung führt demnach insbesondere beim 8ABG zu einer verringerten MGMT-Reaktivität und infolgedessen zu einer niedrigeren MGMT-Inhibition.

Alle bislang publizierten N-9-substituierten O⁶-Alkylguanin-Derivate waren deutlich schwächere MGMT-Inhibitoren, als deren nicht an der N-9-Position substituierten Analoga. Da für die anderen möglichen Substitutionsorte jedoch noch massivere Wirkungsverluste beobachtet werden, scheint dies die einzig sinnvolle Stelle zu sein an der Modifikationen vorgenommen werden können.

Die Einführung lipophiler Spacer zwischen einem polaren Substituenten (hier Glucose) und dem Guanin-Grundgerüst stellte sich als hervorragende Möglichkeit heraus, diese Nachteile zu umgehen. Es konnte gezeigt werden, dass die in dieser Arbeit synthetisierten Glucoside ab einem Octyl-Spacers nahezu gleiche Aktivität wie die nicht modifizierte Ausgangssubstanz aufweisen. Die Verbindungen mit kürzeren Spacern sind bessere MGMT-Inhibitoren als der bislang etablierte "Goldstandard" O⁶-Benzylguanin und darüberhinaus deutlich besser wasserlöslich. Allesamt stellen die Glucoside Verbindungen dar, die einem Drug-Targeting-Konzept über aktive Glucosetransporter dienen können. Dementsprechend soll als nächster Schritt deren Eignung zur MGMT-Inaktivierung *in vivo* und deren mögliche Präferenz gegenüber dem Zielgewebe geprüft werden. Desweiteren wäre es von Interesse zu untersuchen, ob sich die Einführung von Alkylspacern auch auf andere Substituenten, wie beispielsweise Oligosaccharide zur Lectin vermittelten Aufnahme, oder Steroide zur Aufnahme über Steroid-Rezeptoren eignet.

4.2.2. Untersuchungen an MeWo-Zellen

Durch Behandlung von Fotemustin-resistenten Zellen mit dem alkylierenden Agens Fotemustin und den MGMT-Inhibitoren sollte untersucht werden, ob die glycosidierten MGMT-Inhibitoren in der Lage sind, die Resistenz dieser Zellen zu modulieren. MeWo-Zellen sind ein geeignetes Modell für solche Bestimmungen, da von der Ursprungszelllinie (MeWo) verschiedene Klone abgeleitet wurden, die unterschiedliche Resistenzstufen aufweisen (MeWo_{Fote4} oder MeWo_{Fote40}).

Die MGMT-Aktivität dieser Zelllinien wurde bestimmt: 12 fmol/mg Gesamtprotein in MeWo-Zellen, 806 fmol/mg Gesamtprotein in MeWo_{Fote4} und 1146 fmol/mg Gesamtprotein in MeWo_{Fote40} [Lage et al. 1999]. Bis dato wurden jedoch noch keine Experimente mit MGMT-Inhibitoren an diesen Zelllinien durchgeführt. Deshalb war es von Interesse, zu untersuchen, ob eine Sensibilisierung der resistenten Zelllinien durch MGMT-Inaktivierung mittels der MGMT-Inhibitor-Glucoside erreicht wird und ob unterschiedliche Effekte durch den Einsatz von O⁶-(4-Bromophenyl)-guanin (**4BTG**), dessen Ethylglucosid (**39**) und dessen

Octylglucosid (**42**) gezeigt werden können. In einer Doppelbehandlung mit MGMT-Inhibitor und Fotemustin wurde dazu jeweils eine der Substanzen in unterschiedlichen und die andere mit konstanter Konzentrationen zugesetzt (Kapitel 3.2.3.1 und 3.2.3.2).

Die sensitiven MeWo-Zellen zeigten in beiden Versuchsreihen keine erniedrigten Überlebensraten nach Fotemustin-Behandlung durch die zusätzliche MGMT-Inhibition. Die *DMF*-Werte als Maß für die Erhöhung der Toxizität nach der Behandlung mit Fotemustin und einer konstanten Konzentration (10 µM) des MGMT-Inhibitors ergaben 0,65 (**4BTG**), 1,75 (**39**) und 0,92 (**42**) (Tabelle 3.2-2). Ein *DMF*-Wert von 1 zeigt, das kein Unterschied der Toxizität mit oder ohne MGMT-Inhibitor besteht. Werte über 1 sprechen für eine Modulation, doch wird beim Vergleich der IC_{50} -Werte von 11,6 µM [nur Fotemustin], mit 6,6 µM [Fotemustin + **39**] deutlich, wie nahe die absoluten Werte beieinander liegen.

Bei steigender Konzentration der MGMT-Inhibitoren konnte bis 100 µM keine Erhöhung gegenüber den Kontrollwerten, die nur mit Fotemustin inkubiert wurden, erkannt werden (Abbildung 3.2-7). Bildet man aus den Überlebensraten der Doppelbehandlung und den nur mit Fotemustin-Behandlung erreichten Überlebensraten den Quotienten (**C**), so ist dieser ein Maß für die Modulation der Toxizität. Der *DMF* (siehe Kapitel 3.2) kann in diesem Falle nicht herangezogen werden, da keine IC_{50} berechnet wurden.

Anhand dieser Quotienten wird deutlich, daß die Hemmung des Wachstums der MeWo-Zellen durch Fotemustin nicht durch die zusätzliche Behandlung mit einem MGMT-Inhibitor beeinflusst werden kann. Anhand der Versuche mit unterschiedlicher MGMT-Inhibitor-Konzentration an MeWo-Zellen konnte darüberhinaus festgestellt werden, daß weder **4BTG** noch dessen Ethylglucosid **39** oder dessen Octylglucosid **42** bis 100 µM das Zellwachstum ohne Fotemustin-Zusatz hemmen (Abbildung 3.2-7). Die Substanzen sind demnach in den eingesetzten Konzentrationen nicht toxisch.

MGMT-Inhibitor	(A) Überlebensrate MGMT-Inhibitor + Fotemustin	(B) Überlebensrate Fotemustin	(C) B/A
4BTG	23,5 (6,5)	27,6 (5,3)	1,17
39	30,0 (4,4)	25,5 (4,6)	0,85
42	27,1 (3,3)	30,0 (3,0)	1,11

Tabelle 4.2-2 Überlebensraten von MeWo-Zellen nach Behandlung mit 150 µg/ml Fotemustin und **4BTG**, **39** und **42**. **A**: Mittelwert (aus n = 36 +/- SD) aller Überlebensraten der Konzentrationsreihe des jeweiligen MGMT-Inhibitors und konstanter Fotemustin-Konzentration. **B**: Mittelwert (aus n = 9 +/- SD) der Fotemustin-Kontrolle. **C**: Errechnet aus: [% Überleben]_{Fotemustin} / [% Überleben]_{Fotemustin + MGMT Inhibitor}.

Wegen der oben beschriebenen äußerst geringen Aktivität der MGMT in den MeWo-Zellen, war zu erwarten, daß die zusätzliche Behandlung mit einem MGMT-Inhibitor die Fotemustin-Toxizität nicht beeinflußt. Das Ergebnis zeigt jedoch auch, daß keine unspezifischen Effekte durch die MGMT-Inhibitoren zu beobachten sind.

Die MeWo_{Fote4}-Zellen hingegen lassen sich durch die Behandlung mit einem MGMT-Inhibitor sensibilisieren. Der *DMF* für **42** beträgt 15,52. Die Werte der IC_{25} , IC_{50} und der IC_{75} nach der Behandlung mit Fotemustin und **42** entsprechen den Werten der sensitiven MeWo-Zellen (Tabellen 3.2-2 und 3.2-3).

Bei steigender MGMT-Inhibitor-Konzentration wird deutlich, daß die MGMT-Inhibitoren auch auf die MeWo_{Fote4}-Zellen nicht toxisch wirken (Abbildung 3.2-8). Die Doppelbehandlung mit Fotemustin jedoch führt zu einer Erhöhung der Toxizität. Gegenüber den Überlebensraten nach Fotemustin-Behandlung von 67,1 % bis 71,6 % wird durch zusätzliche MGMT-Inhibition eine Senkung der Überlebensraten auf durchschnittlich 45 % erreicht.

Für 4BTG und **42** ist in den Konzentrationen bis 0,019 μM noch keine Dosisabhängigkeit der Wirkung zu erkennen, wohingegen **39** ab 0,63 μM nicht mehr die maximale Wirkung zeigt. Dies entspricht den Ergebnissen, die mit HeLaS3-Zellen erhalten wurden (Kapitel 3.2.2).

Auch an dieser Zelllinie waren 4BTG und **42** die potenteren MGMT-Inhibitoren mit IC_{50} -Werten von 3,7 nM (4BTG) und 18 nM (**42**). Die IC_{50} von **39** lag an HeLaS3-Zellen mit 1,72 μM deutlich darüber. Die MGMT-Aktivität beträgt in HeLaS3-Zellen zwischen 500 und 1500 fmol/mg Gesamtprotein, weshalb die Daten sehr gut mit den Ergebnissen an einer der resistenten MeWo-Zelllinien vergleichbar sind.

Auch an MeWo_{Fote40}-Zellen wurde erwartungsgemäß eine Steigerung der Fotemustin-Toxizität durch die zusätzliche Behandlung mit den MGMT-Inhibitoren 4BTG, **39** und **42** beobachtet. Die *DMF*-Werte lagen bei 1,82 (4BTG), 2,21 (**39**) und 1,77 (**42**). Um 50 % des Zellwachstums zu hemmen, könnten die Fotemustin-Konzentrationen entsprechend um 82 %, 121 %, bzw. 77 % gesenkt werden. Auch wenn die *DMF*-Werte nicht sehr hoch erscheinen, würde die Doppelbehandlung mit Fotemustin und MGMT-Inhibitor klinisch einen enormen Vorteil bedeuten, da dadurch auch die Gesamtbelastung des Organismus verringert wird.

In der zweiten Versuchsreihe mit unterschiedlicher MGMT-Inhibitor-Konzentration konnte festgestellt werden, daß, wie in den MGMT-Tests (Kapitel 3.2.2) und in den Untersuchungen mit MeWo_{Fote4}-Zellen, 4BTG und **42** bessere Inaktivatoren als **39** sind. Bei Betrachtung der Überlebenskurven der Konzentrationsreihen von 0,019 μM bis 5 μM MGMT-Inhibitor plus 150 $\mu\text{g/ml}$ Fotemustin (Abbildungen 3.2-9) wird ersichtlich, daß die maximale Wirkung von

39 bei Konzentrationen von mindestens 1,25 μM erreicht wird, wohingegen **42** schon ab 0,08 μM und 4BTG ab 0,04 μM die maximale Wirkungsverstärkung auf die Fotemustin-Toxizität erkennen läßt. Die Überlebensraten der MeWo-Zellen nach der Behandlung mit 150 $\mu\text{g/ml}$ Fotemustin von 92,7 % (**39**), 84,9 % (**42**) und 87,7 % (4BTG) konnte durch zusätzliche Behandlung mit den MGMT-Inhibitoren bei diesen und den entsprechend höheren Konzentrationen auf 63,5 % (**39**), 51,8 % (**42**) und 53,4 % (4BTG) gesteigert werden.

Insgesamt kann festgehalten werden, daß die eingesetzten MGMT-Inhibitoren **4BTG**, **39** und **42** allesamt in der Lage sind, die Fotemustin-Toxizität in MeWo_{Fote4-} und MeWo_{Fote40-}Zellen zu steigern. Während die Resistenz der MeWo_{Fote4-}-Zellen vollständig reversibel ist, lassen sich MeWo_{Fote40-}-Zellen lediglich bis zu einem gewissen Grad sensibilisieren. Dies spricht dafür, daß die MGMT-Expression den entscheidenden Einfluß auf die Resistenzentwicklung der MeWo_{Fote4-}-Zellen ausübt, wohingegen die MGMT-Aktivität lediglich einen Beitrag zur Resistenz der MeWo_{Fote40-}-Zellen leistet. Nichtsdestotrotz könnte durch zusätzliche Applikation von MGMT-Inhibitoren eine deutlich effizientere Therapie mit Alkylantien erreicht werden, sofern die Tumoren einen gewissen Grad an MGMT-Aktivität aufweisen.

Die Aktivität der MGMT-Inhibitoren entspricht den Ergebnissen im MGMT-Test. 4BTG ist der potenteste Inhibitor, wobei nur ein äußerst geringer Unterschied zu dessen Octylglucosid (**42**) festgestellt werden kann.

Davon ausgehend, daß das Glucosid durch aktive Transportmechanismen im Tumor angereichert werden könnte, stellt dieses eine entscheidende Weiterentwicklung dar.

Das Ethylglucosid des 4BTG (**39**) muß auch in diesen Versuchen in höheren Konzentrationen eingesetzt werden, um wirkungsvoll die MGMT-Aktivität zu hemmen. Dennoch bietet es aufgrund seiner deutlich verbesserten Wasserlöslichkeit bereits entscheidende Vorteile *in vivo*, insbesondere bezüglich einer oralen Applikation.

4.3. Eigenschaften der MGMT-Inhibitoren

4.3.1. Physikochemische Eigenschaften

Anhand des Octylglucosids (**42**) und des Ethylglucosids (**39**) des 4BTG sollte exemplarisch gezeigt werden, wie sich die MGMT-Inhibitor-Glucoside in wäßrigem Milieu unter typischen Inkubationsbedingungen der *in vitro* Testsysteme verhalten. Dazu wurden Phosphat-Puffersysteme (pH 6,0 und pH 7,4) sowie Zellkulturmedium (Vollmedium mit Zusatz von 5 % FCS) verwendet und **39** und **42** bei 37°C für 24 h (pH 6,0), bzw. 168 h (pH

7,4 und Medium) inkubiert. Die Quantifizierung der Proben erfolgte mittels RP-HPLC und UV-Detektion.

Für die beiden Substanzen wurden analytische Methoden etabliert, die einen reproduzierbaren linearen Zusammenhang zwischen der Probenaufgabemenge und den Signalintegralen zeigte (Abbildung 3.3-1). Als problematisch stellte sich dabei lediglich die schlechte Wasserlöslichkeit von **42** in den verwendeten Konzentrationen von 0,1 mg/ml (0,16 mM) heraus. Obwohl kein fester Bodensatz durch teilweise ungelöste Substanz erkennbar war und die Proben optimal vorbereitet wurden (Ultrafiltration, Zentrifugation), erhielt ich nach heftiger Bewegung der Proben deutlich höhere Werte erhält als nach langem Ruhen. Um dieses Problem zu umgehen, wurde die Summe aller Integrale als interner Standard definiert und der Quotient aus Standard und Produktsignal gebildet. Es zeigte sich, daß mit dieser Methode niedrigere Standardabweichungen innerhalb einer Versuchsreihe erhalten werden, wengleich die Reihen mitunter teilweise deutlich voneinander abweichen. Insgesamt können jedoch auch auf diese Art wichtige Kernaussagen bezüglich der Haltbarkeit von **42** getroffen werden.

Für **39** und **42** konnten in allen Untersuchungen Zerfallskinetiken erster Ordnung beobachtet werden, daß heißt zwischen der Zerfallszeit und den gemessenen Konzentrationen besteht ein logarithmischer Zusammenhang. Die Edukte zerfallen demnach bei abnehmender Konzentration mit abnehmender Geschwindigkeit (Abbildungen 3.3-2 und 3.3-3).

Der Zerfall bei pH 6,0 ist äußerst schnell. Nach 24 h konnten für **39** nur noch Restkonzentrationen von unter 5 % des Ausgangswertes gemessen werden (Tabelle 3.3-1). Bei allen biologischen Experimenten mit **39** muß demnach darauf geachtet werden, daß der pH-Wert nicht in den sauren Bereich absinkt und die schnelle Hydrolyse unter den gegebenen Bedingungen berücksichtigt wird. Auch **42** weist bei pH 6,0 nur eine kurze Haltbarkeit auf, doch liegen die Werte mit 31,4 h ($T_{1/2}$) und 4,8 h ($T_{90\%}$) deutlich höher als für **39**.

Unter den Inkubationsbedingungen der MGMT-Tests ist die saure Hydrolyse jedoch unproblematisch, da die Versuche im neutralen pH-Bereich in PBS oder Zellkulturmedium durchgeführt werden (Kapitel 3.2.1).

Von beiden Verbindungen können bei pH 7,4 nach 13 h (**39**) bzw. 108 h (**42**) über 90 % ihrer Ausgangskonzentration nachgewiesen werden. Wasserlösliche Glucoside wie **39** werden *in vivo* sehr rasch über die Nieren wieder ausgeschieden [Pfeifer et al. 1995]. Liegt die Hydrolyserate in diesen Fällen unter der Halbwertszeit führen auch kurze $T_{90\%}$ -Werte nicht zu Anwendungsschwierigkeiten.

In Medium sind **39** und **42** deutlich stabiler als in Phosphat-Puffer. Der $T_{90\%}$ -Wert von **39** liegt bei 26,3 h, der von **42** bei 252,1 h. Die Halbwertszeiten sind mit 172,9 h für **39** und 1636 h für **42** ungefähr siebenmal so hoch. Demnach können bei Langzeitinkubationen in Zellversuchen bis zu einem Tag (**39**) und bis zu einer Woche (**42**) mit mindestens 90 % der Ausgangskonzentration gerechnet werden. Eine mögliche Begründung für die längere Haltbarkeit in Zellkulturmedium könnte in einer Proteinbindung liegen. Das zugesetzte FCS enthält Serumalbumin, das über nicht kovalente Wechselwirkungen insbesondere lipophile Arzneistoffe binden kann [Burger & Wachter 1998]. Aufgrund der höheren Lipophilie ist der Effekt für **42** stärker ausgeprägt als für **39**.

Obwohl für eine Reihe von Analoga des 4BTG Stabilitätsuntersuchungen veröffentlicht wurden, sind für das 4BTG keine Daten publiziert. Die $T_{1/2}$ von O^6 -(4-Bromothienyl)-guanosin wird mit über 16 h in PBS bei 37 °C angegeben, wobei die Quantifizierung photometrisch erfolgte [Cancer Research Campaign Technology limited 1996]. Desweiteren wurde die Halbwertszeit der biologischen Aktivität beschrieben: Sie liegt für das O^6 -(4-Bromothienyl)-guanosin bei über 48 h. Der Wert entspricht dem Zeitpunkt, zu dem der MGMT-Inhibitor noch die halbmaximale Wirkung der MGMT-Hemmung besitzt [Cancer Research Campaign Technology Limited 1996]. Obwohl 16 h nach Versuchsbeginn nur noch 50 % der Anfangskonzentration des O^6 -(4-Bromothienyl)-guanosin detektiert werden, liegt die Aktivität des Inhibitors auch nach über 48 h noch bei der Hälfte des Ausgangswertes. Anhand der Differenz der Werte wird deutlich, daß möglicherweise Hydrolyseprodukte entstehen, die auch zur MGMT-Hemmung beitragen.

In den Messungen konzentrierte ich mich in erster Linie auf die Stabilität des Glucosides. Sowohl eine Spaltung der glucosidischen Bindung als auch der Bruch der N-Alkyl-Bindung zwischen Spacer und Purin sollte mit dem analytischen System sicher detektiert werden. Es konnte in den Versuchen gezeigt werden, daß die Glucokongugate **39** und **42**, bezogen auf diese Molekülteile, in den angegebenen Grenzen stabil sind. Möglicherweise kann jedoch in dem verwendeten HPLC-System eine Hydrolyse des O^6 -substituierten Purins nicht identifiziert werden, weshalb Modifikationen des 4-Bromthienyl-Substituenten nicht ausgeschlossen werden können. Da das Edukt der Kongugate (**4BTG**) sich momentan in der klinischen Prüfung befindet [Middleton et al. 2000], kann jedoch davon ausgegangen werden, daß *in vivo* eine ausreichende Stabilität des 4BTG gegeben ist.

4.3.2. β -Glucosidase-Stabilität der MGMT-Inhibitoren

Im weiteren sollte die mögliche Hydrolyse durch spezielle, ubiquitär vorkommende Enzyme untersucht werden.

Die Spaltbarkeit von Glucosiden durch β -Glucosidasen spielt eine große Rolle bei einer Reihe von Stoffwechselfvorgängen und für die Umsetzung sogenannter *Prodrugs* [Conn 1993]. Es handelt sich dabei um *per se* mehr oder weniger wirkungslose Arzneistoffe, deren Wirkform erst durch Freisetzung aktiver Metaboliten zur Verfügung steht [Burger & Wachter 1998]. Beispielsweise wird der DNA-aktive Metabolit des *Glufosfamids* durch Einwirken von β -Glucosidasen freigesetzt [Seker et al. 1998].

Auch im Falle der glucosidierten MGMT-Inhibitoren wäre es denkbar, daß das durch β -Glucosidase-Aktivität freigesetzte Aglycon vollkommen veränderte Eigenschaften gegenüber dem Glycosid besitzt. Das Aglycon kann sich in Bezug auf die Verteilung, die Ausscheidung, den weiteren Metabolismus und die Pharmakodynamik (= die Interaktion mit der MGMT) vom Konjugat unterscheiden, weshalb es von Interesse ist, inwiefern die glucosidierten MGMT-Inhibitoren als Substrate für β -Glucosidasen dienen können.

Mittels Massenspektrometrie (ESI) konnte sowohl für **39** als auch für **42** eine Spaltung durch das Enzym nachgewiesen werden (Abbildungen 3.3-5 und 3.3-6). Insbesondere für **39** kann eine hohe Umsetzungsrate angenommen werden, da im ESI kein Edukt mehr detektiert werden konnte. Neben der qualitativen Nachweise der Spaltung, konnte für **39** eine zeitabhängige Kinetik gezeigt werden (Abbildung 3.3-5 B), wobei bis 4 min maximale Umsetzungsrate erreicht werden und nach ungefähr 10 min eine Sättigung eintritt.

Wegen der großen Unterschiede in Bezug auf Lipophilie und sterische Ansprüche der zwei Verbindungen **39** und **42** kann davon ausgegangen werden, daß diese einen repräsentativen Querschnitt der MGMT-Inhibitor-Glucoside **39** bis **45** darstellen. Wahrscheinlich werden demzufolge auch die anderen Glucoside von β -Glucosidasen hydrolysiert. Aufgrund des verringerten sterischen Anspruchs und der erhöhten Lipophilie der Aglyca wäre es im weiteren von Interesse zu untersuchen, wie sich die Aglyca von den Glucosiden bezüglich ihrer Potenz zur MGMT-Inaktivierung unterscheiden und wie diese sich *in vivo* verhalten [Pegg et al. 1997].

4.4. *Molecular Modeling* der MGMT-Inhibitoren

Aufgrund der biologischen Ergebnisse der MGMT-Inhibitoren an Gesamtproteinextrakten von HeLaS3-Zellen schien sich eine Struktur-Wirkungs-Beziehung abzuzeichnen, die mittels *Molecular Modeling* Experimenten geprüft werden sollte.

Dazu wurde mit Moleküldynamiksimulation die mittlere Distanz zwischen Purin- und Glucoseteil der MGMT-Inhibitor-Glucoside **39** bis **45** ermittelt und mit den IC₅₀-Werten in Relation gesetzt (Abbildung 3.4-1, Tabelle 3.4-1).

Die kalkulierten Abstände für die homologe Reihe des Ethylglucosids des 4BTG (**39**) bis zum Decylglucosid des 4BTG (**43**) korrelierten hervorragend mit deren IC₅₀-Werten für die MGMT-Inhibition, die am Proteingesamtextrakt von HeLaS3-Zellen ermittelt wurden (Abbildung 3.4-2). Da das Decylglucosid (**43**) und das Dodecylglucosid (**44**) des 4BTG die gleiche IC₅₀ am Gesamtproteinextrakt von 0,03 µM aufweisen, wurde das Dodecylglucosid des 4BTG (**44**) nicht in diese Reihe aufgenommen. Es wird ein Grenzwert erreicht, so daß ab einer gewissen Länge des Spacers keine Steigerung der Aktivität mehr erreicht werden kann. Das Butinylglucosid (**45**) wurde aufgrund seiner dreifach ungesättigten Bindung ebenso nicht berücksichtigt.

Eine mögliche These zur Erklärung dieses Zusammenhangs ist, daß die gesteigerte Wirkung der Glucokongulate mit längerem Spacer davon abhängig sein könnte, daß der hydrophile Saccharidteil ab einer gewissen Länge aus dem Protein herausragen kann und dadurch die MGMT-Inhibitor:MGMT-Interaktion erleichtert wird (Abbildung 3.4-3). Dies sollte mit *Molecular Modeling* Experimenten an einem Modell zu klären versucht werden, wobei die ersten Versuche mit einem Homologiemodell der humanen MGMT auf Basis einer Röntgenkristallstruktur des Produktes des *ada* Gens von E.coli. durchgeführt wurden [Moore et al. 1994; Wibley et al. 1995].

Zur Etablierung des Modells war es notwendig, einen möglichen Eintrittskanal für die Inhibitoren zu definieren. Hierzu mußte der Radius der Kugel, die zur Darstellung der Wasser-zugänglichen Oberfläche (*water accesible surface*) dient, um 0,4 Å auf 1,0 Å gesenkt werden. Dadurch wurde ein möglicher Zugang zu Cys145 sichtbar, über den die Inhibitoren per Hand in das aktive Zentrum modelliert wurden. Anhand von Moleküldynamiksimulationen der MGMT-Inhibitor:MGMT-Komplexe ist zu erkennen, daß ab einem Octylspacer der Glucoseteil aus dem Protein herausragt und dementsprechend der sterisch anspruchsvolle Teil des N9-Substituenten nicht mit dem engen Eintrittskanal der MGMT interferiert (Abbildung 3.4-5). Das Ethylglucosid des 4BTG (**39**) muß vollständig in

die MGMT eindringen, damit der O⁶-Substituent in einen für die S_N2-Reaktion geeigneten Abstand kommt (ca. 4 Å).

Der Mechanismus erklärt jedoch nicht, weshalb die Änderung von Tyr114, das weit vom hier vorgeschlagenen Eintrittskanal liegt zu einer deutlichen Inaktivierung gegenüber O6BG führt [Goodtzova et al. 1998].

Desweiteren ist das Modell nicht geeignet, den Wirkungsverlust von N7-substituierten MGMT-Inhibitoren mit Guaninstruktur zu erklären (Kapitel 1.3.2) [Moschel et al. 1992]. Solche Verbindungen könnten nach dem hier vorgeschlagenen Bindungsmodus ebenfalls mit der MGMT reagieren.

Während der experimentellen Arbeit wurde die Kristallstruktur der humanen MGMT sowie deren methylierte- und benzylierte Produkte veröffentlicht [Wibley et al. 2000; Daniels et al. 2000]. Da die Kristallstrukturen experimentell ermittelt sind, können solche Daten als validere Grundlage betrachtet werden, um weitere Aussagen bezüglich der Substratspezifität abzuleiten [Böhm et al. 1996].

Die Röntgenstruktur zeigte neben dem oben beschriebenen Zugang zu Cys145 eine weitere mögliche Orientierung der Liganden, wobei dieser von der anderen Seite in das offen liegende aktive Zentrum eindringen kann.

Die Moleküldynamiksimulationen für **39** bis **45** wurden nach dem gleichen Simulationsprotokoll mit der Kristallstruktur der humanen MGMT wiederholt. Die Komplexe lieferten sehr aufschlußreiche Daten bezüglich der Interaktion einzelner Teile der MGMT-Inhibitoren mit bestimmten Aminosäuren der MGMT (Kapitel 5.4).

Zur besseren Übersichtlichkeit wurden die Interaktionsenergien der Molekülteile zusammengefaßt (Abbildung 3.4-7; Tabelle 3.4-2) bzw. für die wichtigsten Aminosäuren die Summen der Interaktionsenergien mit dem Gesamtmolekül und dem Spacerglucosid gegenübergestellt (Abbildung 3.4-9, Tabelle 3.4-3).

Es wurde deutlich, daß einige Aminosäuren eine entscheidende Rolle für die Interaktion der MGMT mit den Pseudosubstraten spielen, wobei der größte Anteil der Interaktionsenergie insgesamt durch das O⁶-substituierte Purin bedingt wird. Die Summen der Energien der vier Molekülteile *LTHO*, *LLNK*, *LPUI* und *LPU2* (Tabelle 3.4-2) betragen zwischen -16 kcal (**39**) und -24 kcal (**42**). Die Interaktionsenergien des Spacers und der Glucose hingegen summieren insgesamt nur zu einem Anteil von 13 % (**45**) bis 43 % (**43**). Die Werte der Interaktionsenergien dieser Molekülteile steigen beginnend bei **39** mit zunehmender Spacerlänge an, doch liegt der Wert von **44** deutlich niedriger als für **43**. Es muß davon

ausgegangen werden, daß aufgrund der Länge des Dodecylspacers ein Grenzwert für die Interaktion erreicht ist.

45 zeigt einen äußerst niedrigen Wert für die Interaktion, was wahrscheinlich auf mangelnde Wechselwirkungen des Butinylspacers mit der Dreifachbindung und den aromatischen Aminosäuren zurückzuführen sein könnte. Insgesamt konnte keine Korrelation der Gesamtsumme der Interaktionsenergien und der biologischen Aktivität der Glucoside abgeleitet werden, doch spricht die Konstanz wichtiger Werte für die hohe Qualität des Modells. Die Glucose leistet für **39** bis **42** einen Beitrag von -4 kcal bis -6 kcal zur Interaktionsenergie. Die Ethylenteile aller Spacer machen Interaktionsenergien von -1 kcal bis -2 kcal aus, und auch das O⁶-substituierte Purin wurde mit einem gut reproduzierbaren Wert für alle Glucoside gemessen (siehe oben).

Zur weiteren Evaluation der Daten wurden die Interaktionenergien der wichtigsten Aminosäuren mit dem Gesamtmolekül den Interaktionsenergien derselben Aminosäuren mit dem Spacerglucosid gegenübergestellt (Abbildung 3.4-10). Die daraus gebildeten Summen sollten eine bessere Vergleichbarkeit der Moleküle gewährleisten (Tabelle 3.4-3). Es wurden die Aminosäuren ausgewählt, die in einer der Interaktionsanalysen einen Zahlenwert größer als -1 kcal aufwiesen. Tabelle 3.4-3 gibt demnach auch eine gute Übersicht der bedeutendsten Residuen für die Wechselwirkungen mit den Glucosiden **39** bis **45**.

Tyr-158 ist für einen Beitrag von 22 % (**42**) bis 38 % (**39**), bezogen auf die Summe der Interaktionsenergien der aufgeführten Residuen, verantwortlich. Die Rolle dieser Aminosäure wurde bereits in der Literatur anhand von ortsspezifischen Mutagenese-Experimenten beschrieben [Edara et al. 1995; Xu-Welliver et al. 1999]. In den Untersuchungen von Edara und Mitarbeitern konnte festgestellt werden, daß der Austausch von Tyrosin an Position 158 durch Alanin eine vollständige Inaktivierung der MGMT zur Folge hat. Xu-Welliver und Mitarbeiter stellten später fest, daß der Austausch durch Histidin nur eine leicht verringerte MGMT-Aktivität, jedoch eine sehr hohe O⁶BG-Resistenz verursacht. Die meisten der bekannten MGMT-Sequenzen tragen an dieser Stelle ein Tyrosin oder in etwa 10 % der Fälle ein Phenylalanin. Auch anhand unserer Experimente kann davon ausgegangen werden, daß die Wechselwirkungen in dieser Position von sehr entscheidender Bedeutung sind.

Arg-128 und Tyr-114 sind zum Großteil für die Interaktion mit dem Spacerglucosid (= Molekülteil **b**, Abbildung 3.4-10) verantwortlich. Der Anteil der Interaktionsenergien der beiden Residuen im Vergleich zur Gesamtsumme des Spacerglucosids weist für **39** einen eher niedrigen Wert von 31 % aus, wohingegen für die anderen zwischen 45 % (**43**) und 64 % (**42**) erreicht werden. Die Bedeutung von Tyr114 für die MGMT:Substrat-Interaktion konnte

anhand von ortsspezifischen Mutagenese-Experimenten nachgewiesen werden [Goodtzova et al. 1998]. Beide Aminosäuren sind in allen bekannten MGMT Sequenzen konserviert, was deren Bedeutung für die Aktivität des Enzyms unterstreicht [Pegg et al. 1995]. Werden die Glucoside **39** bis **43** wie zuvor als homologe Reihe betrachtet, so läßt sich eine Korrelation der Interaktionsenergien der Spacerglucoside mit den IC₅₀-Werten der MGMT-Hemmung herstellen (Abbildung 3.4-10).

Einige Monate nach Veröffentlichung der Kristallstruktur der humanen MGMT, wurde die Kristallstrukturen des benzylierten und des methylierten Produkts der humanen MGMT publiziert. Es ergab sich dadurch die Möglichkeit, die Qualität des hier vorgeschlagenen Modells zur Bindung der 4BTG-Glucoside durch Vergleich mit experimentellen Daten abzuschätzen. Hierzu wurde das Rückgrat der beiden Modelle überlagert und zum einen die Übereinstimmung der Lage der wichtigen Strukturmerkmale verifiziert und zum anderen der Abstand des O⁶-Substituenten der 4BTG-Glucoside mit dem Benzylrest des Benzylethers gemessen. Beide Versuche zeigten, daß das hier vorgeschlagenen Modell gut mit den publizierten Daten übereinstimmt und von einer hohen Zuverlässigkeit ausgegangen werden kann.

Im folgenden wäre es sinnvoll, beide Modelle auf ihre Eignung zur Vorhersage der biologischen Aktivität von MGMT-Inhibitoren hin zu prüfen. Es könnten Glucoside mit einem Heptylspacer und einem Nonylspacer synthetisiert und getestet werden, um deren Übereinstimmung mit der erstellten Struktur-Wirkungsbeziehung zu prüfen. Die Interaktion des Tyr114 könnte eventuell durch einen aromatischen Spacer zwischen dem 4BTG und der Glucose verbessert werden. Nach Berechnung durch eine Moleküldynamiksimulation mit dem etablierten Protokoll könnte eine Vorauswahl von Strukturen getroffen werden, die dann ebenfalls synthetisiert und getestet werden.

4.5. Biologische Aktivität der PARP-Inhibitoren

Die zwei PARP-Inhibitoren 2-[(1'-*H*-benzimidazol-4''-carboxamidyl)-4'-phenyl]-oxoethyl-β-D-glucosid (**56**) und 4-[(1'-*H*-benzimidazol-4''-carboxamidyl)-4'-phenyl]-oxobutyl-β-D-glucosid (**57**) wurden mittels eines immunochemischen PARP-Tests auf ihre Fähigkeit zur PARP-Hemmung getestet.

Sowohl **56** als auch **57** waren deutlich besser wasserlöslich als die nicht modifizierten Substanzen 2-(4'-hydroxyphenyl)-1-*H*-benzimidazol-4carboxamid (*PARP-OH*) und 2-(4'-hydroxyphenyl)-1-*H*-benzimidazol-4carboxamid (*PARP-MET*). Während das Ethylglucosid

(56) bis zu 10 mM in Wasser eine klare Lösung ergab, mußte für das Butylglucosid (57) zur Herstellung einer 10 mM Stammlösung 2 % DMSO zugesetzt werden. PARP-OH und PARP-MET jedoch sind unter gleichen Bedingungen in Wasser schlecht löslich.

Die Ergebnisse an den permeabilisierten C4I-Zellen für PARP-OH und PARP-MET entsprechen qualitativ den Untersuchungen von White [1996]. PARP-MET ist mit einer IC_{50} von 3,9 μM gegenüber 11,8 μM für PARP-OH der aktivere PARP-Inhibitor ist. Das Butylglucosid (57) und das Ethylglucosid (56) liegen mit IC_{50} -Werten von 11,2 μM bzw. 15,3 μM in einem vergleichbaren Bereich mit PARP-OH.

Auch im Test an C4I-Zellen zeigten das Butylglucosid (57) und das Ethylglucosid (56) vergleichbare Werte bezüglich der PARP-Hemmung. Es wurden Versuche in glucosereduziertem und in Vollmedium durchgeführt, um zu untersuchen, ob ein möglicher aktiver Transport durch Glucosetransporter für die Aufnahme der Konjugate verantwortlich sein könnte. Durch Entzug des Substrates D-Glucose könnte eine verstärkte Aktivität der Transporter erreicht werden, die sich in einer erhöhten Wirkung der Glucokonjugate bemerkbar machen würde. Lediglich für das Ethylglucosid (56) konnte mit einer IC_{50} von 8,4 μM in glucosereduziertem Medium gegenüber einem Wert von 15,6 μM in Vollmedium ein Unterschied festgestellt werden. Die Werte des Butylglucosids (57) sind unter beiden Bedingungen weitestgehend gleich. Ob der beobachtete Effekt für das Ethylglucosid (56) auf einen aktiven Transport zurückzuführen ist, müßte jedoch weiter untersucht werden.

In den Versuchen konnte gezeigt werden, daß sowohl das Ethylglucosid (56) als auch das Butylglucosid (57) in der Lage sind, die PARP an perforierten C4I-Zellen als auch an lebenden C4I-Zellen zu hemmen. Die für die halbmaximale Hemmung notwendigen Konzentrationen entsprechen der nicht-glucosidierten Ausgangssubstanz *PARP-OH*. Die Glucoside der PARP-Inhibitoren stellen aufgrund ihrer Fähigkeit zur PARP-Inhibition bei deutlich gesteigerter Wasserlöslichkeit eine hervorragende Ausgangsbasis für die Entwicklungen analoger Verbindungen dar.

4.6. Biologische Aktivität der SWITCH-Inhibitoren

Die Glucosidierung der drei SWITCH-Inhibitoren N-Methyl-, N-Phenyl- und N- α -Naphthyl-N⁴-(4,4-dimethyl-1,2,3,4-tetra-hydro-1,3-dioxo-7-isoquinoliny)-harnstoff sollte zur Verbesserung der Wasserlöslichkeit bei einer möglichst gleichwertigen biologischen Aktivität führen.

CD-Messungen wurden als erstes *Screening* verwendet, um zu prüfen, ob das 2-[2'-(N-**Methyl**-N'-(4,4-dimethyl-1,2,3,4-tetrahydro-1,3-dioxo-7-isoquinolinyloxy)-harnstoff)]-**ethyl**-1- β -D-glucosid (**50**) und das 4-[2'-(N-**Methyl**-N'-(4,4-dimethyl-1,2,3,4-tetrahydro-1,3-dioxo-7-isoquinolinyloxy)-harnstoff)]-**butyl**-1- β -D-glucosid (**51**) zur *SWITCH*-Inhibition geeignet sind. Mit $IC(CD)_{50}$ -Werten von 1 μ M (**50**) bzw. 2 μ M (**51**) liegen diese deutlich über den Werten des nicht glucosidierten *SWITCH*-Inhibitors, der in diesem Versuch eine $IC(CD)_{50}$ von 150 μ M aufweist [von Stosch et al. 1996]. Darüberhinaus sind **50** und **51** im Gegensatz zu den nicht modifizierten Ausgangssubstanzen bis 10 mM in Wasser löslich.

Mittels des *gp120-CD4-Bindungsversuchs* (Abbildung 3.6-5) wurde die Potenz der glucosidierten *SWITCH*-Inhibition zur Hemmung der Bindung des LAV15-Peptids an den CD4-Rezeptor *in vitro* evaluiert. Erste Messungen nach dem etablierten Versuchsaufbau verliefen ohne erkennbare Hemmung der [14 C]-LAV-Hemmung. Nach einem modifizierten Protokoll wurde das [14 C]-LAV-Peptid mit den *SWITCH*-Inhibitoren **50** und **51** vorinkubiert, so daß die Interaktion vor der Exposition mit den Zellen stattfinden konnte.

Es wurde eine deutlich Reduktion der gebundenen Radioaktivität beobachtet (Abbildung 3.6-7). Sowohl **50** als auch **51** waren ungefähr 8 mal aktiver als die nicht-glucosidierte Ausgangssubstanz N-Methyl-N'-(4,4-dimethyl-1,2,3,4-tetrahydro-1,3-dioxo-7-isoquinolinyloxy)-harnstoff mit einer IC_{50} von 250 μ M [Reed 2000].

Als mögliche Erklärung für die unterschiedlichen Ergebnisse ist eine Immobilisierung der *SWITCH*-Inhibitoren in Betracht zu ziehen. Die glucosidierten *SWITCH*-Inhibitoren binden an zelluläre Strukturen, die eine Affinität gegenüber Glucose aufweisen, und stehen infolgedessen nicht mehr für die Interaktion mit dem LAV-Peptid zur Verfügung.

Eine andere Möglichkeit wäre die zelluläre Aufnahme der Glucoside. Da nur die Glucosekonjugate dieses Phänomen zeigen, wird die Aufnahme wahrscheinlich über den Saccharidteil des Moleküls vermittelt, was für die Aktivität von Glucosetransportern spricht.

Durch Zusatz von Glucose zum PBS sollte die Inaktivierung der *SWITCH*-Inhibitoren unterbunden werden. Dabei wurde von einer höheren Affinität der Glucose bindenden Strukturen gegenüber der unsubstituierten D-Glucose im Vergleich zu den Glucosekonjugaten ausgegangen und erwartet, daß die *SWITCH*-Inhibitor-Glucoside wieder frei vorliegen und mit dem LAV-Peptid interagieren können. Es wurden 3 mM Glucose eingesetzt, da dies der 10-fachen Konzentration des *SWITCH*-Inhibitors entsprach.

Sowohl für **50** als auch für **51** konnte im Konzentrationsbereich von 0,1 μ M bis 300 μ M eine über 50 %ige Reduktion der [14 C]-LAV-Bindung beobachtet werden. Die IC_{50} dieser Substanzen liegen unterhalb des zuerst gemessenen Wertes und übersteigen die Aktivität der

Ausgangssubstanz um das 2500-fache. Für das Ethylglucosid des Phenyl-Derivats (**52**) ergab die Messung von 5 nM bis 300 μM eine logarithmische Beziehung zwischen der Konzentration und der Hemmung der [^{14}C]-LAV-Bindung mit einer IC_{50} von 0,068 μM . Die nicht glucosidierte Ausgangssubstanz ist mit einer IC_{50} von 30 μM über 400 mal weniger wirksam als das Glucosid.

Das Ethylglucosid des Naphthyl-Derivats (**53**) ist deutlich weniger wirksam als alle anderen Glucoside mit einer IC_{50} von 6 μM . Im Vergleich zur Ausgangsverbindung mit einer IC_{50} von 5,5 μM konnte demnach auch keine Verbesserung durch die Glucosidierung erreicht werden. Eventuell ist dies auf die geringe Wasserlöslichkeit zurückzuführen, da das Glucosid **53** in den notwendigen Konzentrationen in Methanol gelöst werden mußte.

Zusammengefaßt kann festgehalten werden, daß die Glucoside **50**, **52**, und **53** der SWITCH-Inhibitoren eine erhebliche Verbesserung gegenüber den unmodifizierten Ausgangssubstanzen darstellen. Die Glucokonjugate zeichnen sich im Vergleich zu den nicht-glucosidierten SWITCH-Inhibitoren durch eine erhöhte Wasserlöslichkeit aus und sind darüberhinaus deutlich potenter, die Bindung des LAV15-Peptids an den CD4-Rezeptor zu hemmen. Insbesondere die Ethylglucoside des Methyl-Derivates (**50**) und des Phenyl-Derivates weisen eine vielversprechende Kombination dieser Eigenschaften auf. Die Glucosidierung des Naphthyl-Derivates hingegen konnte keine entscheidende Verbesserung der Wasserlöslichkeit bewirken und führte lediglich zu einer ähnlich potenten Struktur in Bezug auf die SWITCH-Inhibition.

