

Random Chemistry
-
Leitstruktursuche mittels Fentons Reagenz

Dissertation zur Erlangung des
naturwissenschaftlichen Doktorgrades
der Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von
Eva Kugelman
aus Wertingen

Würzburg 2011

Eingereicht am

bei der Fakultät für Chemie und Pharmazie

1. Gutachter

2. Gutachter

der Dissertation

1. Prüfer

2. Prüfer

3. Prüfer

des Öffentlichen Promotionskolloquiums

Tag des Öffentlichen Promotionskolloquiums

.....

Doktorurkunde ausgehändigt am

.....

In Liebe und Dankbarkeit
Eugen Kugelman

*April 1945 – †September 2010

*Vielleicht begegnen wir der Wahrheit
nur durch Zufall.*

Honoré de Balzac (1799-1850)

1 EINLEITUNG	1
1.1 Antiinfektiva	1
1.1.1 Antibiotika	1
1.1.2 Chinolone.....	3
1.1.2.1 <i>Geschichte der Fluorchinolone</i>	3
1.1.2.2 <i>Struktur-Wirkungs-Beziehungen</i>	5
1.1.2.3 <i>Wirkungsspektrum</i>	6
1.1.2.4 <i>Antibakterielle Aktivität der Chinolone</i>	8
1.1.3 Resistenzentwicklung	13
1.1.3.1 <i>Resistenzsituation</i>	13
1.1.3.2 <i>Pharmakokinetik</i>	14
1.2 Arzneimittelforschung	15
1.2.1 Leitstruktursuche und Leitstrukturoptimierung	15
1.2.1.1 <i>Naturstoffe als Leitstrukturen</i>	16
1.2.1.2 <i>Kombinatorische Chemie</i>	17
1.2.1.3 <i>Strukturbasierter und computergestützter Entwurf von Wirkstoffen</i>	17
1.2.1.4 <i>Lipinski's „Rule of Five“</i>	18
1.2.2 Leitstruktursuche mittels Random Chemistry	18
1.3 Random Chemistry	19
1.3.1 γ - Bestrahlung und Reaktion der Primärprodukte	21
1.3.2 Fentons Reagenz	22
1.4 Problemstellung und Zielsetzung der Arbeit	26
2 LEITSTRUKTURSUCHE MIT FENTONS REAGENZ	29
2.1 Synthese der Ausgangssubstanzen	29
2.1.1 Synthese von 6-Fluor-1-(2-fluorphenyl)-4-oxo-7-(piperazin-1-yl)-1,4-dihydro- chinolin-3-carbonsäure 1	29
2.1.2 Synthese von 4-Oxo-1,4-dihydrochinolin-3-carbonsäure 2	31

2.2 Analyse der Umsetzung von Chinolon 1	32
2.2.1 Umsetzung mit Fentons Reagenz.....	32
2.2.2 Fraktionierung der Substanzbibliothek und Hit-Suche.....	34
2.2.2.1 <i>Bioaktivitätsgeleitete Fraktionierung</i>	34
2.2.2.2 <i>Entwicklung einer HPLC-Methode zur Trennung der entstandenen</i>	35
<i>Substanzbibliothek</i>	35
2.2.2.3 <i>HPLC-Trennung und Up-Scaling</i>	39
2.2.2.4 <i>Fraktionierung der Substanzbibliothek und 1. Aktivitätstestung</i>	42
2.2.2.5 <i>Subfraktionierung und 2. Aktivitätstestung</i>	45
2.2.3 Isolierung der biologisch aktiven Substanzen.....	53
2.2.4 Identifizierung der isolierten Substanzen.....	54
2.2.4.1 <i>Identifizierung von Substanz Frk1-2c</i>	57
2.2.4.2 <i>Identifizierung von Substanz Frk1-1c</i>	63
2.2.5 Mikrobiologische Testung der Reinsubstanzen	73
2.2.6 Synthese	74
2.2.6.1 <i>Synthese von Amiden in Position 7</i>	74
2.2.6.2 <i>Synthese von Amiden in Position 7 und 3</i>	82
2.2.6.3 <i>Mikrobiologische Testungen</i>	83
2.3 Analyse der Umsetzung von Chinolon 2	89
2.3.1 Umsetzung mit Fentons Reagenz.....	89
2.3.2 Fraktionierung der Substanzbibliothek und Hit-Suche.....	89
2.3.2.1 <i>HPLC-Trennung der Substanzbibliothek und Up-Scaling</i>	89
2.3.2.2 <i>Fraktionierung der Substanzbibliothek und 1. Aktivitätstestung</i>	91
2.3.2.3 <i>Subfraktionierung und 2. Aktivitätstestung</i>	92
2.3.3 Identifizierung der Substanzen	94
2.3.3.1 <i>Synthese möglicher Substanzen</i>	94
2.3.3.2 <i>Identifizierung durch Spiken</i>	98
2.3.4 Mikrobiologische Testungen	100
2.4 Zusammenfassung und Diskussion	101

3 METABOLISMUSVORHERSAGE MIT FENTONS REAGENZ	103
3.1 Cytochrom-P450-Katalysezyklus	103
3.2 Umsetzungen mit Fentons Reagenz.....	105
3.2.1 Umsetzung von Cinoxacin mit Fentons Reagenz	106
3.2.2 Umsetzung von Linezolid mit Fentons Reagenz	107
3.2.3 Umsetzung von Ciprofloxacin mit Fentons Reagenz	115
3.3 Zusammenfassung und Diskussion	125
4 ZUSAMMENFASSUNG	127
5 SUMMARY	130
6 EXPERIMENTELLER TEIL	133
6.1 Allgemeine Angaben	133
6.1.1 Verwendete Geräte.....	133
6.1.2 Chromatographie.....	134
6.1.3 Chemikalien und Lösungsmittel	136
6.1.4 Abkürzungen.....	137
6.2 Umsetzungen mit Fentons Reagenz.....	139
6.2.1 Umsetzung von 6-Fluor-1-(2-fluorphenyl)-4-oxo-7-(piperazin-1-yl)-1,4- dihydrochinolin-3-carbonsäure 1 mit Fentons Reagenz	139
6.2.2 Umsetzung von 4-Oxo-1,4-dihydroquinoline-3-carbonsäure 2 mit Fentons Reagenz.....	139
6.2.3 Umsetzung von Cinoxacin mit Fentons Reagenz	140
6.2.4 Umsetzung von Linezolid mit Fentons Reagenz	140
6.2.5 Umsetzung von Ciprofloxacin mit Fentons Reagenz	141
6.3 Synthesevorschriften und analytische Daten.....	142
6.3.1 Synthese von 6-Fluor-1-(2-fluorphenyl)-4-oxo-7-(piperazin-1-yl)-1,4-	

dihydrochinolin-3-carbonsäure 1	142
6.3.2 Synthese von Ethyl-2-(2,4-dichlor-5-fluorbenzoyl)-3-((2-fluorphenyl)amino)-acrylat 3	143
6.3.3 Synthese von Ethyl-7-chlor-6-fluor-1-(2-fluorphenyl)-4-oxo-1,4-dihydrochinolin-3-carboxylat 4	144
6.3.4 Synthese von Ethyl-4-oxo-1,4-dihydrochinolin-3-carboxylat 7	145
6.3.5 Synthese von 7-((2-Aminoethyl)amino)-6-fluor-1-(2-fluorphenyl)-4-oxo-1,4-dihydrochinolin-3-carbonsäure 8	145
6.3.6 Synthese von 7-(<i>N</i> -(2-Aminoethyl)formamido)-6-fluor-1-(2-fluorphenyl)-4-oxo-1,4-dihydrochinolin-3-carbonsäure 9	147
6.3.7 Synthese von 6-Fluor-1-(2-fluorphenyl)-7-((2-methoxyethyl)amino)-4-oxo-1,4-dihydrochinolin-3-carbonsäure 10	148
6.3.8 Synthese von 6-Fluor-1-(2-fluorphenyl)-7-((2-hydroxyethyl)amino)-4-oxo-1,4-dihydrochinolin-3-carbonsäure 11	149
6.3.9 Synthese von 6-Fluor-1-(2-fluorphenyl)-7-(methylamino)-4-oxo-1,4-dihydrochinolin-3-carbonsäure 12	150
6.3.10 Synthese von 6-Fluor-1-(2-fluorphenyl)-4-oxo-7-(propylamino)-1,4-dihydrochinolin-3-carbonsäure 13	151
6.3.11 Synthese von 7-((2-(Dimethylamino)ethyl)amino)-6-fluor-1-(2-fluorphenyl)-4-oxo-1,4-dihydrochinolin-3-carbonsäure 14	153
6.3.12 Synthese von 7-(Benzylamino)-6-fluor-1-(2-fluorphenyl)-4-oxo-1,4-dihydrochinolin-3-carbonsäure 16	154
6.3.13 Synthese von 7-Amino-6-fluor-1-(2-fluorphenyl)-4-oxo-1,4-dihydrochinolin-3-carbonsäure 17	155
6.3.14 Synthese von 6-Fluor-1-(2-fluorphenyl)-7-(4-formylpiperazin-1-yl)-4-oxo-1,4-dihydrochinolin-3-carbonsäure 21	156
6.3.15 Synthese von 7-Acetamido-6-fluor-1-(2-fluorphenyl)-4-oxo-1,4-dihydrochinolin-3-carbonsäure 22	158
6.3.16 Synthese von 6-Fluor-1-(2-fluorphenyl)-7-(<i>N</i> -methylacetamido)-4-oxo-1,4-dihydrochinolin-3-carbonsäure 23	159
6.3.17 Synthese von 7-((2-Acetamidoethyl)amino)-6-fluor-1-(2-fluorphenyl)-4-oxo-	

1,4-dihydro-chinolin-3-carbonsäure 25	160
6.3.18 Synthese von 7-(4-Acetylpiperazin-1-yl)-6-fluor-1-(2-fluorphenyl)-4-oxo-1,4-dihydrochinolin-3-carbonsäure 26	161
6.3.19 Synthese von 6-Fluor-1-(2-fluorphenyl)-4-oxo-7-(3-oxopiperazin-1-yl)-1,4-dihydrochinolin-3-carbonsäure 27	162
6.3.20 Synthese von 7-(4-Carbamoylpiperidin-1-yl)-6-fluor-1-(2-fluorphenyl)-4-oxo-1,4-dihydrochinolin-3-carbonsäure 28	164
6.3.21 Synthese von <i>N</i> -(2,4-Dichlorbenzyl)-6-fluor-1-(2-fluorphenyl)-4-oxo-7-(3-oxo-piperazin-1-yl)-1,4-dihydrochinolin-3-carboxamid 29	165
6.3.22 Synthese von 7-(4-Carbamoylpiperidin-1-yl)- <i>N</i> -(2,4-dichlorbenzyl)-6-fluor-1-(2-fluorphenyl)-4-oxo-1,4-dihydrochinolin-3-carboxamid 30	166
6.3.23 Synthese von 7-(4-Acetylpiperazin-1-yl)- <i>N</i> -(2,4-dichlorbenzyl)-6-fluor-1-(2-fluorphenyl)-4-oxo-1,4-dihydrochinolin-3-carboxamid 31	167
6.3.24 Synthese von <i>N</i> -(2,4-Dichlorbenzyl)-6-fluor-1-(2-fluorphenyl)-7-(4-formylpiperazin-1-yl)-4-oxo-1,4-dihydrochinolin-3-carboxamid 32	169
6.3.25 Synthese von 7-((2-Acetamidoethyl)amino)- <i>N</i> -(2,4-dichlorbenzyl)-6-fluor-1-(2-fluorphenyl)-4-oxo-1,4-dihydrochinolin-3-carboxamid 33	170
6.3.26 Synthese von 6-Fluor-1-(2-fluorphenyl)-7-(piperazin-1-yl)chinolin-4(1 <i>H</i>)-on 34	171
6.3.27 Synthese von Diethyl-2-((methyl(phenyl)amino)methylen)malonat 35	172
6.3.28 Synthese von Methyl-4-oxo-1,4-dihydrochinolin-3-carboxylat 39	173
7 ANHANG	174
8 LITERATURVERZEICHNIS	177
9 DANKSAGUNG	197

1 EINLEITUNG

1.1 Antiinfektiva

Antiinfektiva sind Arzneimittel, die zur Bekämpfung von Erregern von Infektionskrankheiten eingesetzt werden. Dabei lassen sich vier große Klassen unterscheiden:

- Antibiotika zur Therapie bakterieller Erkrankungen
- antiprotozoische Wirkstoffe zur Therapie parasitärer Infekte
- Antimykotika zur Therapie von Pilzkrankungen und
- Virustatika zur Therapie viraler Erkrankungen

1.1.1 Antibiotika

Antibiotika sind Stoffe, die im Körper Mikroorganismen schädigen oder abtöten können, d. h. bakteriostatisch oder bakterizid wirken können, dies jedoch in Konzentrationen, die für den Menschen oder das Tier weitestgehend nicht toxisch sind. Diese selektive Toxizität beruht auf dem Angriff des Antibiotikums an Zielstrukturen, die beim Menschen nicht oder nur in deutlich unterschiedlicher Form vorkommen. Die Wirkung des Antibiotikums kann dabei je nach Angriffspunkt auf unterschiedlichen Mechanismen beruhen.¹

- Hemmung der Zellwandsynthese
- Störung der Permeabilität der Zytoplasmamembran
- Blockade der Proteinsynthese
- Hemmung der Nukleinsäuresynthese

Die unterschiedlichen sich auf dem Markt befindenden Antibiotika werden folglich nach Angriffspunkt und damit Mechanismus, in den sie eingreifen, unterteilt.