Die Verbindungen werden zur Zeit in einem HIV-Bindungstest geprüft, ob sie in der Lage sind, in komplexeren Systemen eine Infektion der Wirtszellen zu verhindern.

5. Zusammenfassung und Ausblick

In dieser Arbeit sollte eine Synthesestrategie entwickelt werden, mit der Monosaccharid-Konjugate potentieller MGMT-Inhibitoren, PARP-Inhibitoren und SWITCH-Inhibitoren dargestellt werden können. Der weitere Schwerpunkt dieser Arbeit lag in der Evaluation der biologischen Aktivität der synthetisierten Glucoside, wobei die Weiterentwicklung der MGMT-Inhibitoren im Vordergrund stand.

Es wurden acetyl- oder benzoylgeschützte Bromoalkyl- β -D-Glucoside synthetisiert, die zur Einführung von Glycosylalkylresten in beliebige Moleküle geeignet sind. So wurden zum Teil in sehr guten Ausbeuten O⁶-substituierten Purine zu MGMT-Inhibitor-Glucosiden, eine Hydroxyphenyl-benzimidazol-Grundstruktur zu PARP-Inhibitor-Glucosiden und eine Isochinolindion-Grundstruktur zu SWITCH-Inhibitor-Glucosiden umgesetzt. Die nukleophile Substitution sowohl mit dem Imidazolring der Purine, als auch mit dem NH-aciden Stickstoff der Isochinolindion-Struktur sowie mit phenolischen OH-Gruppen analog einer *Williamson-Ethersynthese* lassen die breiten Anwendungsmöglichkeiten dieser Verbindungen erkennen. Es wurden zwanzig neue Zielverbindungen dargestellt und charakterisiert, die im zweiten Teil der Arbeit auf deren biologische Aktivität untersucht werden konnten.

Ein Vorteil der neu entwickelten Methode besteht darin, daß durch die Verwendung von Bromoalkyl- β -D-Glucosiden zur Reaktion mit den Pharmakophoren, die oftmals aufwendige Trennung der bei der direkten Glucosidierung entstehenden α -/ β -Glucosid-Gemische vermieden werden.

Die zur Darstellung der Bromoalkylglucoside entwickelten Synthesestrategien stellen gegenüber den bislang beschriebenen Wegen eine deutliche Verbesserung dar: Es konnten eine Reihe neuer Verbindungen synthetisiert und für bekannte Strukturen die Ausbeuten verbessert und die Reinigung vereinfacht werden. Alle Synthesewege sind mit preiswerten Edukten im großen Maßstab durchführbar, so daß ein guter Zugang zu den Bromoalkylglucosiden gewährleistet wird.

Der "Goldstandard" der MGMT-Inhibitoren, das O⁶-Benzylguanin (O6BG), befindet sich derzeit in der klinischen Prüfung. Es zeichnet sich jedoch durch schlechte Wasserlöslichkeit aus und zeigt keine Präferenz gegenüber dem Zielgewebe.

Die Bestimmung der IC₅₀ der MGMT-Hemmung am Gesamtproteinextrakt von HeLaS3-Zellen zeigte, daß die MGMT-Inhibitor-Glucoside des O⁶-(4-Bromophenyl)-guanin (4BTG) in Abhängigkeit von der Spacerlänge eine mit dem O6BG vergleichbare oder deutlich höhere MGMT-Aktivität besitzen. Das Octylglucosid des 4BTG weist einen IC₅₀-Wert auf, der 20

mal niedriger liegt, als der des O6BG. Das Ethylglucosid des 4BTG zeigt bei deutlich höherer Wasserlöslichkeit eine dem O6BG vergleichbare Potenz zur Hemmung der MGMT-Aktivität. Beide Substanzen können einem Targeting Konzept genügen, das einen aktiven Transport über Glucose-Transporter impliziert, was einen großen Vorteil gegenüber allen bislang über zweihundertfünfzig veröffentlichten MGMT-Inhibitoren bedeutet. Am Zelltest mit HeLaS3-Zellen zeigt die hohe Aktivität der MGMT-Inhibitor-Glucoside, daß diese in der Lage sind auch über Zellmembranen an ihren Wirkort zu gelangen.

Die klinische Anwendung von MGMT-Inhibitoren soll der Sensibilisierung von Tumorgewebe zur Überwindung der Resistenz bei der Behandlung mit chlorethylierenden oder methylierenden Chemotherapeutika dienen. Die Fähigkeit der 4BTG-Glucoside zur Steigerung der Toxizität dieser Therapeutika konnte an zwei Fotemustin-resistenten Melanom-Zelllinien nachgewiesen werden.

Mit Stabilitätsuntersuchungen wurde sichergestellt, daß die 4BTG-Glucoside unter den angegebenen Bedingungen der *in vitro*-Testsysteme bei pH 7,4 und in Zellkulturmedium stabil sind, was diese für einen Einsatz auch *in vivo* qualifiziert. Die 4BTG-Glucoside können dementsprechend an HeLaS3-Tumor-Xenografts in Nacktmäusen auf deren Fähigkeit zur MGMT-Inhibition *in vivo* getestet werden.

Anhand der Ergebnisse wurde eine Struktur-Wirkungsbeziehung zwischen der Spacerlänge und der biologischen Aktivität aufgestellt, die eine sehr gute Korrelation beider Parameter nachweist. Durch Moleküldynamiksimulationen von MGMT:MGMT-Inhibitor-Komplexen an einem Homologiemodell und einer Kristallstruktur der MGMT konnten zwei Modelle etabliert werden, die in der Lage sind, die unterschiedliche Potenz der MGMT-Inhibitoren einerseits durch Visualisierung und andererseits durch Auswertung der gemessenen Interaktionsenergien zu erklären. Die entwickelten Computermodelle können ein hilfreiches Instrument für die Weiterentwicklung der Substanzklasse darstellen, müssen dazu jedoch auf ihre Validität zur Voraussage der biologischen Aktivität geprüft werden.

Auch für die zwei synthetisierten PARP-Inhibitor-Glucoside konnte eine Verbesserung der biologischen Anwendungsmöglichkeiten erreicht werden. Bei erheblich verbesserter Wasserlöslichkeit zeigten diese sowohl an permeabilisierten, als auch an intakten C4I-Zellen eine mit der nicht glucosidierten Ausgangsverbindung vergleichbare PARP-Hemmung.

Zukünftig wäre es für die MGMT-Inhibitor-Glucoside und die PARP-Inhibitor-Glucoside von Interesse deren Eigenschaften bezüglich eines aktiven Transports zu prüfen.

In der Literatur wird für beide Substanzklassen eine Steigerung der Toxizität alkylierender Agenzien beschrieben. Es könnte dementsprechend untersucht werden, inwiefern durch eine Kombination dieser Substanzen ein synergistischer Effekt erzielt werden kann.

Drei der vier SWITCH-Inhibitoren wiesen im modifizierten *gp120-CD4-Bindungsversuch* eine höhere Wirksamkeit auf, als die nicht glucosidierten Ausgangsverbindungen. Für das Ethylglucosid des Phenyl-Derivates wurde eine 400 mal niedrigere IC_{50} bestimmt, als für das nicht-glucosidierte Molekül. Die bislang verwendeten SWITCH-Inhibitoren waren aufgrund der zu geringen Wirksamkeit und der unzureichenden Wasserlöslichkeit in ihrer Anwendung stark limitiert. Die hier vorgestellten SWITCH-Inhibitor-Glucoside sind allesamt besser wasserlöslich und könnten insbesondere auch wegen der erhöhten Potenz den entscheidenden Durchbruch bei der Weiterentwicklung dieses Therapiekonzepts bedeuten. Dazu müssen diese im folgenden am intakten HI-Virus auf ihre Fähigkeit zur Hemmung der Virus-Wirtszell-Interaktion geprüft werden. Zeigen sie sich ebenso aktiv wie im *gp120-CD4-Bindungsversuch*, wäre es darüber hinaus sinnvoll zum rationalen Design der Verbindungen ein Computermodell zu entwickeln, das bessere Voraussagen über die Wirksamkeit neuer Verbindungen zuließe.

6. Experimenteller Teil

6.1. Materialien und Methoden

6.1.1. Synthesen

Lösungsmittel

Alle Reaktionen wurden in wasserfreien, käuflich erworbenen p.A. Lösungsmitteln durchgeführt. Die polaren Lösungsmittel Methanol, Ethanol, DMF, DMSO und Acetonitril wurden über Molekularsieb 3 Å getrocknet, alle anderen über Molekularsieb 4 Å.

Als mobile Phase der Säulen-, bzw. Flashchromatographie wurden p.A. Lösungsmittel, bzw. frisch destillierte, technische Lösungsmittel verwendet.

Als mobile Phase bei der HPLC dienten Laufmittel der Firma Merck (Darmstadt), Lichrosolv®, und der Firma Roth (Karlsruhe), *Gradient Grade*, sowie Milipore-Wasser die zuvor min. 5min im Ultraschallbad, bzw. durch Vakuum (Milipore-Wasser) entgast wurden.

Reagenzien

Soweit nicht anders angegeben wurden alle kommerziell erhältlichen Edukte über die Firmen Sigma-Aldrich (Deisenhofen), Merck (Darmstadt), Fluka (Neu-Ulm) oder Acros Organics (Geel, Belgien) bezogen.

Kernresonanzspektroskopie

¹H-NMR: Bruker AM 250 (250 MHz)

Bruker AM 500 (500MHz)

¹³C-NMR Bruker AM 250 (63 MHz)

Bruker 500 (125 MHz)

Interner Standard: Tetramethylsilan, $\delta = 0,00$ ppm

Abteilung Zentrale Spektroskopie des DKFZ, Heidelberg

Massenspektrometrie

Elektrospray-Ionisation (ESI) Finnigan MAT TSQ 7000

Abteilung Zentrale Spektroskopie des DKFZ, Heidelberg

Fast-Atom-Bombardment (HR-FAB) JEOL JMS700

Abteilung Spektroskopie des Instituts für Chemie der Universität Heidelberg

UV-Spektren

Kontron Uvikon Spectrophotometer 931, Kontron Instruments (Rotkreuz, Schweiz)

Schmelzpunktbestimmung

Schmelzpunktapparatur nach Dr. Tottoli, Büchi, Flawil Laborgeräte (Schweiz)

Werte sind nicht korrigiert

Elementaranalysen

Carlo Erba Elemental Analyzer CHNS EA 1108

Max-Planck-Institut für Theoretische Medizin, Heidelberg

Dünnschichtchromatographie

Zur Dünnschichtchromatographie kamen beschichtete Kunststoffplatten der Firma Macherey-Nagel (Düren), Polygram[®] Sil G/UV₂₅₄, und im Einzelfall beschichtete Aluplatten der Firma Merck (Darmstadt), Kieselgel 60 F₂₅₄, zur Anwendung. Die Detektion erfolgte mittels UV (254 nm) und / oder Färbereagenzien.

Es wurden dazu im einzelnen verwendet:

Cer-Molybdänreagenz: 25 g Molybdätophosphorsäure, 10 g Cer-(IV)-sulfat-tetrahydrat und 60 ml konzentrierte Schwefelsäure in 900 ml Wasser gelöst. Anwendung bei allen oxidierbaren Substanzen, speziell Glucoside etc.

Vanillin-Schwefelsäurereagenz: 1 g Vanillin gelöst in 1000 g 50% Schwefelsäure.
Anwendung insbesondere bei Glucosiden.

Kaliumpermanganatreagenz: 5 g Kaliumpermanganat in 1000 g Wasser.
Anwendung bei Olefinen und anderen oxidierbaren Substanzen.

Die besprühten Platten wurden mit dem Heißluftgebläse bis zur vollständigen Trocknung erhitzt (~150 – 200 ° C; 1-3 min).

Säulenchromatographie

Die Säulenchromatographie wurde mit selbst gefüllten Normaldruckglassäulen an Kieselgel der Firma Macherey-Nagel (Düren), Kieselgel 60; 70-230 mesh ASTM, durchgeführt, wobei durchschnittlich 50 g Kieselgel pro g Reaktionsgemisch verwendet wurden. Die eingesetzte Menge wurden bei größeren Trennproblemen bis auf 100 g erhöht.

Zur Flash-Chromatographie wurde Stickstoff über ein Ausgleichsventil auf die selbst gefüllten Säulen geleitet, so daß Durchflußzeiten von 45 - 90 s / 20 ml erreicht wurden. Als stationäre Phase diente Kieselgel der Firma Macherey-Nagel (Düren), Kieselgel 60, 230-400 mesh ASTM.

Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC)

Die HPL-Chromatographie wurde mit verschiedenen Anlagen durchgeführt.

Anlage A:

HP1090, Hewlett Packard (Bad Homburg)

Anlage B:

Pumpe PU980, Jasco (Groß-Umstadt)

Ternärer Gradientenmischer DG980-50, Jasco (Groß-Umstadt)

Entgaser LG980-02, Jasco (Groß-Umstadt)

Detektor UV975 intelligent UV-VIS-detector, Jasco (Groß-Umstadt)

Ventil mit 250 µl Aufgabeschleife, Rheodyne, Latek (Eppelheim)

Anlage C:

Gradient-Master, Latek (Heidelberg)

P400-Pumpen, Latek (Heidelberg)

Latek Spectrum-Monitor, Latek (Heidelberg)

HP Integrator 3396A-Integrator, Hewlett Packard (Bad Homburg)

Ventil mit 2ml Aufgabeschleife, Rheodyne, Latek (Eppelheim)

HPLC-Methoden

HPLC Methoden I - XII (siehe Tabelle 3.1-6)

Anlage:	B
Anwendung:	MGMT-Inhibitoren 34, 37, 39 - 45
Säule:	Beckmann, Lichrospher (100-RP18-(E)-5 µ; 250 x 4 mm)
Mobile Phase:	siehe Tabelle 3.1-6
Flußrate:	1 ml/min
Detektion:	254 nm

HPLC Methode XIII

Anlage:	A
Anwendung:	MGMT-Inhibitoren 20 - 33, 35 - 36, 38
Säule:	Merck (Darmstadt) Lichrospher (100-RP18-(E)-5µ; 250 x 4 mm)
Mobile Phase:	Acetonitril/Wasser 10 : 90 % in 20 min auf 100 % Acetonitril

Flußrate: 1 ml/min
Detektion: 254 nm und 280 nm

HPLC Methode XIV

Anlage: **A**
Anwendung: SWITCH-Inhibitoren **46, 47**
Säule: Merck (Darmstadt) Purospher (Si 80- 5 µ; 125 x 4 mm)
Mobile Phase: Chloroform / Methanol 97,5 : 2,5 %
Flußrate: 1 ml/min
Detektion: 254 nm bis 366 nm

HPLC Methode XV

Anlage: **A**
Anwendung: SWITCH-Inhibitoren **50, 51**
Säule: Merck (Darmstadt) Purospher (Si 80- 5 µ; 125 x 4 mm)
Mobile Phase: Chloroform / Methanol 85 : 15 %
Flußrate: 0,5 ml/min
Detektion: 254 nm bis 366 nm

HPLC Methode XVI

Anlage: **A**
Anwendung: SWITCH-Inhibitoren **53**
Säule: Merck (Darmstadt) Lichrospher (100-RP18-(E)-5µ; 250 x 4 mm)
Mobile Phase: Methanol / 0,1 M Trimethylammoniumacetat (pH 7,0) 10 : 90 %
Flußrate: 1 ml/min
Detektion: 254 nm

HPLC Methode XVII

Anlage: **A**
Anwendung: PARP-Inhibitoren **54, 55**
Säule: Merck (Darmstadt) Purospher (Si 80- 5 µ; 125 x 4 mm)
Mobile Phase: Chloroform / Methanol 98 : 2 %
Flußrate: 1 ml/min
Detektion: 254 nm; 330 nm

HPLC Methode XVIII

Anlage: **A**
Anwendung: PARP-Inhibitoren **56, 57**
Säule: Merck (Darmstadt) Purospher (Si 80- 5 µ; 125 x 4 mm)

Mobile Phase: Chloroform / Methanol 97,5 : 2,5 %, 7 min; in 1 min auf 80 : 20 %
Flußrate: 1 ml/min
Detektion: 254 nm bis 330 nm

HPLC Methode XIX

Anlage: **C**
Anwendung: PARP-Inhibitoren **56, 57**
Säule: Merck (Darmstadt) Purospher (Si 80- 5 µ; 250 x 25 mm)
Mobile Phase: Chloroform / Methanol 98 : 2 % in 30 min auf 80 : 20 %
Flußrate: 10 ml/min (Druck 70 bar)
Detektion: 254 nm bis 330 nm

6.1.2. MGMT-Inhibitoren

6.1.2.1. MGMT-Tests

Die MGMT-Tests wurden in Zusammenarbeit mit der Abteilung für Angewandte Toxikologie des Instituts für Toxikologie der Universität Mainz durchgeführt

Chemikalien, Lösungen und Puffer

Ultraschallpuffer	20 mM Tris-HCl, pH 8,5 1 mM EDTA 1 mM Mercaptoethanol 5 % Glycerin
„10 x“-Puffer	70 mM Hepes-KOH pH 7,8 10 mM Dithiotreitol 50 mM EDTA
Trypsin	2 mM EDTA 0,25 % trypsin
PBS	Life Technologies GmbH (Karlsruhe)
[³ H]-Kalbsthymus-DNA	Durch Umsetzung mit [³ H]-Methyl-N-nitrosoharnstoff modifizierte Kalbsthymus-DNA. Bereitgestellt von Prof. Dr. Bernd Kaina, Institut für Toxikologie, Abteilung für angewandte Toxikologie, Universität Mainz.

wovon 15 µl 15 – 20 min bei 95 °C gekocht werden. Nach dem Abkühlen wird zentrifugiert (14.000 U / min; 10 min) und das Pellet in 400 µl 5 % Trichloressigsäure gewaschen. Der Vorgang wird zweimal wiederholt. Danach wird das Pellet in 200 µl NaOH gelöst und nach Zusatz von 4 ml Szintillator (Cocktail) im β-Counter vermessen (3 min).

Der Ausdruck der Aktivität erfolgt im Vergleich zur Kontrolle (= 100 %) in Femtomol übertragener [³H]-Methylgruppen / mg Protein.

6.1.2.2. Untersuchungen an MeWo-Zellen

Die Untersuchungen an MeWo-Zellen wurden in Zusammenarbeit mit der Klinischen Kooperationsseinheit für Dermato-Onkologie durchgeführt

Chemikalien, Lösungen und Puffer

Wasser	Aqua ad injectabilia; Braun (Melsung)
DMSO	Dimethylsulfoxid; Sigma (Deisenhofen)
FCS	Fötale Kälberserum; Life Technologies (Karlsruhe)
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl) 2,5diphenoltetrazoliumbromide; Sigma (Deisenhofen)
PBS	Phosphatgepufferte Saline, Biochrom KG (Berlin)
Penicillin/Streptomycin	Biochrom KG (Berlin)
Fotemustin	Muphoran®; Les Laboratoires Servier (München)
Trypsin/EDTA (10x)	Biochrom KG (Berlin)
Trypsin/EDTA (2x)	Trypsin-EDTA (10x) mit Aqua ad injectabile zur Endkonzentration von 0,1/0,04% (w/v) (Trypsin/EDTA (2x)) verdünnt.
MTT/PBS-Lösung	MTT zu 5mg/ml PBS lösen, steril filtrieren (=Stammlösung); lichtgeschützt aufbewahren
Messmedium:	20%(v/v) Medium 70%(v/v) PBS 10%(v/v) MTT/PBS-Lösung
Fotemustin-Lösung	Fotemustin mit 95% Ethanol zu 50mg/ml lösen; mit RPMI 1640 zu Stammlösungen verdünnen; lichtgeschützt bei -20 °C aufbewahren (<= 2 Monate).

Zellkulturbedingungen

Zelllinien

MeWo Humanen Melanomzelllinie, aus einer Lymphknotenmetastase eines Melanompatienten am Memorial Sloan Kettering Cancer Center New York etabliert. Bereitgestellt von Prof. Dr. Dirk Schadendorf, Klinische Kooperationsseinheit für Dermato-Onkologie, DKFZ Heidelberg. Ausgehend davon wurden Zelllinien abgeleitet, die chemoresistent gegen verschiedene Chemotherapeutika (Cisplatin, Etoposid, Fotemustin, Vindesin) sind (siehe Kapitel 3.2.2).

MeWo_{Fote4} Inkubationskonzentration 4 µg Fotemustin / ml Vollmedium

MeWo_{Fote40} Inkubationskonzentration 40 µg Fotemustin / ml Vollmedium

Medium

RPMI 1640 Biochrom KG (Berlin)
 Vollmedium +10% inaktiviertes FCS
 +2% Glutamin (100X) 200mM
 +1% Penicillin/Streptomycin (100X)

Geräte

ELISA-Reader µ-QUANT, BIO-TEK-Instruments Inc., Delux (Gödenstorf)
 Inkubator US Auto-Flow; Nuair, American Auto-Matrix (Export, Pennsylvania)
 Mikroskop DMIL, Leica (Heidelberg)
 Sterilbank SterilGard ClassII Type A/B3
 The Baker Company (Sanford, Maine)
 Wasserbäder Köttermann Labortechnik (Uetze/Hänigsen)
 SW20, Julabo Labortechnik (Seelbach)
 Zentrifuge RT7, Sorvall (Bad Homburg)

Inkubation mit MGMT-Inhibitor / Fotemustin

Die Zellen werden in einer Dichte von 500 Zellen / Loch (100 µl Suspension / Loch) in einer 96 Loch-Kulturplatte ausgesät (48 h, 37 °C, 5 % CO₂). Es wird bei wird für 2 h mit dem MGMT-Inhibitor und anschließend mit Fotemustin inkubiert (jeweils in 50 µl Medium). Als Kontrolle dient ein nur mit Medium behandelter Vergleich. Nach einer Gesamtzeit von 5 h

wird das Medium entfernt, 3 x mit 150 µl PBS gewaschen und im letzten Schritt durch 150 µl Vollmedium ersetzt. Die Platten werden 96 h bei 37 °C / 5 % CO₂ inkubiert und die Überlebensraten mittels des MTT-Tests ermittelt:

Bestimmung der Überlebensraten mittels des MTT-Test

Mitochondrien lebender Zellen sind in der Lage MTT aufzunehmen und dies zu Formazan zu reduzieren. Die Menge des gebildeten Formazans ist proportional zur Zahl lebender Zellen und wird erlaubt die photometrische Quantifizierung bei 540 nm. Dazu wird das Medium in der 96 Loch-Kulturplatte durch 100 µl Meßmedium ersetzt und für 4 h unter den Standardkulturbedingungen (s.o.) inkubiert. Es wird abgesaugt und 150 µl DMSO zum Lysieren der Zellen und Lösen der Formazan-Kristalle zugegeben. Die Platten werden im ELISA-Reader vermessen. Aus dem Quotienten der Extinktion behandelter und unbehandelter Zellen wird die Überlebensrate berechnet, wobei die Eigenabsorption durch die Platte zu berücksichtigen ist.

6.1.2.3. Eigenschaften der MGMT-Inhibitoren

6.1.2.3.1. Stabilitätsbestimmungen

Lösungen und Puffer

Puffer pH 6,0 37,4 ml KH₂PO₄-Lösung (9,073 g/l H₂O)
 62,6 ml Na₂HPO₄ x 2 H₂O -Lösung (9,073 g/l H₂O)

Puffer pH 7,4 9,8 ml KH₂PO₄-Lösung (9,073 g/l H₂O)
 90,2 ml Na₂HPO₄ x 2 H₂O -Lösung (9,073 g/l H₂O)

Der pH-Wert ist mittels pH-Meter (Handylab 1, Schott Glaswerke , Mainz) kontrolliert und im Bedarfsfalle eingestellt worden.

Medium RPMI 1640, Glucosefrei, ohne Farbstoff
 5 % *inaktiviertes FCS*

Stabilitätsbestimmung

Die beiden MGMT-Inhibitor-Glucoside wurden aus DMSO-Stammlösungen (10 mg/ml) mit den Puffern oder Medium unter Einhaltung der Sterilität verdünnt und bei 37 °C geschüttelt. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden jeweils 150 µl entnommen, direkt in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -30 °C bis zur Analyse gelagert.

Für die Messungen in Puffer pH 6,0 erfolgte die Probenentnahme nach ½ h, 1 h, 2 h, 4 h, 8 h und 24 h. In Puffer pH 7,4 und in Medium wurden nach 1 h, 8 h, 24 h, 48 h, 72 h, 168 h Proben entnommen.

HPLC-Analytik

Die Proben wurden ohne Aufarbeitung auf einer HP1090- Anlage (Hewlett Packard, Bad Homburg) analysiert.

Methode für 2-[O⁶-(4-Bromothienyl)-guan-9-yl]-ethyl-b**-D-glucosid (39):**

Säule: Merck (Darmstadt) Lichrospher (100-RP18-(E)-5 µ; 250 x 4 mm)
 Mobile Phase: Methanol / Wasser 52 : 48 %
 Flußrate: 1 ml/min
 Detektion: 254 nm
 Aufgabevolumen: 20 µl

Methode für 8-[O⁶-(4-Bromothienyl)-guan-9-yl]-octyl-b**-D-glucosid (42):**

Säule: Merck (Darmstadt) Lichrospher (100-RP18-(E)-5 µ; 250 x 4 mm)
 Mobile Phase: Methanol / Wasser 65 : 35 %
 Flußrate: 1 ml/min
 Detektion: 254 nm
 Aufgabevolumen: 20 µl

6.1.2.3.2. Glucosidase-Bestimmung

Lösungen und Puffer

Puffer pH 6,0 siehe 5.1.3.1 Stabilitätsmessungen
 Glucosidase β-Glucosidase von Sigma-Aldrich (Deisenhofen); Nr.: G 4511; EC 3.2.1.2.1.
 Glucosidase-Lösung 1,15 mg Protein gelöst in 2,53 ml Puffer pH 6
 p-Nitrophenol-Lösung 2,4 mg p-Nitrophenol-β-D-glucosid in 50 ml Puffer pH 6
 Cer-Molybdän-Reagenz siehe 5.1.1 Synthese

Materialien und Geräte

DC siehe 5.1.1 Synthese.
 UV-Spektrophotometer siehe 5.1.1 Synthese.
 Massenspektrometrie (ESI) siehe 5.1.1 Synthese.

Bestimmung der Aktivität

Die Freisetzung des Aglycons aus der p-Nitrophenol-Lösung wird photometrisch anhand der Extinktionszunahme bei 420 nm quantifiziert. Die p-Nitrophenol-Lösung wird hierzu mit der Glucosidase-Lösung vereinigt und auf ein konstantes Volumen (1 ml) mittels Puffer pH 6 eingestellt.

Bestimmung der Zeitabhängigen Kinetik

2-[O⁶-(4-Bromophenyl)-guan-9-yl]-ethyl-**b**-D-glucosid (**39**)

DC-Bestimmung: 99 µl einer Lösung von **39** (1,93 mg/ml) werden mit 1 µl Glucosidase-Lösung bei Raumtemperatur inkubiert und nach 15 s, 30 s, 45 s, 1 min, 2 min, 5 min, 10 min und 20 min eine Probe auf eine DC-Platte aufgetragen (Laufmittel: Chloroform / Methanol 5 / 1; Detektion mit Cer-Molybdän-Sprühreagenz).

HPLC-Messung: 961,5 µl **39** (1,93 mg/ml) werden mit 9,6 µl Glucosidase-Lösung bei Raumtemperatur inkubiert. Nach jeweils 30 s, 1 min, 2 min, 3 min, 4 min, 5 min, 10 min, 15 min und 20 min werden 90 µl entnommen und in 910 µl Methanol inaktiviert. Die Proben werden abzentrifugiert (5000 U/min) und bei -30 °C bis zur HPLC Analyse aufbewahrt. Die HPLC-Methode entspricht der Stabilitätsbestimmung von **39** (Kapitel 5.2.3.1).

8-[O⁶-(4-Bromophenyl)-guan-9-yl]-octyl-**b**-D-glucosid (**42**)

5 mg **42** werden in 10 ml Puffer pH 6 und 1 ml DMSO gelöst und mit 100 µl Glucosidase-Lösung versetzt. Das Gemisch wird vorsichtig mit 5 ml Chloroform unterschichtet und sehr langsam gerührt. Nach 1h werden die Phasen getrennt, das Chloroform abrotiert und der Rückstand der organischen Phase massenspektroskopisch (ESI) analysiert.

6.1.2.4. Molecular Modeling

Die Versuche wurden in Zusammenarbeit mit Dr. C.W. von der Lieth aus der Molecular Modeling Gruppe der Abteilung Zentrale Spektroskopie des DKFZ durchgeführt

Die Simulationen mit den Kristallstrukturen der humanen MGMT und dem Homologiemodell wurden nach dem gleichen Protokoll durchgeführt. Die Kristallstruktur der O⁶-Methylguanin-DNA-methyltransferase (PDB-Eingang 1QNT, Auflösung 1.90, R-Wert 0.198) wurde genutzt um ein Modell der Orientierung der Liganden innerhalb des aktiven Zentrums abzuleiten. Um die Rechenzeiten zu minimieren, wurde das N-proximale Ende (Residuen 1-82) nicht berücksichtigt, da das aktive Zentrum vollständig innerhalb des C-proximalen Ende lokalisiert

ist (Residuen 83-176). Fehlende Wasserstoff-Atome wurden durch Anwendung eines pH-Wertes von 7 generiert. Atomtypen und Partialladungen des CFF91 Kraftfeldes wurden mittels automatischer Routinen zugeordnet. Alle Berechnungen und Zuordnungen wurden durch Verwendung der INSIGHTII-Software ermittelt. Die Liganden wurden per Hand durch die Builder-Option der Software konstruiert. Gemäß der Ausrichtung des O⁶-Benzylguanin (von Wibley et al. [2000] beschrieben) wurde das 4BTG und die 4BTG-Glucoside per Hand in die Bindungstasche gedockt. Der Komplex wurde in eine Box zentriert (Kantenlänge: 50 x 40 x 50 Å), die mit 2720 Wassermolekülen gefüllt war. Mittels DISCOVER wurde von allen so entstandenen Komplexen das gleiche Protokoll einer Molekular-Dynamik-Simulation (MD) durchgeführt. Um sicherzustellen, daß die Tertiärstruktur während der Simulation erhalten blieb, wurde eine konstante Kraft von 100 Kcal/Å angelegt, um das Rückgrat in seine ursprüngliche Position zurückzubringen (*tethering force*). Es wurden 1000 Minimizationsschritte initial durchgeführt und dann mit 50000 Bewegungen äquilibriert. Die Produktion der MD erfolgte durch 1 fs lange Integrationsschritte, die insgesamt über 1 ns ermittelt wurden (entsprechend 1.000.000 Schritten / Komplex). Die Simulationen erfolgten bei 300 K mit einem Cutoff von 10 Å für die nicht bindenden (gebundenen) Interaktionen und einer Dielektrizitätskonstante von 1. Jeder 100. Schritt wurde während der MD als Schnappschuß aufgenommen und gespeichert. Das so archivierte Material der Konformationen diente der Ausführung der Interaktionsanalysen und der Ermittlung einiger Trajektorien (zeitliche Darstellung der Meßgrößen). Die Liganden wurden in sinnvolle strukturelle Gruppen unterteilt, um deren Interaktion detaillierter zu betrachten. Mittels der ENCLOSE-Option von DISCOVER wurden die nicht-bindenden Interaktionen der Liganden mit den Residuen der MGMT und Wasser-Molekülen innerhalb eines Radius von 5 Å. Diese Prozedur wurde für alle 1.000 Strukturen jedes Komplexes durchgeführt. Das Programm PAVODO [Frank 2000] extrahiert die relevanten Details der großen DISCOVER Ausgabedateien und generiert von CAT lesbare Tabellen. Diese Software wandelt die Rohdaten um und berechnet die gewünschten Interaktionsmatrizes samt der statistischen Ausdrücke.

6.1.3. PARP-Inhibitoren

Die Versuche wurden in Zusammenarbeit mit dem Steinbeis-Transferzentrum für Angewandte Biologische Chemie durchgeführt.

Lösungen und Puffer

PBS	140 mM NaCl 2,6 mM KCl 6,4 mM Na ₂ HPO ₄ 1,4 mM KH ₂ PO ₄
PBS/Milchpulver	= „Blockpuffer“:PBS (s.o.) + 5 % (m/m) fettfreies Magermilchpulver (Marke „Glücksklee“)
NAD-Lösung	50 µl 10 mM NAD-Lösung 100 µl 1M TRIS-Lösung 10 µl 1 M MgCl ₂ -Lösung 10 µl 0,1 M Dithiothreitol-Lösung 730 µl H ₂ O
10 H-Antikörper	Bereitgestellt von Dr. Manfred Frey, Steinbeißtransferzentrum für angewandte biologische Chemie, Heidelberg. Eingesetzte Konzentration = 20 µg/ml. Verdünnung in Blockpuffer
G α M-Antikörper	F4018, Sigma (Deisenhofen). Anti mouse IgG (Fab - spezifisch), in Ziegen entwickelt. Eingesetzte Konzentration = 1/50 in Blockpuffer verdünnt. Zusatz von 0,1 % einer 1000-fach konzentrierten DAPI-Lösung.
H ₂ O ₂ -Lösung	Aus 30 % H ₂ O ₂ -Lösung mit RPMI auf 10 mM verdünnt.

Zellkulturbedingungen

Zelllinie

C4I Zervix-Karzinom-Zelllinie. Über ATCC (American tissue culture corporation) bezogen; bereitgestellt von Dr. Manfred Frey Steinbeißtransferzentrum für angewandte biologische Chemie, Heidelberg.

Medium

RPMI Life Technologies GmbH (Karlsruhe)

Geräte

Fluoreszenzscanner Fluoroskan „Ascent“, Labsystems

PARP-Bestimmungen an permeabilisierten C4I-Zellen

Die C4I - Zellen werden mit einer Dichte von ca. 1.000.000/ml in 24 Well-Platten ausgesät (entspricht 100.000 / 100 µl) und über Nacht anwachsen gelassen. Das Medium wird abgesaugt, die Zellen mit 100 µl/Well -20 °C kaltem Ethanol für 10 min bei -20 °C fixiert und 3 h in der Laminar-Flow getrocknet.

Durch Zusatz von 100 µl PBS werden die Proteine 15 min bei RT zurückgefaltet und dann durch PBS plus den PARP-Inhibitor ersetzt. Nach 5 min wird abgesaugt und mit 100 µl NAD-Lösung plus den PARP-Inhibitor (10 % des Gesamtvolumens) für 1 h bei 37 °C inkubiert. Es folgen 3 Waschschrte mit 200 µl / Well PBS/Milchpulver + 0,3 % TWEEN und 1 Waschschrte mit PBS für jeweils 5 min (Rüttler; 200 rpm).

Zur Immunreaktion wird mit 70 µl 10 H-Antikörper für 1 h bei 37 °C inkubiert und einmal mit 200 µl PBS (Rüttler; 200 rpm) und dreimal mit 75 µl PBS (Rüttler; 600-800 rpm) gewaschen. Der G α M-Antikörper (70 µl) wird zugesetzt und nach 1 h bei 37 °C wie oben beschrieben gewaschen. Nach Zusatz von 70 µl PBS erfolgt die Messung im Fluoroskan.

PARP-Bestimmungen an C4I-Zellen

Konfluent wachsende C4I-Zellen werden in 24 Well-Platten kultiviert. Nach 30 min Inkubation der PARP-Inhibitoren (in RPMI-Medium), werden 50 µl H₂O₂-Lösung zugesetzt (Rüttler; 200 U/min; ½ min) und für weitere 10 min bei 37°C inkubiert. Mittels 500 µl Methanol/Aceton (70/30 (vol/vol)) werden die Zellen bei -10 °C fixiert und nach dem Absaugen mit 500 µl PBS für 5 min bei RT rehydratisiert. Es wird abgesaugt und 500 µl PBS/Milchpulver plus 0,05% Tween für 30 min zugesetzt. Die Immunreaktion erfolgt wie oben beschrieben: 10 H-Antikörper 200µl für 1h (37°C) inkubieren; 5 x 5 min mit 500 µl PBS waschen (Rüttler; 300 U/min); G α M-Antikörper für 30 min (37°C) inkubieren, 5 x 5 min mit 500 µl PBS waschen (Rüttler; 300 U/min). Die Messung erfolgt nach Zusatz von 500 µl PBS im Fluoroskan.

6.1.4. SWITCH-Inhibitoren

Die Untersuchungen wurden in Zusammenarbeit mit der Abteilung für Pathochemie des DKFZ durchgeführt.

6.1.4.1. CD-Messungen

Geräte

Spektropolarimeter Jasco J-710; gekoppelt mit einer Peltier Temperatur-Kontrolle.

Die Kalibrierung erfolgt mittels einer 0,05 % β -Androsteron-Lösung in Dioxan (*spectral grade*) als Standard. Gearbeitet wurde mit einer Auflösung von 1 nm über das gesamte Spektrum von 190 – 240 nm bei Raumtemperatur. Die Spektren wurden in 1 mm, dichroitisch neutralen Quartz-Küvetten vermessen. Die Sensitivität beträgt dabei 10,0 mdeg / cm, die Zeitkonstante 4,0 s und die Scan-Geschwindigkeit 5,0 nm / s.

CD-Messungen der SWITCH-Inhibitoren

Die Fähigkeit der Substanzen den kooperativen Charakter der Konformationsänderung von gp120 (*SWITCH*) aufzuheben wird mittels Circular-Dichroismus-Spektroskopie gemessen. Dazu werden 100 μ g / ml des LAV38mer mit- und ohne Zusatz von 100 μ M SWITCH-Inhibitor gemessen (5 μ l 10mM Lösung wurden dazu 495 μ l LAV38mer zugesetzt). Die CD-Spektren werden aufgenommen und die Verschiebung des Minimums ermittelt. Es wird anschließend eine Konzentrationsreihe (1 μ M, 5 μ M, 10 μ M, 50 μ M, 100 μ M, 150 μ M) vermessen und daraus in erster Näherung eine IC₅₀ im Vergleich zur unmodifizierten Substanz berechnet.

6.1.4.2. gp120-CD4-Bindungsversuch

Lösungen und Puffer

[¹⁴ C]-LAV-Peptid	15-meres Fragment von gp120, das die Fähigkeit zur CD4-Bindung aufrecht erhält [Reed & Kinzel 1991]. Die Sequenz <i>Leu-Pro-Lys-Arg-Ile-Lys-Glu-Phe-Ile-Asn-Met-Trp-Glu-Glu-Val</i> ist im Leucin am N-terminalen Ende [¹⁴ C]-markiert. Die Synthese erfolgte nach der Merrifield-Methode.
Szintillator-Cocktail	Quickzint, Zinsser Analytik (Frankfurt)
GluPBS	3 mM β -D-Glucose in PBS

Zelllinien

HeLaT4 Bereitgestellt von PD. Dr. Jennifer Reed, Abteilung für Pathochemie, DKFZ Heidelberg. Bezogen über das NIH AIDS Research and Reference Reagent Programm (Katalog-Nr.: 154). Die Zellen wurden mittels immunohistochemischer Methoden auf die Expression von CD4-Rezeptoren geprüft und zeigten zu 100 % positives Ergebnis.

HeLa Bereitgestellt von PD. Dr. Jennifer Reed, Abteilung für Pathochemie, DKFZ Heidelberg. Bezogen über die Tumorbank des DKFZ.

gp120(¹⁴C)-LAV)-CD4-Bindungsversuch

Die HeLaT4-Zellen werden mit einer Dichte von ca. 200.000 Zellen / Well auf einer 24-Well-Platte ausgesät und auf Eis gestellt. Es wird zweimal mit 1 ml PBS gewaschen und anschließend 300 µl PBS zugefügt. Nacheinander werden die entsprechende Verdünnung des SWITCH-Inhibitors und 20 µl der [¹⁴C]-LAV-Lösung zugesetzt. Die Inkubation erfolgt 1 h bei 4 °C, bevor zwei mal mit 1 ml kaltem PBS gewaschen wird. Anschließend werden die Zellen mit 200 µl SDS in PBS lysiert, 3 ml Szintillationscocktail zugefügt und die Proben im β-Counter vermessen.

Desweiteren wurde diese Standardvorschrift aufgrund der beschriebenen Problematik (siehe 3.6) modifiziert, indem (1) der SWITCH-Inhibitor mit dem [¹⁴C]-LAV-Peptid vorinkubiert wurde und (2) durch die Verwendung von GluPBS, anstelle des normalen PBS. Der weitere Versuchsaufbau erfolgt analog der Beschreibung.

6.2. Synthesevorschriften

Alle Kopplungskonstanten sind in Hz, Verschiebungen in ppm angegeben gegen Me₄Si als interner Standard.

6.2.1. MGMT-Inhibitoren

6.2.1.1. O⁴-substituierte Pyrimidine

2-Amino-4-chloro-6-(5-hydroxypentylamino)-pyrimidin (**1**)

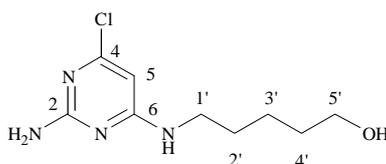
26 g [158 mmol] 2-Amino-4,6-dichloropyrimidin und 15 g [145 mmol] 5-Amino-1-pentanol werden in einem Gemisch aus 150 ml Triethylamin und 600 ml n-Butanol gelöst. Es wird unter Rückfluß für 48 h auf 150 °C erhitzt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur werden die flüchtigen Bestandteile abrotiert und nach Adsorption auf Kieselgel säulenchromatographisch gereinigt. (SiO₂, Dichlormethan / Methanol 40 : 1, 30 : 1, 20 : 1, 15 : 1, 10 : 1). Die Substanz wird in 250 ml Aceton aufgenommen, wobei das Triethylamin abfiltriert werden kann. Es wird erneut einrotiert und aus Essigester umkristallisiert, um weißgraue Kristalle zu erhalten.

Ausbeute: 32 g (88 %)

DC: R_f (SiO₂, Dichlormethan / Methanol 20 : 1): 0,15

MS (ESI): m/z (%) 101,8 (10) [N(CH₃)₃+H]⁺, 230,9 (100) [M+H]⁺, 461,2 (20) [2M+H]⁺, 483,2 (20) [2M+Na]⁺

C₉H₁₅N₄OCl M_r = 230,1



¹H-NMR δ_H (250 MHz, CD₃OD): 1,40 (m, 2H, 3'); 1,54 (m, 4H, 2',4'); 3,28 (dd, 2H, 1'); 3,52 (dd, 2H, 5'); 5,78 (s, 1H, 5); J_{4'/5'} = 6,1

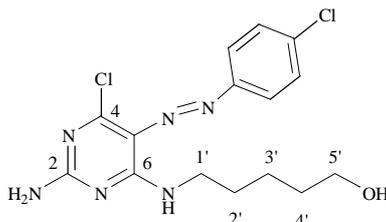
¹³C-NMR δ_C (63 MHz, CD₃OD): 24,40; 30,25; 33,40; 41,84; 62,94 (5C, 1'-5'); 101,30 (1C, 5); 164,40; 165,91 (3C, 2, 4, 6)

2-Amino-4-chloro-5-[(4-chlorophenyl)azo]-6-(5-hydroxypentylamino)-pyrimidin (**2**)

Aus 1,47 g [11,5 mmol] p-Chloranilin in 25 ml 3 N HCl und 870 mg [12,6 mmol] Natriumnitrit in 10 ml Wasser wird die Lösung des entsprechende Diazonium-Salzes dargestellt. Diese wird zu einer Lösung von 2,4 g [10,5 mmol] **1** in 50 ml Essigsäure, 50 ml

Wasser und 20 g Natriumacetat-trihydrat gegeben und bei Raumtemperatur für 1 h gerührt. Der zitronengelbe Niederschlag wird filtriert und mehrere Male mit Wasser gewaschen. Es wird aus Methanol umkristallisiert.

Ausbeute: 3,6 g (93 %)
 DC: R_f (SiO₂, Dichlormethan / Methanol 20 : 1): 0,24
 MS (ESI): m/z (%) 369,0 (95) [M+H]⁺
 C₁₅H₁₈N₆Cl₂O $M_r = 368,1$

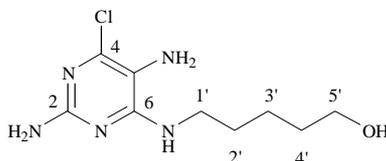


¹H-NMR δ_H (250 MHz, CD₃OD): 1,56 (m, 6H, 2',3',4'); 3,55 (m, 4H, 1',5'); 7,44; 7,73 (dd, 4H, Phenyl-); $J_{\text{Phenyl}} = 8,7$; $J_{4'/5'} = 6,2$

4-Chloro-2,5-diamino-6-(5-hydroxypentylamino)-pyrimidin (**3**)

3,08 g [12 mmol] **2** und 5,2 g Zink-Staub werden in 2,6 ml Essigsäure, 130 ml Ethanol und 130 ml Wasser aufgenommen und 3 h unter Rückfluß unter Argon erhitzt. Nach dem Abkühlen wird filtriert, abrotiert, das Produkt auf Kieselgel adsorbiert und säulenchromatographisch gereinigt (SiO₂, Dichlormethan / Methanol 20 : 1).

Ausbeute: 0,85 g (29 %)
 DC: R_f (SiO₂, Dichlormethan / Methanol 20 : 1): 0,17 (rosa)
 MS (ESI): m/z (%) 245,8 (100) [M+H]⁺, 267,8 (10) [M+Na]⁺, 491,1 (10) [2M+H]⁺, 513,2 (5) [2M+Na]⁺
 C₉H₁₆N₅ClO $M_r = 245,1$



¹H-NMR δ_H (250 MHz, CD₃OD): 1,45 (m, 2H, 3'); 1,60 (m, 4H, 2',4'); 3,41 (dd, 2H, 1'); 3,56 (dd, 2H, 5'); $J_{1'/2'} = 7,1$; $J_{4'/5'} = 6,4$

2-Amino-6-chloro-9-(5-hydroxypentyl)-purin (4)

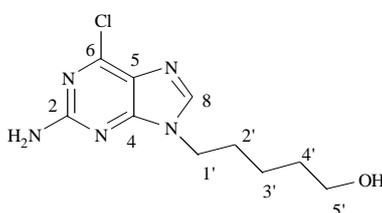
245 mg [1 mmol] **3** werden in 5 ml Triethylorthoformat und 0,26 ml 12 N Salzsäure gelöst und 12 h gerührt. Die flüchtigen Bestandteile werden abrotiert und nach Zusatz von 7,3 ml verdünnter Salzsäure erneut gerührt. Nach Neutralisation mit 1N NaOH wird auf Kieselgel adsorbiert und säulenchromatographisch gereinigt (SiO₂, Dichlormethan / Methanol 20 : 1).

Ausbeute: 0,0883 g (34,6 %)

DC: R_f(SiO₂, Dichlormethan / Methanol 20 : 1): 0,5

MS (ESI): m/z (%) 255,8 (100) [M+H]⁺, 277,8 (30) [M+Na]⁺, 511,1 (10) [2M+H]⁺, 533,2 (50) [2M+Na]⁺

C₁₀H₁₄N₅ClO M_r = 255,1



¹H-NMR δ_H (250 MHz, CDCl₃): 1,42; 1,61; 1,88 (3m, 6H, 2', 3', 4'); 3,31 (s, 1H, OH); 3,61 (dd, 2H, 5'); 4,09 (dd, 2H, 1'); 5,63 (s, 2H, NH₂); 7,81 (s, 1H, 8); J_{1/2} = 7,1; J_{4/5} = 6,4

¹³C-NMR δ_C (63 MHz, CD₃OD): 22,68; 29,22; 31,90; 43,61; 61,61 (5C, 1'-5'); 124,62 (1C, 5); 142,41 (1C, 8) 150,88 (1C, 6); 153,61 (1C, 4); 159,16 (1C, 2)

2-Amino-8-aza-6-chloro-9-(5-hydroxypentyl)-purin (5)

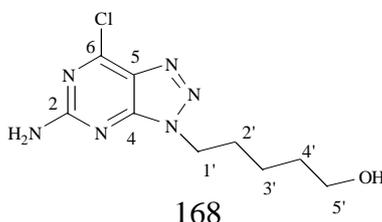
245 mg [1 mmol] **3** werden in 1,5 ml Essigsäure und 2,5 ml Wasser gelöst und tropfenweise mit einer Lösung von 83 mg Natriumnitrit in 2 ml Wasser versetzt. Der Reaktionsverlauf wird dabei mittels Kaliumiodid-Stärke-Papier überwacht. Es wird eine weitere Stunde bei 0 °C gerührt und anschließend der Niederschlag abfiltriert, mit kaltem Wasser gewaschen und getrocknet. Gereinigt wird durch Umkristallisation aus Methanol.

Ausbeute: 179 mg (69,9 %)

DC: R_f(SiO₂, Dichlormethan / Methanol 20 : 1): 0,5

MS (ESI): m/z (%) 256,8 (100) [M+H]⁺, 278,8 (40) [M+Na]⁺, 513,1 (20) [2M+H]⁺, 535,1 (100) [2M+Na]⁺

C₉H₁₃N₆ClO M_r = 256,1



$^1\text{H-NMR}$ δ_{H} (250 MHz, CDCl_3): 1,39; 1,57; 1,99 (3m, 6H, 2', 3', 4'); 3,51 (dd, 2H, 5'); 4,47 (dd, 2H, 1'); $J_{1/2} = 7,0$; $J_{4/5} = 6,4$

2-Amino-8-aza-6-benzyloxy-9-(5-hydroxypentyl)-purin (6)

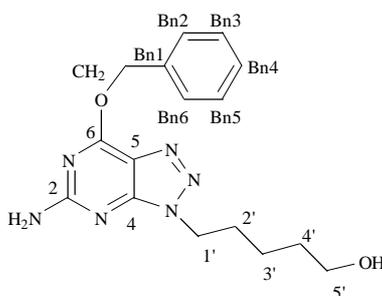
24 mg [1 mmol] Natriumhydrid werden vorsichtig in 5 ml Benzylalkohol gegeben und unter Rühren portionsweise 128 mg [0,5 mmol] **5** zugesetzt. Man hält für einige Minuten in ein auf 110 °C vorgeheiztes Ölbad. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wird mit Essigsäure neutralisiert und der Benzylalkohol abdestilliert. Gereinigt wird säulenchromatographisch (SiO_2 , Dichlormethan / Methanol 20 : 1).

Ausbeute: 30 mg (18,3 %)

DC: R_f (SiO_2 , Dichlormethan / Methanol 20 : 1): 0,28

MS (ESI): m/z (%) 328,9 (100) $[\text{M}+\text{H}]^+$, 351,0 (60) $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 679,3 (30) $[2\text{M}+\text{H}]^+$

$\text{C}_{16}\text{H}_{20}\text{N}_6\text{O}_2$ $M_r = 328,2$



$^1\text{H-NMR}$ δ_{H} (250 MHz, CD_3OD): 1,42; 1,62; 2,01 (3m, 6H, 2', 3', 4'); 3,57 (dd, 2H, 5'); 4,47 (dd, 2H, 1'); 5,64 (s, 2H, CH_2); 7,39; 7,57 (2m, 5H, Bn2-6); $J_{1/2} = 7,1$; $J_{4/5} = 6,5$

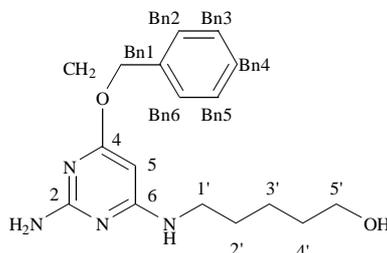
$^{13}\text{C-NMR}$ δ_{C} (63 MHz, CD_3OD): 24,09; 30,23; 33,07; 47,40; 62,75 (5C, 1'-5'); 69,90 (1C, CH_2); 122,31 (1C, 5); 129,51-129,71 (5C, Bn2-6); 137,38 (1C, Bn1); 154,56 (1C, 6); 162,79 (1C, 4); 164,22 (1C, 2)

2-Amino-4-benzyloxy-6-(5-hydroxypentylamino)-pyrimidin (7)

23,0 g [100 mmol] **1** werden in 70 ml Benzylalkohol gelöst und langsam eine Mischung aus 4,8 g Natriumhydrid in 30 ml Benzylalkohol zugetropft. Es wird für 6 h auf 150-160 °C unter Rückfluß erhitzt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wird mit Essigsäure neutralisiert und der Alkohol abdestilliert. Das Produkt wird in Essigester aufgenommen und mit einer Natriumhydrogencarbonat-Lösung ausgeschüttelt. Die organische Phase wird über Natriumsulfat getrocknet und einrotiert. Gereinigt wird säulenchromatographisch (SiO_2 , Aceton / Petrolether 1 : 1).

Ausbeute: 16,2 g (53,6 %)

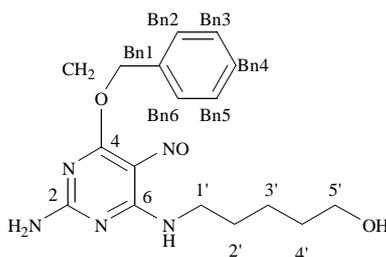
DC: R_f (SiO₂, Essigester / Petrolether 10 : 1): 0,18
 MS (ESI): m/z (%) 303,0 (100) [M+H]⁺, 605,4 (10) [2M+H]⁺
 C₁₆H₂₂N₄O₂ $M_r = 302,2$



2-Amino-6-benzyloxy-4-(5-hydroxypentylamino)-5-nitrosopyrimidin (8)

3,6 g [11,9 mmol] **7** werden in 100 ml 30 %iger Essigsäure gelöst und die Verunreinigungen abfiltriert. Es wird auf 80 °C erhitzt und unter Kontrolle mit Kaliumiodid-Stärke-Papier eine konzentrierte Natriumnitrit-Lösung zugetropft bis der Farbumschlag von gelb nach violett erfolgt. Es wird mit 0,1 N NaOH neutralisiert und mit Essigester ausgeschüttelt. Die organische Phase wird mit Natriumsulfat getrocknet, auf Kieselgel adsorbiert und säulenchromatographisch gereinigt (SiO₂, Dichlormethan / Methanol 20 : 1).

Ausbeute: 3,94 g (100 %)
 DC: R_f (SiO₂, Dichlormethan/Methanol 20/1): 0,22
 R_f (SiO₂, Essigester / Petrolether / Methanol 10 : 2 : 1): 0,43
 MS (ESI): m/z (%) 332,0 (100) [M+H]⁺
 C₁₆H₂₁N₅O₃ $M_r = 331,2$



¹H-NMR δ_H (250 MHz, CD₃OD): 1,49 (m, 2H, 3'); 1,65 (m, 4H, 2',4'); 3,58 (m, 4H,1', 5'); 5,67 (s, 2H, -CH₂); 7,36-7,60 (2m, 5H, Bn2-6); J_{1'/2'} = 7,0; J_{4'/5'} = 6,4
¹³C-NMR δ_C (63 MHz, CD₃OD): 24,49; 30,05; 33,33; 40,74; 62,88 (5C, 1'-5'); 70,05 (1C, CH₂); 114,57 (1C, 5); 129,41-129,67 (5C, Bn2-6); 137,63 (1C, Bn1); 154,56 (1C, 4); 172,19 (2C, 2, 6)

2-Amino-8-aza-6-benzyloxy-9-(5-hydroxypentyl)-purin (6)

993 mg [3 mmol] **8** werden in 5 ml Wasser und 15 ml Essigsäure gelöst. Nach Zusatz von 1,8

g Zinkstaub wird für 15 min auf 80 °C erhitzt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur, wird abfiltriert und unter Kontrolle mit Kaliumiodid-Stärke-Papier eine konzentrierte Natriumnitrit-Lösung zugetropft. Es wird mit Dichlormethan ausgeschüttelt, einrotiert und säulenchromatographisch gereinigt. (SiO₂, Essigester / Petrolether 5 : 1, 4 : 1).

Ausbeute: 600 mg (61,6 %)

Analytische Daten siehe 6

6.2.1.2. *O*⁶-substituierte Guanin-Derivate

*O*⁶-Methylguanin (O6MG)

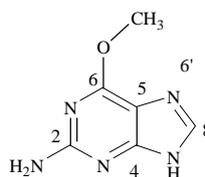
0,6 g [26 mol] Natriumhydrid werden vorsichtig in 20 ml Methanol suspendiert und 2 g [11,8 mmol] 2-Amino-6-chloropurin in kleinen Portionen zugesetzt. Das Gemisch wird im Stahlautoklaven auf 130 °C erhitzt. und 18h gerührt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wird mit Essigsäure neutralisiert und der Alkohol abrotiert. Gereinigt wird durch Umkristallisation aus 60 ml Wasser.

Ausbeute: 1,26 g (65 %)

DC: R_f (SiO₂, Dichlormethan / Methanol 5 : 1): 0,55

MS (ESI): m/z (%) 165,3 (70) [M+H]⁺, 186,8 (5) [M+Na]⁺, 330,5 (50) [2M+H]⁺, 352,6 (100) [2M+Na]⁺

C₁₂H₁₁N₅O M_r = 165,1



¹H-NMR δ_H (250 MHz, CD₃OD): 4,06 (s, 3H, -CH₃); 7,83 (s, 1H, 8)

*O*⁶-Benzylguanin (O6BG)

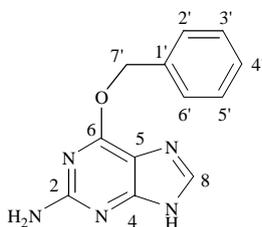
0,6 g [26 mol] Natriumhydrid werden vorsichtig in 20 ml Benzylalkohol gelöst und auf 130 °C erhitzt. 2 g [11,8 mmol] 2-Amino-6-chloropurin werden in kleinen Portionen zugesetzt und 18 h gerührt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wird mit Essigsäure neutralisiert und der Benzylalkohol abdestilliert. Gereinigt wird säulenchromatographisch (SiO₂, Dichlormethan / Methanol 20 : 1).

Ausbeute: 0,91 g (31 %)

DC: R_f (SiO₂, Dichlormethan / Methanol 10 : 1): 0,31

MS (ESI): m/z (%) 241,8 (100) $[M+H]^+$, 263,8 (5) $[M+Na]^+$, 483,2 (15) $[2M+H]^+$,
505,2 (5) $[2M+Na]^+$, 724,3 (5) $[3M+H]^+$

$C_{12}H_{11}N_5O$ $M_r = 241,1$



1H -NMR δ_H (250 MHz, CD_3OD): 5,52 (s, 2H, 7'); 7,35 (m, 3H, 2', 6'); 7,48 (m, 2H, 3'-5');
7,82 (s, 1H, 8)

^{13}C -NMR δ_C (63 MHz, CD_3OD): 69,11 (1C, 7'); 116,22 (1C, 5); 129,25-129,60 (5C, 2'-6');
138,08 (1C, 1'); 140,19 (1C, 8); 161,55; 161,85 (2C, 2, 4)

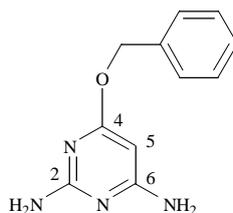
2,6-Diamino-4-benzyloxypyrimidin

21,6 g [149,5 mmol] 2,4-Diamino-6-chloropyrimidin wird zu einer Lösung von 6 g [260 mmol] Natriumhydrid in 100 ml Benzylalkohol gegeben, auf 150 °C erhitzt und 3 h gerührt.

Der Benzylalkohol wird abdestilliert und das resultierende gelbe Öl mit Wasser gewaschen.

DC: R_f (SiO_2 , Aceton / Petrolether, 1 : 1): 0,26

$C_{11}H_{12}N_4O$ $M_r = 245,1$



2,6-Diamino-5-nitroso-4-benzyloxypyrimidin

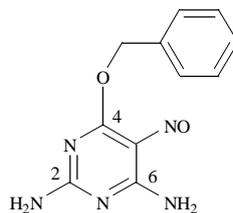
Das Rohprodukt s.o. wird in 300 ml 30%iger, warmer Essigsäure aufgenommen und von unlöslichen Rückständen abfiltriert. Es wird auf 80 °C erhitzt und unter Kontrolle mit KJ-Stärke-Papier tropfenweise mit einer 2 M-Natriumnitrit-Lösung versetzt. Es fällt ein pinkes Produkt aus; das abgesaugt, mit Wasser gewaschen und über Blaugel im Exzikator getrocknet wird.

Ausbeute: 26 g (71 %)

DC: R_f (SiO_2 , Aceton / Petrolether, 1 : 1): 0,37

MS (ESI): m/z (%) 245,9 (30) [M+H]⁺, 267,9 (10) [M+Na]⁺, 491,1 (15) [2M+H]⁺,
513,2 (100) [2M+Na]⁺

C₁₁H₁₁N₅O₂ M_r = 245,1



2,5,6-Triamino-4-benzyloxy-pyrimidin

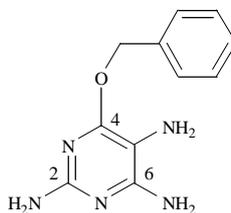
9,8 g [40 mmol] 2,4-Diamino-5-nitroso-6-benzyloxy-pyrimidin werden in 250 ml Wasser suspendiert und bei 80 °C mit einer ausreichenden Menge Natriumdithionit behandelt bis der vollständige Farbumschlag von pink nach gelb erfolgt. Es wird abgesaugt, mit Wasser gewaschen und unter Vakuum getrocknet.

Ausbeute: 7,16 g (77,5 %)

DC: R_f (SiO₂, Essigester / Petrolether, 5 : 1): 0,45

MS (ESI) m/z (%) 231,9 (100) [M+H]⁺, 463,2 (5) [2M+H]⁺

C₁₁H₁₃N₅O M_r = 231,1



O⁶-Benzylguanin (O6BG)

4,62 g [20 mmol] 2,4,5-Triamino-6-benzyloxy-pyrimidin werden in 15 g [90 mmol] Diethoxymethylacetal 25 min bei 185 °C Ölbadtemperatur vorsichtig gekocht (Auf- und Abbewegungen!). Es wird auf 100 °C abgekühlt und eingengt. Zum Rückstand werden 20 ml Wasser und (bis zur vollständigen Lösung) NaOH-Pellets gefügt. Das Gemisch wird 15 min unter Rückfluß gekocht, mit Aktivkohle behandelt und erneut für 5 min gekocht. Es wird über ein Celite-Bett abfiltriert, und mit Essigsäure auf pH 6 eingestellt. Das Gemisch wird eingengt und aus Wasser / Ethanol umkristallisiert.

Ausbeute: 1,1 g (22,8 %)

8-Aza-*O*⁶-benzylguanin (8ABG)

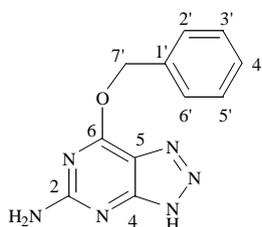
4,9 g [20 mmol] 2,4,5-Triamino-6-benzyloxypyrimidin und 1,38 g [20 mmol] Natriumnitrit werden in 200 ml Aceton und 20 ml Eisessig suspendiert und 2 h gerührt. Der Aceton wird eingeeengt und mit 5 x 100 ml Chloroform gegen 100 ml Wasser ausgeschüttelt. Die Reinigung erfolgt mittels Flash-Chromatographie (SiO₂; Chloroform / Methanol 15 : 1). Produkt wird aus Ethanol / Wasser 1 : 1 umkristallisiert.

Ausbeute: 3,05 g (63 %)

DC: R_f (SiO₂, Dichlormethan / Methanol 10 : 1): 0,40

MS (ESI): m/z (%) 243,0 (50) [M+H]⁺, 264,9 (20) [M+Na]⁺, 485,2 (80) [2M+H]⁺, 507,1 (50) [2M+Na]⁺

C₁₁H₁₀N₆O M_r = 242,1



¹H-NMR δ_H (250 MHz, CD₃OD): 5,62 (s, 2H, 7'); 7,37 (m, 3H, 2', 6'); 7,53 (m, 2H, 3'-5')

¹³C-NMR δ_C (63 MHz, CD₃OD): 69,90 (1C, CH₂); 121,46 (1C, 5); 129,53-130,62 (5C, 2'-6'); 137,41 (1C, 1'); 156,29 (1C, 6); 162,78 ; 164,22 (2C, 2, 4)

4-Brom-2-thenylalkohol

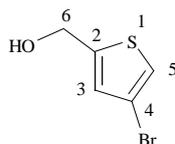
25 g [130 mmol] 4-Bromthiophen-2-aldehyd und 5,7 g [150 mmol] Natriumborhydrid werden in 400 ml Isopropanol 1 h gerührt. Es wird durch Zusatz von 10 ml Wasser deaktiviert, abfiltriert und mit n-Hexan extrahiert.

Ausbeute: 22,5 g (89 %)

DC: R_f (SiO₂, Toluol / Methanol, 4 : 1): 0,38

MS (ESI): m/z (%) 190,7 / 192,7 (40) [[M (⁷⁹Br / ⁸¹Br) - H]⁻

C₅H₅OSBr M_r = 191,9



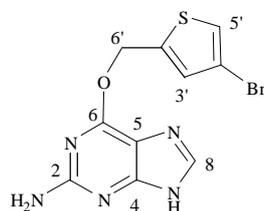
¹H-NMR δ_H (250 MHz, CDCl₃): 4,67 (s, 2H, 6); 6,84; 7,13 (2d, 2H, 3, 5); J_{3/5} = 1,4

^{13}C -NMR δ_{C} (63 MHz, CDCl_3): 59,41 (1C, 6), 77,20 (1C, 2), 109,27 (1C, 4), 122,30 (1C, 3), 127,42 (1C, 5)

*O*⁶-(4-Bromothienyl)-guanin; 2-Amino-6-(4-bromothienyloxy)-purin (**4BTG**)

4,63 g [24 mmol] 4-Bromothienylalkohol werden in 5 ml DMSO gelöst, vorsichtig mit 0,64 g [16 mmol] Natriumhydrid behandelt und 1 h gerührt. 1 g [5,9 mmol] 2-Amino-6-chloropurin werden in kleinen Portionen zugesetzt, die Temperatur auf 100 °C erhöht und 6h gerührt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wird mit 1,3 ml Essigsäure neutralisiert, 240 ml Diethylether zugefügt und 1,5 h gerührt. Der Feststoff wird abgesaugt, mit Wasser gewaschen und bei -15 °C aus Methanol umkristallisiert.

Ausbeute: 1,2 g (61 %)
 DC: R_f (SiO_2 , Dichlormethan / Methanol 10 : 1): 0,4
 R_f (SiO_2 , Toluol / Methanol 4 : 1): 0,22
 SP: 212-214 °C
 MS (ESI): m/z (%) 325,8 / 327,8 (98 / 100) [M (^{79}Br / ^{81}Br) + H]⁺, 347,8 / 349,8 (19 / 20) [M (^{79}Br / ^{81}Br) + Na]⁺
 $\text{C}_{10}\text{H}_8\text{BrN}_5\text{OS}$ $M_r = 326,2$



NMR-Daten siehe Tabellen 3.1.5 und 3.1.6

6.2.1.3. Bromoalkylglucoside

1-(2-Bromoethyl)-2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-**b**-*D*-glucopyranosid (**9**)

50 ml Dichlormethan werden 1 h unter Argon mit Molsieb (gepulvert 4 Å) gerührt. 9,85 g [20 mmol] Pentaacetylglucose und 7,1 ml [12,5 g; 100 mmol] 2-Bromethanol werden darin gelöst und eine weitere Stunde gerührt. Nach Zusatz von 5,4 ml [30 mmol] Trimethylsilyltrifluormethansulfonat wird 1,5 h unter DC-Kontrolle reagiert. Die Reaktion wird durch Zusatz von 3,3 g [30 mmol] Triethylamin abgebrochen und mit festem Natriumhydrogencarbonat ein pH-Wert von 6 - 7 eingestellt. Es wird von den festen Bestandteilen über ein Celite-Bett abfiltriert und die organische Phase mit

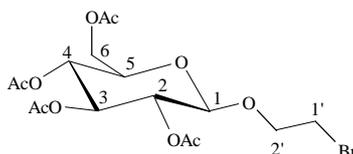
Natriumhydrogencarbonat-Lösung (4 x 80 ml) ausgeschüttelt. Es wird über Natriumsulfat getrocknet, abfiltriert und einrotiert. **9** kristallisiert aus Methanol bei -30 °C in weißen Nadeln.

Ausbeute: 4,1 g (36,1 %)

DC: R_f (SiO₂, Petrolether / Essigester, 1 : 1): 0,49

MS (ESI): m/z (%) 477,1 / 479,1 (98 / 100) [M (⁷⁹Br / ⁸¹Br) + Na]⁺

C₁₆H₂₃O₁₀Br $M_r = 455,3$



¹H-NMR δ_H (250 MHz, CD₃OD): 1,97; 2,01; 2,04; 2,06 (4s, 12H, 4 CH₃); 3,55 (m, 2H, 2'); 3,86 (dd, 1H, 1'a); 3,88 (ddd, 1H, 5); 4,11 (dd, 2H, 1'b); 4,14 (dd, 1H, 6a); 4,28 (dd, 1H, 6b); 4,74 (d, 1H, 1); 4,91 (dd, 1H, 2); 5,02 (dd, 1H, 4); 5,26 (dd, 1H, 3); $J_{1/2} = 8,1$; $J_{2/3} = 9,5$; $J_{3/4} = 9,7$; $J_{4/5} = 9,7$; $J_{6a/5} = 2,8$; $J_{6b/5} = 4,6$; $J_{6a/6b} = 12,5$

¹³C-NMR δ_C (63 MHz, CD₃OD): 20,69; 20,77; 20,89 (4C, CH₃); 31,32 (1C, 2'); 69,98 (1C, 1'); 63,22 (1C, 6); 71,16; 72,83; 73,07; 74,32 (4C, 2, 3, 4, 5); 101,99 (1C, 1); 171,31; 171,38; 171,74; 172,43 (4C, C=O)

1-(2-Bromoethyl)-2,3,4,6-tetra-O-acetyl- β -D-galactopyranosid (10)

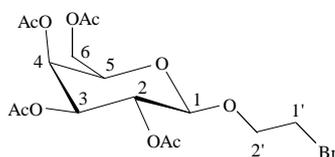
4,11 g [10 mmol] 1-Bromo-2,3,4,6-tetra-O-acetyl- β -D-galactopyranosid werden in 100 ml trockenem Dichlormethan gelöst und bei 0 °C gerührt. Nacheinander werden 2,49 g [20 mmol] 2-Bromethanol, 3,3 g [30 mmol] N,N,N',N'-Tetramethylharnstoff und 4,1 g [16,5 mmol] Silbertriflat zugegeben und die Reaktion mittels DC-Kontrolle überwacht. Nach 2 h wird die Reaktion durch Filtration über ein Celite-Bett abgebrochen und das Gemisch gegen gesättigte Natriumhydrogencarbonat-Lösung ausgeschüttelt. Die organische Phase wird über Natriumsulfat getrocknet, abfiltriert, einrotiert und säulenchromatographisch gereinigt (SiO₂, Petrolether / Essigester, 2 : 1).

Ausbeute: 0,95 g (20,9 %)

DC: R_f (SiO₂, Petrolether/Essigester, 1/1): 0,53

MS (ESI): m/z (%) 476,8 / 478,8 (98 / 100) [M (⁷⁹Br / ⁸¹Br) + Na]⁺

C₁₆H₂₃O₁₀Br $M_r = 455,3$



$^1\text{H-NMR}$ δ_{H} (250 MHz, CD_3OD): 1,94; 2,02; 2,05; 2,14 (4s, 12H, 4 CH_3); 3,52 (dd, 2H, 1'); 3,86 (ddd, 2H, 5); 4,13 (m, 5H, 6a, 6b, 2'); 4,70 (d, 1H, 1); 5,11 (2dd, 2H, 2, 4); 5,38 (dd, 1H, 3); $J_{1/2} = 7,8$; $J_{6a/5} = 1,9$; $J_{6b/5} = 5,4$; $J_{6a/6b} = 11,5$; $J_{4/5} = 9,7$

$^{13}\text{C-NMR}$ δ_{C} (63 MHz, CD_3OD): 20,63; 20,70; 20,98 (4C, CH_3); 31,35; 68,97 (2C, 1', 2'); 62,72 (1C, 6); 70,42; 71,12; 72,09; 72,45 (4C, 2, 3, 4, 5); 102,43 (1C, 1); 171,57; 171,63; 172,13; 172,20 (4C, C=O)

1-(3-Bromopropyl)-2,3,4,6-tetra-O-acetyl- β -D-glucopyranosid (11)

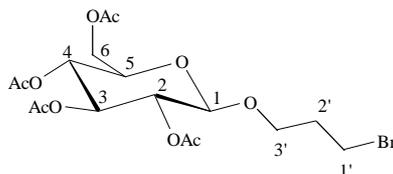
3,9 g [10 mmol] Pentaacetylglucose und 6,9 g [50 mmol] 3-Bromopropanol werden wie für **9** beschrieben umgesetzt. Durch Umkrystallisation des nach Aufarbeitung erhaltenen Rohproduktes in Methanol bei $-30\text{ }^\circ\text{C}$ erhält man **11** als weiße Nadeln.

Ausbeute: 1,82 g (38,84 %)

DC: R_f (SiO_2 , Petrolether / Essigester, 1 : 1): 0,64

MS (ESI): m/z (%) 491,0 / 493,0 (100 / 95) [$\text{M} (^{79}\text{Br} / ^{81}\text{Br}) + \text{Na}]^+$

$\text{C}_{17}\text{H}_{25}\text{O}_{10}\text{Br}$ $M_r = 469,0$



$^1\text{H-NMR}$ δ_{H} (250 MHz, CDCl_3): 2,01-2,09 (4s, 12H, CH_3); 2,05 (dd, 2H, 2'); 3,46 (dd 2H, 1'); 3,70 (m, 2H, 5, 3'a); 3,98 (ddd, 1H, 3'b); 4,15 (dd, 1H, 6a); 4,27 (dd, 1H, 6b); 4,52 (d, 1H, 1); 5,00 (dd, 1H, 2); 5,08 (dd, 1H, 4); 5,22 (dd, 1H, 3); $J_{6a/6b} = 12,3$; $J_{6a/5} = 2,5$; $J_{6b/5} = 4,8$; $J_{1/2} = 7,9$; $J_{2/3} = 9,8$; $J_{3/4} = 9,5$; $J_{4/5} = 9,6$

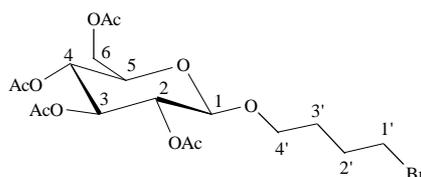
$^{13}\text{C-NMR}$ δ_{C} (63 MHz, CDCl_3): 20,49; 20,59; 20,63 (4C, CH_3); 29,97; 32,21; 67,27 (3C, 1', 2', 3'); 61,87 (1C, 6); 68,36; 71,22; 71,76; 72,68 (4C, 2, 3, 4, 5); 100,97 (1C, 1); 170,54; 170,13; 169,30 (4C, C=O)

1-(4-Bromobutyl)-2,3,4,6-tetra-O-acetyl- β -D-glucopyranosid (12)

Eine Lösung von 9 g [25 mmol] Quecksilberbromid und 10,5 g [25,5 mmol] 1-Bromo-2,3,4,6-tetra-O-acetyl- β -D-glucopyranosid in 50 ml absolutem THF werden innerhalb von 15 h bei $35\text{ }^\circ\text{C}$ unter Vakuum (250 - 300 mm Hg) eingengt. Der Rückstand wird in 100 ml Chloroform aufgenommen und von festen Rückständen abfiltriert. Es wird mit 1 M Kaliumbromid-Lösung (1 x 50 ml, 3 x 25 ml) ausgeschüttelt, mit CaCl_2 getrocknet, mit Aktivkohle behandelt und das Lösungsmittel abrotiert. Die Aufreinigung erfolgt mittels

Flash-Chromatographie (SiO₂, Petrolether / Essigester, 2 : 1). **12** kristallisiert als weiße Nadeln aus Methanol / Wasser bei + 4 °C. Hierzu wird das Produkt in wenig Methanol gelöst und tropfenweise Wasser zugegeben, bis eine leichte Trübung durch leichtes Schütteln gerade noch verschwindet.

Ausbeute: 1,2 g (10 %)
 DC: R_f (SiO₂, Petrolether / Essigester, 1 : 1): 0,39
 MS (ESI): m/z (%) 505,0 / 507,0 (98 / 100) [M(⁷⁹Br / ⁸¹Br) + Na]⁺
 C₁₈H₂₇O₁₀Br M_r = 483,3



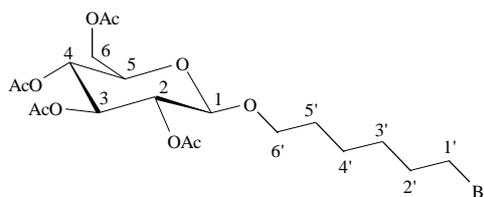
¹H-NMR δ_H (250 MHz, CDCl₃): 1,72 ; 1,92 (2m, 4H, 2', 3'); 2,00; 2,02; 2,05; 2,09 (4s, 12H, 4 CH₃); 3,41 (dd, 2H, 4'); 3,53 (ddd, 1H, 1'a); 3,77 (ddd, 1H, 5); 3,89 (ddd, 1H, 1'b); 4,14 (dd, 1H, 6a); 4,26 (dd, 1H, 6b); 4,98 (d, 1H, 1); 5,00 (dd, 1H, 2); 5,08 (dd, 1H, 4); 5,20 (dd, 1H, 3); J_{1/2} = 7,6; J_{2/3} = 9,4; J_{3/4} = 9,4; J_{4/5} = 9,4; J_{6a/5} = 2,5; J_{6b/5} = 4,7; J_{6a/6b} = 12,3

¹³C-NMR δ_C (63 MHz, CDCl₃): 20,55; 20,62; 20,69 (4C, CH₃); 27,96; 29,23 (2C, 2', 3'); 33,21 (1C, 4'); 68,84 (1C, 1'); 61,93 (1C, 6); 68,44; 71,26; 71,80; 72,79 (4C, 2, 3, 4, 5); 100,70 (1C, 1); 169,22; 169,32; 170,20; 170,57 (4C, C=O)

1-(6-Bromohexyl)-2,3,4,6-tetra-O-acetyl-β-D-glucopyranosid (13)

7,8 g [20 mmol] 1,2,3,4,6-O-Pentaacetyl-β-D-glucopyranosid und 5,52 g [4 ml; 30mmol] 6-Bromhexanol werden wie für **9** beschrieben umgesetzt und säulenchromatographisch gereinigt (SiO₂, Petrolether / Essigester, 2 : 1). **13** kristallisiert als weiße Nadeln aus Methanol / Wasser bei + 4 °C (siehe **12**).

Ausbeute: 2,0 g (19,6 %)
 DC: R_f (SiO₂, Petrolether / Essigester, 1 : 1): 0,5
 MS (ESI): m/z (%) 530,2 (20) [M+NH₄]⁺, 535,1 (50) [M+Na]⁺, 1045,3 (80) [2M+Na]⁺
 C₂₀H₃₁O₁₀Br M_r = 511,4



$^1\text{H-NMR}$ δ_{H} (250 MHz, CDCl_3): 1,42; 1,62; 1,89 (3m, 8H, 2', 3', 4', 5'); 2,01; 2,03; 2,06; 2,09 (4s, 12H, 4 CH_3); 3,40 (dd, 2H, 6'); 3,49 (ddd, 1H, 1'a); 3,70 (ddd, 1H, 5); 3,97 (ddd, 1H, 1'b); 4,13 (dd, 1H, 6a); 4,25 (dd, 1H, 6b); 4,49 (d, 1H, 1); 4,98 (dd, 1H, 2); 5,04 (dd, 1H, 1; 4); 5,21 (dd, 1H, 3); $J_{1/2} = 7,9$; $J_{2/3} = 9,5$; $J_{3/4} = 9,3$; $J_{4/5} = 9,8$; $J_{6a/5} = 2,5$; $J_{6b/5} = 5,1$; $J_{6a/6b} = 12,3$

$^{13}\text{C-NMR}$ δ_{C} (63 MHz, CDCl_3): 20,47; 20,54; 20,56 (4C, CH_3); 25,12; 27,68; 28,93; 32,50; 33,51; 68,34 (6C, 1', 2', 3', 4', 5', 6'); 61,86 (1C, 6); 67,08; 68,55; 70,10; 70,81 (4C, 2, 3, 4, 5); 95,56 (1C, 1); 169,43; 169,94; 170,42 (4C, C=O)

1-(6-Bromohexyl)-2,3,4,6-tetra-O-benzoyl- α -D-galactopyranosid (**14**)

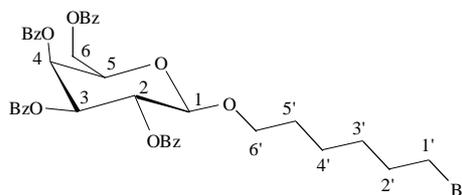
2 g [3 mmol] 1-O-(2,3,4,6-tetra-O-benzoyl- α -D-galactopyranosyl)trichloracetimidat, 652 mg [3,6 mmol] 6-Brom-1-hexanol und Molsieb 4 Å (gepulvert) werden in 20 ml Dichlormethan aufgenommen und unter Argon mit 72 μl Bortrifluoridetherat versetzt. Nach 15 stündigem Rühren werden 10 ml Wasser zugefügt und nochmals 10 min gerührt. Das Reaktionsgemisch wird mit NaHCO_3 -Lösung ausgeschüttelt und die organische Phase über Natriumsulfat getrocknet. Die Reinigung erfolgt mittels Säulenchromatographie (SiO_2 , Petrolether / Essigester 6 : 1).

Ausbeute: 1,1 g (48 %)

DC: R_f (SiO_2 , Petrolether / Essigester, 4 : 1; 2 x entwickelt): 0,46

MS (ESI): m/z (%) 781,1 / 782,9 (70) [M (^{79}Br / ^{81}Br) + Na] $^+$, 1541,7 (20) [$2\text{M} + \text{Na}$] $^+$

$\text{C}_{40}\text{H}_{39}\text{O}_{10}\text{Br}$ $M_r = 759,2$



$^1\text{H-NMR}$ δ_{H} (250 MHz, CDCl_3): 1,26; 1,58 (2m, 8H, 2', 3', 4', 5'); 3,20 (dd, 2H, 6'); 3,58; 3,99 (2ddd, 2H, 1'a, 1'b); 4,38 (m, 2H, 5, 6a); 4,69 (dd, 1H, 6b); 4,81 (d, 1H, 1); 5,62 (dd, 1H, 3); 5,79 (m, 1H, 2); 5,99 (dd, 1H, 4) 7,21-8,23 (m, 20H, Benzoyl); $J_{1/2} = 7,8$; $J_{2/3} = 10,4$; $J_{3/4} = 3,4$; $J_{4/5} = 0,9$; $J_{6b/5} = 4,7$; $J_{6a/6b} = 11,0$

^{13}C -NMR δ_{C} (63 MHz, CDCl_3): 24,96; 27,68; 29,17; 32,49; 33,58; 70,22 (6C, 1', 2', 3', 4', 5', 6'); 62,00 (1C, 6); 68,15; 69,85 71,26; 71,67 (4C, 2, 3, 4, 5); 101,71 (1C, 1); 128,26-133,58 (20C, Benzoyl) 163,65; 165,21; 165,61; 166,05 (4C, C=O)

1-(6-Bromohexyl)-2,3,4,6-tetra-O-benzoyl- β -D-glucopyranosid (15)

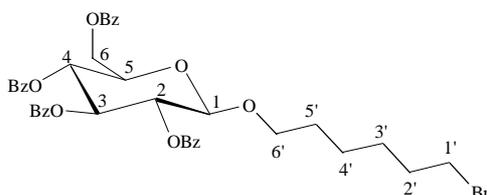
Zu 25 ml Nitromethan, Molsieb (3 Å) werden unter Argon 5,5 g [30 mmol] 1-Brom-6-hexanol und 3,3 g [5 mmol] 1-Bromo-2,3,4,6-tetra-O-benzoyl- β -D-glucopyranosid zugesetzt und für eine Stunde gerührt. 0,7 g Silberphosphat werden zugefügt und 4 h unter DC Kontrolle gerührt. Das Reaktionsgemisch wird in 75 ml Essigester aufgenommen, von festen Rückständen abfiltriert und das Lösungsmittel abrotiert. Die Aufreinigung erfolgt mittels Flash-Chromatographie, wobei **15** als farbloses Öl erhalten wird (SiO_2 , Petrolether / Essigester, 4 : 1).

Ausbeute: 2,2 g (58 %)

DC: R_f (SiO_2 , Petrolether / Essigester, 4 : 1; 2 x entwickelt): 0,25

MS (ESI): m/z (%) 761,2 (5) [$\text{M}(^{79}\text{Br}/^{81}\text{Br}) + \text{H}$] $^+$

$\text{C}_{40}\text{H}_{39}\text{O}_{10}\text{Br}$ $M_r = 759,2$



^1H -NMR δ_{H} (250 MHz, CDCl_3): 1,18-1,65 (m, 8H, 2'-5'); 3,20 (dd, 2H, 6'); 3,54 (m, 1H, 1'a); 3,92 (m, 1H, 1'b); 4,19 (ddd, 1H, 5); 4,53 (dd, 1H, 6a); 4,66 (dd, 1H, 6b); 4,87 (d, 1H, 1); 5,55 (dd, 1H, 2); 5,70 (d, 1H, 4); 5,94 (dd, 1H, 3) 7,21-7,55; 7,82-8,04 (2m, 20H, Benzoyl); $J_{1a/1b} = 9,8$; $J_{1/2} = 8,0$; $J_{2/3} = 9,6$; $J_{3/4} = 9,6$; $J_{4/5} = 9,5$; $J_{6a/5} = 3,4$; $J_{6b/5} = 5,2$; $J_{6a/6b} = 12,2$

^{13}C -NMR δ_{C} (63 MHz, CDCl_3): 24,99; 27,71; 29,20; 32,56 (4C, 2'-5'); 33,64 (1C, 6'); 70,01 (1C, 1'); 63,24 (1C, 6); 69,90; 71,96; 72,22; 72,94 (4C, 2-5); 101,35 (1C, 1); 128,30-133,42 (20C, Benzoyl) 165,94; 165,22; 165,84; 166,15 (4C, C=O)

1-(8-Bromooctyl)-2,3,4,6-tetra-O-benzoyl- β -D-glucopyranosid (16)

1,22 g [5,8 mmol] 1-Brom-8-octanol und 3,3 g [5 mmol] 1-Bromo-2,3,4,6-tetra-O-benzoyl- β -D-glucopyranosid werden wie für **15** beschrieben umgesetzt und das Produkt mittels Flash-

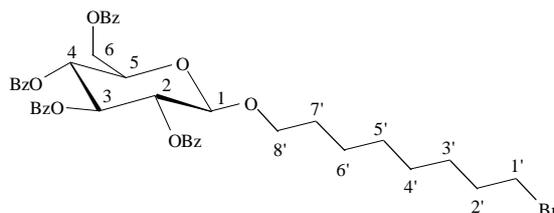
Chromatographie gereinigt (SiO₂, Petrolether / Essigester, 4 : 1). Das erhaltene farblose Öl kristallisiert bei + 4 °C in weißen Nadeln.