Tabelle 1 Einteilung der Antibiotika nach ihrem Angriffspunkt

Zellwandsynthese	Permeabilität der Zytoplasmamembran	Proteinsynthese	Nukleinsäuresynthese
β -Lactame	Polypeptid-Antibiotika	Aminoglycoside	Sulfonamide
Glykopeptide		Tetracycline Makrolide	Chinolone

Zur Hemmung der Zellwandsynthese führt neben der Anwendung der β -Lactam-Antibiotika vor allem die der Glykopeptide. Zu den β -Lactamen zählen Penicilline und Cephalosporine. Sie hemmen die Transpeptidase und damit die Quervernetzung bei der Synthese des Peptidoglykans (Mureins), das das Grundgerüst der bakteriellen Zellwand bildet. Glykopeptide hingegen, wie etwa das Vancomycin, greifen bereits einen Schritt eher in die Mureinsynthese ein und verhindern die Elongation der Peptidoglykanketten durch Bindung an das UDP-Muramylpentapeptid.

Polypeptid-Antibiotika stören die Permeabilität der Zytoplasmamembran; durch diese direkte Schädigung der mikrobiellen Zytoplasmamembran werden wiederum Transportmechanismen gehemmt, wodurch für die Bakterienzelle schädliche Stoffe nicht mehr aus dieser hinaus transportiert werden können.

Aminoglykoside wie Streptomycin oder Gentamicin und Tetracycline wie Doxycyclin führen zu einer Blockade der Proteinsynthese durch die Bindung an bakterielle Ribosomen. Aminoglykoside wirken dabei bakterizid, Tetracycline nur bakteriostatisch. Makrolid-Antibiotika wie Erythromycin, die ebenfalls zu dieser Klasse gezählt werden, stören die Elongation der Proteinsynthese durch die Hemmung der Translokation.

Die Hemmung der Nukleinsäuresynthese induzieren sowohl Sulfonamide als auch Chinolone. Sulfonamide verdrängen dabei kompetitiv die p-Aminobenzoensäure, die von den Bakterien zum Aufbau der Dihydrofolsäure benötigt wird.¹ Im Gegensatz dazu unterbrechen Chinolone die bakterielle DNA-Synthese durch Hemmung der Gyrase, d. h. einer den Bakterien eigenen Topoisomerase. Häufig werden sie deshalb auch als Gyrasehemmer bezeichnet.

1.1.2 Chinolone

Chinolone stellen als systemische Chemotherapeutika eine Gruppe von Wirkstoffen dar, die mit einem breiten antimikrobiellen Wirkspektrum sowohl Gram-positive als auch Gram-negative Mikroorganismen, darunter auch Chlamydien und Mykoplasmen, erfassen. In der Humanmedizin sind sie oft das Mittel erster Wahl; in der Tiermedizin kommen sie prophylaktisch zur Vermeidung von Erkrankungen bei größeren Tierbeständen oder metaphylaktisch bei klinisch manifesten bakteriellen Erkrankungen zur Anwendung.²

1.1.2.1 Geschichte der Fluorchinolone

Anfang der sechziger Jahre erwies sich ein Zwischenprodukt der Chloroquin-Synthese als antibakteriell wirksam, aus dem die Nalidixinsäure (Abbildung 1) entwickelt wurde. Bereits 1962 wurde der Wirkstoff unter dem Handelsnamen Nogram[®] zur Behandlung von Harnwegsinfektionen in der Humanmedizin eingeführt. Die schlechte Resorption von Nalidixinsäure, ihr nur wenige Erreger umfassendes Wirkspektrum sowie die sehr schnelle Bildung von Resistenzen, führten zu einer nur kurzzeitigen Anwendung von Nogram[®]. Erst Variationen des Substitutionsmusters am Grundgerüst führten daraufhin zu weitaus wirksameren Chinolonen, die auch heute noch eingesetzt werden.³

Einen wichtigen Meilenstein in der Geschichte der Gyrasehemmstoffe stellt die Synthese der Pipemidsäure (Abbildung 1) dar, die aufgrund des zusätzlichen Piperazinrings in Position 7 eine stark verbesserte Pharmakokinetik und Wirksamkeit zeigte. Ebenso stellt die Einführung des Fluoratoms in Position 6 des Chinolon-Grundgerüsts einen großen Durchbruch dar. Im Vergleich zu heutigen Vertretern, wiesen die Chinolone der 1. Generation jedoch trotz allem noch eine ungünstige Pharmakokinetik und eine geringe antibakterielle Aktivität auf. Darüber hinaus wurden sie sehr schlecht resorbiert und hatten ein relativ enges Wirkspektrum.

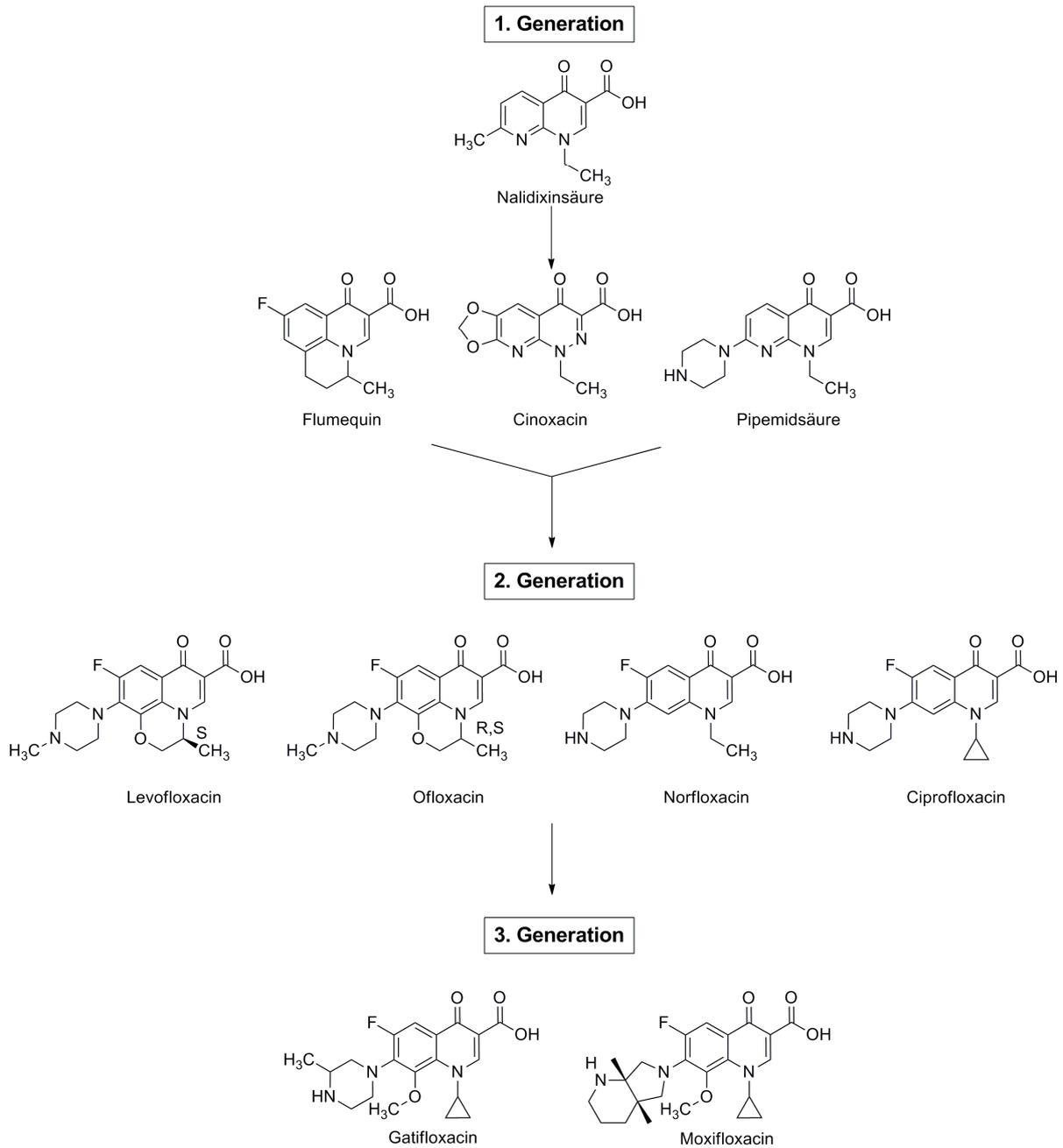


Abbildung 1 Strukturformeln wichtiger Chinolone^{4;5}

Norfloxacin war 1984 der erste Vertreter der Chinolone der 2. Generation, der auf den Markt gebracht wurde. Zum ersten Mal wurde nun das Fluor in Position 6 und der Piperazinring in Position 7 in einem Molekül vereint. Norfloxacin wies eine eindeutig

bessere Bioverfügbarkeit auf, hatte eine längere Halbwertszeit und ein breiteres Erregerspektrum, insbesondere im Gram-negativen Bereich.⁶

In den darauf folgenden Jahren kamen nacheinander zahlreiche weitere Fluorchinolone, wie etwa 1985 das Ofloxacin, 1987 das Ciprofloxacin und 1997 das Sparfloxacin auf den Markt. Ciprofloxacin und Ofloxacin, die auch gegen Gram-positive Keime wirksam sind, können als die potentesten Mittel dieser Gruppe angesehen werden. Die neueren Chinolone der 3. Generation wie etwa Moxifloxacin und Gatifloxacin zeichnen sich außerdem durch eine zusätzliche Wirksamkeit gegen Anaerobier und andere atypische Erreger aus.⁷

1.1.2.2 Struktur-Wirkungs-Beziehungen

Als Grundgerüst der meisten Vertreter dieser Antibiotika-Gruppe dient ein Chinolin-Ringsystem (Abbildung 2), welches durch die Einführung einer Ketogruppe in Position 4, wodurch ein vinyloges Amid entsteht, und einer Carboxygruppe in Position 3 modifiziert wurde. Diese häufig auch als „Chinolon-Antibiotika“ bezeichneten Verbindungen weisen nun eine deutlich erhöhte Affinität zur bakteriellen Gyrase auf. Weitere Variationen im restlichen Substitutionsmuster des Grundgerüsts entscheiden über das bakterielle Wirkspektrum, über mögliche Nebenwirkungen und über die Pharmakokinetik.^{8;9}

So hat die Einführung von Substituenten in Position 1 einen direkten Einfluss auf die Wirksamkeit und die Pharmakokinetik. Oft werden hier kleine aliphatische Reste eingebaut, wie Cyclopropyl- oder Ethylreste, jedoch gibt es auch Vertreter mit Arylresten oder Brücken zum C-8. In Position 5 hingegen werden vornehmlich kleine polare Gruppen wie Amino- oder Hydroxylfunktionen bevorzugt, die zu einer Aktivitätssteigerung gegenüber Gram-positiven Erregern führen. Die Einführung eines Fluoratoms als Substituent in Position 6 sowie die Einführung eines Piperazins in Position 7 des Chinolongrundgerüsts schufen, wie bereits erwähnt, eine gänzlich neue Gruppe der 4-Chinolone, die sogenannten Fluorchinolone.