Ausbeute: 1,92 g (48 %)

DC: R_f(SiO₂, Petrolether / Essigester, 4 : 1): 0,26

MS (ESI): m/z (%) 787,1 / 789,2 (19 / 20) [M (⁷⁹Br / ⁸¹Br) + H]⁺; m/z (%) 809,1 / 811,1 (90 / 100) [M (⁷⁹Br / ⁸¹Br) + Na]⁺

C₄₂H₄₃O₁₀Br M_r = 787,7



¹H-NMR δ_H (250 MHz, CDCl₃): 1,08-1,30; 1,50-1,68; 1,72-1,78 (3m, 12H, 2'-7'); 3,31 (dd, 2H, 8'); 3,54 (ddd, 1H, 1'a); 3,92 (ddd, 1H, 1'b); 4,16 (ddd, 1H, 5); 4,51 (dd, 1H, 6a); 4,64 (dd, 1H, 6b); 4,83 (d, 1H, 1); 5,52 (dd, 1H, 2); 5,67 (d, 1H, 4); 5,91 (dd, 1H, 3) 7,21-7,55; 7,82-8,04 (m, 20H, Benzoyl); J_{1a/1b} = 9,7; J_{8a/8b} = 6,8; J_{6a/5} = 3,3; J_{1/2} = 7,9; J_{2/3} = 9,7; J_{3/4} = 9,7; J_{4/5} = 9,2; J_{6b/5} = 5,5; J_{6a/6b} = 12,0

¹³C-NMR δ_C (63 MHz, CDCl₃): 25,54; 27,83; 28,38; 28,82; 29,20; 32,61 (5C, 2'-7'); 33,76 (1C, 8'); 70,08 (1C, 1'); 63,12 (1C, 6); 69,79; 71,86; 72,05; 72,87 (4C, 2-5); 101,18 (1C, 1); 128,14-133,26 (20C, Benzoyl) 164,90; 165,07; 165,68; 165,97 (4C, C=O)

1-(10-Bromodecyl)-2,3,4,6-tetra-O-benzoyl-β-D-glucopyranosid (**17**)

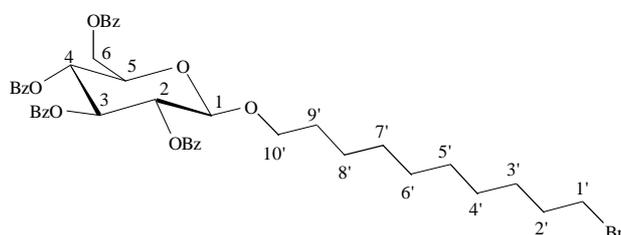
1 g [4,3 mmol] 1-Brom-10-decanol und 3,3 g [5 mmol] 1-Bromo-2,3,4,6-tetra-O-benzoyl-β-D-glucopyranosid werden wie für **15** beschrieben umg esetzt und mittels Flash-Chromatographie gereinigt (SiO₂, Petrolether / Essigester, 4 : 1).

Ausbeute: 1,62 g (46 %)

DC: R_f (SiO₂, Petrolether / Essigester, 6 : 1; 2 x entwickelt): 0,30

MS (ESI): m/z (%)m/z (%) 815,3 / 817,2 (18 / 20) [M (⁷⁹Br / ⁸¹Br) + H]⁺; 837,2 / 839,2 (92 / 100) [M(⁷⁹Br / ⁸¹Br) + Na]⁺

C₄₄H₄₇O₁₀Br M_r = 815,7



$^1\text{H-NMR}$ δ_{H} (250 MHz, CDCl_3): 1,08-1,58; 1,76-1,87 (2m, 16H, 2'-9'); 3,38 (ddd, 1H, 10'a); 3,40 (ddd, 1H, 10'b); 3,53 (ddd, 1H, 1'a); 3,91 (ddd, 1H, 1'b); 4,15 (ddd, 1H, 5); 4,50 (dd, 1H, 6a); 4,63 (dd, 1H, 6b); 4,83 (d, 1H, 1); 5,51 (dd, 1H, 2); 5,66 (d, 1H, 4); 5,90 (dd, 1H, 2) 7,24-7,57; 7,81-8,04 (m, 20H, Benzoyl); $J_{1a/1b} = 9,5$; $J_{10a/10b} = 6,9$; $J_{1/2} = 7,9$; $J_{2/3} = 9,8$; $J_{3/4} = 9,6$; $J_{4/5} = 9,6$; $J_{6a/5} = 3,4$; $J_{6b/5} = 5,2$; $J_{6a/6b} = 12,1$

$^{13}\text{C-NMR}$ δ_{C} (63 MHz, CDCl_3): 25,73; 28,09; 28,66; 29,13; 29,22; 29,27; 29,37; 32,80 (8C, 2'-9'); 33,98 (1C, 10'); 70,28 (1C, 1'); 63,27 (1C, 6); 69,91; 71,95; 72,16; 72,97 (4C, 2-5); 101,29 (1C, 1); 128,27-133,37 (20C, Benzoyl) 165,03; 165,19; 165,82; 166,12 (4C, C=O)

1-(12-Bromododecyl)-2,3,4,6-tetra-O-benzoyl- β -D-glucopyranosid (18)

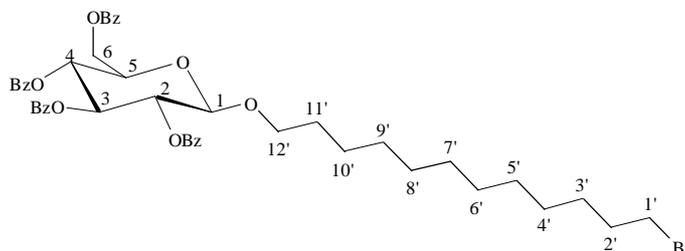
1 g [3,7 mmol] 1-Brom-12-dodecanol und 2,5 g [3,7 mmol] 1-Bromo-2,3,4,6-tetra-O-benzoyl- β -D-glucopyranosid werden wie für **15** beschrieben umgesetzt und mittels Flash-Chromatographie gereinigt (SiO_2 , Petrolether / Essigester, 4 : 1).

Ausbeute: 1,95 g (62,5 %)

DC: R_f (SiO_2 , Petrolether / Essigester, 6 : 1; 2 x entwickelt): 0,34

MS (ESI): m/z (%) 865,2 / 867,1 (84 / 100) [$\text{M} (^{79}\text{Br} / ^{81}\text{Br}) + \text{Na}]^+$

$\text{C}_{46}\text{H}_{51}\text{O}_{10}\text{Br}$ $M_r = 843,8$



$^1\text{H-NMR}$ δ_{H} (250 MHz, CDCl_3): 1,07-1,61; 1,84 (2m, 20H, 2'-11'); 3,40 (dd, 2H, 12'); 3,53 (ddd, 1H, 1'a); 3,91 (ddd, H, 1'b); 4,15 (ddd, 1H, 5); 4,51 (dd, 1H, 6a); 4,64 (dd, 1H, 6b); 4,83 (d, 1H, 1); 5,52 (dd, 1H, 2); 5,67 (d, 1H, 4); 5,90 (dd, 1H, 3) 7,24-7,57; 7,81-8,04 (m, 20H, Benzoyl). $J_{1a/1b} = 9,6$; $J_{2/3} = 9,8$; $J_{3/4} = 9,6$; $J_{4/5} = 9,6$; $J_{6a/5} = 3,4$; $J_{6b/5} = 5,2$; $J_{1/2} = 8,0$; $J_{6a/6b} = 12,1$

$^{13}\text{C-NMR}$ δ_{C} (63 MHz, CDCl_3): 25,74; 28,14; 28,73; 29,19; 29,38; 29,43; 32,81 (10C, 2'-11'); 33,99 (1C, 12'); 70,32 (1C, 1'); 63,27 (1C, 6); 69,92; 71,95; 72,16; 72,97 (4C, 2-5); 101,29 (1C, 1); 128,25-133,36 (20C, Benzoyl) 165,04; 165,19; 165,82; 166,13 (4C, C=O)

1-(4-Bromobut-2-ynyl)-2,3,4,6-tetra-O-acetyl-β-D-glucopyranosid (19)

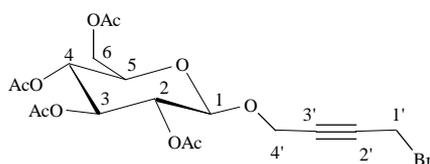
745 mg [5 mmol] 4-Brombut-2-in-1-ol und 780 mg [2 mmol] 1,2,3,4,6-penta-O-acetyl-β-D-glucopyranosid werden in 5 ml trockenem 1,2-Dichlorethan wie für **9** beschrieben umgesetzt und mittels Flash-Chromatographie gereinigt. (SiO₂, Petrolether / Essigester, 2 : 1). **19** kristallisiert in weißen Nadeln aus Methanol bei -30 °C

Ausbeute: 160 mg (16,7 %)

DC: R_f (SiO₂, Petrolether / Essigester 1 : 1): 0,37

MS (ESI): m/z (%) 501,1 / 503,2 (92 / 100) [M (⁷⁹Br / ⁸¹Br) + Na]⁺

C₁₈H₂₃BrO₁₀ M_r = 479,3



¹H-NMR δ_H (250 MHz, CDCl₃): 2,01; 2,03; 2,07; 2,09 (4s, 12H, 4 CH₃); 3,73 (ddd, 1H, 5); 3,94 (dd, 2H, 1'), 4,16 (dd, 1H, 6a); 4,27 (dd, 1H, 6b); 4,42 (dd, 2H, 4'); 4,73 (d, 1H, 1); 5,00 (dd, 1H, 2); 5,10 (dd, 1H, 4); 5,24 (dd, 1H, 3); J_{1/2} = 7,8; J_{2/3} = 9,3; J_{3/4} = 9,3; J_{4/5} = 9,4; J_{6a/5} = 2,3; J_{6b/5} = 4,5; J_{6a/6b} = 12,3

¹³C-NMR δ_C (63 MHz, CDCl₃): 13,70 (1C, 4'); 20,55; 20,68 (4C, CH₃); 56,19 (1C, 1'); 61,75 (1C, 6); 68,29; 71,01; 71,96; 72,78 (4C, 2-5); 81,19; 82,34 (2C, 2', 3'); 98,31 (1C, 1); 169,33; 169,36; 170,20; 170,58 (4C, C=O)

6.2.1.4. MGMT-Inhibitor-Glycoside**Schritt 1: Nukleophile Substitution (siehe Abbildung 3.1.11)**

1 eq des O⁶-substituierten Purins (**A**) und 1 eq (1,3 eq.) des aktivierten Bromoalkylglucosids (**B**) werden 12 h bei 1 x 10⁻³ mm Hg vorgetrocknet. 1 ml / 0,1 mmol trockenes DMF, Molekularsieb 4 Å und anschließend 1,1 eq. Lithiumhydrid werden unter Argon zu **A** gesetzt und die Temperatur auf 80 °C erhöht.

B wird in 1 ml / 0,2 mmol DMF gelöst und zu **A** getropft. Es wird bei 80 °C gerührt, bis kein Edukt mehr detektiert werden kann (DC). Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur wird 1 ml / 0,1 mmol 0,1 M Phosphat-Puffer (KH₂PO₄ / Na₂PO₄) (pH 7,0) zugesetzt und 15min gerührt. Das Gemisch wird filtriert und 3 mal mit 100 ml Chloroform ausgeschüttelt. Die

organische Phase wird über Natriumsulfat getrocknet und anschließend das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Die Reinigung erfolgt mittels Säulenchromatographie oder Flash-Chromatographie (wie angegeben).

2-(O⁶-Methylguan-9-yl)-ethyl-tetra-O-acetyl-β-D-glucosid (20)

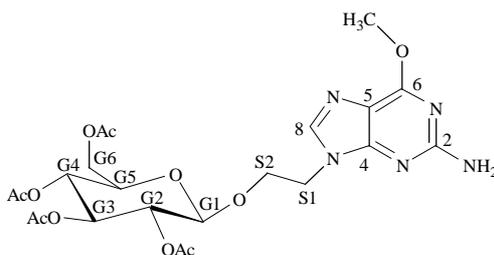
165 mg [1 mmol] O⁶-Methylguanin werden mit 455 mg [1 mmol] 1-(2-Bromoethyl)-2,3,4,6-tetra-O-acetyl-β-D-glucopyranosid gemäß der Standardvorschrift umgesetzt und mittels Flash-Chromatographie gereinigt (SiO₂, Aceton / Petrolether 1 : 1).

.Ausbeute : 209,5 mg (55 %)

DC: R_f (SiO₂, Essigester / Petrolether / Methanol 10 : 1 : 1): 0,41

MS (ESI): m/z (%) 540,2 (40) [M+H]⁺, 562,2 (20) [M+Na]⁺, 1079,5 (100) [2M+H]⁺, 1101,5 (30) [2M+Na]⁺

C₂₂H₂₉N₅O₁₁ M_r = 539,5



¹H-NMR δ_H (250 MHz, CDCl₃): 1,98; 1,99; 2,01; 2,09 (4s, 12H, 4 CH₃); 3,65 (ddd, 2H, G5); 3,78 (m, 1H, S2a); 4,07 (s, 3H, CH₃); 4,12-4,36 (m, 5H, S1, S2b, G6, G6b); 4,44 (d, 1H, G1); 4,85 (s, 1H, NH₂); 5,01; (dd, 1H, G2); 5,07; (dd, 1H, G4); 5,16 (dd, 1H, G3); 7,57 (s, 1H, 8); J_{1/2} = 7,5; J_{2/3} = 9,2; J_{3/4} = 9,2; J_{4/5} = 9,2

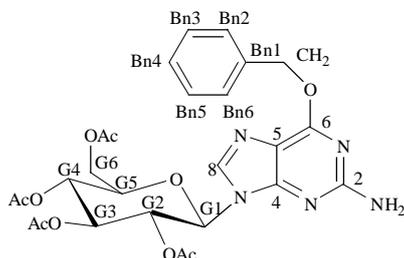
¹³C-NMR δ_C (63 MHz, CDCl₃): 20,52; 20,63; 20,68 (4C, Acetyl-CH₃); 43,01 (1C, S1); 67,51 (1C, S2); 53,84 (1C, CH₃); 61,73 (1C, G6); 70,85; 71,94; 72,55; 77,20 (4C, G2-G5); 100,54 (1C, G1); 115,46 (1C, 5); 140,23 (1C, 8); 153,66 (1C, 4); 159,25 (1C, 2); 161,60 (1C, 6) 169,32; 169,45; 170,12; 170,57 (4C, C=O)

2-Amino-6-benzyloxy-N₉-[2',3',4',6'-tetra-O-acetyl-β-D-glucopyranosidyl]-purin

241 mg [1 mmol] O⁶-Benzylguanin werden mit 455 mg [1 mmol] 1-Bromo-2,3,4,6-tetra-O-acetyl-β-D-glucopyranosid gemäß der Standardvorschrift umgesetzt und mittels Flash-Chromatographie gereinigt (SiO₂, Aceton / Petrolether 1 : 1).

Ausbeute: 95 mg (33,3 %)

DC: R_f (SiO₂, Petrolether / Essigester, 2 : 1): 0,21
 MS (ESI): m/z (%) 572,3 (100) [M+H]⁺, 594,3 (20) [M+Na]⁺
 C₂₆H₂₉N₅O₁₀ M_r = 571,2



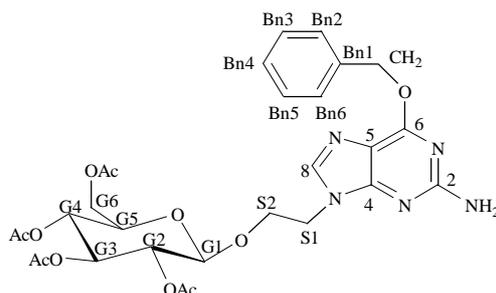
¹H-NMR δ_H (250 MHz, CDCl₃): 1,26; 1,81; 2,02; 2,07 (4s, 12H, 4 CH₃); 3,96-4,03 (ddd, 1H, G5); 4,14, 4,28 (2dd, 4H, G6a, G6b); 5,09 (s, 1H, NH₂); 5,27 (dd, 1H, G2); 5,42 (dd, 1H, G4); 5,55 (s, 2H, CH₂); 5,60 (dd, 1H, G3); 5,74 (d, 1H, G1); 7,27-7,39 (m, 3H, -Benzyl); 7,48-7,51 (m, 2H, -Benzyl); 7,77 (s, 1H, 8); $J_{1/2}$ = 9,6; $J_{2/3}$ = 9,3; $J_{3/4}$ = 9,3; $J_{4/5}$ = 9,1; $J_{6a/5}$ = 2,1; $J_{6b/5}$ = 4,5; $J_{6a/6b}$ = 12,4

¹³C-NMR δ_C (63 MHz, CDCl₃): 20,14; 20,47; 20,49; 20,61 (4C, CH₃); 61,61 (1C, G6); 68,25 (1C, CH₂); 67,85; 69,80; 73,16; 74,78 (4C, G2-G5); 111,22 (1C, G1); 115,21 (1C, 5); 127,83-129,81 (5C, Bn2-Bn6); 136,14 (1C, Bn1); 136,79 (1C, 8); 153,91 (1C, 4); 159,50 (1C, 2); 161,19 (1C, 6) 168,86; 169,32; 169,95; 170,51 (4C, C=O)

*2-(O⁶-Benzylguan-9-yl)-ethyl-tetra-O-acetyl-**b**-D-glucosid (21)*

241 mg [1mmol] O⁶-Benzylguanin werden mit 455 mg [1mmol] 1-(2-Bromoethyl)-2,3,4,6-tetra-O-acetyl- β -D-glucopyranosid gemäß der Standardvorschrift umgesetzt und mittels Flash-Chromatographie gereinigt (SiO₂, Aceton / Petrolether 1 : 2).

Ausbeute: 90 mg (14,6 %)
 DC: R_f (SiO₂, Aceton / Petrolether 1 : 1): 0,25
 HPLC: (MethodeXIII) 13,1 min
 MS (ESI): mz (%) 616,2 (100) [M+H]⁺, 638,2 (50) [M+Na]⁺
 C₂₈H₃₃N₅O₁₁ M_r = 615,2



$^1\text{H-NMR}$ δ_{H} (250 MHz, CDCl_3): 1,96; 1,99; 2,01; 2,08 (4s, 12H, 4 CH_3); 3,66 (ddd, 2H, G5); 3,77; 3,81 (2m, 2H, S2); 4,29; 4,35 (2m, 2H, S1); 4,11 (dd, 1H, G6a); 4,23 (dd, 1H, G6b); 4,44 (d, 2H, G1); 4,86 (s, 1H, $-\text{NH}_2$); 5,00 (dd, 1H, G3); 5,06 (dd, 1H, G4); 5,15 (d, 1H, G2); 5,57 (s, 2H, $-\text{CH}_2$); 7,34; 7,50 (2m, 5H, Bn2-Bn6); 7,59 (s, 1H, 8); $J_{1/2} = 8,0$; $J_{2/3} = 9,2$; $J_{3/4} = 9,2$; $J_{4/5} = 9,2$; $J_{6a/6b} = 12,4$; $J_{6a/5} = 2,4$; $J_{6b/5} = 4,8$

$^{13}\text{C-NMR}$ δ_{C} (63 MHz, CDCl_3): 20,50; 20,56; 20,66 (4C, CH_3); 43,01 (1C, S1); 67,47 (1C, S2); 61,71 (1C, G6); 67,47 (1C, CH_2); 70,83; 71,97; 72,54; 77,20 (4C, G2-G5); 100,51 (1C, G1); 115,42 (1C, 5); 127,91-128,32 (5C, Bn2-Bn6); 136,52 (1C, Bn1); 140,30 (1C, 8); 153,95 (1C, 4); 160,99 (1C, 2); 162,47 (1C, 6) 169,30; 169,38; 170,10; 170,56 (4C, $\text{C}=\text{O}$)

2-(*O*⁶-benzylguan-9-yl)-ethyl-tetra-*O*-acetyl-***b***-*D*-galatosid (**22**)

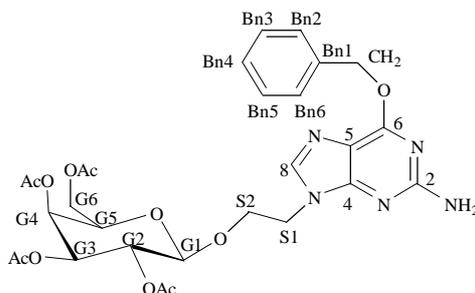
241 mg [1 mmol] *O*⁶-Benzylguanin werden mit 455 mg [1 mmol] 1-(2-Bromoethyl)-2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- β -*D*-galactopyranosid gemäß der Standardvorschrift umgesetzt und mittels Flash-Chromatographie gereinigt (SiO_2 , Aceton / Petrolether 1 : 2).

Ausbeute: 80 mg (13 %)

DC: R_f (SiO_2 , Aceton / Petrolether 1 : 1): 0,25

MS (ESI): m/z (%) 616,3 (60) $[\text{M}+\text{H}]^+$

$\text{C}_{28}\text{H}_{33}\text{N}_5\text{O}_{11}$ $M_r = 615,2$



$^1\text{H-NMR}$ δ_{H} (250 MHz, CDCl_3): 1,85; 1,91; 1,98; 2,10 (4s, 12H, 4 CH_3); 3,85-3,92 (ddd, 2H, G5); 3,98-4,15; 4,26-4,28 (2m, 6H, S1, S2, G6a, G6b); 4,54-4,57 (d, 1H, G1); 5,03-5,05 (2dd, 2H, G2, G4); 5,33 (dd, 1H, G3) 5,52 (s, 2H, CH_2); 7,27-7,36; 7,46-7,50 (2m, 5H, Bn2-Bn6); 7,72 (s, 1H, 8)

$^{13}\text{C-NMR}$ δ_{C} (63 MHz, CDCl_3): 20,63; 20,74; 20,77 (4C, CH_3); 44,49 (1C, S1); 68,22 (1C, S2); 62,64 (1C, G6); 69,03 (1C, CH_2); 68,84; 70,19; 71,95; 72,29 (4C, G2-G5); 101,84 (1C, G1); 115,18 (1C, 5); 129,21-129,56 (5C, Bn2-Bn6); 138,09 (1C, Bn1); 142,09 (1C, 8); 155,22 (1C, 4); 161,67 (1C, 2); 162,08 (1C, 6) 171,30; 171,54; 172,07; 172,10 (4C, $\text{C}=\text{O}$)

*3-(O⁶-benzylguan-9-yl)-propyl-tetra-O-acetyl-**b**-D-glucosid (23)*

200 mg [1 mmol] O⁶-Benzylguanin werden mit 300 mg [0,66 mmol] 1-(3-Bromopropyl)-2,3,4,6-tetra-O-acetyl-β-D-glucopyranosid gemäß der Standardvorschrift umgesetzt und mittels Flash-Chromatographie gereinigt (SiO₂, Essigester / Petrolether 1 : 2).

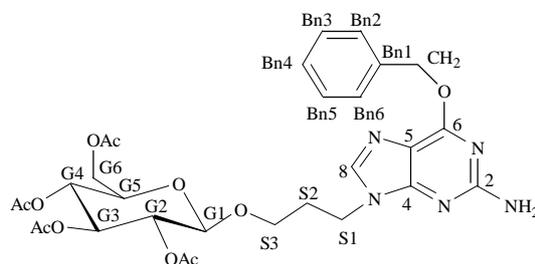
Ausbeute: 73,6 mg (17,7 %)

DC: R_f(SiO₂, Dichlormethan / Methanol 20 : 1): 0,5

HPLC: (MethodeXIII) 13,8 min

MS (ESI): m/z (%) 630,2 (20) [M+H]⁺, 652,2 (30) [M+Na]⁺, 731,3 (10) [M+Triethylamin=102]⁺; 747,3 (10) [M+Triethylamin+Na]⁺; 513,1 (20) [2M+H]⁺, 535,1 (100) [2M+Na]⁺

C₂₉H₃₅N₅O₁₁ M_r = 629,2



¹H-NMR δ_H (250 MHz, CDCl₃): 2,01; 2,02; 2,07; 2,09 (4s, 12H, 4 CH₃, 1dd, 2H, S2); 3,42 (m, 1H S3a); 3,69 (ddd, 2H, G5); 3,84 (m, 1H, S3b); 4,12 (m, 2H, G6a, S1); 4,25 (dd, 1H, G6b); 4,51 (d, 1H, 1); 5,00-5,26 (m, 5H, G2, G3, G4, NH₂); 5,56 (s, 2H, CH₂); 7,25-7,38; 7,48-7,51 (2m, 5H, Bn2-Bn6); 7,60 (s, 1H, 8); J_{1/2} = 7,9; J_{2/3} = 9,4; J_{6a/6b} = 10,2; J_{6a/5} = 2,5; J_{6b/5} = 4,8

¹³C-NMR δ_C (63 MHz, CDCl₃): 20,46; 20,60; 20,62; 20,92 (4C, CH₃); 29,49 (1C, S2); 39,76 (1C, S1); 65,64 (1C, S3); 61,74 (1C, G6); 67,91 (1C, CH₂); 68,24; 71,34; 71,81; 72,67 (4C, G2-G5); 100,60 (1C, G1); 115,48 (1C, 5); 127,84-128,25 (5C, Bn2-Bn6); 136,40 (1C, Bn1); 139,69 (1C, 8); 154,03 (1C, 4); 159,19 (1C, 2); 160,94 (1C, 6) 169,28; 170,12; 170,51 (4C, C=O)

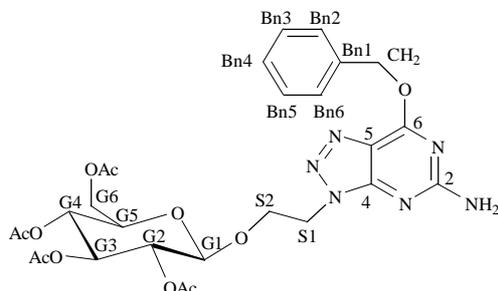
*2-(8-aza-O⁶-benzylguan-9-yl)-ethyl-tetra-O-acetyl-**b**-D-glucosid (24)*

121 mg [0,5 mmol] 8-Aza-O⁶-benzylguanin werden mit 225 mg [0,5 mmol] 1-(2-Bromoethyl)-2,3,4,6-tetra-O-acetyl-β-D-glucopyranosid gemäß der Standardvorschrift umgesetzt und mittels Flash-Chromatographie gereinigt (SiO₂, Essigester / Petrolether 2 : 1).

Ausbeute: 61 mg (19,8 %)

DC: R_f(SiO₂, Aceton / Petrolether 1 : 1): 0,32

HPLC: (MethodeXIII) 13,5 min
 MS (ESI): m/z (%) 617,2 (40) [M+H]⁺, 639,1 (20) [M+Na]⁺, 1233,7 (100)
 [2M+H]⁺, 1255,6 (200) [2M+Na]⁺
 C₂₇H₃₂N₆O₁₁ M_r = 616,2



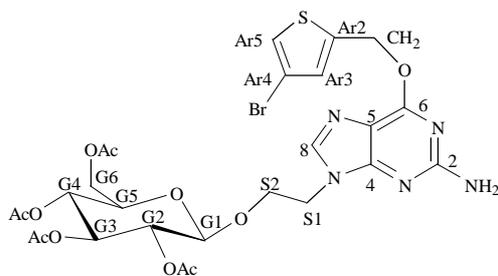
¹H-NMR δ_H (250 MHz, CDCl₃): 2,23; 2,38; 2,43; 2,50 (4s, 12H, 4 CH₃); 4,09 (ddd, 1H, G5); 4,52 (dd, 1H, G6a); 4,66 (dd, 1H, G6b); 4,73; 5,05 (2m, 4H, S1, S2); 4,90 (d, 1H, G1); 5,34 (dd, 1H, G2); 5,46 (dd, 1H, G4); 5,55 (dd, 1H, G3); 5,91 (s, 2H, NH₂); 6,04 (s, 2H, CH₂-); 7,77; 7,92 (2m, 5H, Bn2-Bn6); J_{G6a/G6b} = 12,3; J_{G6a/G5} = 2,5; J_{G6b/G5} = 4,6; J_{G1/G2} = 7,7; J_{G2/G3} = 9,4; J_{G3/G4} = 9,4; J_{G4/G5} = 9,6

¹³C-NMR δ_C (63 MHz, CDCl₃): 20,18; 20,42; 20,60 (4C, CH₃); 45,65 (1C, S1); 67,03 (1C, S2); 61,74 (1C, G6); 68,76 (1C, CH₂); 68,20; 70,75; 71,73; 72,55 (4C, G2-G5); 100,45 (1C, G1); 121,66 (1C, 5); 128,27-128,42 (5C, Bn2-Bn6); 135,46 (1C, Bn1); 153,53 (1C, 4); 161,60 (1C, 2); 161,73 (1C, 6); 169,07; 169,26; 170,00; 170,55 (4C, C=O)

2-[O6-(4-Bromophenyl)-guan-9-yl]-ethyl-tetra-O-acetyl-β-D-glucosid (25)

163 mg [0,5 mmol] O⁶-(4-Bromophenyl)-guanin werden mit 225 mg [0,5 mmol] 1-(2-Bromoethyl)-2,3,4,6-tetra-O-acetyl-β-D-glucopyranosid gemäß der Standardvorschrift umgesetzt und mittels Flash-Chromatographie gereinigt (SiO₂, Aceton / Petrolether 1 : 1)

Ausbeute: 30 mg (8,5 %)
 DC: R_f (SiO₂, Aceton / Petrolether 1 : 1): 0,17
 HPLC: (MethodeXIII) 13,9 min
 MS (ESI): m/z (%) 702,1 (20) [M+H]⁺, 723,9 (20) [M+Na]⁺, 1401,3 (100)
 [2M+H]⁺, 1423,3 (20) [2M+Na]⁺
 C₂₆H₃₁BrN₅O₁₁S M_r = 700,5



$^1\text{H-NMR } \delta_{\text{H}}$ (250 MHz, CDCl_3): 2,01; 2,03; 2,06; 2,13 (4s, 12H, 4 CH_3); 3,70 (ddd, 1H, G5); 3,83; 4,20 (2ddd, S2); 4,34; 4,40 (2ddd, 2H, S1); 4,15 (dd, 1H, G6a); 4,27 (dd, 1H, G6b); 4,48 (d, 1H, G1); 4,91 (s, 1H, NH_2); 5,04 (dd, 1H, G2); 5,10 (dd, 1H, G4); 5,19 (dd, 1H, G3); 5,70 (d, 2H, CH_2); 7,16 (d, 1H, Ar3), 7,23 (d, 1H, Ar5), 7,63 (s, 1H, 8) ; $J_{\text{G1/G2}} = 7,8$; $J_{\text{G2/G3}} = 9,2$; $J_{\text{G3/G4}} = 9,2$; $J_{\text{G4/G5}} = 9,2$; $J_{\text{G6a/G5}} = 2,5$; $J_{\text{G6b/G5}} = 4,5$; $J_{\text{G6a/G6b}} = 12,3$; $J_{\text{Ar3/Ar5}} = 1,4$

$^{13}\text{C-NMR } \delta_{\text{C}}$ (63 MHz, CDCl_3): 20,54; 20,63; 20,71 (4C, CH_3); 43,07 (1C, S1); 67,46 (1C, S2); 61,71; 61,74 (2C, G6, CH_2); 68,30; 70,85; 71,97; 72,55 (4C, G2-G5); 100,54 (1C, G1); 109,12 (1C, Ar4); 115,33 (1C, 5); 124,02 (1C, Ar5); 130,85 (1C, Ar3); 140,62 (1C, 8); 154,19 (1C, 4); 158,81 (1C, 2); 160,21 (1C, 6) 169,33; 169,44; 170,14; 170,58 (4C, $\text{C}=\text{O}$)

4-[O^6 -(4-Bromophenyl)-guan-9-yl]-butyl-tetra-O-acetyl- β -D-glucosid (**26**)

163 mg [0,5 mmol] O^6 -(4-Bromophenyl)-guanin werden mit 300 mg [0,66 mmol] 1-(4-Bromobutyl)-2,3,4,6-tetra-O-acetyl- β -D-glucopyranosid gemäß der Standardvorschrift umgesetzt und mittels Flash-Chromatographie gereinigt (SiO_2 , Aceton / Petrolether 1 : 1).

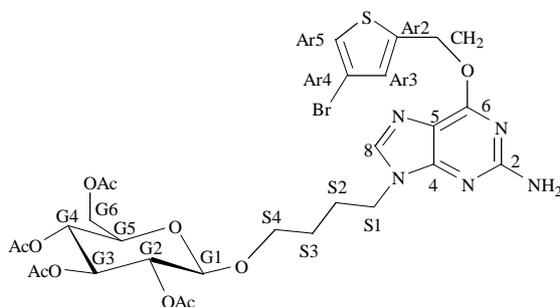
Ausbeute: 86 mg (24,8 %)

DC: R_f (SiO_2 , Aceton / Petrolether 1 : 1): 0,17

HPLC: (MethodeXIII) 14,8 in

MS (ESI): m/z (%) 729,8 (100) $[\text{M}+\text{H}]^+$, 749,9 (90) $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 1456,6 (10) $[2\text{M}+\text{H}]^+$, 1479,2 (20) $[2\text{M}+\text{Na}]^+$

$\text{C}_{28}\text{H}_{35}\text{BrN}_5\text{O}_{11}\text{S}$ $M_r = 728,6$



$^1\text{H-NMR } \delta_{\text{H}}$ (250 MHz, CDCl_3): 1,59; 1,92 (2m, 4H, S2; S3); 2,00; 2,01; 2,02; 2,08 (4s, 12H, 4 CH_3); 3,68 (ddd, 1H, G5); 3,52; 3,90 (2m, 2H, S4); 4,06 (m, 2H, S1); 4,14 (dd, 1H, G6a); 4,26 (dd, 1H, G6b); 4,48 (d, 1H, G1); 4,92 (s, 1H, NH_2); 4,98 (dd, 1H, G2); 5,07 (dd, 1H,

G4); 5,20 (dd, 1H, G3); 5,65 (d, 2H, CH₂); 7,11 (d, 1H, Ar3), 7,18 (d, 1H, Ar5), 7,59 (s, 1H, H8); J_{S1a/S1b} = 9,6; J_{G1/G2} = 8,0; J_{G2/G3} = 9,2; J_{G3/G4} = 9,4; J_{G4/G5} = 9,2; J_{G6a/G5} = 2,5; J_{G6b/G5} = 4,6; J_{G6a/G6b} = 12,4; J_{Ar3/Ar5} = 1,5

¹³C-NMR δ_C (63 MHz, CDCl₃): 20,57; 20,61; 20,71 (4C, CH₃); 26,42; 26,47 (2C, S2, S3); 43,18 (1C, S1); 69,01; 61,69 (2C, G6, CH₂); 61,93 (1C, G6); 68,44; 71,31; 71,84; 72,80 (4C, G2-G5); 100,69 (1C, G1); 109,11 (1C, Ar4); 115,53 (1C, 5); 123,99 (1C, Ar5); 130,79 (1C, Ar3); 139,88 (1C, 8); 154,41 (1C, 4); 158,86 (1C, 2); 160,19 (1C, 6) 169,31; 169,36; 170,24; 170,63 (4C, C=O)

6-[O⁶-(4-Bromophenyl)-guan-9-yl]-hexyl-tetra-O-benzoyl-**b**-D-glucosid (**27**)

163 mg [0,5 mmol] O⁶-(4-Bromophenyl)-guanin werden mit 378 mg [0,5 mmol] 1-(6-Bromohexyl)-2,3,4,6-tetra-O-benzoyl-β-D-glucoopyranosid gemäß der Standardvorschrift umgesetzt und mittels Flash-Chromatographie gereinigt (SiO₂, Aceton / Petrolether 1 : 1).

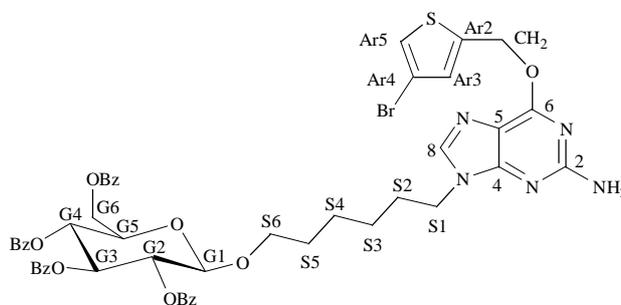
Ausbeute: 150 mg (29,8 %)

DC: R_f(SiO₂, Aceton / Petrolether 1 : 1): 0,31

HPLC: (MethodeXIII) 20,7 min

MS (ESI): m/z (%) 1004,0 (100) [M+H]⁺, 1025,9 (20) [M+Na]⁺

C₅₀H₄₆O₁₁BrN₅S M_r = 1004,9



¹H-NMR δ_H (250 MHz, CDCl₃): 0,90; 1,20; 1,54 (3m, 8H, S2-S5); 3,51; 3,92 (2m, 2H, S6); 3,83 (m, 2H, S1); 4,16 (ddd, 1H, G5); 4,51 (dd, 1H, G6a); 4,64 (dd, 1H, G6b); 4,83 (d, 1H, G1); 4,99 (s, 1H, -NH₂); 5,52 (dd, 1H, G2); 5,64 (d, 2H, CH₂); 5,68 (d, 1H, G4); 5,91 (dd, 1H, G3); 7,11 (d, 1H, Ar3), 7,18 (d, 1H, Ar5), 7,38; 7,92 (m, 21H, Benzoyl, 8); J_{S1a/S1b} = 9,5; J_{G1/G2} = 8,0; J_{G2/G3} = 9,6; J_{G3/G4} = 9,4; J_{G4/G5} = 9,4; J_{Ar3/Ar5} = 1,6; J_{G6a/G5} = 3,2; J_{G6b/G5} = 5,2; J_{G6a/G6b} = 12,0

¹³C-NMR δ_C (63 MHz, CDCl₃): 25,22; 26,02; 29,52; 36,67 (4C, S2-S5); 43,27 (1C, S1); 69,83 (1C, S6); 61,70 (1C, CH₂); 63,78 (1C, G6); 69,83 (1C, G4); 71,93 (1C, G2); 72,16 (1C, G5); 72,88 (1C, G3); 101,26 (1C, G1); 109,08 (1C, Ar4); 115,35 (1C, 5); 123,96 (1C, Ar5);

130,74 (1C, Ar3); 128,12-129,78; 133,08-133,37 (24C, Benzoyl); 139,85 (1C, 8); 154,17 (1C,

8-[O⁶

b-D-glucosid **29**)

⁶-(4-Bromothienyl)-guanin und 1,82 mg [0,25 mmol] 8-Bromooctyl-tetra-

Chromatographie gereinigt (SiO₂

Ausbeute: 1,0 g (37,7 %)

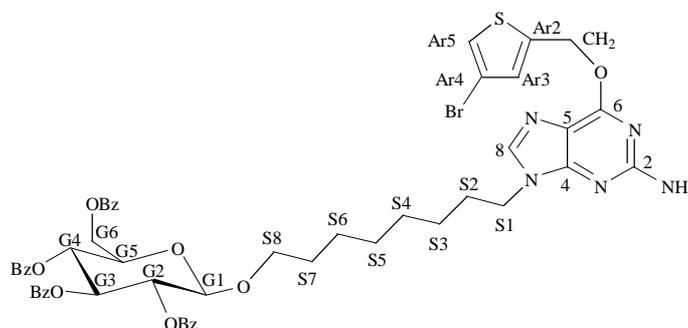
R_f 2, Aceton / Petrolether 1 : 1): 0,50

(MethodeXIII) 20,9 min

MS (ESI):

+

C H₅₀ 11BrN S M = 1033,0



¹ δ_H (250 MHz, CDCl₃

S8); 3,95 (m, 2H, S1); 4,14 (ddd, 1H, G5); 4,50 (dd, 1H, G6a); 4,63 (dd, 1H, G6b); 4,82 (d, 1H, G1); 4,89 (s, 2H, NH); 5,51 (dd, 1H, G2); 5,63 (d, 2H, CH₂

1H, G3); 7,11 (d, 1H, Ar3), 7,17 (d, 1H, Ar5), 7,24-7,55; 7,81-8,03 (m, 21H, Benzoyl-, H8);

J = 7,8; J_{G6a/G5} G6b/G5 G6a/G6b = 12,4; J = 1,3

¹³ δ_C (63 MHz, CDCl₃

S5); 29,27 (1C, S7); 29,71 (1C, S2); 43,46 (1C, S1); 70,19 (1C, S8); 61,67 (1C, CH₂ (1C, G6); 69,88 (1C, G4); 71,96 (1C, G2); 72,16 (1C, G5); 72,93 (1C, G3); 101,30 (1C, G1); 109,09 (1C, Ar4); 123,97 (1C, Ar5); 130,75 (1C, Ar3); 128,26-130,75; 133,07-133,37 (24C,

165,82; 166,12 (4C, C=O)

*10-[O⁶-(4-Bromophenyl)-guan-9-yl]-decyl-tetra-O-benzoyl-**b**-D-glucosid (30)*

163 mg [0,5 mmol] O⁶-(4-Bromophenyl)-guanin werden mit 378mg [0,5mmol] 1-(10-Bromodecyl)-2,3,4,6-tetra-O-benzoyl-β-D-glucopyranosid gemäß der Standardvorschrift umgesetzt und mittels Flash-Chromatographie gereinigt (SiO₂, Aceton / Petrolether 3 : 2).