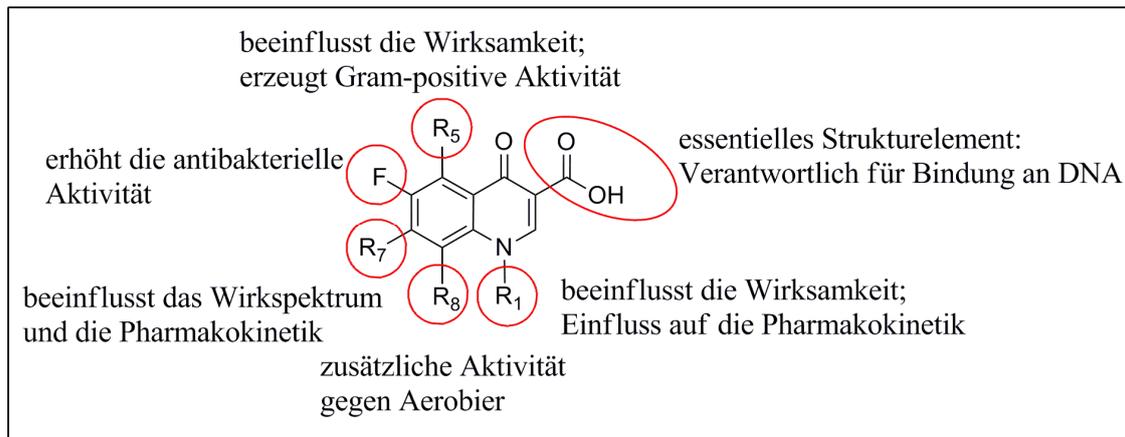


Abbildung 2 Grundgerüst der 1,4-Dihydro-4-oxo-chinolin-3-carbonsäuren mit assoziierten Struktur-Wirkungs-Beziehungen¹⁰

Die Einführung des Fluors in Position 6 führte zu einer zehnfachen Steigerung der Gyrase-Inhibition und dehnte das Spektrum auf Gram-positive Erreger aus. Der basische Rest am C-7 verbesserte darüber hinaus die orale Bioverfügbarkeit und die Membranpermeabilität der Substanzen und erhöhte deren Verteilungsvolumen. Neben Piperazin wurden auch andere stickstoffhaltige Fünf- und Sechsring-Heterocyclen sowie bicyclische Ringsysteme wie im Moxifloxacin eingebaut.⁹ In Position 8 hat sich ein Methoxy-Substituent bewährt, wie am Beispiel von Moxifloxacin und Gatifloxacin zu sehen ist. Dieser bewirkt eine enorme Steigerung in der Affinität zur GyrA-Untereinheit mit einer erhöhten Aktivität gegenüber Aerobier.^{8; 11}

1.1.2.3 Wirkungsspektrum

Die historisch-chronologische Klassifizierung antibakterieller Substanzen ist meist jedoch wenig hilfreich, da der Zeitpunkt der Zulassung einer Substanz über ihre Stellung innerhalb der Klasse wenig aussagt. Naber und Adam¹² unterteilen die Substanzen nach folgenden Kriterien: Zeitpunkt der Zulassung, chemische Struktur, antibakterielles Spektrum, Pharmakokinetik, Indikationen, Verträglichkeit, Applikationsformen etc. Die Paul-Ehrlich-Gesellschaft wiederum hat die Chinolone in vier Gruppen steigender

Wirksamkeit eingeteilt (siehe Tabelle 2). Dabei wurden allerdings nur Vertreter ab der 2. Generation wie Norfloxacin und Ciprofloxacin berücksichtigt, da die Chinolone der 1. Generation nur noch von historischem Interesse sind. Einige der in Tabelle 2 genannten Substanzen (*) sind heute nicht mehr im Handel erhältlich, da sie durch zu starke Nebenwirkungen Todesfälle zur Folge hatten.

Tabelle 2 Einteilung der Chinolone aufgrund ihrer Wirksamkeit (* vom Markt genommen)

Gruppe	Indikation	Keime	4-Chinolone
1. Orale 4-Chinolone zum Einsatz bei Harnwegsinfektionen	Harnwegsinfekte, bakterielle Enteritiden, Gonorrhoe, Prostatitis	Gram-negative Bakterien	Norfloxacin, Pefloxacin*
2. Systemisch anwendbare 4-Chinolone mit breiter Indikation	Harnwegsinfekte, Atemwegsinfekte (Gram-negativ), Haut-, Weichteil- und Knocheninfektion	Wie Gruppe 1 plus Staphylokokken, Streptokokken, Pneumokokken, Enterokokken	Enoxacin, Fleroxacin*, Ofloxacin, Ciprofloxacin
3. 4-Chinolone mit verbesserter Aktivität gegen Gram-positive und atypische Erreger	(Harnwegsinfekte), Atemwegsinfekte (Primärtherapie), Gonorrhoe, Urethritis, Zervizitis	Wie Gruppe 1&2 plus Chlamydien, Mykoplasmen	Levofloxacin, Sparfloxacin*
4. 4-Chinolone mit verbesserter Aktivität gegen Gram-positive atypische Erreger sowie gegen Anaerobier	Haut-, Weichteil- und Knocheninfektion, abdominale Infektionen, systemische Infektionen, Sepsis, Meningitis	Wie Gruppe 1-3 plus Anaerobier	Gatifloxacin*, Moxifloxacin

1.1.2.4 Antibakterielle Aktivität der Chinolone

1.1.2.4.1 DNA-Topologie in der Zelle

In allen lebenden Organismen spielt die Topologie, d. h. die räumliche Anordnung der DNA, eine entscheidende Rolle in zellulären Prozessen wie der Zellteilung sowie der Rekombination und der Transkription der DNA.

In pro- und eukaryotischen Zellen liegt die Erbinformation als doppelsträngige, α -helikale DNA vor. In Bakterien, d. h. in Prokaryonten befindet sie sich dabei frei im Zytoplasma, wohingegen sie in Eukaryonten als DNA-Protein-Komplex im Zellkern lokalisiert ist. In beiden Fällen muss der DNA-Strang jedoch zu einem hoch strukturierten Knäuel verdrillt werden (Supercoiling), um überhaupt in die ca. 1 μm große Bakterienzelle zu passen. In der geschlossenen, relaxierten, energieärmsten Form (B-DNA) verteilen sich dabei 10.4 Basenpaare auf eine helikale Windung.¹³ Der Prozess des Supercoilings beinhaltet das Auftrennen des DNA-Doppelstranges, das Drehen des Stranges um die Helixachse und das Wiederverknüpfen der DNA. Um zur Transkription und zur anschließenden Replikation die Erbinformationen lesen zu können, muss dieser überspiralisierte Zustand entwirrt und der DNA-Strang getrennt werden. Für diese Regulierung der Topologie, d. h. der Verknotung, sind die Topoisomerasen zuständig.¹⁴

1.1.2.4.2 Struktur und Funktion der Topoisomerasen

Enzyme, die die Topologie von DNA-Molekülen beeinflussen, bezeichnet man als Topoisomerasen. Man unterscheidet dabei zwei Klassen:

- Typ-I-Topoisomerasen: Unterklassen Topoisomerase I & III
- Typ-II-Topoisomerasen: Unterklassen Topoisomerase II & IV bei Eukaryonten bzw. Gyrase bei Prokaryonten

Die Topoisomerasen des Typs I schneiden dabei, ohne ATP zu verbrauchen, immer nur einen DNA-Strang, wohingegen die Topoisomerasen des Typs II unter ATP-Verbrauch immer einen Doppelstrangbruch herbeiführen. Der Reaktionszyklus der Topoisomerasen beinhaltet die Bildung kovalenter Intermediate, in denen entweder das 5'-Ende (Typ IA, Typ II) oder das 3'-Ende (Typ IB) des geschnittenen DNA-Strangs durch eine Phosphotyrosin-Bindung über die Koordination an Metallionen mit dem Enzym verknüpft ist.^{15; 16}

Die Hauptfunktion der Topoisomerase I besteht in der Relaxierung des DNA-Strangs durch Einführen eines Einzelstrangbruchs. Darüber hinaus reguliert sie den Überspiralisierungsgrad und verhindert die Anhäufung negativer Überspiralisierung im Verlauf der Transkription.¹⁷

Die Gyrase findet man nur in Bakterien. Sie ist als einziges bekanntes Enzym in der Lage auch negative Superhelices in die DNA einzufügen^{15; 18} und ist daher zur Erhaltung eines negativen Überspiralisierungsgrads essenziell. Unter ATP-Verbrauch katalysiert sie nicht nur die Komprimierung sondern auch die Relaxation der DNA. Der Mechanismus der Komprimierung beruht darauf, dass sie die DNA über Kreuz bindet und energieabhängig schneidet. Anschließend werden die Stränge aneinander vorbeigeführt und letztendlich wieder verknüpft (siehe Abbildung 3).

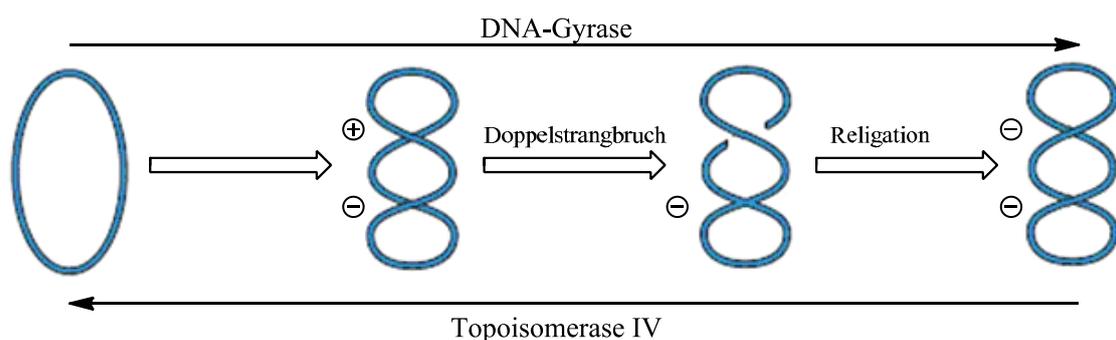


Abbildung 3 Schematische Darstellung der durch die Gyrase und Topoisomerase IV katalysierten Komprimierung bzw. Relaxation der DNA¹⁹

Die Gyrase besteht aus zwei Untereinheiten GyrA (97 kDa) und GyrB (90 kDa), die zusammen ein A₂B₂ Tetramer bilden. Die Untereinheit GyrA besteht wiederum aus zwei

Domänen, der N-terminalen Domäne bis Aminosäure 571 und der C-terminalen Domäne bis Aminosäure 875. Die N-terminale Domäne enthält dabei mit Tyrosin 122 das aktive Zentrum, das für das Schneiden und Wiederverknüpfen der DNA verantwortlich ist. Das C-terminale Fragment hingegen ist beteiligt an der unspezifischen DNA-Bindung und stabilisiert den Komplex durch Wechselwirkung mit der GyrB-Untereinheit. Diese besteht ebenfalls aus zwei Domänen. In der N-terminalen Domäne ist die ATPase-Aktivität lokalisiert, d. h. hier findet die ATP-Verarbeitung statt. Die C-terminale oder Toprim-Domäne wiederum wechselwirkt mit der C-terminalen Einheit der GyrA und bildet so den Enzymkern.^{20; 21; 22}

Tabelle 3 Einteilung der Topoisomerasen^{14; 23}

Klassifizierung		Struktur	Wichtigste Reaktion
<u>Typ-I-Topoisomerasen</u>			
Bakterien	Topoisomerase I	eine Untereinheit	Relaxation negativ superhelikaler DNA
	Topoisomerase III	eine Untereinheit	Relaxation negativ superhelikaler DNA
Eukaryonten	Topoisomerase I	eine Untereinheit	Relaxation negativ und positiv superhelikaler DNA
	Topoisomerase III	eine Untereinheit	Relaxation negativ superhelikaler DNA
<u>Typ-II-Topoisomerasen</u> (ATP-abhängig)			
Bakterien	Topoisomerase II (Gyrase)	Tetramer aus 2 GyrA- und 2 GyrB-Untereinheiten	Einführen von negativen Supercoils; Relaxation negativ superhelikaler DNA; Auflösung von Catenanen und verknüpften DNA-Ringen
	Topoisomerase IV	Tetramer aus 2 ParC- und 2 ParE-Untereinheiten	Trennung der Bakterienchromosomen nach DNA-Replikation, Dekatenierung
Eukaryonten	Topoisomerase II	Dimer aus identischen Untereinheiten	Relaxation negativ und positiv superhelikaler DNA

Die Topoisomerase III ist wie die Topoisomerase I ein Monomer und katalysiert aller Wahrscheinlichkeit nach die Entknotung einzelsträngiger DNA, die während der Replikation oder der DNA-Rekombination entsteht.²⁴ Die Topoisomerase III ist für die Zelle nicht essenziell.

Die Topoisomerase IV besteht ähnlich wie die Gyrase als Heterotetramer aus je zwei ParC- und ParE-Untereinheiten.^{22; 25} Die ParC-Untereinheiten beinhalten das aktive Zentrum, das den temporären Strangbruch und die Religation katalysiert, während die ParE-Untereinheiten durch Hydrolyse von ATP die für die Strangpassage und Religation notwendigen Konformationsänderungen katalysieren.²⁶ Sie ist in der Lage sowohl positive als auch negative Überspiralisierung zu relaxieren, wobei ihre Hauptaufgabe jedoch in der Dekatenierung d. h. in der Trennung der replizierten Tochterchromosomen, die wie Kettenglieder miteinander verknüpft sind, besteht.²⁷ Um die Zellteilung zu vervollständigen, müssen diese Kettenglieder voneinander getrennt werden.^{14; 21} Neben dieser Hauptaufgabe ist die Topoisomerase IV, wie die Gyrase auch, für das Supercoiling verantwortlich.

1.1.2.4.3 Wirkmechanismus der Chinolone

Der Wirkmechanismus der Fluorchinolone beruht darauf, dass sie die DNA-Synthese der Gyrase und der Topoisomerase IV hemmen.²¹ Beide Enzyme zeigen große Ähnlichkeit in ihrer Struktur und ihren Funktionen, doch unterscheidet sich ihre spezifische Funktion während der DNA-Replikation.²⁶

Die DNA-Gyrase stellt ein ausgezeichnetes Ziel für Chinolone dar, da sie in Eukaryonten nicht zu finden, für das Bakterienwachstum aber essenziell ist.