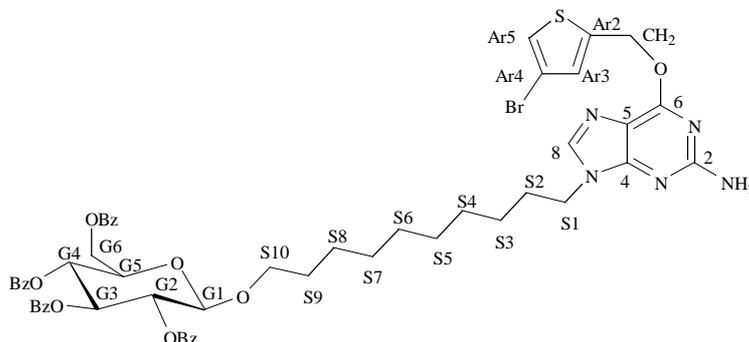
Ausbeute: 142 mg (35,8 %)

DC: R_f(SiO₂, Aceton / Petrolether 1 : 1): 0,37

HPLC: (MethodeXIII) 22,5 min

MS (ESI): m/z (%) 1062,2 (100) [M+H]⁺, 1085,4 (90) [M+Na]⁺

C₅₄H₅₄O₁₁BrN₅S M_r = 1061,0



¹H-NMR δ_H (250 MHz, CDCl₃): 0,88; 1,09; 1,26; 1,50 (4m, 16H, S2-S9); 3,52; 3,90 (2m, 2H, S10); 4,03 (m, 2H, S1); 4,15 (ddd, 1H, G5); 4,50 (dd, 1H, G6a); 4,63 (dd, 1H, G6b); 4,83 (d, 1H, G1); 5,17 (s, 1H, NH₂); 5,51 (dd, 1H, G2); 5,65 (d, 2H, CH₂); 5,67 (d, 1H, G4); 5,90 (dd, 1H, G3); 7,11 (d, 1H, Ar3), 7,17 (d, 1H, Ar5), 7,24-7,62; 7,81-8,12 (m, 21H, Benzoyl, 8); J_{S1a/S1b} = 9,6; J_{G1/G2} = 8,1; J_{G2/G3} = 9,7; J_{G3/G4} = 9,6; J_{G4/G5} = 9,6; J_{G6a/G5} = 3,6; J_{G6b/G5} = 5,2; J_{G6a/G6b} = 12,0; J_{Ar3/Ar5} = 1,5

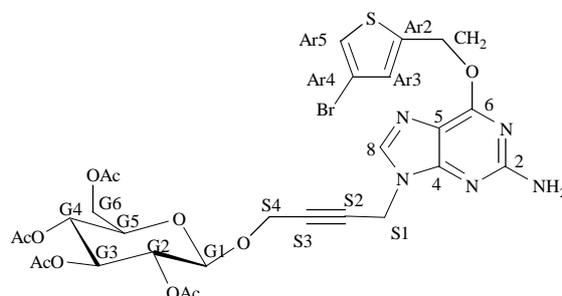
¹³C-NMR δ_C (63 MHz, CDCl₃): 25,70; 26,55; 28,96; 29,08; 29,22; 29,36; 29,67; 29,86 (8C, S2-S9); 43,76 (1C, S1); 70,29 (1C, S10); 61,79 (1C, CH₂); 63,28 (1C, G6); 69,91 (1C, G4); 71,97 (1C, G2); 72,16 (1C, G5); 72,97 (1C, G3); 101,30 (1C, G1); 109,12 (1C, Ar4); 115,13 (1C, 5); 124,00 (1C, Ar5); 130,76 (1C, Ar3); 128,27-129,81; 133,07-133,38 (24C, Benzoyl); 139,74 (1C, 8); 154,04 (1C, 4); 158,98 (1C, 2); 160,28 (1C, 6); 165,05; 165,20; 165,84; 166,14 (4C, C=O)

*4-[O⁶-(4-Bromophenyl)-guan-9-yl]-but-2-ynyl-tetra-O-acetyl-**b**-D-glucosid (25)*

163 mg [0,5 mmol] O⁶-(4-Bromophenyl)-guanin werden mit 240 mg [0,5 mmol] 1-(4-Bromobut-2-ynyl)-2,3,4,6-tetra-O-acetyl-β-D-glucopyranosid gemäß der Standardvorschrift umgesetzt und mittels Flash-Chromatographie gereinigt (SiO₂, Essigester / Petrolether, 2 : 1)

Ausbeute: 135 mg (37,3 %)

DC:	R_f (SiO ₂ , Aceton / Petrolether 1 : 1): 0,53
HPLC:	(MethodeXIII) 14,8 min
ESI:	m/z (%) 727,4 (80) [M+H] ⁺
C ₂₉ H ₃₀ O ₁₁ BrN ₅ S	M _r = 724,5



¹H-NMR δ_H (250 MHz, CDCl₃): 2,02; 2,03; 2,07; 2,10 (4s, 12H, 4 CH₃); 3,68 (ddd, 1H, G5); 4,11 (dd, 1H, G6a); 4,24 (dd, 1H, G6b); 4,38; 4,86 (2dd, 4H, S1, S4); 4,70 (d, 1H, G1); 4,97 (dd, 1H, G2); 5,07 (dd, 1H, G4); 5,22 (dd, 1H, G3); 5,63 (d, 2H, CH₂); 7,10 (d, 1H, Ar3), 7,17 (d, 1H, Ar5), 7,74 (s, 1H, 8); $J_{G1/G2} = 8,0$; $J_{G2/G3} = 9,3$; $J_{G3/G4} = 9,5$; $J_{G4/G5} = 9,5$; $J_{G6a/G5} = 2,4$; $J_{G6b/G5} = 4,4$; $J_{G6a/G6b} = 12,3$; $J_{Ar3/Ar5} = 1,2$

¹³C-NMR δ_C (63 MHz, CDCl₃): 20,54; 20,67 (4C, CH₃); 32,94; 55,94 (2C, S1, S4); 61,69 (1C, G6); 61,80 (1C, CH₂); 68,22; 71,03; 71,93; 72,71 (4C, G2-G5); 79,92; 80,68 (2C, S2, S3); 98,30 (1C, G1); 109,13 (1C, Ar4); 124,05 (1C, Ar5); 130,86 (1C, Ar3); 138,61; 139,68 (2C, Ar2, 8); 159,09 (1C, 2 oder 6); 169,31; 170,17; 170,56 (4C, C=O)

Schritt 2: Abspaltung der Schutzgruppen:

Zur Abspaltung der Acetyl- oder Benzoyl-Schutzgruppen wird 1 eq. der in *Schritt 1* erhaltenen Glucoside in Methanol (1 ml / 0,5 mmol) gelöst und 0,1 eq frsich hergestellte 0,1 M Natriummethanolat-Lösung zugesetzt. Unter DC-Kontrolle wird so lange gerührt, bis kein Edukt mehr detektiert werden kann. Das Gemisch wird anschließend mit Dowex (H⁺ 50WX2) Ionenaustauscherharz neutralisiert, filtriert und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Die Produkte werden mittels Flash-Chromatographie gereinigt und falls möglich umkristallisiert.

Die analytischen Daten der Produkte **34**, **37** und **40** bis **45** finden sich tabellarisch aufgelistet im Ergebnisteil unter 3.1.1.2.

2-(O⁶-Methylguan-9-yl)-ethyl-b-D-glucosid (33)

54 mg [0,1 mmol] 2-(O⁶-Methylguan-9-yl)-ethyl-tetra-O-acetyl-β-D-glucosid (**20**) werden nach der Standardvorschrift umgesetzt und nach Flashchromatographie (SiO₂, Essigester / Methanol, 5 : 2) durch Umkristallisation in wenig Acetonitril gereinigt.

Ausbeute: 33 mg (88,9 %)

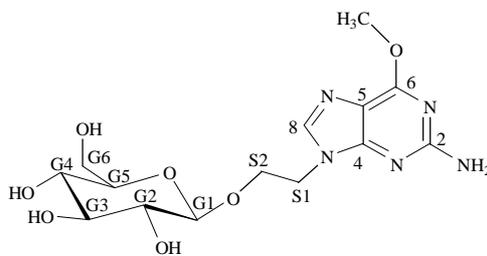
DC: R_f (SiO₂, Essigester / Methanol, 5 : 2): 0,22

HPLC: (Methode XIII) 4,55 min

MS (ESI): m/z (%) 372,1 (40) [M+H]⁺, 394,0 (50) [M+Na]⁺, 743,3 (20) [2M+H]⁺, 765,2 (100) [2M+Na]⁺

MS (HR-FAB): *berechnet*: 372,1557 (100) [M+H]⁺ *gefunden*: 372,1538
394,1392 (68,3) [M+Na]⁺ 394,1365

C₁₄H₂₁N₅O₇ 371,3



¹H-NMR δ_H (500 MHz, DMSO-D₆): 2,95 (dd, 1H, G2); 3,05 (dd, 1H, G4); 3,12 (ddd, 1H, G5); 3,15 (dd, 1H, G3); 3,44 (dd, 1H, G6a); 3,67 (d, 1H, G6b); 3,85 (m, 1H, S2a); 3,97 (s, 3H, CH₃); 4,02 (m, 1H, S2b); 4,21 (m, 2H, S1); 4,23 (d, 1H, G1); 6,32 (m, 2H, NH₂); 7,92 (s, 1H, 8); J_{1/2} = 7,8; J_{2/3} = 8,9; J_{3/4} = 9,3 ; J_{4/5} = 9,2; J_{G6a/G5} = 2,0; J_{G6b/G5} = 6,0; J_{G6a/G6b} = 11,8

¹³C-NMR δ_C (125 MHz, DMSO-D₆): 42,75 (1C, S1); 66,87 (1C, S2); 53,06 (1C, CH₃); 61,07 (1C, G6); 69,98; 73,29; 76,51; 76,87 (4C, G2-G5); 102,96 (1C, G1); 113,54 (1C, 5); 140,40 (1C, 8); 154,00 (1C, 4); 159,63 (1C, 6); 160,59 (1C, 2)

O⁶-Benzyloxy-9-b-D-glucopyanosylguanosin

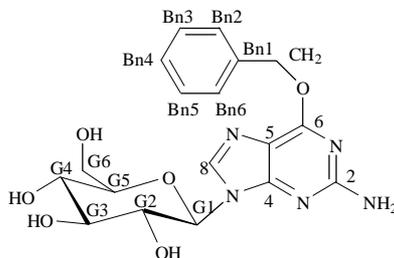
9,1 mg [0,016 mmol] 2-Amino-6-benzyloxy-N₉-[2',3',4',6'-tetra-O-acetyl-β-D-glucopyranosidyl]-purin werden gemäß der Standardvorschrift umgesetzt und mittels Flash-Chromatographie gereinigt (SiO₂, Chloroform / Methanol 7 : 1)..

Ausbeute: 6 mg (93 %)

DC: R_f (SiO₂, Chloroform / Methanol, 5 : 1): 0,37

HPLC: (Methode XIII) 7,91 min

MS (ESI):	m/z (%) 404,0 (100) [M+H] ⁺ , 426,0 (5) [M+Na] ⁺ , 807,2 (40) [2M+H] ⁺ , 829,2 (5) [2M+Na] ⁺
MS (HR-FAB):	<i>berechnet:</i> 404,1570 (53) [M+H] ⁺ <i>gefunden:</i> 404,1591 426,1427 (26,4) [M+Na] ⁺ 426,1408
C ₁₂ H ₂₁ N ₅ O ₆	403,4



¹H-NMR δ_H (500 MHz, DMSO-D₆): 3,21-3,51 (m, 7H, G2-5, G6a); 3,68 (dd, 1H, G6b); 4,54 (s, 1H, OH); 5,27 (d, 1H, G1); 5,25-5,31 (3s, 3H, OH); 5,51 (d, 2H, CH₂); 6,44 (s, 2H, NH₂); 7,32-7,41 (m, 3H, -Bn2, Bn4, Bn6); 7,48-7,51 (m, 2H, Bn3, Bn5); 8,01 (s, 1H, 8); J_{1/2} = 10,5; J_{2/3} = 9,3; J_{3/4} = 8,8; J_{G6a/G5} = 2,0; J_{G6b/G5} = 4,1; J_{G6a/G6b} = 11,8

¹³C-NMR δ_C (125 MHz, DMSO-D₆): 60,82 (1C, G6); 66,72 (1C, CH₂); 69,64; 71,12; 77,24; 79,94 (4C, G2-G5); 82,24 (1C, G1); 113,54 (1C, 5); 127,86-128,28 (5C, Bn2-Bn6); 136,64 (1C, Bn1); 138,16 (1C, 8); 154,74 (1C, 4); 159,63 (1C, 6); 159,94 (1C, 2)

2-(O⁶-Benzylguan-9-yl)-ethyl-**b**-D-galactosid (**35**)

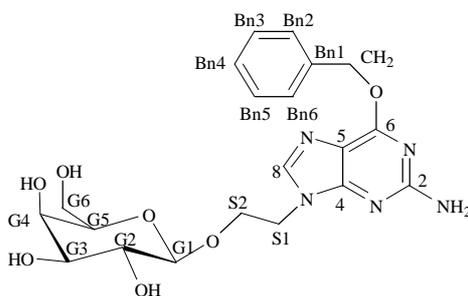
72,5 mg [0,12mmol] 2-(O⁶-benzylguan-9-yl)-ethyl-tetra-O-acetyl-β-D-galatosid (**22**) werden gemäß der Standardvorschrift umgesetzt und mittels Flash-Chromatographie gereinigt (SiO₂, Chloroform / Methanol 10 : 1).

Ausbeute: 51 mg (95 %)

DC: R_f (SiO₂, Chloroform / Methanol, 5 : 1): 0,50

MS (ESI): m/z (%) 448,1 (20) [M+H]⁺, 470,1 (50) [M+Na]⁺, 895,4 (40)
[2M+H]⁺, 917,4 (100) [2M+Na]⁺

MS (HR-FAB): *berechnet:* 448,1862 (100) [M+H]⁺ *gefunden:* 448,1847
470,1688 (28) [M+Na]⁺ 470,1670



C₁₄H₂₁N₅O₇ 447,4

¹H-NMR δ_H (500 MHz, DMSO-D₆): 3,32-3,43 (2m, 6H, G2-G5); 3,55 (m, 2H, G6a, G6b); 3,69 (d, 1H, G4); 3,88; 4,04 (2m, 2H, S2a, S2b); 4,22 (d, 1H, G1); 4,26 (m, H, S1); 4,99; 4,62; 4,61; 4,39 (4s, 4H, OH); 5,56 (s, 2H, CH₂); 6,43 (m, 2H, NH₂); 7,38-7,46; 7,54-7,56 (2m, 5H, Bn2-Bn6); 7,96 (s, 1H, 8) ; J_{1/2} = 7,8; J_{4/5} = 2,0 ; J_{G6a/G5} = 2,1; J_{G6b/G5} = 4,2; J_{G6a/G6b} = 11,7
¹³C-NMR δ_C (125 MHz, DMSO-D₆): 42,54 (1C, S1); 66,51 (1C, S2); 60,20 (1C, G6); 66,51 (1C, CH₂); 67,86; 70,19; 73,04; 75,07 (4C, G2-G5); 103,30 (1C, G1); 113,48 (1C, 5); 127,65-128,06 (5C, Bn2-Bn6); 136,69 (1C, Bn1); 140,26 (1C, 8); 154,30 (1C, 4); 159,54 (1C, 6); 159,99 (1C, 2)

3-(O⁶-Benzylguan-9-yl-)-propyl-**b**-D-glucosid (**36**)

31 mg [0,05 mmol] 3-(O⁶-benzylguan-9-yl)-propyl-tetra-O-acetyl-β-D-glucosid (**23**) werden gemäß der Standardvorschrift umgesetzt und mittels Flash-Chromatographie gereinigt (SiO₂, Chloroform / Methanol 7 : 1).

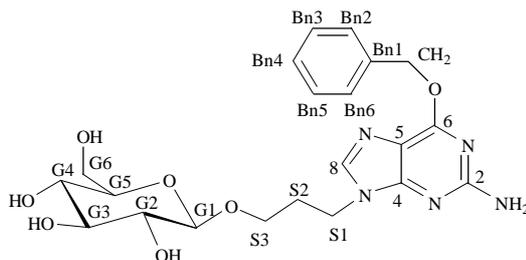
Ausbeute: 22 mg (90 %)

DC: R_f(SiO₂, Chloroform/Methanol, 5/1): 0,40

HPLC: (Methode XIII) 8,27 min

MS (ESI): m/z (%) 462,2 (20) [M+H]⁺, 484,2 (100) [M+Na]⁺, 945,4 (100) [2M+Na]⁺

C₁₅H₂₃N₅O₇ 461,2



¹H-NMR δ_H (500 MHz, DMSO-D₆): 2,01 (m, 2 H, S2); 2,99 (dd, 1H, G2); 3,06 (dd, 1H, G4); 3,09 (ddd, 1H, G5); 3,15 (dd, 1H, G3) 3,39; 3,76 (2m, 2H, S3a; S3b); 3,46; 3,67 (2dd, 2H, G6a, G6b); 4,12 (m, 2H, S1); 4,12 (d, 1H, G1); 4,48; 5,10 (2s, 2H, OH); 5,55 (s, 2H, CH₂); 7,32-7,41; 7,49-7,51 (2m, 5H, Bn2-Bn6); 7,87 (s, 1H, 8) ; J_{S2a/s2b} = 6,8; J_{1/2} = 7,8; J_{2/3} = 8,9; J_{3/4} = 9,2; J_{4/5} = 9,2; J_{G6a/G5} = 2,0; J_{G6b/G5} = 5,0; J_{G6a/G6b} = 10,8

¹³C-NMR δ_C (125 MHz, DMSO-D₆): 29,08; 65,16; 66,71 (3C, S1-S3); 61,11 (1C, G6); 66,71 (1C, CH₂); 69,99; 73,38; 76,60; 76,81 (4C, G2-G5); 102,78 (1C, G1); 113,76 (1C, 5); 127,87-

128,28 (5C, Bn2-Bn6); 136,65 (1C, Bn1); 140,13 (1C, 8); 154,26 (1C, 4); 159,53 (1C, 6); 159,95 (1C, 2)

4-(8-Aza-*O*⁶-benzylguan-9-yl-)-butyl-**b**-D-glucosid (**38**)

22 mg [0,033mmol] 4-(8-Aza-*O*⁶-benzylguan-9-yl-)-butyl-tetra-*O*-acetyl-**b**-D-glucosid (**25**) werden gemäß der Standardvorschrift umgesetzt und mittels Flash-Chromatographie gereinigt (SiO₂, Chloroform / Methanol 7 : 1).

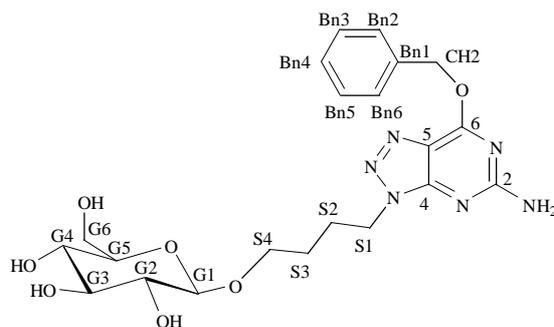
Ausbeute: 14,3 mg (91 %)

DC: R_f (SiO₂, Chloroform / Methanol, 10 : 1): 0,16

HPLC: (MethodeXIII) 9,15 min

MS (ESI): m/z (%) 477,0 (100) [M+H]⁺, 499,0 (40) [M+Na]⁺, 953,3 (15) [2M+H]⁺, 975,3 (20) [2M+Na]⁺

C₂₁H₂₈BrN₆O₇ 476,5



¹H-NMR δ_H (500 MHz, DMSO-d₆): 1,53; 1,94 (2m, 4H, S2, S3); 2,95 (dd, 1H, G2); 3,06 (dd, 1H, G4); 3,09 (ddd, 1H, G5); 3,15 (dd, 1H, G3); 3,47 (m, 1H, S4a); 3,47 (dd, 1H, G6a); 3,66 (dd, 1H, G6b); 3,80 (m, 1H, S4b); 4,11 (d, 1H, G1); 4,41 (m, 3H, S1, OH); 4,83; 4,91 (3d, 3H, OH); 5,58 (d, 2H, CH₂); 7,11 (s, 2H, NH₂); 7,36-7,44 (m, 3H, Bn2, Bn4, Bn6); 7,54-7,56 (m, 2H, Bn3, Bn5); J_{S2a/s2b} = 6,5; J_{1/2} = 7,8; J_{2/3} = 9,1; J_{3/4} = 8,7; J_{4/5} = 9,1; J_{G6a/G5} = 2,0; J_{G6b/G5} = 5,0; J_{G6a/G6b} = 11,6

¹³C-NMR δ_C (125 MHz, DMSO-d₆): 25,57; 26,26 (2C, S2, S3); 45,37 (1C, S1); 67,07 (1C, S4); 61,71 (1C, G6); 67,75 (1C, CH₂); 70,07; 73,37; 76,68; 76,74 (4C, G2-G5); 102,74 (1C, G1); 120,37 (1C, 5); 128,25-128,62 (5C, Bn2-Bn6); 135,77 (1C, Bn1); 153,05 (1C, 4); 160,67 (1C, 6); 162,06 (1C, 2)

6.2.2. PARP-Inhibitor-Glucoside

Standardvorschrift:

Die Edukte werden in 5 ml absolutem DMF gelöst und mit Molsieb (gepulvert 4Å) unter Argon 12 h gerührt. Es werden 138 mg [10 mmol] wasserfreies Kaliumcarbonat (bei 180°C getrocknet und fein gemörsert) zugesetzt, die Temperatur auf 80 °C erhöht und für 48 h gerührt. Es wird auf Raumtemperatur abgekühlt, mit Dowex (H⁺ 50WX2) Ionenaustauscherharz neutralisiert, filtriert und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt.

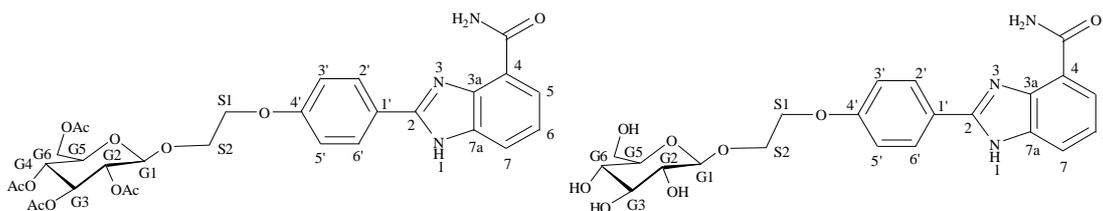
Das Reaktionsgemisch wird in 5 ml Methanol aufgenommen und mit 1 ml 0,1 N Natriummethanolatlösung versetzt. Nach vollständiger Reaktion (DC-Kontrolle) wird mit Dowex (H⁺ 50WX2) Ionenaustauscherharz neutralisiert, abfiltriert und der Methanol am Rotationsverdampfer entfernt. Die Aufreinigung erfolgt wie im einzelnen angegeben.

*2-[(1''-H-benzimidazol-4''-carboxamidyl)-4'-phenyl]-oxoethyl-tetra-O-acetyl-**b**-D-glucosid (54)*

*2-[(1''-H-benzimidazol-4''-carboxamidyl)-4'-phenyl]-oxoethyl-**b**-D-glucosid (56)*

45,5 mg [0,1 mmol] 1-(2-Bromoethyl)-2,3,4,6-tetra-O-acetyl-β-D-glucopyranosid und 29 mg [0,1 mmol] 2-(4'-Hydroxyphenyl)-1-H-benzimidazol-4-carbonsäureamid x HCl werden gemäß der Standardvorschrift umgesetzt. Die Aufreinigung erfolgt mittels Flash-Chromatographie (Chloroform / Methanol, 5 : 1) und anschließender präparativer HPLC (Methode XIX).

Ausbeute:	16 mg (34,8 %)
DC:	Rf (SiO ₂ , Dichlormethan / Methanol, 20 : 1): 0,11 (54) Rf (SiO ₂ , Dichlormethan / Methanol, 5 : 1): 0,11 (56)
HPLC:	(Methode XVII) 4,46 min (54) (Methode XVIII) 4,61 (54) (Methode XVIII) 11,78 min (56) (Methode XIX) 35,28 min (56)
MS (ESI):	54 : m/z (%) 628,3 (100) [M+H] ⁺ , 650,3 (20) [M+H] ⁺ 56 : m/z (%) 459,9 (100) [M+H] ⁺ , 481,9 (70) [M+Na] ⁺
C ₃₀ H ₃₂ O ₁₂ N ₃	M _r = 627,6 (54)
C ₂₂ H ₂₅ O ₈ N ₃	M _r = 459,4 (56)



54: $^1\text{H-NMR}$ δ_{H} (250 MHz, CD_3OD): 3,20 (dd, 1H, G2); 3,27 (m, 2H, G4, G5); 3,36 (dd, 1H, G3); 3,65 (ddd, 1H, S2a); 3,66 (dd, 1H, G6a); 3,84 (dd, 1H, G6b); 3,94 (ddd, 1H, S2b); 4,36 (d, 1H, G1); 7,06 (d, 2H, 3', 5'); 7,26 (dd, 1H, 6); 7,67; 7,89 (2d, 2H, 5,7); 8,05 (d, 2H, 2'; 6'); $J_{\text{G1/G2}} = 7,7$; $J_{\text{G2/G3}} = 8,8$; $J_{\text{G3/G4}} = 8,8$; $J_{\text{G6a/G5}} = 1,6$; $J_{\text{G6b/G5}} = 5,4$; $J_{\text{G6a/G6b}} = 11,9$; $J_{2'/3'} = 8,7$; $J_{5'/6'} = 8,7$; $J_{5/6} = 7,7$; $J_{7/6} = 7,7$

56: $^{13}\text{C-NMR}$ δ_{C} (63 MHz, CD_3OD): 62,76; 69,05 (2C, S1, S2); 68,83 (1C, G6); 71,63; 75,10; 78,06 (4C, G2-G5); 104,68 (1C, G1); 116,14 (2C, 3', 5'); 121,38, 122,09; 122,35 (3C, 2, 4; 1'); 123,07; 124,20 (3C, 5, 6, 7); 129,67 (2C, 2', 6'); 154,18 (1C, 4'); 162,33 (2C, 3a, 3b)

*4-[(1''-H-benzimidazol-4''-carboxamidyl)-4'-phenyl]-oxobutyl-tetra-O-acetyl-**b**-D-glucosid (55)*

*4-[(1''-H-benzimidazol-4''-carboxamidyl)-4'-phenyl]-oxobutyl-**b**-D-glucosid (57)*

96,6 mg [0,2 mmol] 1-(4-Bromobutyl)-2,3,4,6-tetra-O-acetyl- β -D-glucopyranosid und 58mg [0,2 mmol] 2-(4'-Hydroxyphenyl)-1-H-benzimidazol-4-carbonsäureamid x HCl werden gemäß der Standardvorschrift umgesetzt. Die Aufreinigung erfolgt mittels Flash-Chromatographie (Chloroform / Methanol, 10 : 1; 8 : 1) und anschließender präparativer HPLC (Methode XIX).

Ausbeute: 28,4 mg (29,2 %)

DC: R_f (SiO₂, Dichlormethan / Methanol, 20 : 1): 0,17 (**55**)

R_f (SiO₂, Dichlormethan/Methanol, 5 : 1): 0,26 (**57**)

HPLC: (Methode XVIII) 11,54 min (**57**)

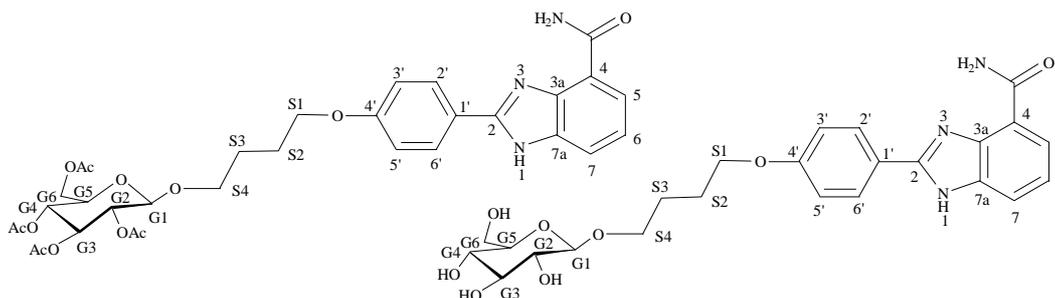
(Methode XIX) 32,86

MS (ESI): **55:** m/z (%) 678,2 (20) $[\text{M}+\text{H}]^+$, 694,1 (30) $[\text{M}+\text{Na}]^+$

57: m/z (%) 488,0 (60) $[\text{M}+\text{H}]^+$, 510,0 (50) $[\text{M}+\text{Na}]^+$; 975,4 (5) $[2\text{M}+\text{H}]^+$

$\text{C}_{32}\text{H}_{37}\text{O}_{12}\text{N}_3$ $M_r = 655,6$ (**55**)

$\text{C}_{24}\text{H}_{29}\text{O}_8\text{N}_3$ $M_r = 487,4$ (**57**)



55: $^1\text{H-NMR}$ δ_{H} (250 MHz, CD_3OD): 1,78-1,93 (m, 4H, S2, S3); 3,18 (dd, 1H, G2); 3,27 (m, 2H, G4, G5); 3,35 (dd, 1H, G3); 3,59 (m, 1H, S4a); 3,66 (dd, 1H, G6a); 3,86 (dd, 1H, G6b); 3,96 (m, 1H, S4b); 4,27 (d, 1H, G1); 7,02 (d, 2H, 3', 5'); 7,27 (dd, 1H, 6); 7,65; 7,85 (2d, 2H, 5, 7); 8,05 (d, 2H, 2'; 6'); $J_{\text{G1/G2}} = 7,7$; $J_{\text{G2/G3}} = 8,5$; $J_{\text{G3/G4}} = 9,2$; $J_{\text{G6a/G5}} = 1,8$; $J_{\text{G6b/G5}} = 4,8$; $J_{\text{G6a/G6b}} = 11,6$; $J_{2'/3'} = 8,8$; $J_{5'/6'} = 8,8$; $J_{5/6} = 7,8$; $J_{7/6} = 7,8$

57: $^{13}\text{C-NMR}$ δ_{C} (63 MHz, CD_3OD): 26,99; 27,33 (2C, S2, S3); 62,82; 70,33 (2C, S1, S4); 69,01 (1C, G6); 71,71; 75,16; 77,95; 78,17 (4C, G2-G5); 104,38 (1C, G1); 115,99 (2C, 3', 5'); 121,94; 122,92 (3C, 2, 4, 1'); 123,00; 124,05 (3C, 5, 6, 7); 129,64 (2C, 2', 6'); 154,30 (1C, 4'); 162,64 (2C, 3a, 3b); 170,95 (1C, CONH_2)

6.2.3. SWITCH-Inhibitor-Glucoside

Standardvorschrift:

Das Isochinolin-Derivates (**A**) und das Bromoalkylglucosids (**B**) werden in jeweils 10 ml / 1 mmol trockenem DMF (mit Molsieb 4Å) unter Argon gelöst und 12 h gerührt.

Zu **A** werden vorsichtig 1 eq. Natriumhydrid gegeben *, und nach 30 min über ein Septum **B** zugefügt. Es wird 5 h bei 65°C gerührt und der Reaktionsverlauf per DC kontrolliert.

Nachdem kein Bromoalkylglucosid mehr detektiert werden kann werden nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur 5 ml / 0,1 eq. 0,25 M Phosphat-Puffer (pH 7,0) zugegeben und 15 min gerührt. Das Reaktionsgemisch wird filtriert, am Rotationsverdampfer bis zur vollständigen Trockne vom DMF befreit und der Rückstand mit Dichlormethan aufgenommen.

Die Aufreinigung erfolgt mittels Flash-Chromatographie nach den im einzelnen angegebenen Bedingungen.

* Wird die an Silikonöl gebundenen Handelsware verwendet, wird der maximale Gehalt der angegebenen Grenzen als Berechnungsgrundlage angenommen, z.B. Sigma-Aldrich: 55 - 65 % Gehalt, Berechnung mit 65 % bezogen auf das Isochinolin-Derivat.

2-[2'-(*N*-Methyl-*N'*-(4,4-dimethyl-1,2,3,4-tetrahydro-1,3-dioxo-7-isochinolinyl)-harnstoff)]-ethyl-tetra-*O*-acetyl-1-**b**-*D*-glucosid (**46**)

391 mg [1,5 mmol] *N*-Methyl-*N'*-(4,4-dimethyl-1,2,3,4-tetrahydro-1,3-dioxo-7-isochinolinyl)-harnstoff und 455 mg [1 mmol] 1-(2-Bromoethyl)-2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- β -*D*-glucopyranosid werden gemäß der Standardvorschrift umgesetzt und mittels Flash-Chromatographie gereinigt (SiO₂, Petrolether / Aceton, 5 : 3).

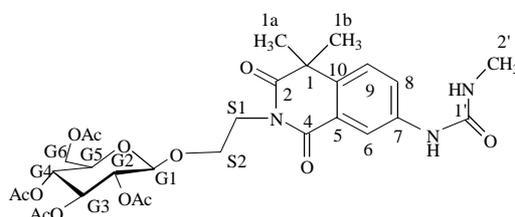
Ausbeute: 520 mg (82 %)

DC: R_f(SiO₂, Petrolether / Aceton, 2 : 1): 0,24

HPLC: (Methode XIV) 3,62 min

MS (ESI): m/z (%) 658,2 (40) [M+Na]⁺, 1293,6 (30) [2M+Na]⁺

C₂₉H₃₇O₁₃N₃ 635,6



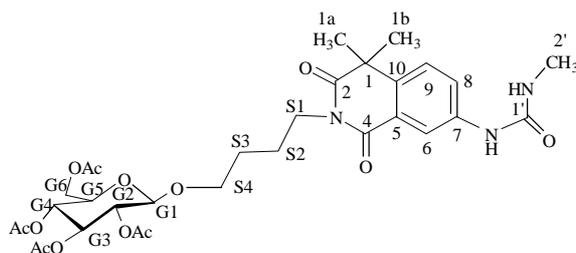
¹H-NMR δ_{H} (250 MHz, CDCl₃): 1,60 (s, 6H, 1a, 1b); 1,74; 1,94; 2,00; 2,05 (4s, 12H, 4 Acetyl-CH₃); 2,87 (s, 3H, 2'); 3,70; 4,20 (2m, 7H, G5, G6a, G6b, S1, S2); 4,48 (d, 1H, G1); 4,92 (dd, 1H, G2); 5,03 (dd, 1H, G4); 5,15 (dd, 1H, G3); 7,39 (d, 1H, 9); 7,84 (d, 1H, 8); 8,31 (dd, 1H, 6); J_{G1/G2} = 7,9; J_{G2/G3} = 9,4; J_{G3/G4} = 9,4; J_{G4/G5} = 9,4; J_{6/8} = 2,2; J_{8/9} = 8,6

¹³C-NMR δ_{C} (63 MHz, CDCl₃): 20,20; 20,45; 20,50; 20,61 (4C, Acetyl-CH₃); 26,70 (1C, 2'); 28,64; 29,78 (2C, 1a, 1b); 39,36 (1C, S1); 43,16 (1C, 1); 61,72 (1C, G6); 66,82 (1C, S2); 68,25; 70,98; 71,81; 72,68 (4C, G2-G5); 100,66 (1C, G1); 117,69 (1C, 6); 123,58 (1C, 7); 125,36 (1C, 8); 126,15 (1C, 9); 139,58; 138,18 (2C, 5, 10); 156,32 (1C, 1'); 164,26 (1C, 4); 170,60; 170,04; 169,32 (4C, Acetyl-C=O); 177,28 (1C, 2)

4-[2'-(*N*-Methyl-*N'*-(4,4-dimethyl-1,2,3,4-tetrahydro-1,3-dioxo-7-isochinolinyl)-harnstoff)]-butyl-tetra-*O*-acetyl-1-**b**-*D*-glucosid (**47**)

26 mg [0,1 mmol] *N*-Methyl-*N'*-(4,4-dimethyl-1,2,3,4-tetrahydro-1,3-dioxo-7-isochinolinyl)-harnstoff und 96 mg [0,2 mmol] 1-(4-Bromobutyl)-2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- β -*D*-glucopyranosid werden gemäß der Standardvorschrift umgesetzt, jedoch direkt in Schritt 2, zur Abspaltung der Schutzgruppen überführt.

C₃₁H₄₁N₃O₁₃ M_r = 636,7



2-[2'-(*N*-Phenyl-*N'*-(4,4-dimethyl-1,2,3,4-tetrahydro-1,3-dioxo-7-isochinolinyl)-harnstoff)]-ethyl-tetra-*O*-acetyl-1-*b*-*D*-glucosid (**48**)

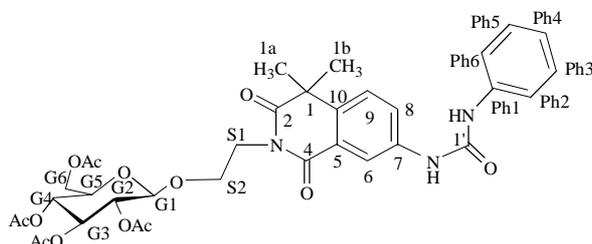
646 mg [2 mmol] *N*-Phenyl-*N'*-(4,4-dimethyl-1,2,3,4-tetrahydro-1,3-dioxo-7-isochinolinyl)-harnstoff und 455 mg [1 mmol] 1-(2-Bromoethyl)-2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- β -*D*-glucopyranosid werden gemäß der Standardvorschrift umgesetzt und mittels Flash-Chromatographie gereinigt (SiO₂; Petrolether / Aceton, 2 : 1)

Ausbeute: 492 mg (71 %)

DC: R_f(SiO₂, Petrolether / Aceton, 2 : 1): 0,09

MS (ESI): m/z (%) 696,2 (70) [M-H]⁻, 732,3 (80) [M+Cl]⁻, 1393,8 (15) [2M-H]⁻, 1429,9 (20) [2M+Cl]⁻

C₃₄H₃₉O₁₃N₃ 697,7



¹H-NMR δ_H (250 MHz, CDCl₃): 1,59 (s, 6H, 1a, 1b); 1,87; 1,96; 2,00; 2,05 (4s, 12H, 4 Acetyl-CH₃); 3,72; 3,93; 4,18 (3m, 7H, G5, G6a, G6b, S1, S2); 4,51 (d, 1H, G1); 4,93 (dd, 1H, G2); 5,02 (dd, 1H, G4); 5,16 (dd, 1H, G3); 7,03-7,46 (m, 6H, Ph2-Ph6, 9); 7,83 (d, 1H, 8); 8,11 (dd, 1H, 6); J_{G1/G2} = 7,8; J_{G2/G3} = 9,4; J_{G3/G4} = 9,4; J_{G4/G5} = 9,7; J_{6/8} = 2,4; J_{8/9} = 8,6

¹³C-NMR δ_C (63 MHz, CDCl₃): 20,47; 20,56; 20,70 (4C, CH₃); 28,87; 29,55 (2C, 1a, 1b); 39,39 (1C, S1); 43,16 (1C, 1); 61,96 (1C, G6); 66,32 (1C, S2); 68,39; 71,18; 71,80; 72,87 (4C, G2-G5); 100,57 (1C, G1); 118,88 (1C, 6); 121,32; 129,34 (5C, Ph2-Ph6); 124,44 (1C, 7); 126,13 (1C, 8); 126,23 (1C, 9); 137,86 (1C, Ph1); 138,12; 139,60 (2C, 5, 10); 153,03 (1C, 1'); 163,90 (1C, 4); 169,38; 170,20; 170,76 (4C, Acetyl-C=O); 177,03 (1C, 2)

2-[2'-(*N*-**a**-Naphthyl-*N'*-(4,4-dimethyl-1,2,3,4-tetrahydro-1,3-dioxo-7-isoquinoliny)-harnstoff)]-ethyl-tetra-*O*-acetyl-1-**b**-*D*-glucosid (**49**)

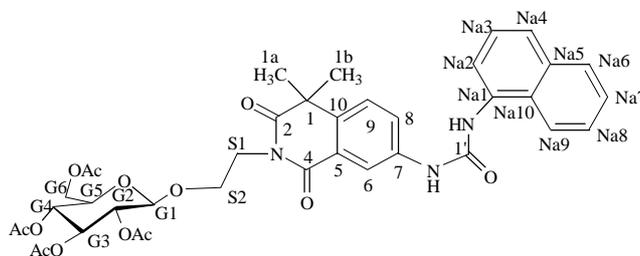
522 mg [1,4 mmol] *N*-Naphthyl-*N'*-(4,4-dimethyl-1,2,3,4-tetrahydro-1,3-dioxo-7-isoquinoliny)-harnstoff und 320 mg [0,7 mmol] 1-(2-Bromoethyl)-2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- β -*D*-glucopyranosid werden gemäß der Standardvorschrift umgesetzt und mittels Flash-Chromatographie gereinigt (SiO₂; Petrolether / Aceton, 2 : 1)

Ausbeute: 380 mg (73 %)

DC: R_f (SiO₂, Petrolether / Aceton, 2 : 1): 0,14

MS (ESI): m/z (%) 748,2 (20) [M+Na]⁺, 765,2 (30) [M+H]⁺, 770,2 (100) [M+Na]⁺, 1517,6 (60) [2M+Na]⁺

C₃₈H₄₁O₁₃N₃ 747,7



¹H-NMR δ_{H} (250 MHz, CDCl₃): 1,56 (s, 6H, 1a, 1b); 1,87; 1,96; 2,00; 2,04 (4s, 12H, 4 Acetyl-CH₃); 3,70; 4,15 (2m, 7H, G5, G6a, G6b, S1, S2); 4,49 (d, 1H, G1); 4,90 (dd, 1H, G2); 4,99 (dd, 1H, G4); 5,14 (dd, 1H, G3); 7,33 (d, 1H, 9); 7,79 (d, 1H, 8); 7,40-8,05 (m, 6H, Na2-Na9); 8,14 (dd, 1H, 6); J_{G1/G2} = 7,9; J_{G2/G3} = 9,5; J_{G3/G4} = 9,6; J_{G4/G5} = 9,3; J_{6/8} = 2,4; J_{8/9} = 8,6

¹³C-NMR δ_{C} (63 MHz, CDCl₃): 20,47; 20,56; 20,69 (4C, Acetyl-CH₃); 28,87; 29,55 (2C, 1a, 1b); 39,34 (1C, S1); 43,24 (1C, 1); 61,97 (1C, G6); 66,28 (1C, S2); 68,41; 71,18; 71,77; 72,91 (4C, G2-G5); 100,53 (1C, G1); 118,42 (1C, 6); 121,54; 121,84; 123,92; 125,68; 125,85; 126,03; 126,08; 126,20; 126,42; 128,51; 128,61 (9C, Na2-Na6); 124,44 (1C; 7); 126,13 (1C, 8); 126,23 (1C, 9); 137,86 (1C, Na1); 138,12; 139,60 (2C, 5, 10); 153,03 (1C, 1'); 163,90 (1C, 4); 169,38; 170,20; 170,76 (4C, Acetyl-C=O); 177,03 (1C, 2)

Standardvorschrift zur Abspaltung der Schutzgruppen:

Zur Abspaltung der Acetyl-Schutzgruppen wird 1 eq. der Glucoside **46** bis **50** in Methanol (1 ml / 0,5 mmol) gelöst und 0,1 eq frsich hergestellte 0,1 M Natriummethanolat-Lösung zugesetzt. Unter DC-Kontrolle wird so lange gerührt, bis kein Edukt mehr detektiert werden kann. Das Gemisch wird anschließend mit Dowex (H⁺ 50WX2) Ionenaustauscherharz

neutralisiert, filtriert und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Die Produkte werden mittels Flash-Chromatographie gereinigt.

2-[2'-(*N*-Methyl-*N'*-(4,4-dimethyl-1,2,3,4-tetrahydro-1,3-dioxo-7-isoquinoliny)-harnstoff)]-ethyl-1-**b**-*D*-glucosid (**50**)

520 mg [0,8 mmol] 2-[2'-(*N*-Methyl-*N'*-(4,4-dimethyl-1,2,3,4-tetrahydro-1,3-dioxo-7-isoquinoliny)-harnstoff)]-ethyl-tetra-*O*-acetyl-1- β -*D*-glucosid (**46**) werden gemäß der Standardvorschrift umgesetzt und mittels Flash-Chromatographie (SiO₂, Chloroform / Methanol, 10 : 1) gereinigt.

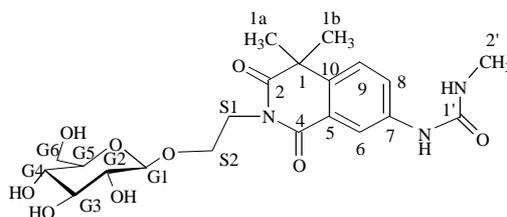
Ausbeute: 380 mg (98 %)

DC: R_f (SiO₂, Chloroform / Methanol, 10 / 1): 0,05

HPLC: (Methode XV) 9,03 min

ESI: m/z (%) 468,1(10) [M+H]⁺; 490,1(100) [M+Na]⁺; 935,4(5) [2M+H]⁺; 957,4(65) [2M+Na]⁺

C₂₁H₂₉N₃O₉ M_r = 467,5



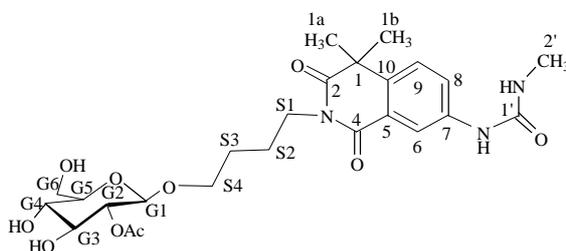
¹H-NMR δ_H (500 MHz, CD₃OD): 1,60; 1,61 (2s, 6H, 1a, 1b); 2,77 (s, 3H, 2'); 3,12 (dd, 1H, G2); 3,23 (dd, 1H, G4); 3,24 (ddd, 1H, G5); 3,30 (dd, 1H, G3); 3,59; 3,80 (2dd, 4H, G6a, G6b); 3,79; 4,00 (2m, 2H, S2); 4,18; 4,29 (2m, 2H, S1); 4,28 (d, 1H, G1); 7,48 (d, 1H, 9); 7,76 (d, 1H, 8); 8,10 (dd, 1H, 6); J_{G1/G2} = 7,7; J_{G2/G3} = 9,2; J_{G3/G4} = 9,4; J_{G4/G5} = 9,3; J_{6/8} = 2,4; J_{8/9} = 8,6

¹³C-NMR δ_C (125 MHz, CD₃OD): 26,83 (1C, 2'); 29,44; 29,78 (2C, 1a, 1b); 40,90 (1C, S1); 44,37 (1C, 1); 62,81 (1C, G6); 67,47 (1C, S2); 71,63 (1C, G4); 75,03 (1C, G2); 77,94 (2C, G3, G5); 104,53 (1C, G1); 118,83 (1C, 6); 125,26 (1C, 7); 126,18 (1C, 8); 127,25 (1C, 9); 140,02; 140,61 (2C, 5, 10); 158,75 (1C, 1'); 165,74 (1C, 4); 179,30 (1C, 2)

4-[2'-(*N*-Methyl-*N'*-(4,4-dimethyl-1,2,3,4-tetrahydro-1,3-dioxo-7-isoquinoliny)-harnstoff)]-butyl-1-**b**-*D*-glucosid (**51**)

Das Reaktionsgemisch aus Schritt 1 wird gemäß der Standardvorschrift umgesetzt und das Produkt mittels Flash-Chromatographie (SiO₂, Dichlormethan / Methanol, 10 : 1, 9 : 1, 8 : 1) gereinigt.

Ausbeute:	29,6 mg (59,8%)
DC:	R _f (SiO ₂ , Dichlormethan / Methanol, 10 : 1): 0,40
HPLC:	(Methode XV) 6,65 min
MS (ESI):	m/z (%) 496,1 (100) [M+H] ⁺ , 518,2 (20) [M+Na] ⁺ , 991,6 (80) [2M+H] ⁺ , 1013,5 (10) [2M+Na] ⁺
C ₂₃ H ₃₃ O ₉ N ₃	495,5



¹H-NMR δ_H (250 MHz, CD₃OD): 1,64 (2s, 6H, 1a, 1b); 1,76 (m, 4H, S2, S3); 2,84 (s, 3H, 2'); 3,30; 3,70; 3,95 (3m, 9H, G3-G6; S1; S4); 4,31 (d, 1H, G1); 7,55 (d, 1H, 9); 7,82 (d, 1H, 8); 8,17 (dd, 1H, 6); J_{G1/G2} = 7,7; J_{G2/G3} = 8,8; J_{6/8} = 2,4; J_{8/9} = 8,6

¹³C-NMR δ_C (63 MHz, CD₃OD): 25,84; 28,28 (2C, S2, S3); 26,96 (1C, 2'); 29,77 (2C, 1a, 1b); 41,27 (1C, S1); 44,37 (1C, 1); 62,95 (1C, G6); 70,46 (1C, S4); 71,82 (1C, G4); 75,29 (1C, G2); 78,06; 78,24 (2C, G3, G5); 104,53 (1C, G1); 118,94 (1C, 6); 125,47 (1C, 7); 126,24 (1C, 8); 127,40 (1C, 9); 140,13; 140,80 (2C, 5, 10); 158,91 (1C, 1'); 165,69 (1C, 4); 179,19 (1C, 2)

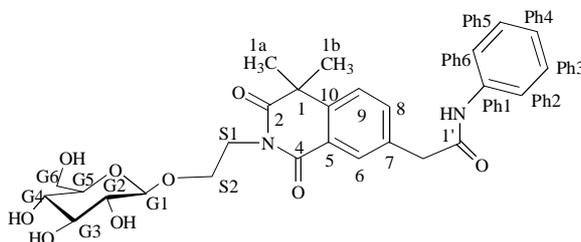
2-[2'-(N-Phenyl-N'-(4,4-dimethyl-1,2,3,4-tetrahydro-1,3-dioxo-7-isochinolinylnyl)-harnstoff)]-ethyl-1-**b**-D-glucosid (**52**)

492 mg [0,7 mmol] 2-[2'-(N-Phenyl-N'-(4,4-dimethyl-1,2,3,4-tetrahydro-1,3-dioxo-7-isochinolinylnyl)-harnstoff)]-ethyl-tetra-O-acetyl-1-β-D-glucosid (**48**) werden gemäß der Standardvorschrift umgesetzt und mittels Flashchromatographie (SiO₂, Chloroform / Methanol, 10 : 1) gereinigt.

Ausbeute:	350 mg (94 %)
DC:	R _f (SiO ₂ , Chloroform / Methanol, 10 / 1): 0,2
HPLC:	(Methode XVI) 17,45 min

ESI: m/z (%) 530,4 (30) [M+H]⁺; 552,3 (100) [M+Na]⁺; 1081,6 (20) [2M+Na]⁺

C₂₆H₃₁N₃O₉ M_r = 529,5



¹H-NMR δ_H (500 MHz, CD₃OD): 1,60; 1,61 (2s, 6H, 1a, 1b) ; 3,13 (dd, 1H,G2); 3,23 (dd, 1H,G4); 3,25 (ddd, 1H,G5); 3,30 (dd, 1H,G3); 3,58; 3,81 (2dd, 2H, G6a, G6b); 3,81; 4,02 (2m, 2H, S2); 4,19; 4,29 (2m, 2H, S1); 4,27 (d, 1H, G1); 7,02 (dd, 1H, Ph4); 7,28 (2dd, 2H, Ph3, Ph5); 7,42 (2d, 2H, Ph2, Ph6); 7,53 (d, 1H, 9); 7,83 (d, 1H, 8); 8,19 (dd, 1H, 6); J_{G1/G2} = 7,8; J_{G2/G3} = 9,2; J_{G3/G4} = 8,8; J_{6/8} = 2,4; J_{8/9} = 8,6

¹³C-NMR δ_C (63 MHz, CDCl₃): 29,44; 29,78 (2C, 1a, 1b); 40,94 (1C, S1); 47,80 (1C, 1); 62,83 (1C, G6); 67,47 (1C, S2); 71,66; 75,05; 77,98 (4C, G2-G5); 104,56 (1C, G1); 119,12 (1C, 6); 120,54; 129,89 (5C, Ph2-Ph6); 124,04 (1C; 7); 126,37 (1C, 8); 127,39 (1C, 9); 140,30 (1C, Ph1); 140,65; 140,96 (2C, 5, 10); 155,55 (1C, 1'); 166,28 (1C, 4); 179,54 (1C, 2)

2-[2'-(N-Naphthyl-N'-(4,4-dimethyl-1,2,3,4-tetrahydro-1,3-dioxo-7-isochinolinyl)-harnstoff)]-ethyl-1-**b**-D-glucosid (**53**)

380 mg [0,5 mmol] 2-[2'-(N-Naphthyl-N'-(4,4-dimethyl-1,2,3,4-tetrahydro-1,3-dioxo-7-isochinolinyl)-harnstoff)]-ethyl-tetra-O-acetyl-1-β-D-glucosid (**49**) werden gemäß der Standardvorschrift umgesetzt und mittels Flashchromatographie (SiO₂, Chloroform / Methanol, 10 : 1) gereinigt.

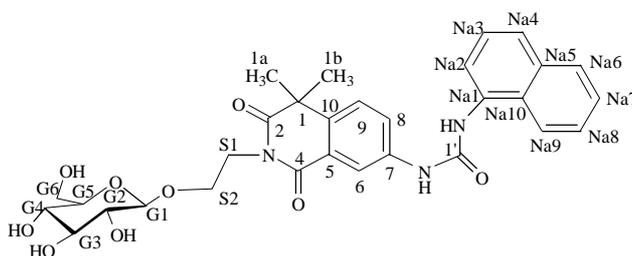
Ausbeute: 295 mg (99 %)

DC: R_f(SiO₂, Chloroform / Methanol, 10 / 1): 0,4

HPLC: (Methode) min

ESI: m/z (%) 602,1 (100) [M+Na]⁺; 1181,4 (100) [2M+Na]⁺

C₃₀H₃₃N₃O₉ M_r = 579,6

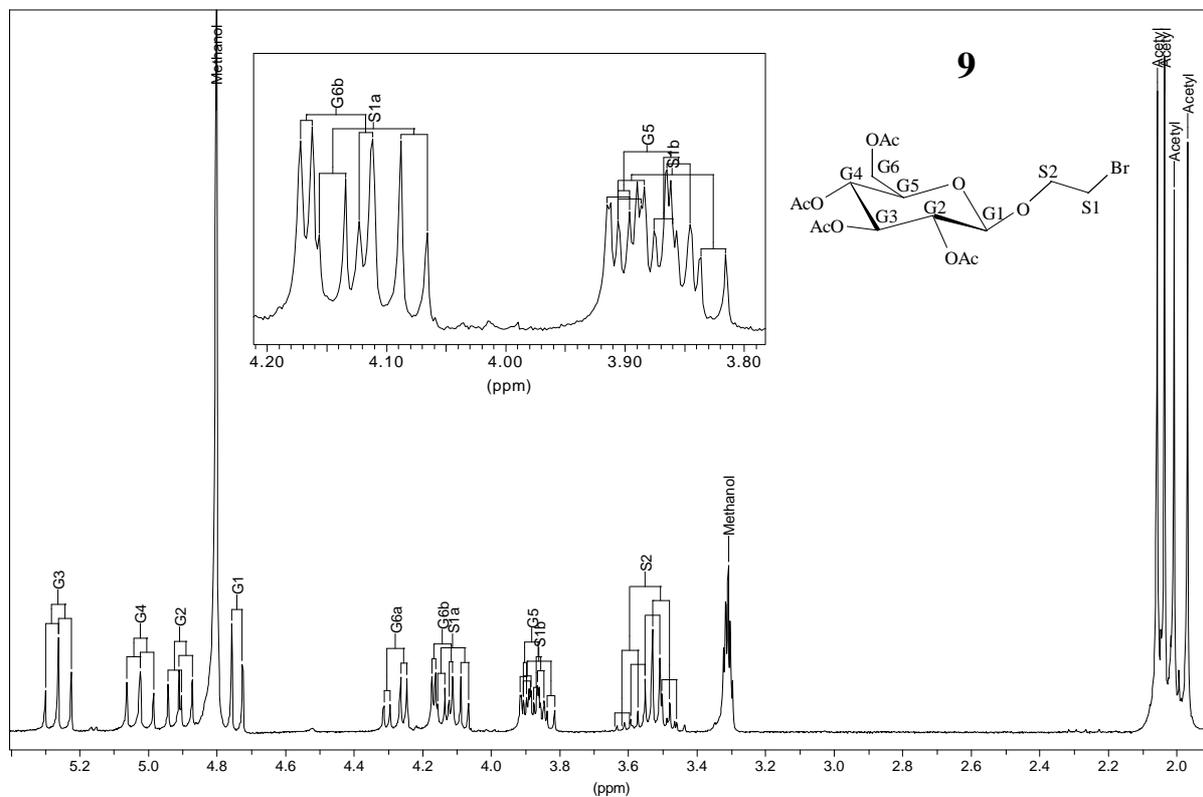


$^1\text{H-NMR}$ δ_{H} (500 MHz, CD_3OD): 1,60; 1,61 (s, 6H, 1a, 1b); 3,13 (dd, 1H,G2); 3,23 (dd, 1H,G4); 3,25 (ddd, 1H,G5); 3,33 (dd, 1H,G3); 3,59; 3,80 (2dd, 2H, G6a, G6b); 3,81; 4,02 (2m, 2H, S2); 4,20; 4,31 (2m, 2H, S1); 4,28 (d, 1H, G1); 7,54 (d, 1H, 9); 7,89 (d, 1H, 8); 7,47 (dd, 1H, Na3); 7,50 (dd, 1H, Na7); 7,54 (dd, 1H, Na8); 7,70 (d, 1H, Na4); 7,81 (d, 1H, Na2); 7,89 (d, 1H, Na6); 8,06 (d, 1H, Na9); 8,22 (dd, 1H, 6); $J_{\text{G1/G2}} = 7,8$; $J_{\text{G2/G3}} = 9,2$; $J_{\text{G3/G4}} = 8,8$; $J_{\text{G4/G5}} = 9,6$; $J_{6/8} = 2,5$; $J_{8/9} = 8,6$

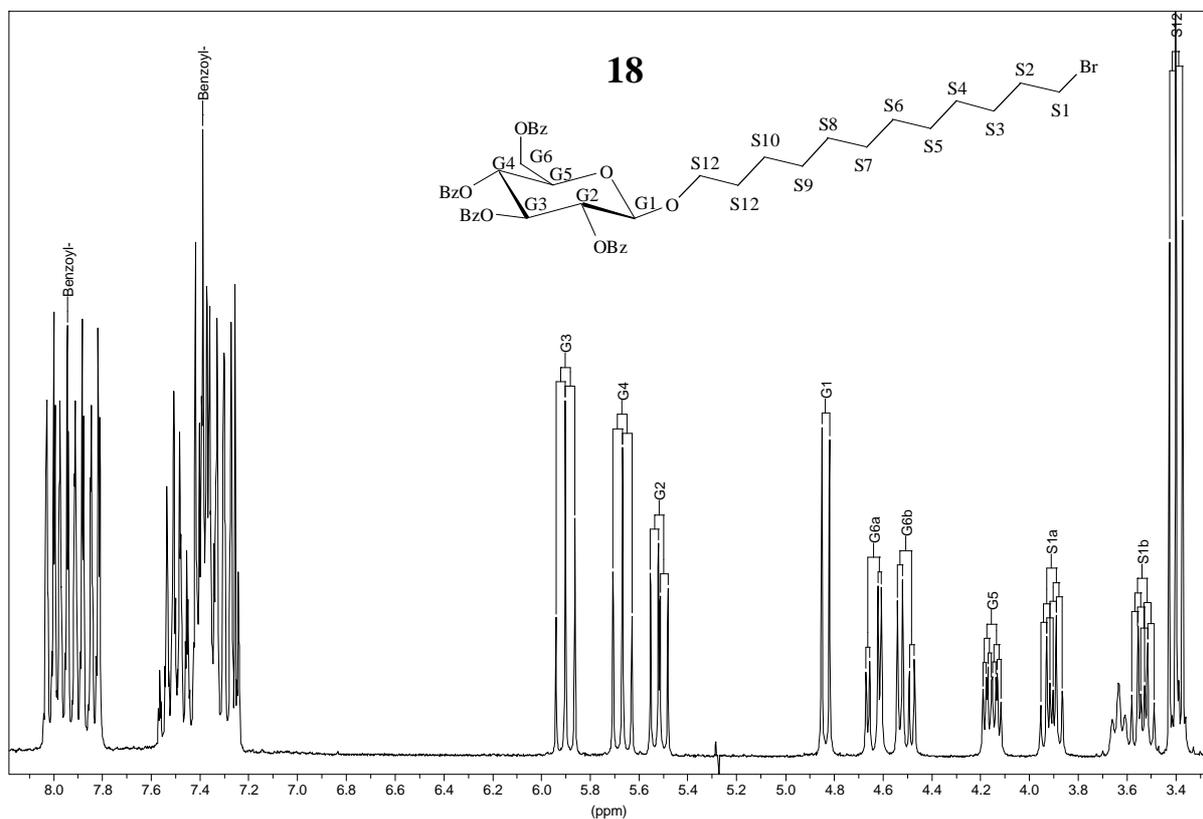
$^{13}\text{C-NMR}$ δ_{C} (125 MHz, CD_3OD): 20,47; 20,56; 20,69 (4C, Acetyl- CH_3); 28,87; 29,55 (2C, 1a, 1b); 39,34 (1C, S1); 43,24 (1C, 1); 61,97 (1C, G6); 66,28 (1C, S2); 68,41; 71,18; 71,77; 72,91 (4C, G2-G5); 100,53 (1C, G1); 118,42 (1C, 6); 121,54; 121,84; 123,92; 125,68; 125,85; 126,03; 126,08; 126,20; 126,42; 128,51; 128,61 (9C, Na2-Na6); 124,44 (1C; 7); 126,13 (1C, 8); 126,23 (1C, 9); 137,86 (1C, Na1); 138,12; 139,60 (2C, 5, 10); 153,03 (1C, 1'); 163,90 (1C, 4); 177,03 (1C, 2)

6.3. Ausgewählte NMR-Spektren

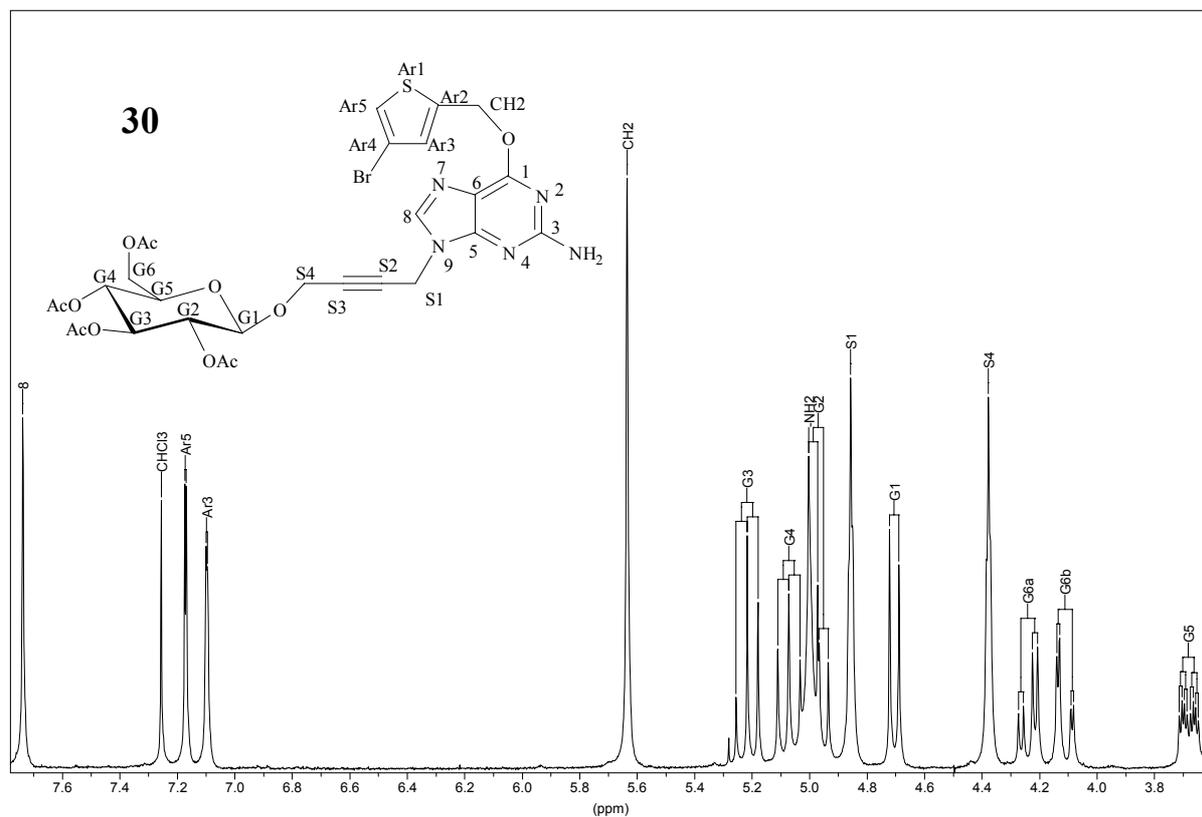
1-(2-Bromoethyl)-2,3,4,6-tetra-O-acetyl-*b*-D-glucopyranosid (**9**). $^1\text{H-NMR } \delta_{\text{H}}$ (250 MHz, CD_3OD)



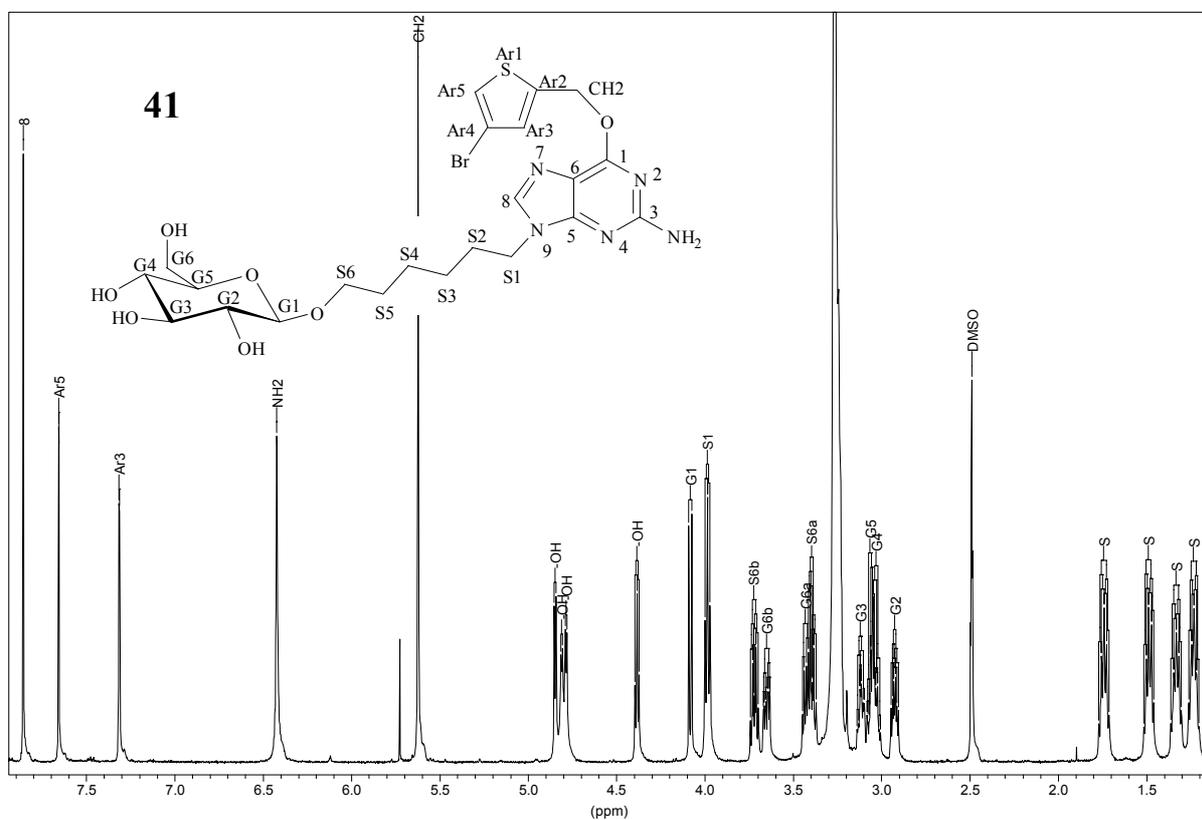
1-(12-Bromododecyl)-2,3,4,6-tetra-O-benzoyl-*b*-D-glucopyranosid (**18**). $^1\text{H-NMR } \delta_{\text{H}}$ (250 MHz, CDCl_3)



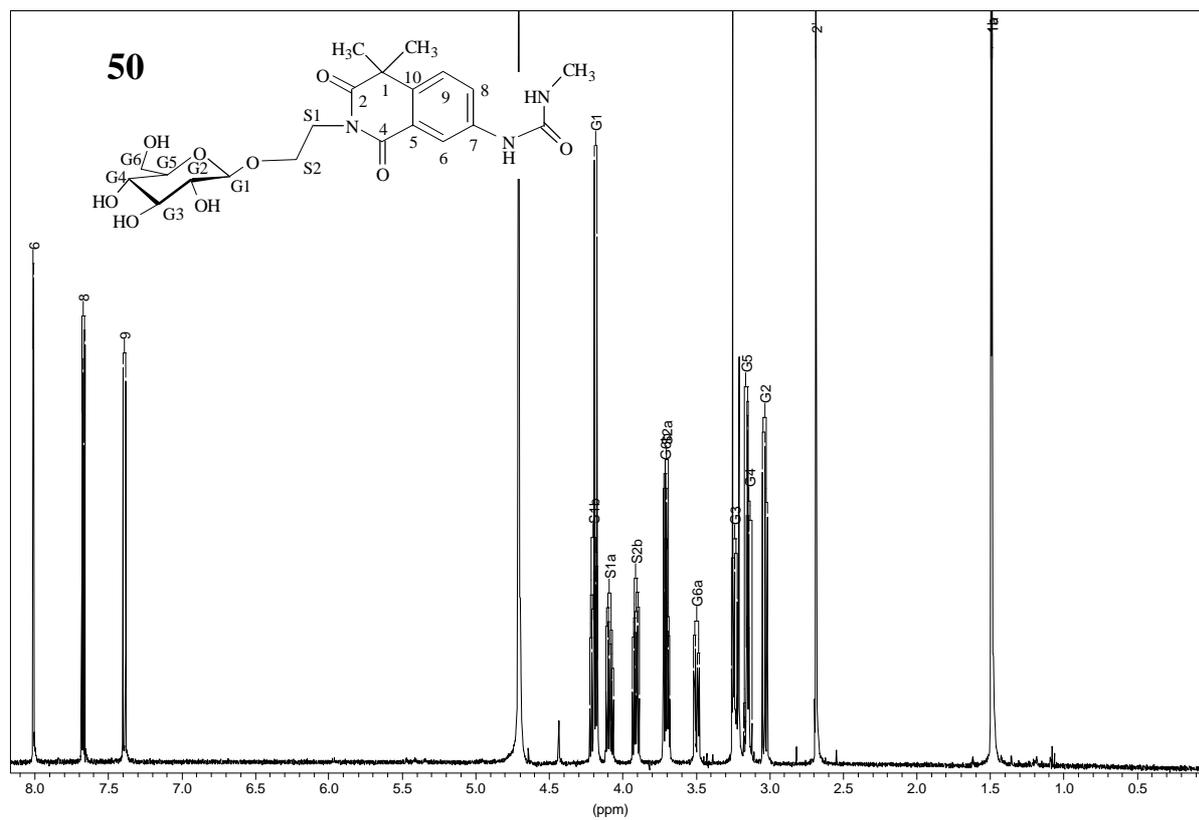
4-[O⁶-(4-Bromothienyl)-guan-9-yl]-but-2-ynyl-tetra-O-acetyl-β-D-glucosid (**25**). ¹H-NMR δ_H (250 MHz, CDCl₃)



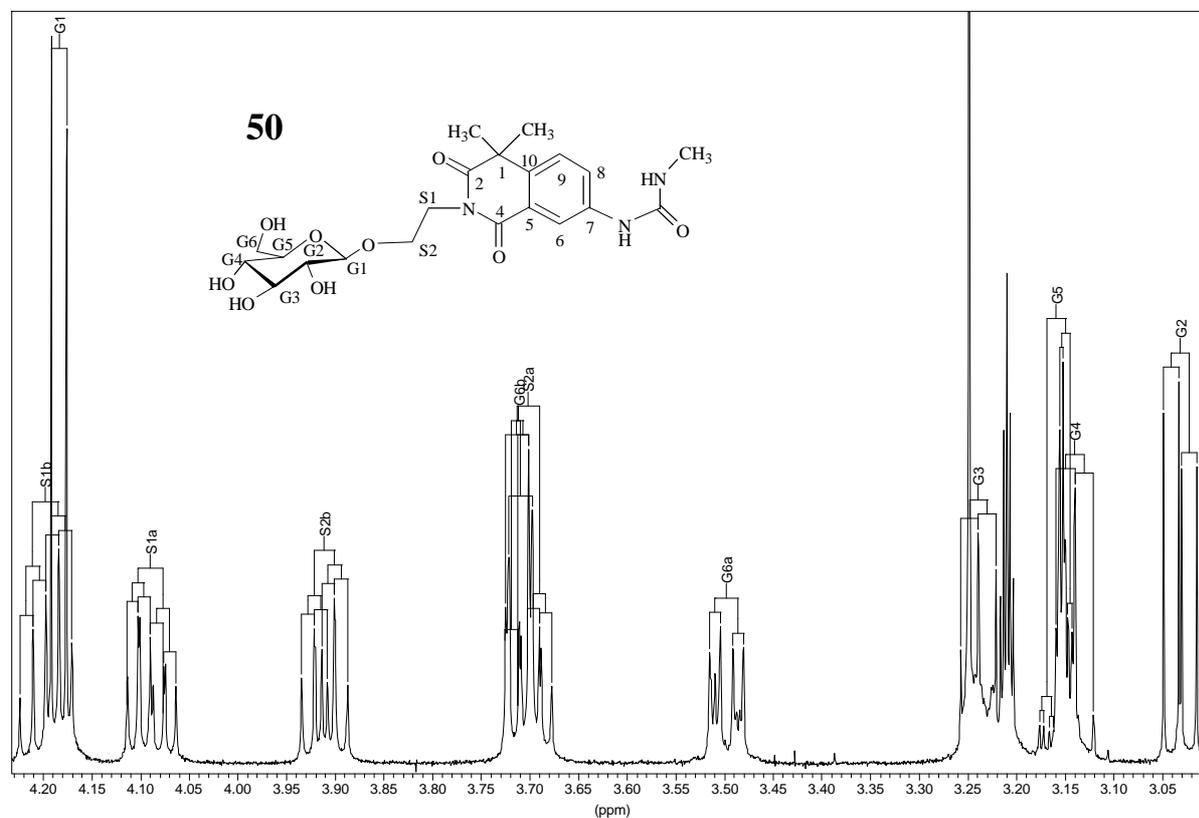
6-[O6-(4-Bromothienyl)-guan-9-yl]-hexyl-β-D-glucosid (**27**). ¹H-NMR δ_H (500 MHz, CD₃OD)



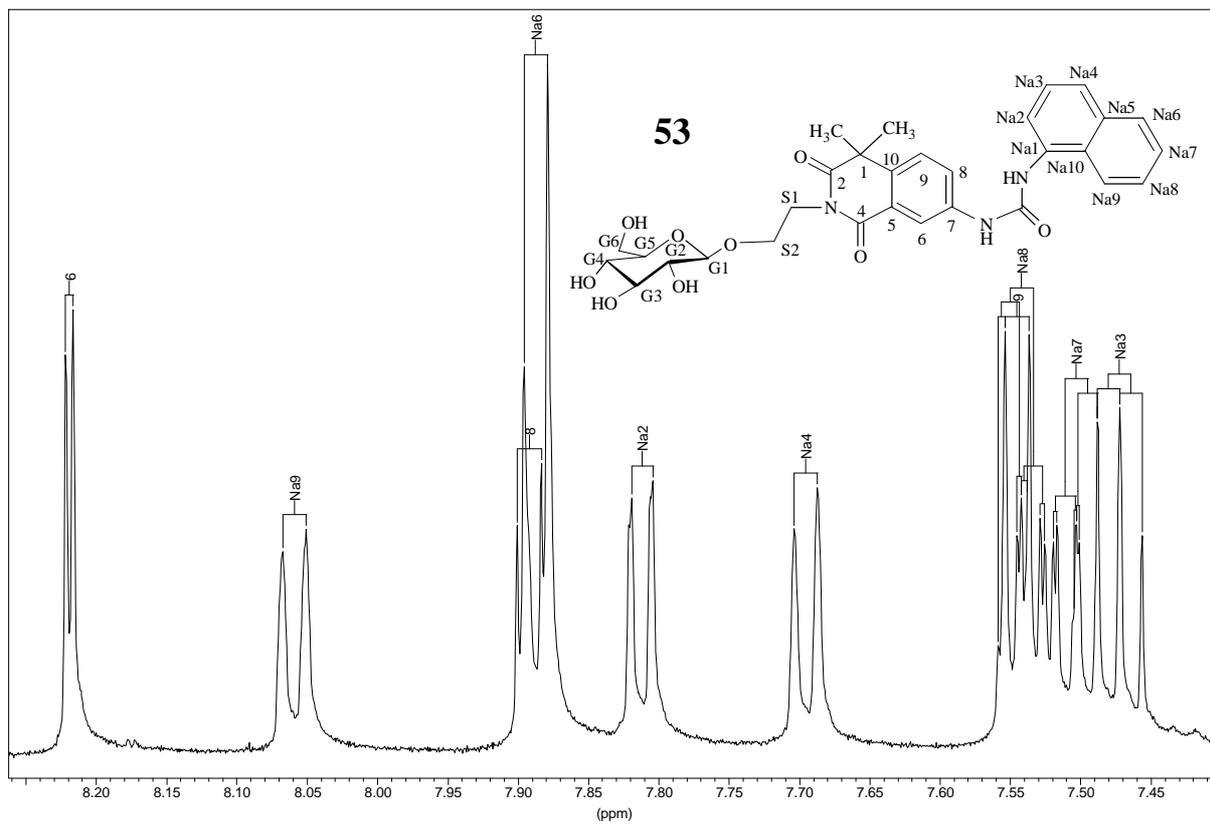
2-[2'-(N-Methyl-N'-(4,4-dimethyl-1,2,3,4-tetrahydro-1,3-dioxo-7-isochinoliny)-harnstoff)]-ethyl-1- β -D-glucosid (**50**). $^1\text{H-NMR}$ δ_{H} (500 MHz, CD_3OD)



2-[2'-(N-Methyl-N'-(4,4-dimethyl-1,2,3,4-tetrahydro-1,3-dioxo-7-isochinoliny)-harnstoff)]-ethyl-1- β -D-glucosid (**50**). $^1\text{H-NMR}$ δ_{H} (500 MHz, CD_3OD)



2-[2'-(N-Naphthyl-N'-(4,4-dimethyl-1,2,3,4-tetrahydro-1,3-dioxo-7-isochinoliny)-harnstoff)]-ethyl-1- β -D-glucosid (**53**). $^1\text{H-NMR}$ δ_{H} (500 MHz, CD_3OD)



6.4. Interaktionsanalysen der MGMT mit den MGMT-Inhibitor-Glucosiden

	LTHO	LLNK	LPU1	LPU2	Σ 1-4	SP1	GLU1	GLU2	GLU3	CLU4	GLU5	Σ 5-10	Σ 1-10
	(1)	(2)	(3)	(4)	(c)	(5)	(6)	(7)	(8)	(9)	(10)	(a)	(b)
TYR 114	0,0	0,0	0,0	-0,3	-0,3	-0,3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	-0,3	-0,6
ARG 128	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	-0,1	-0,2	-1,0	-1,4	-1,4
ALA 129	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
ALA 127	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
GLY 131	0,0	0,0	0,0	-0,1	-0,1	-0,1	-0,1	0,0	0,0	0,0	-0,3	-0,5	-0,6
GLY 132	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	-0,2	-0,2	-0,2
MET 134	0,0	0,0	0,0	-0,3	-0,4	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	-0,4
ARG 135	-0,1	-0,2	-1,0	-0,7	-2,0	-1,0	-0,6	-0,2	-0,1	-0,2	-0,5	-2,6	-4,7
GLY 136	0,0	0,0	0,0	-0,1	-0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	-0,1
VAL 139	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
PRO 138	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
ASN 137	-0,2	0,0	0,0	-0,1	-0,3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	-0,3
ILE 141	-0,2	0,0	0,0	0,0	-0,2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	-0,2
PRO 140	-0,7	0,0	0,0	0,0	-0,7	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	-0,7
CYS 145	-0,3	-0,2	0,0	-0,4	-0,9	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	-0,9
VAL 148	0,0	0,0	0,0	-0,2	-0,2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	-0,2
VAL 149	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
HIS 146	-0,5	-0,1	0,0	-0,1	-0,6	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	-0,6
CYS 150	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
TYR 158	-0,7	-0,8	-2,3	-1,1	-5,0	-0,4	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	-0,4	-5,4
SER 159	-0,9	-0,8	-0,1	-0,4	-2,3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	-2,3
ASN 157	0,0	0,0	-0,7	0,0	-0,7	-0,3	0,0	-0,1	0,0	0,0	0,0	-0,3	-1,0
LEU 162	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
GLY 161	-0,5	0,0	0,0	0,0	-0,5	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	-0,5
GLY 160	-0,7	0,0	0,0	0,0	-0,7	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	-0,7
LYS 165	-0,1	0,0	0,0	0,0	-0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	-0,1
ALA 163	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
VAL 164	-0,4	0,0	0,0	0,0	-0,4	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	-0,4
LEU 168	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	Σ 1	Σ 2	Σ 3	Σ 4	Σ c	Σ 5	Σ 6	Σ 7	Σ 8	Σ 9	Σ 10	Σ a	Σ b
	-5,5	-2,3	-4,2	-3,8	-15,7	-2,0	-0,8	-0,2	-0,3	-0,4	-2,1	-5,8	-21,5

Tabelle 6.3-1 Auswertung der Interaktionsanalyse des Komplexes von **39** mit der MGMT. Detaillierte Versuchsbeschreibung siehe 6.1.2.4. Die Nomenklatur der einzelnen Molekülteile entspricht Abbildung 3.4-7.

	LTHO (1)	LLNK (2)	LPU1 (3)	LPU2 (4)	Σ 1-4 (c)	SP2 (5)	SP1 (6)	GLU1 (7)	GLU2 (8)	GLU3 (9)	CLU4 (10)	GLU5 (11)	Σ 5-11 (a)	Σ 1-11 (b)
GLN 115	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	-0,2	-0,5	-0,7	-0,7
TYR 114	0,0	0,0	-0,3	-0,5	-0,8	-0,4	-1,0	-0,5	0,0	0,0	0,0	-0,8	-2,7	-3,6
:LYS 125	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	-0,1
ARG 128	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	-0,2	-0,4	-0,1	-0,7	-0,2	0,0	0,0	-1,6	-1,6
ALA 127	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	-0,4	-0,2	-0,3	-0,1	-0,1	-0,1	-1,3	-1,3
GLY 131	0,0	-0,1	-0,8	-0,7	-1,6	-0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	-0,1	-1,8
VAL 130	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
ARG 135	-1,2	-0,8	-0,8	-0,1	-2,9	-0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	-0,1	-3,0
GLY 136	-0,1	0,0	0,0	0,0	-0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	-0,1
MET 134	-0,7	-0,8	-0,2	-0,9	-2,5	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	-2,5
GLY 132	0,0	0,0	-0,1	0,0	-0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	-0,1
ASN 137	-0,8	0,0	0,0	0,0	-0,8	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	-0,8
PRO 138	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
PRO 140	-0,3	0,0	0,0	0,0	-0,3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	-0,3
CYS 145	-0,4	-0,2	0,0	-0,6	-1,3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	-1,3
VAL 149	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	-0,1	-0,1	-0,1
HIS 146	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
VAL 148	0,0	0,0	0,0	-0,4	-0,4	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	-0,4
SER 151	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
CYS 150	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	-0,5	-0,5	-0,5
VAL 155	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
GLY 156	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
TYR 158	-1,4	-1,1	-2,1	-1,4	-6,0	-0,4	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	-0,4	-6,4
SER 159	-1,0	-0,9	-0,5	-0,4	-2,7	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	-2,7
ASN 157	0,0	0,0	-1,1	-0,1	-1,2	-0,6	-0,4	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	-1,0	-2,1
GLY 161	-0,1	0,0	0,0	0,0	-0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	-0,1
GLY 160	-0,5	0,0	0,0	0,0	-0,5	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	-0,5
VAL 164	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	Σ 1	Σ 2	Σ 3	Σ 4	Σ c	Σ 5	Σ 6	Σ 7	Σ 8	Σ 9	Σ 10	Σ 11	Σ a	Σ b
	-6,5	-3,9	-5,9	-5,1	-21,5	-1,7	-2,3	-0,8	-1,1	-0,3	-0,3	-2,0	-8,5	-30,0

Tabelle 6.3-2 Auswertung der Interaktionsanalyse des Komplexes von **40** mit der MGMT. Detaillierte Versuchsbeschreibung siehe 6.1.2.4. Die Nomenklatur der einzelnen Molekülteile entspricht Abbildung 3.4-7.

	LTHO (1)	LLNK (2)	LPU1 (3)	LPU2 (4)	Σ 1-4 (c)	SP3 (5)	SP2 (6)	SP1 (7)	GLU1 (8)	GLU2 (9)	GLU3 (10)	CLU4 (11)	GLU5 (12)	Σ 5-12 (a)	Σ 1-12 (b)
TYR 114	0,0	0,0	-0,3	-0,4	-0,6	-0,4	-0,9	-0,7	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	-2,0	-2,6
GLN 115	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	-0,6	-0,6	-0,6
ALA 118	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
LYS 125	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
PRO 124	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	-0,1	-0,1	-0,1
ARG 128	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	-0,5	-0,6	-0,8	-0,4	-0,3	-0,4	-3,0	-3,0
ALA 126	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
ALA 127	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	-0,5	-0,5	0,0	0,0	0,0	-0,4	-1,4	-1,4
VAL 130	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
GLY 131	0,0	0,0	-0,1	0,0	-0,1	-0,3	0,0	-0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	-0,4	-0,5
ARG 135	0,0	-0,1	-1,3	-0,3	-1,7	-0,4	-0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	-0,5	-2,3
GLY 136	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
MET 134	-0,2	-0,8	-0,6	-1,1	-2,7	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	-2,7
ASN 137	-0,2	0,0	0,0	0,0	-0,2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	-0,2
PRO 140	-0,9	0,0	0,0	0,0	-0,9	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	-0,9
ILE 141	-0,6	0,0	0,0	0,0	-0,6	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	-0,6
CYS 145	-1,0	-0,6	0,0	-0,6	-2,2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	-2,2
HIS 146	-1,3	-0,1	0,0	0,0	-1,4	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	-1,4
VAL 149	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
VAL 148	0,0	0,0	0,0	-0,4	-0,4	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	-0,4
VAL 155	0,0	0,0	-0,1	0,0	-0,1	-0,4	-0,5	-0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	-1,0	-1,2
GLY 156	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
ALA 154	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
TYR 158	-0,9	-1,1	-2,8	-1,6	-6,3	-0,5	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	-0,5	-6,8
SER 159	-1,2	-1,0	-0,3	-0,6	-3,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	-3,1
ASN 157	0,0	0,0	-0,8	0,0	-0,8	-0,2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	-0,2	-0,9
GLY 161	-0,6	0,0	0,0	0,0	-0,6	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	-0,6
GLY 160	-1,0	0,0	0,0	0,0	-1,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	-1,0
LYS 165	-0,1	0,0	0,0	0,0	-0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	-0,1
VAL 164	-0,5	0,0	0,0	0,0	-0,5	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	-0,5
LEU 168	-0,1	0,0	0,0	0,0	-0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	-0,1
	Σ 1	Σ 2	Σ 3	Σ 4	Σ c	Σ 5	Σ 6	Σ 7	Σ 8	Σ 9	Σ 10	Σ 11	Σ 12	Σ a	Σ b
	-8,5	-3,6	-6,2	-5,0	-23,4	-2,1	-1,6	-1,9	-1,1	-0,9	-0,4	-0,3	-1,5	-9,7	-33,2

Tabelle 6.3-3 Auswertung der Interaktionsanalyse des Komplexes von **41** mit der MGMT. Detaillierte Versuchsbeschreibung siehe 6.1.2.4. Die Nomenklatur der einzelnen Molekülteile entspricht Abbildung 3.4-7.