Chinolone bilden durch ihre Ketogruppe in Position 4 und die Carboxygruppe in Position 3 eine Bindung zum DNA-Topoisomerase-Komplex aus, wodurch dieser Enzymkomplex gehemmt wird.²⁸ Der genaue molekulare Mechanismus der Gyrasehemmung ist bis heute noch nicht ganz geklärt.²¹ Ein Modell nach Shen *et al.*²⁹, wie auch Molecular-Docking-Berechnungen³⁰ prognostizieren jedoch ein Anlagern der Chinolone

über Wasserstoffbrückenbindungen an die Aminogruppen der ungepaarten Nukleotide, an der durch die Gyrase erzeugten Spaltstelle. So entsteht ein ternärer Komplex aus DNA, Gyrase und Chinolon. Dieser Komplex ist relativ stabil und führt zu mehreren Konformationsänderungen, wodurch sich das enzymstabilisierte Tor der Topoisomerasen nicht vollständig öffnet und weder die Relaxation noch die Komprimierung der DNA mehr möglich ist. So wird das Ablesen der Nukleinsäure^{31; 32; 33} und damit die Vermehrung der DNA verhindert. Die Polymerasen (Replikationsenzyme) können über diesen Komplex nicht hinweglesen und sämtliche Reparaturmechanismen der Bakterienzellen können aufgrund der Stabilität des Komplexes den Defekt nicht beseitigen. Dies wiederum löst Kaskaden enzymatischer Reaktionen aus, die schließlich zum Zelltod führen.^{14; 34} Die bakteriostatische Wirkung ist bereits bei geringen Chinolonkonzentrationen zu beobachten und beruht in erster Linie auf der Ausbildung des ternären Chinolon-DNA-Enzym-Komplexes.

Neuere Untersuchungen zum Wirkmechanismus der Chinolone deuten jedoch darauf hin, dass nicht nur Wechselwirkungen zwischen dem Chinolon und der DNA ausbilden, sondern die Chinolonstruktur zusätzlich über die Koordination an ein Magnesiumion Mg^{2+} mit dem Enzym wechselwirkt, indem es in eine Art Chinolonbindungstasche dockt.^{22; 35} Diese ist nicht zu verwechseln mit der Bindungstasche neuerer Topoisomeraseinhibitoren, die bereits die Ausführung des Doppelstrangbruchs verhindern und dadurch die Replikation der DNA hemmen.³⁶ Darüber hinaus scheinen sich lediglich zwei und nicht wie von Shen et al.²⁹ prognostiziert vier Chinolonmoleküle am ternären Komplex aus DNA, Gyrase und Chinolon zu beteiligen.³⁷

Bei Gram-negativen Bakterien stellt die Gyrase das primäre Ziel der Chinolone dar, wohingegen bei Gram-positiven Bakterien ein anderes Enzym, die Topoisomerase IV, die primäre Zielstruktur darstellt. Die Topoisomerase IV ist für die Trennung der prokaryontischen Chromosomen nach der Replikation verantwortlich. Wird das Enzym gehemmt, bleiben die Tochterchromosomen miteinander verbunden und können in der Tochterzelle nicht verteilt werden.³⁸ Die Chinolone bilden mit der DNA und der Topoisomerase IV ebenfalls einen ternären Komplex, der ähnlich wie bei der Gyrase die weitere Vermehrung der Bakterienzelle verhindert.³⁹

1.1.3 Resistenzentwicklung

1.1.3.1 Resistenzsituation

Betrachtet man eine Vielzahl von Bakterienstämmen, so lassen sich zwei Arten von Antibiotika-Resistenzen unterscheiden. Eine natürliche oder primäre Resistenz, die alle Stämme einer Bakterienspezies betrifft und eine erworbene, sekundäre Resistenz, die nur einzelne Stämme einer Spezies aufweisen. So sind etwa alle Stämme von *Enterococcus faecium* gegen Chinolone primär resistent, während *E. coli*-Stämme primär empfindlich sind und nur einzelne eine erworbene Resistenz aufweisen. Eine erworbene, sekundäre Resistenz kann dabei auf drei Arten entstehen: Durch eine Veränderung der Zielstruktur, eine Verringerung der Antibiotikakonzentration am Wirkort oder aber durch eine Inaktivierung des Antibiotikums. Diese Entstehung der Resistenz kann durch eine einzige Mutation der bakteriellen Zielstruktur erfolgen, oder aber durch eine Vielzahl von Schritten, indem durch die Wechselwirkung mit der Zielstruktur, sekundäre Mechanismen ausgelöst werden, die den zellulär sichtbaren Effekt induzieren.¹⁴

In zwei Punkten unterscheiden sich die Resistenzmechanismen von Gram-positiven und Gram-negativen Erregern. Bei Gram-positiven Erregern ist die Topoisomerase IV die primäre, d. h. die empfindlichere Zielstruktur der Chinolone, wohingegen bei Gram-negativen Bakterien die Gyrase die höhere Empfindlichkeit aufweist. Bevorzugte Stellen für Resistenzmutationen sind hochkonservierte Aminosäuren innerhalb einer Chinolon-Resistenz-determinierenden Region.

Bei Chinolonen konnten Resistenzen sowohl durch die Veränderung der Zielstruktur als auch durch eine Verringerung der Antibiotikakonzentration am Wirkort nachgewiesen werden. Die Ausbildung von Resistenzen durch eine Veränderung der Zielstruktur konnte nach der Veröffentlichung der vollständigen DNA-Sequenz des GyrA-Gens aus einem chinolonempfindlichen Stamm von *E. coli* K12 belegt werden. Die Mutation des Serin-Restes (Ser83) zu Leucin oder Tryptophan war dabei vornehmlich verantwortlich für die gestiegenen MHK-Werte und damit für die Resistenz des *E. coli*-Stamms gegenüber den Chinolonen.¹⁴

Die Verringerung der Chinolonkonzentration am Wirkort beruht darauf, dass Chinolone normalerweise mit Hilfe von Porinen, d. h. Transportproteinen, die die äußere Membran Gram-negativer Bakterien durchspannen, in die Bakterienzelle gelangen. Porine sind kleine wassergefüllte Transmembrankanäle, die für hydrophile Moleküle den wichtigsten Zugang zum Zellinneren darstellen. In resistenten Keimen werden diese Porine in geringerem Maße gebildet, wodurch weniger Chinolon in die Bakterienzelle gelangt. Darüber hinaus wird bei dieser Resistenzform ein erhöhter aktiver Auswärtstransport der Chinolone durch die verstärkte Expression von Effluxproteinen beobachtet.^{21; 40; 41} Eine Reihe solcher „Multidrug-Resistance-Effluxproteine“ sind in letzter Zeit charakterisiert worden. Die bei chinolonresistenten *Staphylococcus-aureus*-Stämmen nachgewiesene NorA-MDR-Pumpe etwa transportiert hydrophobe Kationen wie beispielsweise am Piperazinring protoniertes Norfloxacin aus der Bakterienzelle.^{42; 43}

Die Resistenzzahlen bei Fluorchinolonen stiegen in den letzten Jahren deutlich. So schwankt die Häufigkeit der Resistenz gegen Ciprofloxacin und Nalidixinsäure in *E. coli*-Isolaten in den letzten Jahren zwischen 3% und 46%.⁴⁴ Gegen *Salmonella*-Isolate hingegen sind lediglich circa 18% resistent, gegen *Klebsiella pneumoniae* 6% und gegen *Proteus mirabilis* 4,4% der Stämme gegen Ciprofloxacin resistent.^{40; 45; 46} Dramatischer ist jedoch bereits die Situation bezüglich *Campylobacter*-Stämme, die beim Menschen schwere Magen-Darm-Infektionen hervorrufen können. Die Resistenzlage ist hierbei regional sehr unterschiedlich und schwankt demnach zwischen 34 und 62%.^{44; 47}

1.1.3.2 Pharmakokinetik

Die Chinolone der 1. Generation weisen sehr kurze Eliminationshalbwertszeiten von nur wenigen Stunden auf, was dazu führt, dass nur in der Niere als Hauptausscheidungsorgan ausreichend hohe Wirkstoffspiegel erreicht werden. Zurückzuführen ist dies vor allem auf ihre gute Resorption und auf ihre, trotz ihrer starken Bindung an Plasmaproteine (Nalidixinsäure > 95%), schnelle Metabolisierung.

Die neueren Chinolone besitzen deutlich günstigere pharmakokinetische Eigenschaften.⁴⁸ So werden sie nach oraler und parenteraler Applikation schnell und gut resorbiert und ihre Plasmaproteinbindung beträgt durchschnittlich 10-20%, in Einzelfällen (Moxifloxacin) bis zu 40%, so dass die Plasmaspiegel im therapeutischen Bereich liegen. Die Gewebskonzentration in Lunge, Bronchialschleimhaut, Knochen, Leber und Haut können darüber hinaus das drei- bis vierfache der Blutplasmaspiegel erreichen.⁴⁹

Das Ausmaß der Metabolisierung der Chinolone unterscheidet sich je nach Substanz ziemlich stark.⁵⁰ So wird Enrofloxacin etwa zu 40% in der Leber zu Ciprofloxacin desethyliert, welches wiederum nur in geringem Anteil metabolisiert wird. Danofloxacin hingegen wird zu einem *N*-Desmethylmetabolit verstoffwechselt. Für die meisten Chinolone ist jedoch die Ausscheidung über die Nieren der Haupteliminationsweg (>50%).

1.2 Arzneimittelforschung

1.2.1 Leitstruktursuche und Leitstrukturoptimierung

Die fortschreitende Entwicklung von Resistenzen gegenüber den vorhandenen Antibiotika fordert eine stetige Neu- bzw. Weiterentwicklung. Diese Weiterentwicklung von Arzneistoffen geschieht in den meisten Fällen durch gezielt geplante, jedoch intuitiv ausgeführte Synthesen neuartiger Substanzen. Doch in vielen Fällen spielte auch hier der Zufall eine entscheidende Rolle.⁵¹

Die Suche nach neuen Wirkstoffen orientiert sich an den so genannten Leitstrukturen. Als Leitstruktur bezeichnet man Liganden, die an einer bestimmten Zielstruktur suboptimale Bindungsaffinität ausüben.⁵² Als tatsächliche Arzneistoffe kommen diese meist noch nicht in Frage, denn es müssen noch zahlreiche Strukturoptimierungen durchgeführt werden, um gute therapeutische Eigenschaften wie Wirkstärke, Spezifität und Wirkdauer bei einer gleichzeitig niedrigen Toxizität und geringen Nebenwirkungen zu erhalten. Um die Leitstrukturen gezielt zu optimieren, versucht man das Pharmakophor, d. h. den Teil der Leitstruktur, die spezifisch mit der Zielstruktur wechselwirkt, zu identifizieren.

Gleichzeitig versucht man Struktur-Wirkungs-Beziehungen (SAR, structure activity relationships) zu analysieren, die die Zusammenhänge zwischen einer Struktur und deren pharmakodynamischen und pharmakokinetischen Eigenschaften definieren. Es ist jedoch nicht nur wichtig zu untersuchen, welche Wirkung ein Arzneistoff im Organismus hat, sondern es ist auch von großer Bedeutung, was der Organismus mit dem Pharmakon macht. So scheitern fast 50% der Wirkstoffkandidaten an einer zu geringen Bioverfügbarkeit oder aufgrund ihrer toxischen Metabolite. Die Chancen eines Wirkstoffes tatsächlich einmal als Arzneistoff Verwendung zu finden, werden gemessen an Parametern wie Resorption, Distribution, Metabolismus, Elimination und Toxikologie (ADMET-Parameter). Der optimale Wirkstoff wird schnell und vollständig resorbiert und findet seinen Weg direkt zu seinem Wirkort ohne mit anderen Rezeptoren oder Proteinen zu wechselwirken. Außerdem ist er ein Substrat der Leberenzyme, wird nicht zu toxischen Metaboliten abgebaut und nach angemessener Zeit über die Nieren ausgeschieden. In der realen Welt besitzen chemische Substanzen selten diese ideale Kombination von Eigenschaften, doch versucht man Optimierungen bezüglich dieser Parameter möglichst früh in die Arzneistoffentwicklung mit einzubeziehen.⁵³

1.2.1.1 Naturstoffe als Leitstrukturen

In vielen Fällen kann die Natur mit ihrem unbändigen Potenzial neuer und vielfältiger Strukturen immer neue Ansätze in der Wirkstoff- und Leitstruktursuche liefern. Die molekulare Diversität und die biologische Funktionalität der aus der Natur stammenden Leitstrukturen übertrifft bei weitem die der synthetisch bzw. kombinatorisch hergestellten Bibliotheken.⁵⁴ Oft sind die Isolierung einer aktiven Substanz aus dem biologischen Material und die Strukturaufklärung jedoch sehr schwierig und zeitaufwendig. Der Versuch die so erhaltenen Substanzen für eine später eventuell anstehende industrielle Nutzung auf klassischen Wege zu synthetisieren, gestaltet sich darüber hinaus aufgrund der komplexen und stereochemisch-anspruchsvollen Struktur vieler Naturstoffe meist als sehr schwierig.

1.2.1.2 Kombinatorische Chemie

Vor gut 25 Jahren eröffnete sich der organischen Chemie eine weitere bis dato unbekannte Methodik. Ausgehend von Merrifields Festphasensynthese von Peptiden startete eine Technologie der parallelen Herstellung „unzähliger“ Substanzen.⁵⁵ So können innerhalb kürzester Zeit durch die systematische Kombination bestimmter Bausteine Substanzbibliotheken vieler Substanzen hergestellt werden. Diese Art der Erzeugung von Strukturvariationen bezeichnet man als kombinatorische Chemie. Die Qualität dieser Substanzbibliotheken ließ jedoch oft zu wünschen übrig. So genügt es nicht einfach nur eine möglichst große Anzahl neuer Substanzen zu erzeugen, sondern es muss darauf geachtet werden, die Erzeugung möglichst vieler effektiver „drug-like“-Substanzen zu sichern.^{56; 57}

1.2.1.3 Strukturbasierter und computergestützter Entwurf von Wirkstoffen

Ein weiterer Ansatz für die Leitstrukturoptimierung ist das rationale Design, das auf der Kenntnis der Zielstruktur oder anderer bereits bekannter Wirkstoffe beruht. So geht man davon aus, dass die Wirkung einer Substanz von ihrer Bindung an das Zielmolekül herrührt und dass sich Wirkstoff und Zielmolekül sowohl geometrisch als auch chemisch zueinander komplementär verhalten. Oft wird nur dann eine biologische Aktivität erreicht, wenn sich eine Substanz in die spezifische Bindungstasche des Targets einpasst, wie beim Schlüssel-Schloss-Prinzip von Enzymen.

In den letzten Jahrzehnten spielt der Computer in der Arzneimittelforschung eine immer größere Rolle. Mit Hilfe der Proteinkristallographie lassen sich die 3D-Strukturen von Proteinen oder Protein-Ligand-Komplexen aufklären und in den Computer eingegeben. Diese sind in der Lage, die komplexen Strukturen der Proteine graphisch darzustellen und die Eigenschaften von Liganden sowie den Proteinen und ihren Komplexen zu berechnen. Durch eine iterative Entwicklung können so andere Liganden oder Inhibitoren in das Protein eingepasst werden.

1.2.1.4 Lipinski's „Rule of Five“

Ob sich ein Wirkstoff für therapeutische Zwecke eignet, hängt von einer Vielzahl von Faktoren ab. So spielen die Selektivität der Wirkung, eine hohe Bioverfügbarkeit, eine ausreichend lange Wirkdauer oder eine gute Verträglichkeit entscheidende Rollen bei der Wirkstoffbeurteilung. Lipinski *et al.* haben durch den Vergleich der Eigenschaften von 2250 Wirkstoffen aus dem „World Drug Index“ (WDI) eine empirische „Fünfer-Regel“ aufgestellt (Lipinski's „Rule of Five“), die die Eigenschaften zusammenfasst, die für 90% der dort aufgeführten Wirkstoffe essenziell waren.^{58; 59} So sollte ein Wirkstoff zur oralen Verfügbarkeit ein Molekulargewicht kleiner 500 und einen Lipophilie-Wert von $\log P \leq 5$ ($P = \text{Octanol/Wasser-Verteilungskoeffizient}$) haben. Darüber hinaus sollte er nicht mehr als fünf Wasserstoffbrücken-Donorgruppen und nicht mehr als zehn Wasserstoffbrücken-Akzeptorgruppen besitzen. Die Regel erhielt ihren Namen aufgrund der Tatsache, dass jede Zahl, die in ihr vorkommt, ein Vielfaches von fünf ist. Die Regel stellt dabei kein allumfassendes Gebot dar, doch sinkt die Wahrscheinlichkeit eines Kandidaten irgendwann als Wirkstoff zu dienen enorm, sobald mehr als eine der Regeln verletzt wird.⁶⁰

1.2.2 Leitstruktursuche mittels Random Chemistry

Das Konzept der sogenannten „re-kombinatorischen Chemie“ oder „Random Chemistry“ stellt ein relativ neues und ungewöhnliches Verfahren zur Erzeugung neuer Leitstrukturen dar. Es führt die Substanzsynthese nach dem Zufallsprinzip aus, d. h. es kann nicht vorhergesagt werden, was im Detail passiert bzw. welche Produkte bei der gegebenen Reaktion entstehen. Die Grundidee liegt dabei in der Kombination von Zufallschemie mit biologischen Selektionsverfahren, was analog zur natürlichen Evolution mit Mutation und Selektion ist.

Vor einigen Jahren wurde diese Methode zum ersten Mal als Verfahren zur Herstellung neuer Substanzen vorgestellt und zum Patent angemeldet.^{61; 62} Bis dato hat die Random

Chemistry schon zur Entwicklung neuer, potenter Acetylcholinesterasehemmer⁶³ und neuer anti-plasmodialer beziehungsweise anti-viraler Wirkstoffe gedient.^{64; 65}

1.3 Random Chemistry

Beim Verfahren der Random Chemistry werden kombinatorisch zusammengesetzte Mischungen bekannter Reinsubstanzen bestimmten reaktionsvermittelnden physikalischen oder chemischen Bedingungen unterworfen. Dabei kommt es zur ungeplanten Erzeugung kleiner Substanzbibliotheken, die nicht nur mit der Leitstruktur verwandte Substanzen enthalten, sondern auch bis dato unbekannte Substanzen und Leitstrukturen.⁶⁴ Die große Anzahl der dabei entstandenen, unbekanntem Produkte wird schließlich anhand selektiver biologischer Tests auf ihre pharmakologische bzw. biologische Wirksamkeit hin untersucht. Aktive Komponenten werden im Anschluss isoliert und rein der chemisch-physikalischen Strukturaufklärung zugeführt.⁶¹

Das von Folkers *et al.*⁶¹ patentierte Verfahren der Random Chemistry umfasst also die fünf folgenden Schritte:

1. Schritt: Mischen der bekannten Edukte

Bekannte Ausgangssubstanzen werden einfach oder kombinatorisch zu einem Cocktail (C) gemischt. Als Ausgangssubstanzen kommen dabei alle löslichen chemischen Verbindungen in Betracht. Aus praktischen und technischen Gründen werden vorteilhafterweise bekannte, kostengünstige, niedermolekulare organische Verbindungen im Molekulargewichtsbereich bis circa 1000 g/mol verwendet. Dabei können die Ausgangssubstanzen eine biologische Wirkung aufweisen, müssen dies aber nicht. Obwohl eine gewisse Auswahl an Ausgangssubstanzen, die zum Beispiel pharmakophore Elemente enthalten, getroffen werden kann, darf beim Herstellen der Edukt-Cocktails das Zufallsprinzip eine Rolle spielen.

2. Schritt: Zufallsreaktion des Cocktails (C) mittels physikalischer und chemischer Methoden

Zur Initialisierung der Zufallschemie können bestimmte physikalische Methoden, wie etwa ionisierende Strahlung, Neutronenbeschuss, Licht, UV, Mikrowellen, Druck oder Temperatur verwendet werden, aber auch chemische Reaktionsvermittler, wie etwa pH-Wert, Radikalfänger bzw. -starter oder Crosslinker. Die Zufallschemie geht hierbei streng nach deterministischen Prinzipien vor und lässt sich bei Kenntnis aller Systemparameter grundsätzlich reproduzieren.

Die Vielzahl der veränderbaren Parameter ermöglicht ein sehr breites Spektrum für die erwünschte Zufallschemie und erhöht so die Wahrscheinlichkeit, biologisch wirksame Strukturen zu erhalten.

3. Schritt: Biologische Testung der unbekanntenen Produkte des entstandenen Cocktails C'

Aus der großen Anzahl neu entstandener chemischer Verbindungen werden nun biologisch aktive Komponenten heraus selektiert. Die Wahl der biologischen Testsysteme, deren sich man hierfür bedient, richtet sich in erster Linie nach dem Indikationsgebiet. Positiv ansprechende Proben, so genannten „Hits“, werden dem nächsten Schritt zugeführt.

4. Schritt: Isolierung und Reindarstellung der aktiven Komponenten mittels bioaktivitätsgeleiteter Fraktionierung

Der Reaktionscocktail C' wird nun mittels nichtdestruktiver Methoden (z. B. Chromatographie) aufgetrennt und die einzelnen Fraktionen werden erneut auf ihre biologische Wirkung hin getestet. Die aktiven Fraktionen werden anschließend, gegebenenfalls nach weiteren Fraktionierungen, auf ihre Reinheit hin überprüft, um sie danach der Strukturaufklärung zuzuführen.

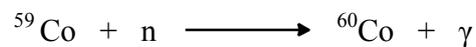
5. Schritt: Strukturaufklärung

Anhand bewährter Analysemethoden wie etwa Elementaranalyse, Massenspektrometrie, NMR-, UV- und IR-Spektroskopie, Röntgenkristallographie etc. werden schließlich die Strukturen der biologisch aktiven Substanzen aufgeklärt.

Der 3. Schritt dieser Aufzählung ist als problematisch anzusehen, da Gemische von Substanzen bei der biologischen Testung nicht unbedingt für die Reinsubstanz aussagekräftige Ergebnisse liefern. So kann es sowohl zu einer Verstärkung der inhibitorischen Wirkung durch Aggregation der Komponenten kommen, aber auch zu einer verringerten Hemmung. Die primäre Aktivitätstestung kann also nur als Hinweis auf die biologisch aktiven Substanzen dienen. Erst die Testung der Reinsubstanzen liefert aussagekräftige Ergebnisse bezüglich der biologischen Aktivität eines Stoffes.⁶⁶

1.3.1 γ - Bestrahlung und Reaktion der Primärprodukte

Ursprünglich wurde als reaktionsstartende Methode in Schritt 2 die Bestrahlung mit hochenergetischen γ -Strahlen verwendet. Diese Strahlung erhält man durch den Zerfall des instabilen, radioaktiven ^{60}Co -Nuklids. Dieses entsteht durch den Beschuss stabiler ^{59}Co -Nuklide mit thermischen Neutronen im Kernreaktor.

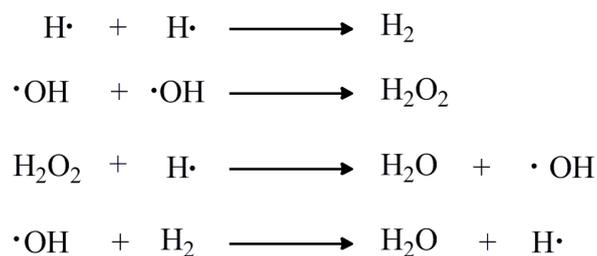


Die so erhaltene elektromagnetische Strahlung erzeugt beim Durchgang durch Materie kaum direkte chemische Wirkung, doch bilden sie Elektronen hoher kinetischer Energie, welche nun wiederum in der Lage sind, Moleküle anzuregen oder zu ionisieren.

Je nachdem, in welchem Lösungsmittel die Bestrahlungen durchgeführt werden, kommt es zur Entstehung unterschiedlicher reaktionsvermittelnder Spezies. Bei der Wasserradio-lyse entstehen vorwiegend hydratisierte Elektronen e^-_{aq} , Wasserstoffradikale $\text{H}\cdot$ und

Hydroxylradikale $\cdot\text{OH}$, wohingegen es bei der Radiolyse in Methanol neben der Bildung von Formaldehyd und den bei der Wasserradiolyse gebildeten Radikalen auch zur Entstehung von Methylradikalen $\text{H}_3\text{C}\cdot$, Methoxyradikalen $\text{H}_3\text{CO}\cdot$ und Hydroxymethylradikalen $\text{HOCH}_2\cdot$ kommen kann.^{62; 67}

Diese Primärteilchen können nun untereinander wieder rekombinieren. So entstehen durch Rekombinationen und Reaktionen der Primärprodukte unter anderem folgende Sekundärprodukte:



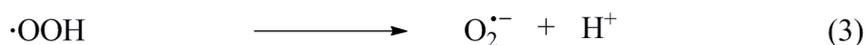
Sowohl diese Sekundärprodukte als auch die Primärprodukte sind nun in der Lage nicht nur untereinander zu rekombinieren, sondern auch Reaktionen mit anderen, sich in der Lösung befindenden Substanzen einzugehen und so grundsätzlich neue Substanzen zu bilden.^{68; 69} Die Bildung neuer Substanzen lässt sich folglich größtenteils auf die Reaktion von Radikalen zurückführen.

Diese Tatsache führte zu der Überlegung, dass diese initiierenden Radikale auch auf andere Art und Weise erzeugt werden können. Die Synthese von Hydroxylradikalen $\cdot\text{OH}$ ist dabei in der klassischen Chemie bereits auf vielfältige Weise möglich.