	LTHO (1)	LLNK (2)	LPU1 (3)	LPU2 (4)	Σ 1-4 (c)	SP4 (5)	SP3 (6)	SP2 (7)	SP1 (8)	CLU1 (9)	GLU2 (10)	GLU3 (11)	GLU4 (12)	GLU5 (13)	Σ 5-13 (a)	Σ 1-13 (b)
TYR 114	0,0	0,0	-0,2	-0,4	-0,6	-0,5	-0,7	-0,9	-0,7	-0,2	0,0	0,0	0,0	0,0	-3,2	-4,4
GLN 115	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	-0,2	0,0	0,0	0,0	-0,9	-1,1	-1,1
LYS 125	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	-0,5	-0,5	-0,5
PRO 124	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
ALA 126	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
ALA 127	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	-0,3	-0,2	-0,8	0,0	0,0	0,0	-0,3	-1,6	-1,6
ARG 128	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	-0,4	-0,7	-0,6	-0,8	-0,4	-0,2	-0,3	-0,4	-3,8	-3,8
GLY 131	0,0	0,0	-0,7	-0,1	-0,8	-0,3	-0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	-0,4	-2,0
ARG 135	-1,2	-0,9	-1,2	-0,6	-3,9	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	-7,8
MET 134	-0,5	-0,8	-0,5	-0,9	-2,6	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	-5,3
GLY 136	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
VAL 139	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
ASN 137	-1,1	0,0	0,0	0,0	-1,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	-2,2
PRO 138	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
PRO 140	-1,1	0,0	0,0	0,0	-1,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	-2,1
CYS 145	-0,2	-0,3	0,0	-0,7	-1,2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	-2,4
HIS 146	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
VAL 148	0,0	0,0	0,0	-0,5	-0,5	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	-1,0
CYS 150	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
SER 151	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
SER 159	-1,0	-1,0	-0,4	-0,5	-2,9	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	-5,8
TYR 158	-1,5	-1,4	-1,6	-1,5	-6,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	-12,0
ASN 157	0,0	0,0	-1,7	-0,5	-2,2	-0,6	-0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	-0,7	-5,1
GLY 161	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
GLY 160	-0,7	0,0	0,0	0,0	-0,7	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	-1,5
Σ 1	Σ 2	Σ 3	Σ 4	Σ c	Σ 5	Σ 6	Σ 7	Σ 8	Σ 9	Σ 10	Σ 11	Σ 12	Σ 13	Σ a	Σ b	
-7,2	-4,4	-6,3	-5,8	-23,7	-1,5	-1,3	-2,0	-1,6	-2,0	-0,4	-0,2	-0,3	-2,0	-11,3	-34,9	

Tabelle 6.3-4 Auswertung der Interaktionsanalyse des Komplexes von **42** mit der MGMT. Detaillierte Versuchsbeschreibung siehe 6.1.2.4. Die Nomenklatur der einzelnen Molekülteile entspricht Abbildung 3.4-7.

	LTH	LLNK	LPU1	LPU2	Σ 1-4	SP5	SP4	SP3	SP2	SP1	GLU1	GLU2	GLU3	CLU4	GLU5	Σ 1-14	Σ 5-14
	(1)	(2)	(3)	(4)	(c)	(5)	(6)	(7)	(8)	(9)	(10)	(11)	(12)	(13)	(14)	(a)	(b)
GLN 115	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	-0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	-0,4	-0,5	-0,2	-1,0	-0,6	-2,8	-2,8
TYR 114	0,0	0,0	-0,3	-0,7	-1,0	-0,4	-0,5	-0,8	-0,8	-0,6	0,0	0,0	0,0	-0,3	0,0	-3,3	-4,3
SER 113	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	-0,3	-0,1	0,0	-0,1	0,0	-0,5	-0,5
LYS 125	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
ARG 128	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	-0,2	-0,7	-0,7	0,0	0,0	0,0	0,0	-0,1	-1,8	-1,8
ALA 127	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	-0,2	-0,4	0,0	0,0	0,0	-0,1	0,0	-0,7	-0,7
GLY 131	0,0	0,0	-0,6	-0,2	-0,8	0,0	-0,4	-0,2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	-0,7	-1,4
VAL 130	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
ARG 135	-0,8	-0,3	-0,8	-0,1	-2,0	0,0	-0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	-0,1	-2,1
MET 134	-0,1	-0,4	-0,8	-0,9	-2,2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	-2,2
GLY 136	-1,0	-0,4	0,0	-0,1	-1,5	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	-1,5
GLY 132	0,0	0,0	-0,1	0,0	-0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	-0,1
VAL 139	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
ASN 137	-1,4	-0,1	0,0	0,0	-1,5	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	-1,5
PRO 138	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
PRO 140	-0,3	0,0	0,0	0,0	-0,3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	-0,3
CYS 145	-0,2	-0,2	0,0	-0,6	-1,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	-1,0
VAL 149	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
VAL 148	0,0	0,0	0,0	-0,4	-0,4	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	-0,4
HIS 146	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
SER 151	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	-0,3	-0,4	0,0	-0,2	0,0	-0,9	-0,9
CYS 150	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	-0,2	0,0	0,0	0,0	0,0	-0,5	0,0	0,0	-0,3	0,0	-1,0	-1,0
ALA 154	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	-0,1	0,0	0,0	0,0	-0,2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	-0,2	-0,2
SER 152	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	-0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	-0,5	-0,1	0,0	-0,4	-0,1	-1,3	-1,3
GLY 156	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
VAL 155	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	-0,5	-0,6	-0,6	-0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	-1,7	-1,7
SER 159	-1,2	-1,0	-0,4	-0,4	-3,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	-3,1
TYR 158	-0,6	-1,1	-2,2	-1,4	-5,3	0,0	-0,3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	-0,3	-5,6
ASN 157	0,0	0,0	-0,7	0,0	-0,7	0,0	-0,3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	-0,3	-1,0
GLY 160	-1,0	-0,5	0,0	0,0	-1,5	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	-1,5
GLY 161	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
VAL 164	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	Σ 1	Σ 2	Σ 3	Σ 4	Σ c	Σ 6	Σ 7	Σ 8	Σ 9	Σ 5	Σ 13	Σ 11	Σ 10	Σ 12	Σ 14	Σ a	Σ b
	-6,7	-3,8	-6,0	-4,8	-21,3	-2,1	-1,9	-2,3	-1,9	-0,9	-2,5	-1,1	-2,1	-0,3	-0,8	-15,6	-36,9

Tabelle 6.3-5 Auswertung der Interaktionsanalyse des Komplexes von **43** mit der MGMT. Detaillierte Versuchsbeschreibung siehe 6.1.2.4. Die Nomenklatur der einzelnen Molekülteile entspricht Abbildung 3.4-7.

	LTH O (1)	LLN K (2)	LPU1 (3)	LPU2 (4)	Σ 1-4 (c)	SP6 (5)	SP5 (6)	SP4 (7)	SP3 (8)	SP2 (9)	SP1 (10)	GLU1 (11)	GLU2 (12)	GLU3 (13)	CLU4 (14)	GLU5 (15)	Σ 5-15 (a)	Σ 1-15 (b)
GLN 115	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	-0,3	-0,3	-0,2	-0,7	0,0	0,0	0,0	-1,5	-1,5
TYR 114	0,0	0,0	-0,4	-0,6	-1,0	-0,5	-0,9	-1,0	-0,6	-0,3	-0,7	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	-3,9	-5,0
SER 113	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	-0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	-0,1	-0,1
ARG 128	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	-0,2	-0,4	-0,3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	-0,9	-0,9
ALA 127	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	-0,2	-0,2	-0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	-0,5	-0,5
GLY 131	0,0	0,0	-0,5	-0,5	-1,0	-0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	-0,1	-1,1
VAL 130	0,0	0,0	0,0	-0,1	-0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	-0,1
MET 134	-0,8	-0,5	0,0	-0,7	-1,9	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	-1,9
ARG 135	-1,5	-0,6	-0,5	-0,3	-2,8	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	-2,8
VAL 139	-0,1	0,0	0,0	0,0	-0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	-0,1
PRO 138	-0,2	0,0	0,0	0,0	-0,2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	-0,2
ASN 137	-0,8	0,0	0,0	0,0	-0,8	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	-0,8
PRO 140	-0,8	0,0	0,0	0,0	-0,8	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	-0,8
CYS 145	-0,3	-0,2	0,0	-0,6	-1,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	-1,1
VAL 148	0,0	0,0	0,0	-0,2	-0,2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	-0,2
VAL 149	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
CYS 150	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	-0,1	-0,2	-0,1	-0,2	0,0	0,0	0,0	0,0	-0,6	-0,6
SER 151	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	-0,1	0,0	-0,1	0,0	0,0	0,0	-0,1	-0,2	-0,2
GLY 156	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
SER 152	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	-0,1	0,0	0,0	0,0	-0,2	-0,1	-0,1
ASN 157	0,0	0,0	-1,2	0,0	-1,2	-0,5	-0,2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	-0,7	-2,0
TYR 158	-1,0	-1,3	-2,0	-1,4	-5,7	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	-5,7
SER 159	-1,1	-0,8	-0,3	-0,2	-2,4	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	-2,4
GLY 160	-0,9	-0,2	0,0	0,0	-1,2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	-1,2
GLY 161	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
VAL 164	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Σ 1	Σ 2	Σ 3	Σ 4	Σ c	Σ 5	Σ 6	Σ 7	Σ 8	Σ 9	Σ 10	Σ 11	Σ 12	Σ 13	Σ 14	Σ 15	Σ a	Σ b	
-7,5	-3,7	-4,9	-4,6	-20,7	-1,2	-1,5	-1,6	-1,1	-1,1	-1,0	-0,5	-0,7	0,0	0,0	-0,4	-8,7	-29,3	

Tabelle 6.3-6 Auswertung der Interaktionsanalyse des Komplexes von **44** mit der MGMT. Detaillierte Versuchsbeschreibung siehe 6.1.2.4. Einteilung der Molekülgruppen siehe Abbildung 3.4-7.

	LTHO (1)	LLNK (2)	LPU1 (3)	LPU2 (4)	Σ 1-4 (c)	SP2 (5)	SP1 (6)	GLU1 (7)	GLU2 (8)	GLU3 (9)	CLU4 (10)	GLU5 (11)	Σ 5-6 (b)	Σ 1-11 (a)
TYR114	0,0	0,0	-0,3	-0,4	-0,7	-0,3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	-0,3	-1,0
ARG 128	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	-0,2	-0,2	0,0	0,0	0,0	-0,5	-0,9	-0,9
ALA 127	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	-0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	-0,1	-0,1
VAL 130	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
GLY 131	0,0	0,0	-0,6	-0,1	-0,7	-0,2	-0,3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	-0,4	-1,1
GLY 132	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	-0,1
GLY 136	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
MET 134	-0,3	-0,4	-0,8	-0,6	-2,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	-2,1
ARG 135	-0,4	-0,2	-0,9	0,0	-1,5	0,0	-0,3	-0,1	-0,2	0,0	0,0	0,0	-0,6	-2,2
ASN 137	-0,4	0,0	0,0	0,0	-0,4	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	-0,4
PRO 138	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
VAL 139	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
ILE 141	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
PRO 140	-0,3	0,0	0,0	0,0	-0,3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	-0,3
CYS 145	-0,5	-0,4	-0,3	-0,4	-1,6	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	-1,6
HIS 146	-0,9	-0,3	0,0	-0,1	-1,2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	-1,2
VAL 149	0,0	0,0	0,0	-0,1	-0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	-0,1
VAL 148	0,0	-0,1	-0,2	-0,6	-0,8	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	-0,9
CYS 150	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
TYR 158	-2,5	-0,8	-0,2	-0,4	-3,9	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	-3,9
SER 159	-0,5	-0,2	0,0	0,0	-0,7	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	-0,7
ASN 157	0,0	-0,1	-0,4	-0,9	-1,4	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	-0,1	-1,4
GLY 161	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
GLY 160	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
VAL 164	-0,4	0,0	0,0	0,0	-0,4	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	-0,4
LYS 165	-0,2	0,0	0,0	0,0	-0,2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	-0,2
LEU 168	-0,3	0,0	0,0	0,0	-0,3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	-0,3
Σ 1	Σ 2	Σ 3	Σ 4	Σ c	Σ 5	Σ 6	Σ 7	Σ 8	Σ 9	Σ 10	Σ 11	Σ a	Σ b	
-6,8	-2,5	-3,8	-3,6	-16,6	-0,7	-0,9	-0,3	-0,2	0,0	0,0	-0,5	-2,6	-19,1	

Tabelle 6.3-7 Auswertung der Interaktionsanalyse des Komplexes von **45** mit der MGMT. Detaillierte Versuchsbeschreibung siehe 6.1.2.4. Die Nomenklatur der einzelnen Molekülteile entspricht Abbildung 3.4-7.

7. Literaturverzeichnis

Ali R.B., Teo A.K.C., Oh H.K., Chuang L.S.H., Ayi T.C. und Li B.F.L. (1998) Implication of localization of human DNA repair enzyme O⁶-methylguanine-DNA-methyltransferase at active transcription sites in transcription-repair coupling of the mutagenic O⁶-methylguanine lesion, *Mol.Cell Biol.*, 18, 1660-1669.

Althaus F.R. (1992) PolyADP-ribosylation: a histone shuttle mechanism in DNA excision repair, *J.Cell.Sci.*, 102, 663-667.

Alvarez Gonzalez R., Pacheco-Rodriguez G. und Medoza-Alvarez H. (1994) Enzymology of ADP-ribose polymer synthesis, *Mol.Cell.Biochem.*, 138, 33-38.

Arguiles J.M. und **Lopez-Soriano F.J.** (1990) Why do cancer cells do have such a high glycolytic rate?, *Medical Hypothesis*, 32, 151-155

Averbuch S.D. (1990) Nonclassic alkylating agents, in: Chabner B.A. and Collins J.M (Eds.), *Cancer Chemotherapy: Principles & Practice*, Lippincott, Philadelphia, pp. 314-340.

Baldwin S.A. (1993) Mammalian passive glucose transporters: members of an ubiquitous family of active and passive transport proteins, *Biochim.Biophys.Acta*, 1154, 17-49.

Balsinger R.W. und **Montgomery J.A.** (1960) Synthesis of Potential Anticancer Agents. XXV. Preparation of 6-Alkoxy-2-Aminopurines, *J.Org.Chem.*, 25, 1573-1575.

Banasik M., Komura H., Shimoyama M. und Ueda K. (1992) Specific inhibitors of poly(ADP-ribose) synthetase and mono(ADP-ribosyl)transferase, *J.Biol.Chem.*, 267, 1575

Barnett J.E., Holman G.D., Chalkley R.A.und Munday K.A. (1975) Evidence for two asymmetric conformational states in the human erythrocyte sugar-transport system, *Biochem.J.*, 145, 417-429.

Barnett, J.E., Holman G.D.und Munday K.A. (1973) Structural requirements for binding to the sugar-transport system of the human erythrocyte, *Biochem.J.*, 131, 211-221.

Barre-Sinoussi F., Chermann J.C., Rey F., Nugeyre M.T., Chamarat S., Gruest J., Dauguet C., Axler-Blin C., Vexinet-Brun F., Rouzioux C., Rozenbaum W. und Montagnier L. (1983) Isolation of a T lymphotropic retrovirus from a patient at risk for the acquired immunodeficiency syndrome (AIDS), *Science*, 224, 868-870.

Bean C.L., Bradt C.L., Hill R., Johnson T.E., Stallworth M. und Galloway S.M. (1994) Chromosome aberrations: persistence of alkylation damage and modulation by O⁶-alkylguanine-DNA alkyltransferase, *Mutat.Res.*, 307, 67-81.

Becker H.G.O., Domschke G., Fanghänel E., Fischer M., Gewalt K., Mayer R. et al. (1986) *Organikum. Organisch Präparatives Grundpraktikum*, VEB Deutscher Verlag der Wissenschaften, Berlin.

Becker K., Dosch J., Gregel C.M., Martin B.A. und Kaina B. (1996) Targeted expression of human O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) in transgenic mice protects against tumor initiation in two-stage skin carcinogenesis, *Cancer Res.*, 56, 3244-3249.

Becker K., Gregel C.M. und Kaina B. (1997) The DNA repair protein O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase protects against skin tumor formation induced by antineoplastic chloroethylnitrosourea, *Cancer Res.*, 57, 3335-3338.

Belanich M., T.C. Ayi, B.F. Li, J.T. Kibitel, D.W. Grob, T. Randall, A.B. White, M.L. Citron und D.B. Yarosh (1994) Analysis of O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase in individual human cells by quantitative immunofluorescence microscopy, *Oncol.Res.*, 6, 129-137.

Becker N. und **Wahrendorf J.** (1998) *Krebsatlas der Bundesrepublik Deutschland*, Springer-Verlag Heidelberg

- Berg S.L.**, Gerson S.L., Godwin K., Cole D.E., Liu L. und Balis F.M. (1995) Pharmacokinetics and cerebrospinal fluid of O⁶-benzylguanine and time course of peripheral blood mononuclear cell O⁶-methylguanine-DNA-methyltransferase in the nonhuman primate, *Cancer Res.*, 55, 4606-4610.
- Berger N.A.**, Catino D.M. und Vietti D.J. (1982) Synergistic antileukemic effect of 6-aminonicotinamide and 1,3-(2-chloroethyl)-nitrosourea on L1210 cells in vitro and in vivo, *Cancer Res.*, 42, 4382-4386.
- Berger N.A.** (1997) Alkylating agents, *Cancer Chemother.Biol.Response Modif.*, 178-194.
- Bibby M.C.**, M.J. Thompson, J.A. Rafferty, G.P. Margison und R.S. McElhinney (1999) Influence of O⁶-benzylguanine on the anti-tumour activity and normal tissue toxicity of 1,3-bis(2-chloroethyl)-1-nitrosourea and molecular combinations of 5-fluorouracil and 2-chloroethyl-1-nitrosourea in mice, *Br.J.Cancer*, 79, 1332-1339.
- Böhm H.J.**, Klebe G. und Kubinyi H. (1996) Wirkstoffdesign, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford.
- Bowles W.A.**, Schneider F.H. , Lewis L.R. und Robins R.K. (1963) Synthesis and Antitumor Activity of 9-(Tetrahydro-2-furyl)purine Analogs of Biologically Important Deoxynucleosides, *J.Med.Chem.*, 6, 471-480.
- Bradford M.** (1976) A rapid method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding, *Analytical Biochemistry*, 72, 248-254
- Breitmaier E. und Jung G.** (1978) Organische Chemie. Grundlagen, Stoffklassen, Reaktionstypen, Thieme, Stuttgart.
- Breitmaier E. und Jung G.** (1983) Chemie spezieller Stoffklassen einschließlich Strukturaufklärung, Thieme, Stuttgart; New York.
- Briscoe W.T.**, Anderson S.P. und May H.E. (1990) Base sequence specificity of three 2-chloroethylnitrosoureas, *Biochem.Pharmacol.*, 40, 1201-1207.
- Brock N.** (1989) Oxazaphosphorine cytostatics: past-present-future., *Cancer Res.*, 49, 1-7.
- Brown D.M.**, Horsman M.R., Hirst D.G. und Brown J.M. (1984) Enhancement of melphalan cytotoxicity in vivo and in vitro by inhibitors of poly(ADP-ribose) polymerase, *Int.J.Rad.Oncol.Biol.Phys.*, 10, 1665-1668.
- Buchdahl, C.**, C. Rolhion, A.L. Glasser, E. Debiton, E. Mounetou, J.C. Madelmont und F. Laval (1998) Melanoma-cell toxicity of cysteamine combined with O⁶-benzyl-N²-acetylguanosine, *Melanoma.Res.*, 8, 123-130.
- Burger A. und Wachter H.** (1998) Hunnius, Pharmazeutisches Wörterbuch, de Gruyter, Berlin, New York.
- Bürkle A.**, Chen G., Küpper J.-H., Grube K. und Zeller W.J. (1993) Increased poly(ADP-ribosyl)ation in intact cells by cisplatin treatment, *Carcinogenesis*, 14, 559-561.
- Bürkle A.**, Heilbronn R. und zur Hausen H. (1990) Potentiation of carcinogen induced methotrexate resistance and dihydrofolate reductase gene amplification by inhibitors of poly(ADP-ribose)polymerase, *Cancer Res.*, 50, 5756-5760.
- Cai Y.**, M.H. Wu, S.M. Ludeman, D.J. Grdina und M.E. Dolan (1999) Role of O⁶-alkylguanine-DNA alkyltransferase in protecting against cyclophosphamide-induced toxicity and mutagenicity, *Cancer Res.*, 59, 3059-3063.
- Cal S. und B.A. Connolly** (1997) DNA distortion and base flipping by the EcoRV DNA methyltransferase. A study using interference at dA and T bases and modified deoxynucleosides, *J.Biol.Chem.*, 272, 490-496.
- Cancer Research Campaign Technology Limited** (1994). O⁶-substituted Guanine Derivates, A process for their preparation and their use in treating tumor cells. PCT/IE94/000311(WO 94/29312). 22-12-1994. International patent application.

Cancer Research Campaign Technology Limited (1997). Pyrimidine Derivates and Guanine derivatives, and their use in treating tumor cells. PCT/IE96/00084(WO 97/20843). 12-6-1997. International patent application.

Carpenter C.C.J., D.A. Cooper, M.A. Fischl, J.M. Gatell, B.G. Gazzard, S.M. Hammer, M.S. Hirsch, D.M. Jacobsen, D.A. Katzenstein, J.S.G. Montaner, D.D. Richman, M.S. Saag, M. Schechter, R.T. Schooley, S. Vella, P.G. Yeni und P.A. Volberding (2000) Antiretroviral therapy in adults - Updated recommendations of the International AIDS Society-USA Panel, *Jama J.Am.Med.Assn.*, 283, 381-390.

Chae M.Y., M.G. McDougall, M.E. Dolan, K. Swenn, A.E. Pegg und R.C. Moschel (1994) Substituted O6-benzylguanine derivatives and their inactivation of human O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase, *J.Med.Chem.*, 37, 342-347.

Chae M.Y., K. Swenn, S. Kanugula, M.E. Dolan, A.E. Pegg und R.C. Moschel (1995) 8-Substituted O6-benzylguanine, substituted 6(4)-(benzyloxy)pyrimidine, and related derivatives as inactivators of human O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase, *J.Med.Chem.*, 38, 359-365.

Chatterjee S., Berger J. und Berger N.A. (1999) Poly(ADP-ribose)polymerase: A guardian of the genome that facilitates DNA repair by protecting against DNA recombination, *Mol.Cell.Biochem.*, 193, 23-30.

Cheng X. (1995) DNA modification by methyltransferases, *Curr.Opin.Struct.Biol.*, 5, 4-10.

Cheng X. und R.M. Blumenthal (1996) Finding a basis for flipping bases, *Structure.*, 4, 639-645.

Chaney S.G. und **A. Sancar** (1996) DNA Repair: Enzymatic Mechanism and Relevance to Drug Response, *J.Natl.Canc.Inst.*, 88, 1346-1360.

Chueh L.L., T. Nakamura, Y. Nakatsu, K. Sakumi, H. Hayakawa und M. Sekiguchi (1992) Specific amino acid sequences required for O6-methylguanine-DNA methyltransferase activity: analyses of three residues at or near the methyl acceptor site, *Carcinogenesis*, 13, 837-843.

Citti L., Boldrini L., I. Preuss, B. Kaina, Mariani L. und Rainaldi G. (1996) Targeting of O⁶-methylguanine-DNA-methyltransferase (MGMT) activity by antimessenger oligonucleotide sensitizes CHO/Mex⁺ transfected cells to mitozolomide, *Carcinogenesis*, 17, 25-29.

Citti L., Eckstein F., Capecchi B., Mariani L., Nevischi S., Poggi A. und Rainaldi G. (1999) Transient transfection of a synthetic hammerhead ribozyme targeted against human MGMT gene to cells in culture potentiates the genotoxicity of the alkylation damage induced by mitozolomide, *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.*, 9, 125-133.

Coffin J.M. (1995) HIV population dynamics in vivo: implications for genetic variation, pathogenesis and therapy, *Science*, 267, 483-489.

Condra J.H., Holder D.J., Schleif W.A. et al. (1996) Genetic correlates of in vivo viral resistance to indinavir, a human immunodeficiency virus type 1 protease inhibitor, *J.Virol.*, 70, 8270-8276.

Condra J.H., Schleif W.A. Blahy O.M. et al. (1995) In vivo emergence of HIV-1 variants resistant to multiple protease inhibitors, *Nature*, 374, 569-571.

Conn E.E. (1993) β -Glucosidases in plants. Substrate specificity. Esen A. (Hrsg.) ACS Symposium series, 533, 15-41

Cordonnier A., L. Montagnier und M. Emerman (1989) Single amino-acid changes in HIV envelope affect viral tropism and receptor binding, *Nature*, 340, 571-574.

Cussac C., E. Mounetou, M. Rapp, J.C. Madelmont, J.C. Maurizis, P. Labarre, P. Chollet, J.L. Chabard, D. Godeneche, J.P. Baudry et al. (1994) Disposition and metabolism of O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase inhibitor in nude mice bearing human melanoma, *Drug Metab.Dispos.*, 22, 637-642.

Cussac C., M. Rapp, E. Mounetou, J.C. Madelmont, J.C. Maurizis, D. Godeneche, J.M. Dupuy, J. Sauzieres, J.P. Baudry und A. Veyre (1994) Enhancement by O6-benzyl-N-acetylguanosine derivatives of

chloroethylnitrosourea antitumor action in chloroethylnitrosourea-resistant human malignant melanocytes, *J.Pharmacol.Exp.Ther.*, 271, 1353-1358.

Daniels D.S., C.D. Mol, A.S. Arvai, S. Kanugula, A.E. Pegg und J.A. Tainer (2000) Active and alkylated human AGT structures: a novel zinc site, inhibitor and extrahelical base binding, *EMBO J.*, 19, 1719-1730.

Deen K.C., J.S. McDougal, R. Inacker, W.G. Folena, J. Arthos, J. Rosenberg, P.J. Maddon, R. Axel und R.W. Sweet (1988) A soluble form of CD4 (T4) protein inhibits AIDS virus infection, *Nature*, 331, 82-84.

Desnoyers S., Shah G.M., Brocho G., Hoflack J.C, Verrault A. und Poirier G.G. (1995) Biochemical properties and function of poly(ADP-ribose) glycohydrolyase, *Biochimie*, 77, 433-438.

Dickes M. (1988) Synthese und Untersuchungen zur Stabilität und biologischen Aktivität O-Glykosidisch gekoppelter 2-Chloroethyl-phosphorsäurediamide- einer neuen Klasse antineoplastisch wirksamer Alkylantien. Dissertation Universität Heidelberg.

Dolan M.E., M.Y. Chae, A.E. Pegg, J.H. Mullen, H.S. Friedman und R.C. Moschel (1994) Metabolism of O6-benzylguanine, an inactivator of O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase, *Cancer Res.*, 54, 5123-5130.

Dolan M.E., R.B. Mitchell, C. Mummert, R.C. Moschel und A.E. Pegg (1991) Effect of O6-benzylguanine analogues on sensitivity of human tumor cells to the cytotoxic effects of alkylating agents, *Cancer Res.*, 51, 3367-3372.

Dolan M.E., K. Morimoto und A.E. Pegg (1985) Reduction of O⁶-alkylguanine-DNA-alkyltransferase activity in HeLa cells treated with O⁶-alkylguanines, *Cancer Res.*, 45, 6413-6417.

Dolan M.E., R.C. Moschel und A.E. Pegg (1990) Depletion of mammalian O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase activity by O6-benzylguanine provides a means to evaluate the role of this protein in protection against carcinogenic and therapeutic alkylating agents, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 87, 5368-5372.

Dolan M.E. und **A.E. Pegg** (1997) O6-benzylguanine and its role in chemotherapy, *Clin.Cancer Res.*, 3, 837-847.

Dolan M.E., A.E. Pegg, L.L. Dumenco, R.C. Moschel und S.L. Gerson (1991) Comparison of the inactivation of mammalian und bacterial O6-alkylguanine-DNA alkyltransferases by O6-benzylguanine and O6-methylguanine, *Carcinogenesis*, 12, 2305-2309.

Domoradzki J., A.E. Pegg, M.E. Dolan, V.M. Maher und J.J. McCormick (1984) Correlation between O6-methylguanine-DNA-methyltransferase activity and resistance of human cells to the cytotoxic and mutagenic effect of N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine, *Carcinogenesis*, 5, 1641-1647.

Duriez P.J. und Shah G.M. (1997) Cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase: a sensitive parameter to study cell death, *Biochem.Cell.Biol.*, 75, 337-349.

Edara S., Goodztova K. und Pegg A.E. (1995) The role of tyrosine 158 in O⁶-alkylguanine-DNA alkyltransferase activity, *Carcinogenesis*, 16, 1637-1642

Erbar P. (1995) Onkologie Kompaktlehrbuch, Einführung in die Patophysiologie, Klinik und Therapie maligner Tumoren, F.K.Schattauer Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart.

Erickson C.C., Bradley M.O., Ducore J.M. et al. (1980) DNA cross-linking and cytotoxicity in normal and transformed human cells treated with antitumor nitrosoureas., *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, 77, 467-471.

Evan G. und **Littlewood T.** (1998) A matter of filfe and cell death, *Science*, 281, 1317-1322.

Federwisch M., U. Hassiepen, K. Bender, M. Dewor, M.F. Rajewsky und A. Wollmer (1997) Recombinant human O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase (AGT), Cys145-alkylated AGT and Cys145 --> Met145 mutant AGT: comparison by isoelectric focusing, CD and time-resolved fluorescence spectroscopy, *Biochem.J.*, 324, 321-328.

- Federwisch M.**, U. Hassiepen, K. Bender, M.F. Rajewsky und A. Wollmer (1997) Recombinant human O⁶-alkylguanine-DNA alkyltransferase induces conformational change in bound DNA, *FEBS Lett.*, 407, 333-336.
- Finberg R.W.**, D.C. Diamond, D.B. Mitchell, Y. Rosenstein, G. Soman, T.C. Norman, S.L. Schreiber und S.J. Burakoff (1990) Prevention of HIV-1 infection and preservation of CD4 function by the binding of CPFs to gp120, *Science*, 249, 287-291.
- Fischbarg J. und J.C. Vera** (1995) Multifunctional transporter models: lessons from the transport of water, sugars, and ring compounds by GLUTs, *Am.J.Physiol.*, 268, C1077-C1089
- Fisher R.A.**, J.M. Bertonis, W. Meier, V.A. Johnson, D.S. Costopoulos, T. Liu, R. Tizard, B.D. Walker, M.S. Hirsch, R.T. Schooley et al. (1988) HIV infection is blocked in vitro by recombinant soluble CD4, *Nature*, 331, 76-78.
- Frank M.** (1999) Konformationsanalyse von Oligosacchariden im freien und gebundenen Zustand, Dissertation, Universität Heidelberg
- Friedman H.S.**, D.M. Kokkinakis, J. Pluda, A.H. Friedman, I. Cokgor, M.M. Haglund, D.M. Ashley, J. Rich, M.E. Dolan, A.E. Pegg, R.C. Moschel, R.E. McLendon, T. Kerby, J.E. Herndon, D.D. Bigner und J. Schold-SC (1998) Phase I trial of O⁶-benzylguanine for patients undergoing surgery for malignant glioma, *J.Clin.Oncol.*, 16, 3570-3575.
- Friedman H.S.**, A.E. Pegg, S.P. Johnson, N.A. Loktionova, M.E. Dolan, P. Modrich, R.C. Moschel, R. Struck, T.P. Brent, S. Ludeman, N. Bullock, C. Kilborn, S. Keir, Q. Dong, D.D. Bigner und O.M. Colvin (1999) Modulation of cyclophosphamide activity by O⁶-alkylguanine-DNA alkyltransferase, *Cancer Chemother.Pharmacol.*, 43, 80-85.
- Fritz G.**, B. Auer und B. Kaina (1994) Effect of transfection of human poly(ADP-ribose)polymerase in Chinese hamster cells on mutagen resistance, *Mutat.Res.*, 308, 127-133.
- Futscher B.W.**, Micetich K.C., Barnes D.M., Fisher R.I. und Erickson L.C. (1989) Inhibition of a specific DNA repair system and nitrosourea cytotoxicity in resistant human cancer cells, *Cancer Commun.*, 1, 65-73.
- Gabriel S.** (1886) *Chem. Ber.*, 19, 2364-2368
- Gallo R.C.**, Salahuddin S.Z., Popovic M., Shearer G.M., Kaplan M., Haynes B.F., Palker T.J., Redfield R., Oleske J., Safai B., White G., Foster P. und Markham P.D. (1984) Frequent detection and isolation of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and a risk for AIDS, *Science*, 224, 200-203.
- Gendelman H.E.**, Orenstein J.E., Baca L.M., Weiser B., Burger H., Kalter C. und Melzer M. (1989) The macrophage in the persistence and pathogenesis of HIV-infection, *AIDS*, 3, 475-495.
- Gerard B.**, Aamdal S, Lee S.M, Leyvraz S, Lucas C, M. D'Incalci und Bizarri J.P. (1993) Activity and unexpected lung toxicity of the sequential administration of two alkylating agents- dacarbazine and fotemustine- in patients with melanoma, *Eur.J.Canc.*, 29A, 711-719.
- Gerson S.L.**, Miller K. und Berger N.A. (1985) O⁶-Alkylguanine-DNA alkyltransferase activity in human myeloid cells, *J.Clin.Invest.*, 76, 2106-2114.
- Gilman A.** (1963) The initial clinical trial of nitrogen-mustard, *Am.j.surg.*, 105, 574-578.
- Gilman A. und Philips F.S.** (1946) The biological actions and therapeutic applications of beta-chloroethyl amines and sulfides, *Sciences*, 103, 409-415.
- Goldie J.H. und Goldmann A.J.** (1984) The genetic origin of drug resistance in neoplasms. Implication for systemic therapy, *Cancer Research*, 44, 3643-3653
- Goldie J.H. und Goldmann A.J.** (1979) A math model for relating the drug sensitivity of tumors to their spontaneous mutation rate, *Cancer Treatment Reviews*, 63, 1727-1733

- Goodtzova K.**, S. Kanugula, Edara S., G.T. Pauly, R.C. Moschel und A.E. Pegg (1997) Repair of O⁶-benzylguanine by the E.coli Ada and Ogt and the human O⁶-alkylguanine-DNA-alkyltransferase, *J.Biol.Chem.*, 272, 8332-8339.
- Goodtzova K.**, S. Kanugula, S. Edara and A.E. Pegg (1998) Investigation of the role of tyrosine-114 in the activity of human O⁶-alkylguanine-DNA alkyltransferase, *Biochemistry*, 37, 12489-12495.
- Gould G.W.** und **G.I. Bell** (1990) Facilitative glucose transporters: an expanding family, *Trends.Biochem.Sci.*, 15, 18-23.
- Gradwohl J.** und **Menissier de Murcia J.** (1990) The second zinc-finger domain of poly(ADP-ribose) polymerase determines specificity for single stranded breaks in DNA Gradwohl G., *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, 87, 2990-2994.
- Graves R.J.**, B.F. Li und P.F. Swann (1989) Repair of O⁶-methylguanine, O⁶-ethylguanine, O⁶-isopropylguanine and O⁴-methylthymine in synthetic oligodeoxynucleotides by Escherichia coli ada gene O⁶-alkylguanine-DNA-alkyltransferase, *Carcinogenesis*, 10, 661-666.
- Grombacher T.**, U. Eichhorn und B. Kaina (1998) p53 is involved in regulation of the DNA repair gene O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) by DNA damaging agents, *Oncogene*, 17, 845-851.
- Grombacher T.**, S. Mitra und B. Kaina (1996) Induction of the alkyltransferase (MGMT) gene by DNA damaging agents and the glucocorticoid dexamethasone and comparison with the response of base excision repair genes, *Carcinogenesis*, 17, 2329-2336.
- Grundler** und **R.R.Schmidt** (1984) Anwendung des Trichloracetimidat-Verfahrens auf 2-Azidoglucose und 2-Azidogalactose-Derivate, *Liebigs Ann.Chem.*, 1826-1847.
- Guillouf C.**, Wang T.S., Liu J., Walsh C.E., Poirier G.G., Moustacchi E. und Rosselli F. (1999) Fanconi anemia C protein acts as a switch between apoptosis and necrosis in mytomicin C-induced cell death, *Exp.Cell.Res.*, 246, 384-394.
- Hager K.**, A. Hazama, H.M. Kwon, D.D. Loo, J.S. Handler und E.M. Wright (1995) Kinetics and specificity of the renal Na⁺/myo-inositol cotransporter expressed in Xenopus oocytes, *J.Membr.Biol.*, 143, 103-113.
- Hahn P.**, Nevaldine B und Morgan B.F. (1990) X-ray induction of methotrexate resistance due to dhfr gene amplification, *Somat.Cell.Mol.Genet.*, 16, 413-423.
- Hansen P.A.**, E.A. Gulve und J.O. Holloszy (1994) Suitability of 2-deoxyglucose for in vitro measurement of glucose transport activity in skeletal muscle, *J.Appl.Physiol.*, 76, 979-985.
- Havlir D.V.**, Eastman S., Gamst A. und Richman D.D. (1996) Nevirapine-resistant human immunodeficiency virus: kinetics of replication and estimated prevalence in untreated patients, *J.Virol.*, 70, 7894-7899.
- Hediger M.A.**, Y. Kanai, G. You und S. Nussberger (1995) Mammalian ion-coupled solute transporters, *J.Physiol.Lond.*, 482, 7S-17S.
- Helferich B.** und **J.Zirner** (1962) Notiz über Tetraacetyl-[4-brom-n-butyl]-β-D-glucosid, *Chem.Ber.*, 96, 374
- Helferich B.** und **K.Weis** (1956) Zur Synthese von Glucosiden und nicht-reduzierenden Disacchariden, *Chem.Ber.*, 89, 314-321.
- Hellwig B.** und **Mutschler E.** (1999) Nicht-nucleosidischer Reverse-Transkriptase-Inhibitor: Efavirenz. Zur Behandlung einer HIV-Infektion, *Neue Arzneimittel (Deutsche Apotheker Zeitung)*, 46, 64-66.
- Hildebrandt H.** (1998) Pschyrembel Klinisches Wörterbuch: mit klinischen Syndromen und Nomina Anatomica, de Gruyter, Berlin, New York.

- Hirayama B.A.**, M.P. Lostao, H.M. Panayotova, D.D. Loo, E. Turk und E.M. Wright (1996) Kinetic and specificity differences between rat, human, and rabbit Na⁺-glucose cotransporters (SGLT-1), *Am.J.Physiol.*, 270, G919-G926
- Hirsch T.**, Marchetti P., Susin S.A., Dallaporta B., Zamzani N., Marzo I., Geuskens M. et al. (1997) The apoptosis-necrosis paradox: apoptogenic proteases activated after mitochondrial permeability transition determine the mode of cell death, *Oncogene*, 15, 1573-1581.
- Ho D.D.**, Neumann A.U., Perelson A.S., Chen W., Leonard J.M. und Markowitz M. (1995) Rapid turnover of plasma virions and CD4 lymphocytes in HIV-1 infection, *Nature*, 373, 123-126.
- Huet J.** und **Laval F.** (1985) Potentiation of cell killing by inhibitors of poly (ADPribose) synthesis in bleomycin-treated chinese hamster ovary cells, *Cancer Res.*, 45, 987-991.
- Hussey R.E.**, N.E. Richardson, M. Kowalski, N.R. Brown, H.C. Chang, R.F. Siliciano, T. Dorfman, B. Walker, J. Sodroski und E.L. Reinherz (1988) A soluble CD4 protein selectively inhibits HIV replication and syncytium formation, *Nature*, 331, 78-81.
- Jaekle K.A.**, H.J. Eyre, J.J. Townsend, S. Schulman, H.M. Knudson, M. Belanich, D.B. Yarosh, S.I. Bearman, D.J. Giroux und S.C. Schold (1998) Correlation of tumor O6 methylguanine-DNA methyltransferase levels with survival of malignant astrocytoma patients treated with bis-chloroethylnitrosourea: a Southwest Oncology Group study, *J.Clin.Oncol.*, 16, 3310-3315.
- Jelinek J.**, Fairbairn L.J., Dexter T.M., J.A. Rafferty, Stocking C., Ostertag W. und G.P. Margison (1996) Long-term protection of hematopoiesis against the cytotoxic effects of multiple doses of nitrosourea by retrovirus mediated expression of human O⁶-alkylguanine-DNA-alkyltransferase, *Blood*, 87, 1957-1961.
- Kaina B.** (1998) Critical steps in alkylation-induced aberration formation, *Mutat.Res.*, 404, 119-124.
- Kaina B.**, G. Fritz, S. Mitra und T. Coquerelle (1991) Transfection and expression of human O6-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) cDNA in Chinese hamster cells: the role of MGMT in protection against the genotoxic effects of alkylating agents, *Carcinogenesis*, 12, 1857-1867.
- Kaina B.**, G. Fritz, K. Ochs, S. Haas, T. Grombacher, J. Dosch, M. Christmann, P. Lund, C.M. Gregel und K. Becker (1998) Transgenic systems in studies on genotoxicity of alkylating agents: critical lesions, thresholds and defense mechanisms, *Mutat.Res.*, 405, 179-191.
- Kaina B.**, A. Ziouta, K. Ochs und T. Coquerelle (1997) Chromosomal instability, reproductive cell death and apoptosis induced by O6-methylguanine in Mex⁻, Mex⁺ and methylation-tolerant mismatch repair compromised cells: facts and models, *Mutat.Res.*, 381, 227-241.
- Kanai Y.**, W.S. Lee, G. You, D. Brown und M.A. Hediger (1994) The human kidney low affinity Na⁺/glucose cotransporter SGLT2. Delineation of the major renal reabsorptive mechanism for D-glucose, *J.Clin.Invest.*, 93, 397-404.
- Kauffmann S.H.**, Desnoyers S., Ottaviano Y., Davidson N.E. und Poirier G.G. (1993) Specific proteolytic cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase: an early marker of chemotherapy-induced apoptosis, *Cancer Res.*, 53, 3976-3985.
- Kaur T.B.**, J.M. Travaline, J.P. Gaughan, J.P. Richie, S.D. Stellman und P. Lazarus (2000) Role of polymorphisms in codons 143 and 160 of the O-6-alkylguanine DNA alkyltransferase gene in lung cancer risk, *Cancer Epidem.Biomarker.Prev.*, 9, 339-342.
- Kerekyarto J.**, J.P. Kamerling, J.B. Bouwstra, und A. Liptak (1989), *Carbohydr.Res.*, 186, 51-62.
- Kern,M.A.**, H. Helmbach, D. Karmann, K. Jurgovsky. Schadendorf,D. (1997) Human melanoma cell lines selected in vitro displaying various levels of drug resistance against cisplatin, fotemustine, vindesine or etoposide: modulation of proto-oncogene expression, *Anticancer Res.*, 17, 6D, 4359-4370
- Kiburis J.** und **J.H.Lister** (1971) Nucleophilic Displacement of the Trimethylamino-group as a New Route to Fluoropurines, *J.Chem.Soc., (C)*, 3942-3946.