1.3.2 Fentons Reagenz

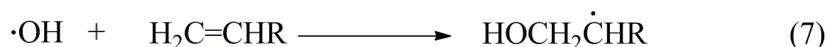
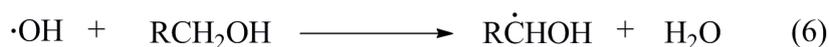
Radikalstarter gibt es vielzählige in der organischen Chemie, die gängigsten sind wohl Dibenzoylperoxid (DBPO), Azo-bis-(isobutyronitril) (AIBN) und Fentons Reagenz. Fentons Reagenz erzeugt bereits im ersten Schritt Hydroxylradikale. Als Fentons Reagenz bezeichnet man die Umsetzung von Eisen(II)ionen und Wasserstoffperoxid zu

Eisen(III)ionen, Hydroxylionen und Hydroxylradikalen.⁷⁰ Die einzelnen auftretenden Reaktionen wurden 1934 erstmals von Haber und Weiss beschrieben.⁷¹ Die später leicht modifizierte Reaktionssequenz^{72; 73} sieht wie folgt aus:



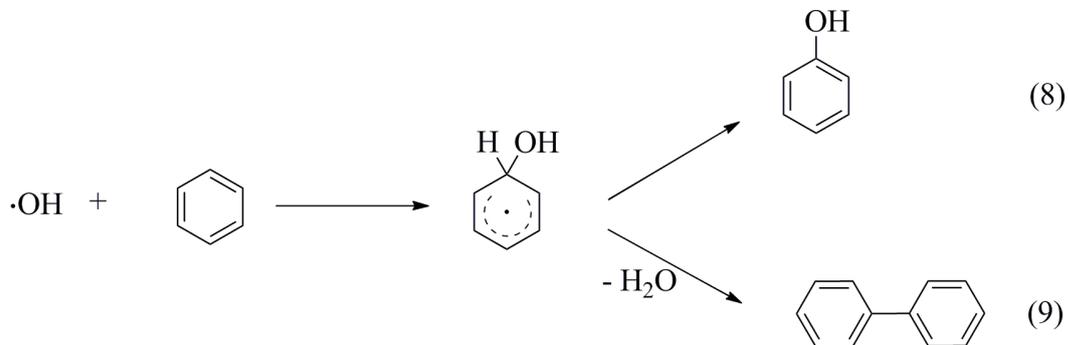
Das Reaktionsschema zeigt, dass die primär entstandenen Hydroxylradikale auf verschiedenste Weise weiterreagieren können. So können sie, wie in Gleichung 2 bis 4 beschrieben, einen Radikalkettenmechanismus einleiten, der zur Entwicklung von Sauerstoff führt. Reagieren sie jedoch sofort mit Fe^{2+} , führt dies, wie Gleichung 5 zeigt, zum Kettenabbruch.

Das Hydroxylradikal $\text{HO}\cdot$ kann andere in Lösung vorliegende oxidierbare Substanzen angreifen.⁷³ Bei Alkoholen kommt es so etwa zur α -H-Abstraktion (6), wohingegen es bei Olefinen zur Addition an die Doppelbindung (7) kommt.⁷²



Trifft das Hydroxylradikal auf Aromaten, kann es ebenfalls auf zwei unterschiedliche Weisen reagieren. In beiden Fällen greift es zunächst direkt am aromatischen Kern an, wo es aufgrund seines Energiereichtums nur eine mäßige Selektivität zeigt. Das dabei als Zwischenprodukt auftretenden Hydroxycyclohexadienyl-Radikal kann nun entweder durch Wasserstoffabspaltung zum entsprechenden hydroxylierten Aromaten reagieren, so entsteht aus Benzol etwa Phenol (8). Das Hydroxycyclohexadienyl-Radikal kann aber

auch unter Wasserabspaltung dimerisieren, so kommt es zur Ausbildung von Biarylverbindungen (9).



Fentons Reagenz kann grundsätzlich also ebenso eine Vielzahl an Reaktionen auslösen, wie dies mit der Bestrahlung mit γ -Strahlen möglich ist. Es konnte auch schon bewiesen werden, dass bei der Umsetzung von Tacrin mit Fentons Reagenz annähernd die gleichen Substanzbibliotheken entstehen, wie dies bei der Bestrahlung mit γ -Strahlen der Fall war.⁷⁴

So konnten auch mit Fentons Reagenz die beiden acetylcholinesterase-aktiven Substanzen 1-Hydroxytacrin und ATAM ((9-Amino-5,6,7,8-tetrahydro-acridin-4-yl)-methanol) erzeugt werden, die bereits durch die Umsetzung mit γ -Strahlen entstanden (siehe Abbildung 4).^{63; 74}

Fentons Reagenz stellt demnach eine günstige und einfach zu handhabende Alternative zur sehr kosten- und technologieaufwendigen γ -Bestrahlung dar.

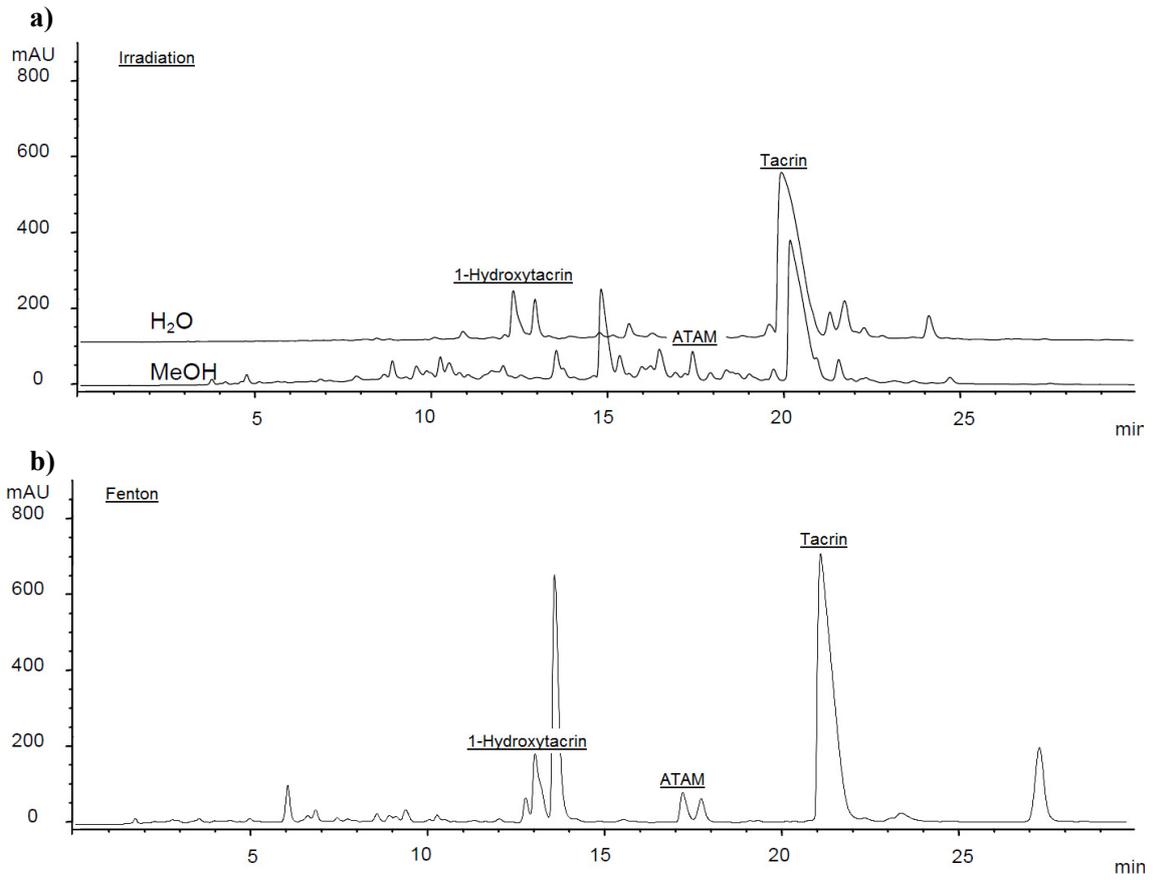


Abbildung 4 Umsetzung von Tacrin mit a) γ -Strahlen; b) Fentons Reagenz

1.4 Problemstellung und Zielsetzung der Arbeit

Die Entwicklung neuer Chinolone ist ein gut untersuchtes Gebiet, in dem auf klassische, rationale Weise bereits unzählige Strukturvariationen erdacht und synthetisiert wurden. Da die Weiterentwicklung bestehender Antibiotika aufgrund des immer stärker ausgeprägten Resistenzaufkommens unabdinglich ist, sollte mit dem unkonventionellen aber vielversprechenden Ansatz der Random Chemistry nach neuen Leitstrukturen gesucht werden. Mit Hilfe dieses Ansatzes konnten im Arbeitskreis von Prof. Folkers (ETHZ, Institut für Pharmazie und Biowissenschaften) bereits zwei neue Inhibitoren der Herpes-Simplex-Typ-1-Thymidin-Kinase^{64; 75}, im Arbeitskreis von Prof. Holzgrabe neue, potente Acetylcholinesterasehemmer^{63; 65} und im Arbeitskreis von Prof. Bringmann neue anti-plasmodiale beziehungsweise anti-virale Wirkstoffe^{64; 65} aufgefunden werden. Das Konzept der Random Chemistry sollte dabei durch den Einsatz von Fentons Reagenz zur Initialisierung der Zufallsreaktion (vgl. Kapitel 1.3) angewandt werden, da vorausgegangene Untersuchungen belegen, dass bei der Nutzung von γ -Strahlen als auslösende Spezies vornehmlich durch Radiolyse des Lösungsmittels erzeugte Radikale für die Bildung neuartiger Substanzen verantwortlich waren.^{63; 76} Diese als Initiator dienenden Radikale können jedoch auch mit herkömmlichen Radikalstartern wie dem Fentons Reagenz erzeugt werden.^{65; 74} Dies wiederum stellt eine deutlich kostengünstigere und leichter zu handhabende Alternative zur Verwendung von γ -Strahlen als Initiator dar und dürfte so relativ schnell und einfach eine Vielzahl neuer Strukturen hervorbringen. Fentons Reagenz erzeugt durch die Reaktion von Wasserstoffperoxid und Eisen(II)-Salzen Hydroxylradikale, die eines der stärksten bekannten Oxidationsmittel sind. Durch ihre Addition an Doppelbindungen bzw. ihre Abstraktion von Wasserstoffradikalen erzeugen sie neue Substratradikale, die wiederum miteinander in Reaktion treten können. Durch den ausgelösten Radikalkettenmechanismus, in dem es zu immer neuen Radikal-Abspaltungen, Rekombinationen und Additionen zwischen Substrat und Lösungsmittel kommt, können zahlreiche neue Verbindungen entstehen.

Als Ausgangssubstanzen wurden zur Erzeugung neuer Leitstrukturen im Gebiet der Chinolone zum einen das 4-Chinolon-Grundgerüst und zum anderen ein Vertreter der

6-Fluor-7-(piperazin-1-yl)-chinolone gewählt, um sowohl den Einfluss möglicher Strukturveränderungen am Chinolongrundkörper selbst als auch an möglichen Substituenten, wie etwa dem Piperazinsubstituenten in Position 7, zu untersuchen.

Die neu gebildeten Substanzen sollten im Rahmen des Sonderforschungsbereichs 630 (Erkennung, Gewinnung und funktionale Analyse von Wirkstoffen gegen Infektionskrankheiten) dem Screening auf *Staphylococcus aureus*-, *Trypanosoma brucei brucei*- und *Leishmania major*-Aktivität zugeführt werden. Dabei sollte vor allem nach Derivaten mit erhöhter Aktivität oder anderen vorteilhaften Eigenschaften gegenüber den Ausgangsverbindungen Ausschau gehalten werden.

Die Untersuchung sollte dabei die Analyse des Charakters der entstandenen Substanzbibliothek, deren bioaktivitätsgeleiteten Trennung und die Isolierung aktiver Komponenten beinhalten. Die so isolierten aktiven Substanzen sollten aufgereinigt werden, um sie anschließend der Strukturaufklärung mittels NMR- und Tandem-ESI-Massenspektrometrie zuführen zu können. Auf diese Weise erzielte Leitstrukturen sollten auf klassischem Wege nachsynthetisiert und die erhaltenen Struktur-Wirkungsbeziehungen zur Strukturoptimierung verwendet werden.

Bei der Suche nach neuen Wirkstoffen scheitern nahezu 50% der möglichen Kandidaten an einer zu geringen Bioverfügbarkeit oder aufgrund ihrer toxischen Metabolite. Deshalb scheint es sinnvoll, bereits in einem möglichst frühen Forschungsstadium auch Parameter wie Resorption, Distribution, Metabolismus, Elimination und Toxikologie (ADMET-Parameter) einer Substanz zu ermitteln und zu berücksichtigen. Da sich im Laufe der Arbeit zur Leitstruktursuche herausstellte, dass ein Großteil der durch Fentons Reagenz neu erzeugten Substanzen in ihrer Struktur literaturbekannten Metaboliten von Fluorchinolonen wie Ciprofloxacin ähnelt, sollte in einem zweiten Teil dieser Arbeit untersucht werden, ob Fentons Reagenz zur Erzeugung des metabolischen Profils neuer biologisch aktiver Substanzen dienen kann. So kann bereits frühzeitig auch auf mögliche Toxizitäten der Metabolite einer Substanz geschlossen werden. Fentons Reagenz ähnelt in seinem Mechanismus der Einelektronen-Oxidation stark der Verstoffwechslung des menschlichen Hauptmetabolismuszyns Cytochrom-P450 und könnte deshalb zum frühzeitigen Erkennen durch Bioaktivierung entstandener reaktiverer bzw. toxischerer

Zwischenstufen und Metabolite dienen. Von den im ersten Teil der Arbeit umgesetzten Chinolonen gab es jedoch bis dato noch keinerlei metabolische Daten. Deshalb sollten strukturell unterschiedliche Antibiotika mit literaturbekanntem Metabolitenspektrum zur Umsetzung mit Fentons Reagenz gewählt werden. Die entstandenen Substanzbibliotheken sollten schließlich mittels LC/MSⁿ-Messungen daraufhin untersucht werden, ob auf diese Weise die literaturbekannten Metabolite der jeweiligen Ausgangssubstanz erzeugt werden können.

2 LEITSTRUKTURSUCHE MIT FENTONS REAGENZ

Zur Leitstruktursuche an Chinolonen mit Hilfe von Fentons Reagenz wurden zwei unterschiedliche Chinolone als Edukte gewählt. Chinolon **1**, das in Position 6 einen Fluorsubstituenten und in Position 7 einen Piperazinrest trägt, wurde gewählt, da entsprechende Chinolone in der Regel gute Wirksamkeiten zeigen, wie etwa die weitverbreitet eingesetzten Antibiotika Ciprofloxacin oder Norfloxacin. Das verwendete Chinolon **1** zeigt darüber hinaus große Ähnlichkeit mit dem in der Veterinärmedizin verwendeten Sarafloxacin, das lediglich in Position 1 eine para- anstelle einer ortho-Fluorphenylgruppe trägt. Als zweites Chinolon wurde das unsubstituierte Chinolon-Grundgerüst **2** verwendet, um den möglichen positiven Einfluss einer Veränderung des Grundgerüsts zu untersuchen.

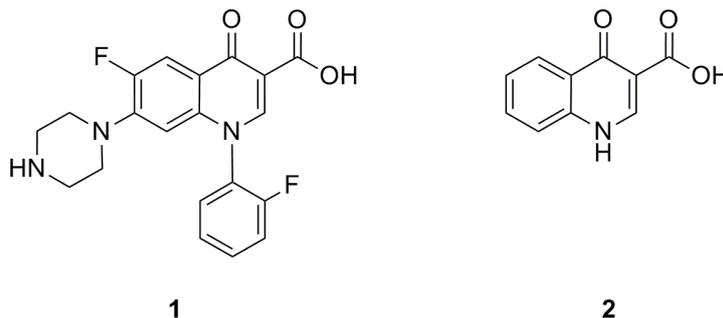


Abbildung 5 Strukturformeln der mit Fentons Reagenz umgesetzten Chinolone **1** und **2**

2.1 Synthese der Ausgangssubstanzen

2.1.1 Synthese von 6-Fluor-1-(2-fluorphenyl)-4-oxo-7-(piperazin-1-yl)-1,4-dihydrochinolin-3-carbonsäure 1

Zur Synthese der Chinolone **1** und **2** wurde aus Gründen der präparativen Zugänglichkeit zwei unterschiedliche Wege gewählt. So wurde Chinolon **1** analog dem Cycloaracy-

lierungsverfahren (Grohe-Synthese) hergestellt⁷⁷, über das auch Ciprofloxacin großtechnisch synthetisiert wird.⁴ Hierbei wurde ausgehend von Ethyl-3-(2,4-dichlor-5-fluorphenyl)-3-oxopropanoat der Einbau des sich später in Position 1 befindenden ortho-Fluorphenyl-Rests durchgeführt (siehe Abbildung 6), indem zunächst durch Zugabe von Orthoameisensäuretriethylester und Acetanhydrid der 2-Benzoyl-3-Ethoxyacrylester unter Rückfluss hergestellt wurde. Dieser wurde ohne weitere Aufarbeitung durch Zugabe von 2-Fluorbenzylamin, bei 0 °C weiter zum entsprechenden 3-Amino-2-benzoylacrylester **3** umgesetzt.^{77; 78} So konnte im Vergleich zur Umsetzung von Jürgens⁷⁹ durch das Herabsetzen der Temperatur eine leichte Ausbeuteerhöhung von 66 auf 72% erreicht werden.

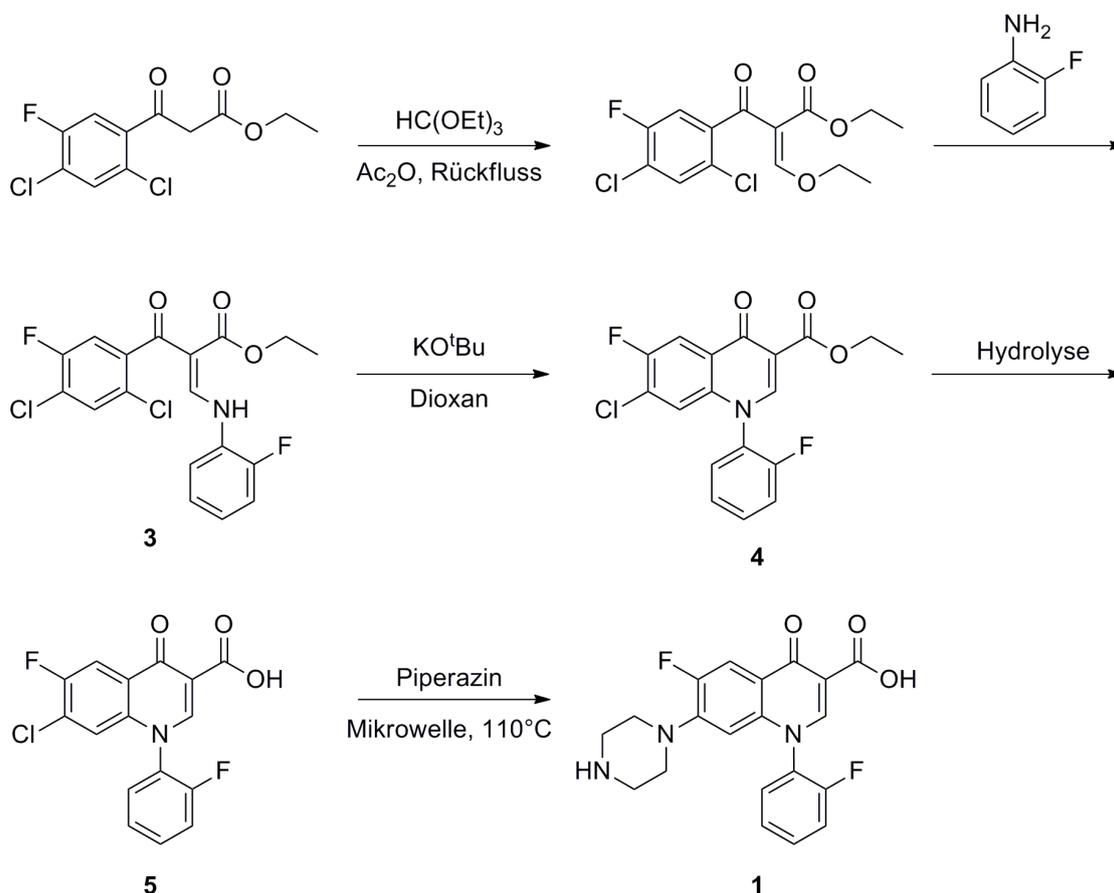


Abbildung 6 Synthese von Chinolon **1** nach Grohe

Die darauffolgende Cyclokondensation zum 4-Chinolon-3-carbonsäureester **4** wurde in Dioxan in Gegenwart von einem Moläquivalent Kalium-*tert.*-butanolat vorgenommen. Die Umstellung des Lösungsmittels von DMF auf Dioxan und die Änderung der eingesetzten Base von Kaliumcarbonat auf Kalium-*tert.*-butanolat führte so im Vergleich zur Umsetzung von Jürgens⁷⁹ zu einer deutlichen Ausbeutesteigerung von 49% auf 75%. Anschließend sollte in Position 7 der Piperazinring eingeführt werden, indem 24 h zum Rückfluss erhitzt wurde. Da hierbei jedoch keinerlei Umsetzung beobachtet werden konnte, wurde der Ester zunächst durch alkalische Verseifung zur Chinoloncarbonsäure **5** umgesetzt.^{77; 78; 79} Der Einbau des Piperazins in Position 7 gelang im Anschluss durch Erhitzen der Chinoloncarbonsäure **5** mit einem achtfachen Überschuss an Piperazin in DMSO^{80; 81} für zwei Stunden in der Mikrowelle bei 110 °C.⁸² Erst die Freisetzung zur Säure scheint demnach die Position 7 des Chinolongrundgerüsts elektrophil genug für den Angriff desamins zu machen, so dass die Umsetzung zu Verbindung **1** stattfinden kann. Der Einsatz der Mikrowelle führte jedoch nicht zur erwünschten Verkürzung der Reaktionszeit bzw. zu einer Erhöhung der Ausbeute, auch wenn dies von Ganapati *et al.*⁸² für analoge Umsetzungen dokumentiert worden war.

2.1.2 Synthese von 4-Oxo-1,4-dihydrochinolin-3-carbonsäure **2**

Die von Grohe beschriebene Synthesesequenz ermöglicht wie im vorhergehenden Fall die einfache Einführung eines Substituenten in Position 1 von Chinolonen. Wird dies nicht benötigt, wie es für das Chinolon **2** der Fall war, kann die Synthese alternativ nach der Gould-Jacobs-Synthese erfolgen.^{83; 84} Im Vergleich zur Grohe-Synthese wird hier das Chinolonringsystem, ausgehend von Anilin, genau in umgekehrter Reihenfolge aufgebaut.

Frisch destilliertes Anilin wurde hierzu mit Diethylethoxymethylenmalonat zum Rückfluss erhitzt und das entstandene Malonat **6** ohne weitere Aufarbeitung direkt zu siedendem Dowtherm A, einer hochsiedenden eutektischen Mischung aus Biphenyl und Diphenylether gegeben. Dabei entstandenes Ethanol wurde mit Hilfe eines Argonstroms

ausgetrieben. Die so erzwungene Cyclisierung lieferte den Chinolonsäureester **7**, der in der Kälte als weißer Feststoff ausfiel.^{85; 86; 87} Die Verlängerung der Reaktionszeit von 45 auf 60 Minuten führte dabei im Vergleich zur Umsetzung von Price *et al.*⁸⁶ zu einer leichten Ausbeutesteigerung von 65% auf 73%. Durch eine anschließend, analog zu den Umsetzungen von Price *et al.*⁸⁶ und Büyükbingöl *et al.*⁸⁵, durchgeführte alkalische Hydrolyse konnte letztendlich Chinolon **2** in Ausbeuten von insgesamt 61% erhalten werden.

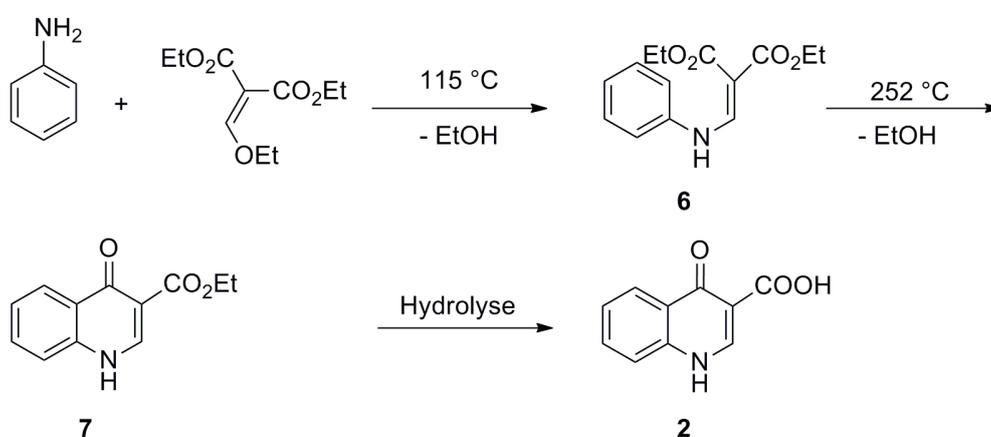


Abbildung 7 Synthese von Chinolon **2** nach Gould-Jacobs

Die so synthetisierten Chinolone **1** und **2** konnten nun der Umsetzung mit Fentons Reagenz zugeführt werden.

2.2 Analyse der Umsetzung von Chinolon **1**

2.2.1 Umsetzung mit Fentons Reagenz

Um eine effiziente Umsetzung mit Fentons Reagenz zu erreichen, musste zunächst auf eine ausreichende Löslichkeit der Substanz im verwendeten Lösungsmittel geachtet werden.⁷⁶ Chinolone zeigen allgemein jedoch geringe Löslichkeiten in verschiedenen Medien. So sind sie in neutral-wässrigem Milieu gar nicht und auch im wässrig-saurem

Milieu nur gering löslich. Die Umsetzung mit Fentons Reagenz unterliegt ebenfalls einigen Beschränkungen.⁷⁴ So kann die Durchführung nicht in rein organischen Lösungsmitteln erfolgen, da hier die Eisenionen wieder präzipitieren würden und so keine Umsetzung stattfinden. Eine Umsetzung im basischen Milieu verbietet sich ebenfalls, da hierbei Eisenhydroxid ausfallen würde, was die Reaktion ebenfalls zum Erliegen brächte. Die Zugabe von EDTA führte ebenso zu keiner vermehrten Umsetzung, auch wenn in der Literatur in vergleichbaren Fällen oft eine Ausbeutesteigerung beobachtet werden konnte.^{88; 89; 90}

Deshalb wurde Chinolon **1** in saurer wässriger Lösung und in saurer DMSO-Lösung mit Fentons Reagenz zur Reaktion gebracht. In beiden Fällen konnten jedoch nur sehr geringe Umsetzungen beobachtet werden. Dies ist im ersten Fall auf eine zu geringe Löslichkeit des Chinolons und im zweiten Fall auf eine zu schlechte Löslichkeit der Eisenionen in DMSO zurückzuführen.