- Kim C.U.**, B.Y. Luh, P.F. Misco, J.J. Bronson, M.J. Hitchcock, I. Ghazzouli und J.C. Martin (1990) Acyclic purine phosphonate analogues as antiviral agents. Synthesis and structure-activity relationships, *J.Med.Chem.*, 33, 1207-1213.
- Kipp H.**, J.T. Lin und R.K. Kinne (1996) Interactions of alkylglucosides with the renal sodium/D-glucose cotransporter, *Biochim.Biophys.Acta*, 1282, 125-130.
- Kjellberg J.** und **Liljenberg M.** (1986) Regioselective Alkylation of 6-(β -Methoxyethoxy)guanine to give the 9-Alkylguanine Derivate, *Tetrahedron Letters*, 27, 877-880.
- Klimasauskas S.**, S. Kumar, R.J. Roberts und X. Cheng (1994) HhaI methyltransferase flips its target base out of the DNA helix [see comments], *Cell*, 76, 357-369.
- Koepsell H.** und **J. Spangenberg** (1994) Function and presumed molecular structure of Na(+)-D-glucose cotransport systems, *J.Membr.Biol.*, 138, 1-11.
- Kokkinakis D.M.**, R.C. Moschel, A.E. Pegg, M.E. Dolan und J. Schold-SC (1994) Metabolism and disposition of O6-benzyl-2'-deoxyguanosine in Sprague-Dawley rats, *Chem.Res.Toxicol.*, 7, 762-769.
- Kokkinakis D.M.**, R.C. Moschel, T.H. Vuong, M.V. Reddy, S.C. Schold und A.E. Pegg (1996) Mechanism of depletion of O6-methylguanine-DNA methyltransferase activity in rat tissues by O6-Benzyl-2'-deoxyguanosine. Role of metabolism, *In Vivo.*, 10, 297-306.
- Kong C.T.**, S.F. Yet und J.E. Lever (1993) Cloning and expression of a mammalian Na+/amino acid cotransporter with sequence similarity to Na+/glucose cotransporters, *J.Biol.Chem.*, 268, 1509-1512.
- Kyrtopoulos S.A.**, L.M. Anderson, S.K. Chhabra, V.L. Souliotis, V. Pletsas, C. Valavanis und P. Georgiadis (1997) DNA adducts and the mechanism of carcinogenesis and cytotoxicity of methylating agents of environmental and clinical significance, *Cancer Detect.Prev.*, 21, 391-405.
- Labahn J.**, O.D. Scharer, A. Long, N.K. Ezaz, G.L. Verdine und T.E. Ellenberger (1996) Structural basis for the excision repair of alkylation-damaged DNA, *Cell*, 86, 321-329.
- Lage H.**, M. Christmann, M.A. Kern, M. Dietel, M. Pick, B. Kaina und D. Schadendorf (1999) Expression of DNA repair proteins hMSH2, hMSH6, hMLH1, O6-methylguanine-DNA methyltransferase and N-methylpurine-DNA glycosylase in melanoma cells with acquired drug resistance, *Int.J.Cancer*, 80, 744-750.
- Lage H.** und **M. Dietel** (1999) Involvement of the DNA mismatch repair system in antineoplastic drug resistance, *J.Cancer Res.Clin.Oncol.*, 125, 156-165.
- Lasky L.A.**, G. Nakamura, D.H. Smith, C. Fennie, C. Shimasaki, E. Patzer, P. Berman, T. Gregory und D.J. Capon (1987) Delineation of a region of the human immunodeficiency virus type 1 gp120 glycoprotein critical for interaction with the CD4 receptor, *Cell*, 50, 975-985.
- Lawley P.D.** und **D.H. Phillips** (1996) DNA adducts from chemotherapeutic agents, *Mutat.Res.*, 355, 13-40.
- Le Cam E.**, Fack F., Menissier de Murcia J., Cognet J.A., Barbin A., Sarantoglou V., Revet B. et al. (1994) Conformational analysis of a 139 base-pair DNA-fragment containing a single-stranded break and its interaction with human poly(ADP-ribose) polymerase, *J.Mol.Biol.*, 235, 1062-1071.
- Lifson J.D.**, K.M. Hwang, P.L. Nara, B. Fraser, M. Padgett, N.M. Dunlop und L.E. Eiden (1988) Synthetic CD4 peptide derivatives that inhibit HIV infection and cytopathicity, *Science*, 241, 712-716.
- Limp Foster M.** und **M.R. Kelley** (2000) DNA repair and gene therapy: Implications for translational uses, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 35, 71-81.
- Lindahl T.**, Satoh M.S., Poirier G.G. und Klungland A. (1995) Post-translational modification of poly(ADP-ribose) polymerase induced by strand breaks, *TIBS*, 20, 405-411.
- Lindemann A.**, V. Kinzel, P. Rosch und J. Reed (1997) Structure of the LAV6 peptide: a nucleation site for the correct receptor-induced refolding of the CD4-binding domain of HIV1 gp 120, *Proteins*, 29, 203-211.

- Lostao M.P.**, B.A. Hirayama, D.D. Loo und E.M. Wright (1994) Phenylglucosides and the Na⁺/glucose cotransporter (SGLT1): analysis of interactions, *J.Membr.Biol.*, 142, 161-170.
- Ludlum D.B.** (1990) DNA alkylation by the haloethylnitrosoureas: nature of modifications produced and their enzymatic repair or removal, *Mutat.Res.*, 233, 117-126.
- Mabic S.**, C:Benezra und J.P.Lepoittevin (1993) Direct Synthesis of Mono-Glycosylated Catechols from Glycosylacetates or imidates Using BF₃.OEt₂ as catalyst., *Tetrahedron Letters*, 34, 4531-4534.
- MacCoss M.**, Chen A.und Toman R.L. (1985) Synthesis of the chiral acyclonucleoside antiherpetic agent (S)-9-(2,3-Dihydroxy-1-propoxymethyl)guanine, *Tetrahedron Letters*, 26, 1815-1818.
- MacPhee D.G.** (1995) Mismatch repair, somatic mutations, and the origins of cancer, *Cancer Res.*, 55, 5489-5492.
- Mahraoui L.**, A. Rodolosse, A. Barbat, E. Dussaulx, A. Zweibaum, M. Rousset und L.E. Brot (1994) Presence and differential expression of SGLT1, GLUT1, GLUT2, GLUT3 and GLUT5 hexose-transporter mRNAs in Caco-2 cell clones in relation to cell growth and glucose consumption, *Biochem.J.*, 298 Pt 3, 629-633.
- Malanaga M.** und **Althaus F.R.** (1994) Poly(ADP-ribose) molecules formed during DNA repair in vivo, *J.Biol.Chem.*, 269, 17691-17696.
- Malapetsa A.**, Noe A.J., Poirier G.G., Desnoyers S., Berger N.A. und Panasci L.C. (1996) Identification of a 116 kDa protein able to bind 1,3-bis(2-chloroethyl)-1-nitrosourea-damaged DNA as poly(ADP-ribose) polymerase, *Mutat.Res.*, 362, 41-50.
- Mattern J.**, R. Koomagi und M. Volm (1998) Smoking-related increase of O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase expression in human lung carcinomas, *Carcinogenesis*, 19, 1247-1250.
- McDougal J.S.**, J.K. Nicholson, G.D. Cross, S.P. Cort, M.S. Kennedy und A.C. Mawle (1986) Binding of the human retrovirus HTLV-III/LAV/ARV/HIV to the CD4 (T4) molecule: conformation dependence, epitope mapping, antibody inhibition, and potential for idiotypic mimicry, *J.Immunol.*, 137, 2937-2944.
- McElhinney R.S.**, D.J. Donnelly, J.E. McCormick, J. Kelly, A.J. Watson, J.A. Rafferty, R.H. Elder, M.R. Middleton, M.A. Willington, T.B.H. McMurry und G.P. Margison (1998) Inactivation of O⁶-alkylguanine-DNA alkyltransferase. 1. Novel O⁶-(hetarylmethyl)guanines having basic rings in the side chain, *J.Med.Chem.*, 41, 5265-5271.
- Meer L.**, S.C. Schold und Kleihues P. (1989) Inhibition of the hepatic O⁶-alkylguanine-DNA-alkyltransferase in vivo by pretreatment with antineoplastic agents, *Biochem.Pharmacol.*, 38, 929-934.
- Middleton M.R.**, J. Kelly, N. Thatcher, D.J. Donnelly, R.S. McElhinney, T.B. McMurry, J.E. McCormick und G.P. Margison (2000) O(6)-(4-bromophenyl)guanine improves the therapeutic index of temozolomide against A375M melanoma xenografts, *Int.J.Cancer*, 85, 248-252.
- Mier W.** (1998) Saccharide und saccharidcluster als Carrier für Chemotherapeutika: Synthese, Charakterisierung und Testung tumorselektiver Prodrugs, Dissertation, Universität Heidelberg
- Misfeldt D.S.** und M.J. Sanders (1981) Transepithelial glucose transport in cell culture, *Am.J.Physiol.*, 240, C92-C95
- Mitchell R.B.** und **M.E. Dolan** (1993) Effect of temozolomide and dacarbazine on O⁶-alkylguanine-DNA-transferase activity and sensitivity of human tumor cells and xenografts to 1,3-bis(2-chloroethyl)-1-nitrosourea, *Cancer Chemother.Pharmacol.*, 32, 59-63.
- Mitra S.** und **B. Kaina** (1993) Regulation of repair of alkylation damage in mammalian genomes, *Prog.Nucleic.Acid.Res.Mol.Biol.*, 44, 109-142.
- Mizuma T.**, S. Masubuchi und S. Awazu (1999) Intestinal absorption of acyclovir beta-glucoside: comparative study with acyclovir, guanosine, and kintin beta-glucoside, *Pharm.Res.*, 16, 69-73.

- Mizuma T.**, K. Ohta und S. Awazu (1994) The beta-anomeric and glucose preferences of glucose transport carrier for intestinal active absorption of monosaccharide conjugates, *Biochim.Biophys.Acta*, 1200, 117-122.
- Mizuma T.**, K. Ohta, M. Hayashi und S. Awazu (1992) Intestinal active absorption of sugar-conjugated compounds by glucose transport system: implication of improvement of poorly absorbable drugs, *Biochem.Pharmacol.*, 43, 2037-2039.
- Mizuma T.**, K. Ohta, M. Hayashi und S. Awazu (1993) Comparative study of active absorption by the intestine and disposition of anomers of sugar-conjugated compounds, *Biochem.Pharmacol.*, 45, 1520-1523.
- Modrich P.** und **Lahue R.** (1996) Mismatch repair in fidelity, genetic recombination and cancer biology, *Annu.Rev.Biochem.*, 65, 101-133.
- Molinete M.**, Vermeulen W. und Bürkle A. (1993) Over production of the poly(ADP-ribose) polymerase DNA-binding domain blocks alkylation-induced DNA repair synthesis in mammalian cells, *EMBO J.*, 12, 2109-2117.
- Moore J.P.** (1997) Co-receptors: implications for HIV pathogenesis and therapy, *Science*, 276, 51-52.
- Moore M.H.**, J.M. Gulbis, E.J. Dodson, B. Demple und P.C. Moody (1994) Crystal structure of a suicidal DNA repair protein: the Ada O6-methylguanine-DNA methyltransferase from *E. coli*, *EMBO J.*, 13, 1495-1501.
- Morimoto K.**, M.E. Dolan, D. Scicchitano und A.E. Pegg (1985) Repair of O6-propylguanine and O6-butylguanine in DNA by O6-alkylguanine-DNA alkyltransferases from rat liver and *E. coli*, *Carcinogenesis*, 6, 1027-1031.
- Morten J.E.** und **G.P. Margison** (1988) Increased O6-alkylguanine alkyltransferase activity in Chinese hamster V79 cells following selection with chloroethylating agents, *Carcinogenesis*, 9, 45-49.
- Moschel R.C.**, M.G. McDougall, M.E. Dolan, L. Stine und A.E. Pegg (1992) Structural features of substituted purine derivatives compatible with depletion of human O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase, *J.Med.Chem.*, 35, 4486-4491.
- Moutouh L.**, Corbeil J. und Richman D.D. (1996) Recombination leads to the rapid emergence of HIV-1 dually resistant mutants under selective drug pressure, *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, 93, 6106-6111.
- Mueckler M.** (1994) Facilitative glucose transporters, *Eur.J.Biochem.*, 219, 713-725.
- Mueckler M.**, R.C. Hresko und M. Sato (1997) Structure, function and biosynthesis of GLUT1, *Biochem.Soc.Trans.*, 25, 951-954.
- Mullin J.M.**, J. Weibel, L. Diamond und A. Kleinzeller (1980) Sugar transport in the LLC-PK1 renal epithelial cell line: similarity to mammalian kidney and the influence of cell density, *J.Cell Physiol.*, 104, 375-389.
- Myers G.** (1989) Human retroviruses and AIDS, in: Los Alamos National Laboratory (Ed.), Los Alamos National Laboratory, Los Alamos, New Mexico, pp. 11-47.
- N.N.** (2000) HIV/Aids-Epidemie: Höchste Infektionsrate in den Ländern Afrikas, *Deutsche Apotheker Zeitung*, 140, 3239-3241.
- Nara P.L.**, K.M. Hwang, D.M. Rausch, J.D. Lifson und L.E. Eiden (1989) CD4 antigen-based antireceptor peptides inhibit infectivity of human immunodeficiency virus in vitro at multiple stages of the viral life cycle, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 86, 7139-7143.
- Newsholme E.A.**, Crabtree B. und Ardawi M.S.M. (1985)The role of high rates of glycolysis and glutamine utilization in rapidly dividing cells, *Bioscience Reports*, 5, 393-400
- Nomoto M.**, K. Yamada, M. Haga und M. Hayashi (1998) Improvement of intestinal absorption of peptide drugs by glycosylation: transport of tetrapeptide by the sodium ion-dependent D-glucose transporter, *J.Pharm.Sci.*, 87, 326-332.

- O'Connor P.J.**, F.C.R. Manning, A.T. Gordon, M.A. Billett, D.P. Cooper, R.H. Elder und G.P. Margison (2000) DNA repair: Kinetics and thresholds, *Toxicologic Pathology*, 28, 375-381.
- Oei S.L.**, J. Griesenbeck und M. Schweiger (1997) The role of poly(ADP-ribosyl)ation, *Rev.Physiol.Biochem.Pharmacol.*, 131, 127-173.
- Ogawa T.**, Beppu W. und Nakabayashi (1981) Trimethylsilyl trifluoromethanesulfonate as an effective catalyst for glycoside synthesis, *Carbohydrate Research*, 93, C6-C9
- Oliver F.J.**, M.J. Menissier-de und G. de-Murcia (1999) Poly(ADP-ribose) polymerase in the cellular response to DNA damage, apoptosis, and disease, *Am.J.Hum.Genet.*, 64, 1282-1288.
- Otteneder M.** und **W.K. Lutz** (1999) Correlation of DNA adduct levels with tumor incidence: carcinogenic potency of DNA adducts, *Mutat.Res.*, 424, 237-247.
- Paalman S.R.**, Sung C. und Clarke N.D. (1997) Specificity of DNA repair methyltransferases determined by competitive inactivation with oligonucleotide substrates: evidence that E.coli Ada repairs O⁶-methylguanine and O⁴-methylthymine with similar efficiency, *Biochemistry*, 36, 11118-11124.
- Pajor A.M.** und **E.M. Wright** (1992) Cloning and functional expression of a mammalian Na⁺/nucleoside cotransporter. A member of the SGLT family, *J.Biol.Chem.*, 267, 3557-3560.
- Pegg A.E.** (2000) Repair of O6-alkylguanine by alkyltransferases, *Mutat.Res.*, 83-100.
- Pegg A.E.**, M. Boosalis, L. Samson, R.C. Moschel, T.L. Byers, K. Swenn und M.E. Dolan (1993) Mechanism of inactivation of human O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase by O6-benzylguanine, *Biochemistry*, 32, 11998-12006.
- Pegg A.E.** und **T.L. Byers** (1992) Repair of DNA containing O6-alkylguanine, *FASEB J.*, 6, 2302-2310.
- Pegg A.E.**, L. Chung und R.C. Moschel (1997) Effect of DNA on the inactivation of O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase by 9-substituted O6-benzylguanine derivatives, *Biochem.Pharmacol.*, 53, 1559-1564.
- Pegg A.E.** und **M.E. Dolan** (1987) Properties and assay of mammalian O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase, *Pharmacol.Ther.*, 34, 167-179.
- Pegg A.E.**, M.E. Dolan und R.C. Moschel (1995) Structure, function, and inhibition of O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase, *Prog.Nucleic.Acid.Res.Mol.Biol.*, 51, 167-223.
- Pegg A.E.**, S. Kanugula, S. Edara, G.T. Pauly, R.C. Moschel und K. Goodtzova (1998) Reaction of O6-benzylguanine-resistant mutants of human O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase with O6-benzylguanine in oligodeoxyribonucleotides, *J.Biol.Chem.*, 273, 10863-10867.
- Pfeifer S.** Pfliegel P. und Borchert H.H. (1995) Biopharmazie: Pharmakokinetik-Bioverfügbarkeit-Biotransformation, 3. Überarbeitete Auflage, Ulstein Mosby GmbH Berlin, Wiesbaden
- Pfleiderer W.** und **Lohrmann R.** (1961) Synthese von 2-Amino-4-Alkoxy-Pteridinen, *Chem.Ber*, 94, 12-18.
- Pieper R.O.** (1997) Understanding and manipulating O6-methylguanine-DNA methyltransferase expression, *Pharmacol.Ther.*, 74, 285-297.
- Pivazyan A.D.**, Birks E.M., Wood T.G., Lin T.-S. und Prusoff W.H. (1992) Inhibition of poly(ADP-ribose) polymerase activity by nucleoside analogs of thymidine, *Biochem.Pharmacol.*, 44, 947-953.
- Pohl J.**, B. Bertram, P. Hilgard, M.R. Nowrousian, J. Stuben und M. Wiessler (1995) D-19575--a sugar-linked isophosphoramidate mustard derivative exploiting transmembrane glucose transport, *Cancer Chemother.Pharmacol.*, 35, 364-370.
- Poppe R.**, U. Karbach, S. Gambaryan, H. Wiesinger, M. Lutzenburg, M. Kraemer, O.W. Witte und H. Koepsell (1997) Expression of the Na⁺-D-glucose cotransporter SGLT1 in neurons, *J.Neurochem.*, 69, 84-94.

- Preston B.D.**, Poiesz B.J. und Loeb L.A. (1988) Fidelity of the HIV-1 reverse transcriptase, *Science*, 242, 1168-1171.
- Preuss I.**, Eberhagen I.; Haas S., Eibl R.H., Kaufmann M. von Mickwitz G. und B. Kaina (1995) O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) activity in breast and brain tumors, *Int.J.Cancer*, 61, 321-326.
- Preuss I.**, R. Thust und B. Kaina (1996) Protective effect of O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) on the cytotoxic and recombinogenic activity of different antineoplastic drugs, *Int.J.Cancer*, 65, 506-512.
- Preuss I.**; Haas S.; Eichhorn U.; Eberhagen I.; Kaufmann M.; Beck T.; Eibl R.H.; Dall P.; Bauknecht T.; Hengstler J.; Wittig B.M.; Dippold W.; Kaina B. (1996) Activity of the DNA repair protein O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) in human tumor and corresponding normal tissue, *Int.J.Cancer*, 20, 130-136.
- Price C.C.** (1975) Chemistry of alkylation, in: Sartorelli A.C. und Johns D.G. (Eds.), *AntHandbook of experimental pharmacology 38/2. Antineoplastic and immunosuppressive agents.*, 2 Edn., Springer-Verlag, Berlin, pp. 1-5.
- Psaroudi M.C.** und **S.A. Kyrtopoulos** (2000) Toxicity, mutation frequency and mutation spectrum induced by dacarbazine in CHO cells expressing different levels of O-6- methylguanine-DNA methyltransferase, *Mutat.Res.Fundam.Mol.Mech.Mut.*, 447, 257-265.
- Rabito C.A.** (1981) Localization of the Na⁺-sugar cotransport system in a kidney epithelial cell line (LLC PK1), *Biochim.Biophys.Acta*, 649, 286-296.
- Rafferty J.A.**, J. Tumelty, M. Skorvaga, R.H. Elder, G.P. Margison und K.T. Douglas (1994) Site-directed mutagenesis of glutamic acid 172 to glutamine completely inactivated human O⁶-alkylguanine-DNA-alkyltransferase, *Biochem.Biophys.Res.Comm.*, 199, 285-291.
- Randles J.** und **G.A. Kimmich** (1978) Effects of phloretin and theophylline on 3-O-methylglucose transport by intestinal epithelial cells, *Am.J.Physiol.*, 234, C64-C72
- Rankin P.W.**, Jacobson E.L., Benjamin R.C., Moss J. und Jacobson M.K. (1989) Quantitative studies of inhibitors of ADP-ribosylation in vitro and in vivo, *J.Biol.Chem.*, 264, 4312-4317.
- Reed J.**, Kinzel V., und Sorg B. (1999) Weiterentwicklung der SWITCH-Inhibitoren. Persönliche Mitteilung
- Reed J.** und **V. Kinzel** (1991) A conformational switch is associated with receptor affinity in peptides derived from the CD4-binding domain of gp120 from HIV I, *Biochemistry*, 30, 4521-4528.
- Reed J.** und **V. Kinzel** (1993) Primary structure elements responsible for the conformational switch in the envelope glycoprotein gp120 from human immunodeficiency virus type 1: LPCR is a motif governing folding, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 90, 6761-6765.
- Reed J.** und **V. Kinzel** (1994) Inhibitors of the conformational switch involved in CD4 binding by the env glycoprotein gp120 from human immunodeficiency virus type 1 (HIV1), *Biochemistry*, 33, 10993-10998.
- Rice W.G.**, Hillyer C.D., Harten B. et al. (1992) Induction of nuclease-mediated apoptosis in tumor cells by C-nitroso-substituted ligands of poly(ADP-ribose) polymerase, *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, 89, 7703-7707.
- Richman D.D.**, Havlir D.V., Corbeil J. et al. (1994) Nevirapine resistance mutations of human immunodeficiency virus, *J.Virol.*, 68, 1660-1666.
- Robert-Koch-Institut** (2000), Fachgebiet Infektionsepidemiologie. HIV/AIDS-Eckdaten und Trends. Epidemiologische Kurzinformation des AIDS-Zentrums im Robert-Koch-Institut. www.rki.de
- Robins M.J.** und **R.K.Robins** (1969) Purine Nucleosides. XXIV. A New Method for the Synthesis of Guanine Nucleosides. The Preparation of 2'-Deoxy-alpha- and beta-guanosines and the corresponding N²-Methyl-Derivates, *J.Org.Chem.*, 34, 2160-2163.

- Roth B.**, J.M.Smith und M.E.Hultquist (1951) Analogs of Pteroylglutamic Acid VIII. 4-Alkoxy Derivates, *J.Am.Chem.Soc.*, 2869
- Roth R.** (1998) Saccharid-konjugierte Antisense-Oligonukleotide: Synthese, Charakterisierung und biologische Validierung, Dissertation, Universität Heidelberg
- Roy S.K.**, R.C. Moschel und M.E. Dolan (1996) Pharmacokinetics and metabolism in rats of 2,4-diamino-6-benzoyloxy-5-nitrosopyrimidine, an inactivator of O⁶-alkylguanine-DNA alkyltransferase, *Drug Metab.Dispos.*, 24, 1205-1211.
- Rydberg B.** und **T. Lindahl** (1982) Nonenzymatic methylation of DNA by the intracellular methyl group donor S-adenosyl-L-methionine is a potentially mutagenic reaction, *EMBO J.*, 1, 211-216.
- Saffhill R.**, G.P. Margison und O'Connor P.J. (1985) Mechanism of carcinogenesis induced by alkylating agents, *Biochem.Biophys.Acta*, 823, 111-145.
- Sancar A.** (1994) Mechanism of DNA excision repair, *Sciences*, 266, 1954-1956.
- Sancar A.** (1995) DNA repair in humans, *Annu.Rev.Genetics*, 69-105.
- Sancar A.** (1996) DNA excision repair, *Annu.Rev.Biochem.*, 65, 6543-6581.
- Schaper M.** (1997) Verteilung, Transport und Wirkungsmechanismus von β -D-Glc-IPM und weiterer o-glykosidisch gekoppelter N,N'-Di-(2-chlorethyl)phosphorsäurediamide, Dissertation, Universität Heidelberg.
- Schmidt R.R.** (1989) Recent developments in the synthesis of glycoconjugates, *Pure and Appl.Chem.*, 61, 1257-1270.
- Schmidt R.R.** und **J.Michel** (1980) Einfache Synthese von Alpha- und Beta-O-Glykosylimidaten; Herstellung von Glykosiden und Disacchariden, *Angew.Chem.*, 92, 763-764.
- Schuurman R.**, Nijhuis M., van Leeuwen R. et al. (1995) Rapid changes in human immunodeficiency virus type 1 RNA load and appearance of drug-resistant virus populations in persons treated with lamivudine, *J.Infect.Dis.*, 171, 1411-1419.
- Seker H.** (1998) β -D-Glucosyl-Iphosphamid Mustard und weitere O-glykosidisch gekoppelte N,N'-Di-(2-chlorethyl)-phosphorsäurediamide: Studien zu enzymatischer Aktivierung, Transport und Genotoxizität, Dissertation, Universität Heidelberg
- Seker H.**, Bertram B., Bürkle A., Kaina B., Pohl J., Koepsell H. und Wiessler M. (2000) Mechanistic aspects of the cytotoxic activity of glufosfamide, a new tumor therapeutic agent, *Br. J. Cancer*, 82, 629-634
- Seeber S.** und **Schütte J.** (1995) *Therapiekonzepte Onkologie*, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New-York.
- Singer B.** und **B. Hang** (1997) What structural features determine repair enzyme specificity and mechanism in chemically modified DNA?, *Chem.Res.Toxicol.*, 10, 713-732.
- Slupphaug G.**, C.D. Mol, B. Kavli, A.S. Arvai, H.E. Krokan und J.A. Tainer (1996) A nucleotide-flipping mechanism from the structure of human uracil-DNA glycosylase bound to DNA [see comments], *Nature*, 384, 87-92.
- Smulson M.E.**, Pang D., Jung M., Dimtchev A., Chasovskikh S., Spoonde A., Simbulan-Rosenthal C. und et al. (1998) Irreversible binding of poly(ADP)ribose polymerase cleavage product to DNA ends revealed by atomic force microscopy: possible role in apoptosis, *Cancer Res.*, 58, 3495-3498.
- Spratt T.E.** und **H. de-los-Santos** (1992) Reaction of O⁶-alkylguanine-DNA alkyltransferase with O⁶-methylguanine analogues: evidence that the oxygen of O⁶-methylguanine is protonated by the protein to effect methyl transfer, *Biochemistry*, 31, 3688-3694.

- Spratt T.E.**, J.D. Wu, D.E. Levy, S. Kanugula und A.E. Pegg (1999) Reaction and binding of oligodeoxynucleotides containing analogues of O6-methylguanine with wild-type and mutant human O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase, *Biochemistry*, 38, 6801-6806.
- Srivenugopal K.S.**, X.H. Yuan, H.S. Friedman und O.F. Ali (1996) Ubiquitination-dependent proteolysis of O6-methylguanine-DNA methyltransferase in human and murine tumor cells following inactivation with O6-benzylguanine or 1,3-bis(2-chloroethyl)-1-nitrosourea, *Biochemistry*, 35, 1328-1334.
- Stüben J.** (1994) Drug Targeting durch Wechselwirkungen zwischen tumorassoziierten Lectinen und oligosidisch gekoppelten N,N'-di-(2-Chlorethyl)-phosphorsäurediamiden: Untersuchungen zur Analytik, Biochemie und Pharmakokinetik, Dissertation, Universität Heidelberg.
- Suto M.J.**, Turner W.R., Arundel-Suto C.M., Werbel L.M. und Sebolt-Leopold J.S. (1991) Dihydroisoquinolinones: the design and synthesis of a new series of potent inhibitors of poly(ADP-ribose)polymerase, *Anti-Cancer Drug Design*, 6, 107-117.
- Szabo C.** und **Dawson V.L.** (1998) Role of poly(ADP-ribose) synthetase in inflammation and ischemia-reperfusion, *Trends Pharmacol.Sci.*, 19, 287-298.
- Teicher B.** (1997) *Cancer Therapeutics: Experimental and Clinical Agents*, Humana Press Inc., Totowan New Jersey, USA.
- Terashima I.** und **K. Kohda** (1998) Inhibition of human O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase and potentiation of the cytotoxicity of chloroethylnitrosourea by 4(6)-(benzyloxy)-2,6(4)-diamino-5-(nitro or nitroso)pyrimidine derivatives and analogues, *J.Med.Chem.*, 41, 503-508.
- Tersmette R.**, Gruters R.A., de Wolf F., de Goede R.E., Lange J.M., Schellekens P.T, Goudsmit J., Huisman H.G. und Miedema F. (1998) Evidence for a role of virulent human immunodeficiency virus (HIV) variants in the pathogenesis of acquired immunodeficiency syndrome. Studies on sequential HIV isolates, *J.Virol.*, 63, 2118-2125.
- Thornberry N.A.** und **Lazebnik Y.** (1998) Caspases: enemies within, *Science*, 281, 1312-1316.
- Thraves P.**, Mossman K.L., Brennan T. und Dritschilo A. (1985) Radiosensitization of human fibroblasts by 3-aminobenzamide: an inhibitor of poly(ADP-ribosylation), *Radiat.Res.*, 104, 119-127.
- Tong W.P.**, Kirk M.C. und Ludlum D.B. (1983) Mechanism of action of the nitrosoureas, *Biochem.Pharmacol.*, 32, 2011-2015.
- Tong W.P.**, Kohn K.W. und Ludlum D.B. (1982) Modifications of DNA by different haloethylnitrosoureas, *Cancer Res.*, 42, 4460-4464.
- Traunecker A.**, W. Luke und K. Karjalainen (1988) Soluble CD4 molecules neutralize human immunodeficiency virus type 1, *Nature*, 331, 84-86.
- Vassilyev D.G.**, T. Kashiwagi, Y. Mikami, M. Ariyoshi, S. Iwai, E. Ohtsuka und K. Morikawa (1995) Atomic model of a pyrimidine dimer excision repair enzyme complexed with a DNA substrate: structural basis for damaged DNA recognition, *Cell*, 83, 773-782.
- Vera J.C.**, A.M. Reyes, J.G. Carcamo, F.V. Velasquez, C.I. Rivas, R.H. Zhang, P. Strobel, R. Iribarren, H.I. Scher, J.C. Slebe und a. et (1996) Genistein is a natural inhibitor of hexose and dehydroascorbic acid transport through the glucose transporter, GLUT1, *J.Biol.Chem.*, 271, 8719-8724.
- Vera J.C.**, C.I. Rivas, J. Fischbarg und D.W. Golde (1993) Mammalian facilitative hexose transporters mediate the transport of dehydroascorbic acid, *Nature*, 364, 79-82.
- Veyhl M.**, K. Wagner, C. Volk, V. Gorboulev, K. Baumgarten, W.M. Weber, M. Schaper, B. Bertram, M. Wiessler und H. Koepsell (1998) Transport of the new chemotherapeutic agent beta-D-glucosylisophosphoramid mustard (D-19575) into tumor cells is mediated by the Na⁺-D-glucose cotransporter SAAT1, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 95, 2914-2919.

- Vince R. und Hua M. (1990)** Synthesis and anti-HIV activity of carbocyclic 2',3'-didehydro-2',3'-dideoxy 2,6-disubstituted purine nucleosides, *J.Med.Chem.*, 33, 17-21.
- Vincenzini M.T., T. Iantomasi, M. Stio, C. Treves, F. Favilli und P. Vanni (1987)** 1-O-n-octyl-beta-D-glucopyranoside as a competitive inhibitor of Na⁺-dependent D-glucose cotransporter in the small intestine brush-border membrane, *Biochim.Biophys.Acta*, 903, 273-276.
- von Stosch S.A., V. Kinzel und J. Reed (1996)** Extension of the polarity-dependent "Switch Phenomenon" of the gp120 binding domain as a target for antiretroviral chemotherapy, *Biochemistry*, 35, 411-417.
- Vora R.A., A.E. Pegg und S.E. Ealick (1998)** A new model for how O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase binds DNA, *Proteins*, 32, 3-6.
- Wagner H. (1993)** Pharmazeutische Biologie 2: Drogen und ihre Inhaltsstoffe, 5.neubearbeitete Auflage, Gustav Fischer Verlag Stuttgart, New-York
- Wagner R., Mayer J. und Wolf H. (1995)** Neue Erkenntnisse zur HIV-Pathogenese. Auswirkungen auf Therapie und Impfstoffentwicklung, *Dtsch.Med.Wochenschr.*, 120, 728-736
- Waldmann H., Böhm G., Schmid U. und Röttele H. (1994)** O-Glucosidsynthesen unter neutralen Bedingungen in konzentrierten Lösungen von LiClO₄ in organischen Solventien, *Angew.Chem.*, 106, 2024-2025.
- Wali R.K., S. Skarosi, J. Hart, Y. Zhang, M.E. Dolan, R.C. Moschel, L. Nguyen, R. Mustafi, T.A. Brasitus und M. Bissonnette (1999)** Inhibition of O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase increases azoxymethane-induced colonic tumors in rats, *Carcinogenesis*, 20, 2355-2360.
- Walmsley A.R., M.P. Barrett, F. Bringaud und G.W. Gould (1998)** Sugar transporters from bacteria, parasites and mammals: structure-activity relationships, *Trends.Biochem.Sci.*, 23, 476-481.
- Wang L.D., Spratt T.E., Liu X.L., Hecht S.S., A.E. Pegg und R.O. Pieper (1997)** Pyridyloxybutyl adduct, O⁶-[4-oxo-4-(3pyridyl)butyl]guanine, is present in 4-acetoxymethylnitrosamino-1-(3-pyridyl)-1-butanone-treated DNA and is substrate for O⁶-alkylguanine-DNA-alkyltransferase, *Chem.Res.Toxicol.*, 10, 562-567.
- Wasserman T.H., Slavik M. und Carter S.K. (1975)** Clinical comparison of the nitrosoureas, *Cancer*, 36, 1258-1268.
- Wei X., Ghosh S.K., Taylor M.E., Johnson V.A., Emini E.A., Deutsch P., Lifson J.D., Bonhoeffer S., Nowak M.A., Hahn B.H., Saag M.S. und Shaw G.M. (1995)** Viral dynamics in human immunodeficiency virus type 1 infection, *Nature*, 373, 117-122.
- Weiss R.A. (1996)** HIV receptors and the pathogenesis of AIDS, *Science*, 272, 1885-1886.
- White A.W. (1996)** The Design of novel inhibitors of Poly (ADP-ribose)polymerase to potentiate cytotoxic drugs, Dissertation, University of Newcastle upon Tyne
- Wibley J.E., J.H. McKie, K. Embrey, D.S. Marks, K.T. Douglas, M.H. Moore und P.C. Moody (1995)** A homology model of the three-dimensional structure of human O⁶-alkylguanine-DNA alkyltransferase based on the crystal structure of the C-terminal domain of the Ada protein from *Escherichia coli* [published erratum appears in *Anticancer Drug Des* 1995 Jul;10(5):439], *Anticancer Drug Des.*, 10, 75-95.
- Wibley J.E., A.E. Pegg und P.C. Moody (2000)** Crystal structure of the human O⁶-alkylguanine-DNA alkyltransferase, *Nucleic.Acids.Res.*, 28, 393-401.
- Wießler M. und Scheulen M.E. (1995)** Antineoplastisch wirksame Substanzen, in: Seeber S. und Schütte J. (Hrsg.), *Therapiekonzepte Onkologie*, 2.vollst.überarb. und erw. Aufl. Edn., Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New-York, pp. 32-78.
- Wießler M. und Bertram B. (2000)** Ergebnisse der klinischen Prüfungen Phase 1 des Glu-IPM. 2000. Persönliche Mitteilung

- Wilkinson M.C.**, P.M. Potter, L. Cawkwell, P. Georgiadis, D. Patel, P.F. Swann und G.P. Margison (1989) Purification of the E. coli ogt gene product to homogeneity and its rate of action on O⁶-methylguanine, O⁶-ethylguanine and O⁴-methylthymine in dodecadeoxyribonucleotides, *Nucleic.Acids.Res.*, 17, 8475-8484.
- Willey R.**, Rutledge R., Dias S., Folks T., Theodore T., Buckler C. und Martin M. (1986) Identification of conserved and divergent domains within the envelope gene of the acquired immunodeficiency virus, *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, 83, 5038-5042.
- Willson J.K.**, Haaga J.R., Trey K.E., Stellato T.A., Gordon N.H. und Gerson S.L. (1995) Modulation of O⁶-alkyltransferase-directed DNA repair in metastatic colon cancers, *J.Clin.Oncol.*, 2301-2308.
- Xu W.M.**, J. Leitao, S. Kanugula and A.E. Pegg (1999) Alteration of the conserved residue tyrosine-158 to histidine renders human O⁶-alkylguanine-DNA alkyltransferase insensitive to the inhibitor O⁶-benzylguanine, *Cancer Res.*, 59, 1514-1519.
- Xu W.M.**, J. Leitao, S. Kanugula, W.J. Meehan und A.E. Pegg (1999) Role of codon 160 in the sensitivity of human O⁶-alkylguanine-DNA alkyltransferase to O⁶-benzylguanine, *Biochem.Pharmacol.*, 58, 1279-1285.
- Yabro J.W.** (1992) The scientific basis of cancer chemotherapy, in: Perry M.C. (Hrsg.), *The Chemotherapy source Book*, pp. 2-14.
- Yamazaki A.** (1969) Synthesis of 9-(4'-Hydroxybutyl)-2-amino-6hydroxypurine-4'-Phosphate, *Chem.Pharm.Bull.*, 17, 1268-1270.
- You G.**, W.S. Lee, E.J. Barros, Y. Kanai, T.L. Huo, S. Khawaja, R.G. Wells, S.K. Nigam und M.A. Hediger (1995) Molecular characteristics of Na(+)-coupled glucose transporters in adult and embryonic rat kidney, *J.Biol.Chem.*, 270, 29365-29371.
- Zeller W.H.** und **zur Hausen H.** (1998) *Onkologie: Grundlagen, Diagnostik, Therapie, Entwicklungen*, Ecomed Verlagsgesellschaft AG & Co. KG, Landsberg/Lech.
- Zheng, J.J.**, K.K. Chan und F. Muggia (1994) Preclinical pharmacokinetics and stability of isophosphoramide mustard, *Cancer Chemother.Pharmacol.*, 33, 391-398.

VERÖFFENTLICHUNGEN

PUBLIKATIONEN

Jost Reinhard, Uta Eichhorn, Hans-Christian Kliem, Claus Wilhelm von der Lieth, Bernd Kaina; Monosaccharide linked inhibitors of human O⁶-methylguanine-DNA-methyltransferase (MGMT): Synthesis, Molecular modeling and structure-activity-relationship. Eingereicht bei *Journal of Medicinal Chemistry*

Jost Reinhard, Uta Eichhorn, Manfred Wiessler, Bernd Kaina; Inactivation of O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) by glucose-conjugated inhibitors. Eingereicht bei *International Journal of Cancer*

VORTRÄGE

„Drug Targeting by monosaccharide conjugation“; 3. Graduiertenforum des DKFZ Schmitten-Oberreifenberg/Taunus; 25.-27. April 1999

„Entwicklung von selektiven Inhibitoren der Methylguaninmethyltransferase“; 6. Tagung des DNA-Reparatur-Netzwerkes; Essen; 4.-5. Juni 1999

POSTERBEITRÄGE

„Monosaccharide linked inhibitors of human O⁶-methylguanine-DNA-methyltransferase as compounds for a novel drug targeting concept“, Molecular Aspects of Chemotherapy; Danzig, Polen; 8.-11. September 1999

„Monosaccharide-linked inhibitors of human O⁶-methylguanine-DNA-Methyltransferase as compounds for a novel drug targeting concept“, Posterausstellung der Doktoranden des DKFZ; Heidelberg; Januar 2000

„Novel inhibitors of the DNA-repair enzyme O⁶-methylguanine-DNA-methyltransferase (MGMT) to increase chemotherapeutic effectiveness of methylating- and chloroethylating agents“, European Graduate Student Meeting for Pharmaceutical Sciences; Frankfurt; März 2000; Beitrag in *Archiv der Pharmazie, Supl.1/00, Vol.333, p.25*

„Monosaccharide linked inhibitors of human O⁶-methylguanine-DNA-methyltransferase exhibiting higher activity than O⁶-benzylguanine“, Jahrestagung der American Association for Cancer Research; San Francisco; 1.-5. April 2000; Beitrag in *Proceedings of the National Academy for Cancer Research; Vol.41 (2000), p.282*

„DNA-Repair modification to increase effectiveness of methylating- and chloroethylating agents“, 4. Graduiertenforum des DKFZ; Schmitten-Oberreifenberg/Taunus; 14.-16. Mai 2000

AUSZEICHNUNG

Auszeichnung anlässlich des 2nd European Graduate Student Meeting for Pharmaceutical Sciences der Deutschen Pharmazeutischen Gesellschaft und der European Pharmaceutical Association vom 2.-5. März 2000 für den Posterbeitrag „Novel inhibitors of the DNA-repair enzyme O⁶-methylguanine-DNA-methyltransferase (MGMT) to increase chemotherapeutic effectiveness of methylating- and chloroethylating agents“

LEBENS LAUF

NAME: Jost Reinhard
GEBURTSDATUM: 28. April 1972
GEBURTSORT: Traben-Trarbach
FAMILIENSTAND: Ledig
ELTERN: Paul Reinhard
Herta Reinhard, geb.: Possardt
GESCHWISTER: Lutz Reinhard

SCHULBILDUNG:

1978-1982 Grundschole Traben-Trarbach
1982-1991 Gymnasium Traben-Trarbach
August 1988 - Januar 1989 Zephyrhills High School, Florida, USA

ZIVILDIENTST:

Juli 1991 - Oktober 1992 Deutsches Rotes Kreuz, Bereich Rettungsdienst
Kreisverband Bernkastel-Wittlich

HOCHSCHULAUSSBILDUNG

SS 1993 - WS 1996/1997 Pharmaziestudium an der Rheinischen-Friedrich-Wilhelms-Universität, Bonn
März 1995 1. Pharmazeutisches Staatsexamen
WS 1995/1996 Pharmaziestudium als Erasmusstipendiat an der Université de Bourgogne, Dijon, Frankreich
März 1997 2. Pharmazeutisches Staatsexamen
April 1997 - Oktober 1997 Pharmaziepraktikum in der Apotheke am Strausberger Platz, Berlin
November 1997 - April 1998 Pharmaziepraktikum in der Apotheke der Universitätskliniken, Valencia, Spanien
Mai 1998 3. Pharmazeutisches Staatsexamen
Juni 1998 Approbation als Apotheker
Juli 1998 – November 2000 Dissertation in der Abteilung Molekulare Toxikologie am Deutschen Krebsforschungszentrum in Heidelberg unter Leitung von Prof. Dr. Manfred Wießler:

Monosaccharid-Konjugate von Inhibitoren der O⁶-Methylguanin-DNA methyltransferase, der Poly-(ADP-ribose) Polymerase und des SWITCH Phänomens des HIV-Hüllproteins gp120: Synthese, Biologische Aktivität und Struktur-Wirkungsbeziehungen.