Daraufhin wurden Versuche mit Lösungsmittelgemischen durchgeführt. Chinolon **1** wurde letztlich in einer Lösung aus DMSO und Methanol (14:1), die mit konzentrierter Schwefelsäure angesäuert worden war, gelöst und mit 1.6 Moläquivalent Fe^{2+} -Ionen und 186 Moläquivalent Wasserstoffperoxid versetzt. Diese Reaktionsmischung wurde für zwei Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Im Gegensatz zur Bestrahlung mit γ -Strahlen, der herkömmlichen Methode zur Durchführung der Random Chemistry, konnte das erhaltene Reaktionsgemisch anschließend jedoch nicht direkt der HPLC-Fraktionierung zugeführt werden, sondern musste zunächst zur Entfernung der entstandenen Fe^{3+} -Ionen geeignet aufgearbeitet werden. Vorausgegangene Untersuchungen dazu zeigten, dass die Ausfällung der Eisenionen als Thiocyanat- oder Phosphatsalz nie quantitativ verlief.⁷⁴

Als beste Möglichkeit der Abtrennung der Eisenionen erwies sich daher das Schwerkraftsäulen über Kieselgel mit einem geeigneten Laufmittelgemisch. Im Fall der Fluorchinolone mit Piperazinsubstituenten eignete sich hierfür ausschließlich das im Europäischen Arzneibuch beschriebene Laufmittel für Norfloxacin, eine Mischung aus Wasser, Diethylamin, Toluol, Chloroform und Methanol im Verhältnis 8: 14: 20: 40: 40.⁹¹ Eine Reduzierung dieses Fließmittels auf weniger Komponenten brachte stets eine Verschlechterung der Trennleistung mit sich, d. h. entweder zu kleine R_f -Werte oder aber ein zu starkes Tailing auf der Säule und damit eine ungenügende Abtrennung der

Eisenionen. Nach der so erfolgten Aufarbeitung konnte die Probe schließlich der eigentlichen HPLC-Fraktionierung zugeführt werden.

2.2.2 Fraktionierung der Substanzbibliothek und Hit-Suche

2.2.2.1 Bioaktivitätsgeleitete Fraktionierung

Zur Fraktionierung der bei der Umsetzung mit Fentons Reagenz entstandenen Substanzbibliothek bediente man sich der bioaktivitätsgeleiteten Fraktionierung. Ein typischer Arbeitsablauf bei der Suche nach biologisch aktiven Substanzen wird in Abbildung 8 gezeigt. Zunächst wird dazu die erhaltene Substanzbibliothek fraktioniert und die erhaltenen Fraktionen auf ihre biologische Aktivität hin geprüft. Biologisch aktive Fraktionen (Hits) werden subfraktioniert, wohingegen inaktive Fraktionen verworfen werden. Diese Subfraktionierung mit anschließenden Testungen der Fraktionen auf Hits wird solange durchgeführt, bis man letztlich Reinsubstanzen erhält, auf die die biologische Aktivität zurückzuführen ist. Die so isolierten aktiven Substanzen werden schließlich der Strukturaufklärung mittels NMR- und Tandem-ESI-Massenspektrometrie zugeführt. Ein solches Verfahren bezeichnet man auch als Dekonvolution.

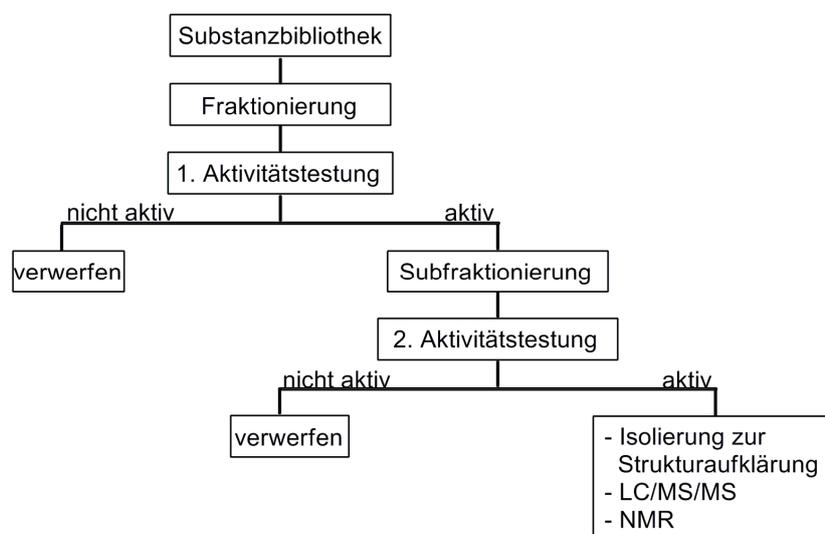


Abbildung 8 Arbeitsablauf der bioaktivitätsgeleiteten Fraktionierung

2.2.2.2 Entwicklung einer HPLC-Methode zur Trennung der entstandenen Substanzbibliothek

Die Entwicklung einer HPLC-Methode zur Fraktionierung der entstandenen Substanzbibliothek beinhaltete eine Reihe von Herausforderungen. Diese bestanden zum Einen in dem Vorliegen eines Vielkomponentengemisches mit unbekannter Zusammensetzung und zum Anderen im Vorhandensein von meist sehr kleinen Mengen an Produkten neben relativ großen Mengen an Ausgangssubstanz. Durch die Komplexität des zu untersuchenden Gemisches bestand vor allem die Gefahr, dass Substanzen unerkannt zur gleichen Zeit eluieren und deshalb nicht registriert werden würden. Die Neigung von 7-(Piperazin-1-yl)-chinoloncarbonsäuren zu zwitterionischen Strukturen stellt ein weiteres Problem dar (siehe Abbildung 9). Dadurch auftretendes Tailing wird in den meisten literaturbekannten HPLC-Methoden für Fluorchinolone durch den Einsatz von Phosphatsalzen verhindert.⁹²

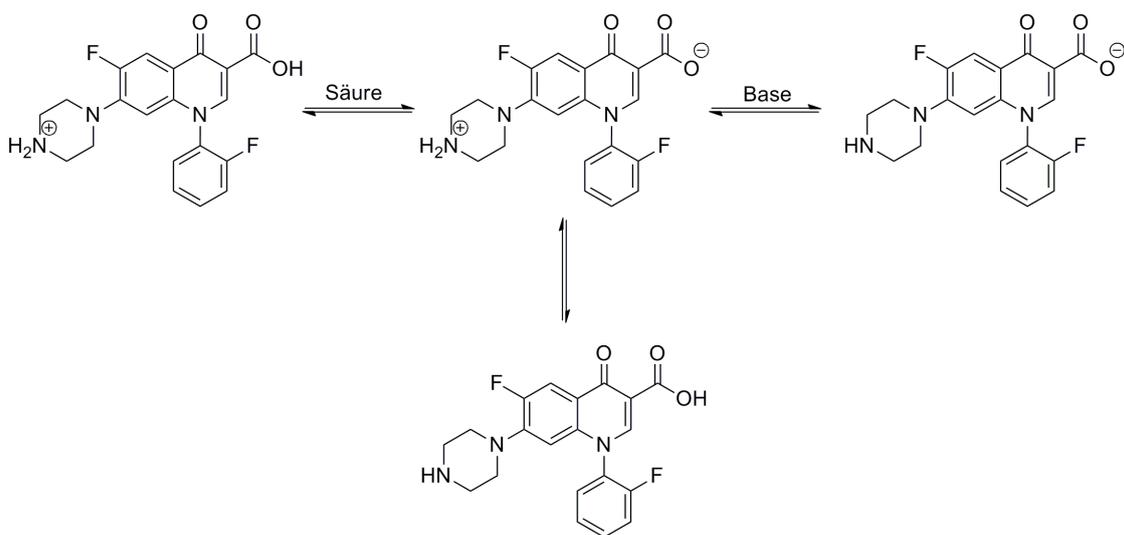


Abbildung 9 pH-Abhängigkeit von Fluorchinolonen

Unter Berücksichtigung der möglichen Anwendbarkeit der entwickelten HPLC-Methode auf später stattfindende LC/MS-Untersuchungen war eine solche Lösung jedoch nicht praktikabel, da der oben genannte Phosphatpuffer nicht flüchtig ist. Darüber hinaus schien der Einsatz von Puffersalzen als Lösungsansatz grundsätzlich diskussionswürdig,

da es bei der Fraktionierung und Isolierung der sehr kleinen Substanzmengen zur starken Puffersalz-Anreicherung kommen würde. Der Substanzverlust bei der anschließenden Entsalzung der Proben mittels Festphasenextraktion ist in dem durchgeführten Maßstab oft untragbar.

Bei der Entwicklung der HPLC-Methode zur Fraktionierung der komplexen Substanzbibliotheken war außerdem darauf zu achten, dass das Gemisch sowohl saure als auch basische Substanzen enthalten konnte, die sich über einen weiten Bereich von polaren bis zu unpolaren Substanzen erstrecken können. Diese sollten alle möglichst effektiv voneinander getrennt werden. Darüber hinaus sollte darauf geachtet werden, dass die im analytischen Maßstab entwickelte Methode später möglichst kostengünstig und ohne größere Optimierungen in eine präparative Methode transferiert werden kann.

Eine gute Vorgehensweise bei der Entwicklung einer HPLC-Methode zur Trennung von ionisierbaren Substanzen, zu denen viele Pharmaka gehören, ist die systematische Änderung sämtlicher HPLC-Parameter. Dies empfiehlt sich vor allem beim Vorliegen von komplexen Substanzgemischen, wie sie die entstandenen Substanzbibliotheken darstellten.

J.J. Kirkland⁹³ empfiehlt, bei der Methodenentwicklung zunächst eine klassisch unpolare stationäre Phase (C18) einzusetzen. Dies schien auch im gegebenen Fall sinnvoll, da zahlreiche in der Literatur zitierte Fraktionierungen von Chinolongemischen an C18-Phasen durchgeführt werden.^{92; 94; 95; 96} C18-„reversed phase“-Materialien sind apolare Phasen, die durch die Umsetzung von Kieselgel mit Alkylreagentien erhalten werden. Aus sterischen Gründen werden dabei jedoch nicht alle Silanolgruppen vollständig derivatisiert. Dies wirkt sich negativ auf das Trennverhalten von basischen Substanzen aus, da diese mit den freien Silanolgruppen in Wechselwirkung treten können, was zu einem starken Peaktailing führt. Um dies zu verhindern, werden die restlichen freien Silanolgruppen meist durch sogenanntes Endcapping, d. h. durch Reaktion mit sterische wenig anspruchsvollen Alkylreagenzien wie etwa Trimethylchlorsilan, nachbehandelt. Da piperazinsubstituierte Fluorchinolone basische Eigenschaften aufweisen (siehe Abbildung 9), wurde eine RP18-Phase verwendet, die durch geeignetes Endcapping das Auftreten von Peaktailing möglichst gering hält. Gute Trennungen lieferten Säulen der

Länge 250 mm. Da ein Großteil der entstandenen Substanzen relative kurze Retentionszeiten aufwies, da sie relativ polare Stoffe sind, wurden ebenso Versuche mit einer Aquasil-Säule, welche hydrophiler OH-Gruppen zusätzlich zu den hydrophoben Alkylketten als „Endcapping“ besitzt, sowie mit einer Cyano-Phase durchgeführt. In beiden Fällen war eine Zunahme der Retentionszeiten zu beobachten, jedoch mit einem Verlust an Selektivität, der vor allem bei der Verwendung des Cyano-Trägermaterials stark ausfiel. Als Säule der Wahl erwies sich letztendlich eine NUCLEOSIL[®] C18-AB Säule (4.0 x 250 mm, 5 µm, 100 Å, ec). Die speziell quervernetzte Octadecyl-Phase (siehe Abbildung 10) trägt keine freien Silanolgruppen mehr, weshalb man mit einer pH-Stabilität im Bereich von pH 1-9 sehr gute Trennungen mit relativ geringem Tailing erhält.

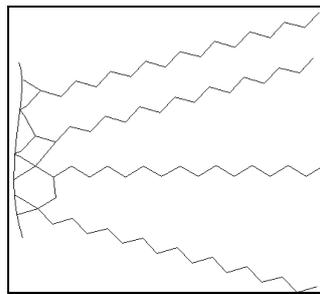


Abbildung 10 Speziell quervernetzte Octadecyl-Phase der NUCLEOSIL[®] C₁₈ AB Säule⁹⁷

Unter Berücksichtigung der Bedingung, dass weder Phosphatpuffer noch Ionenpaarreagenzien als mobile Phase verwendet werden sollten, da diese schwer flüchtig sind und bei einer späteren LC/MS-Kopplung Probleme bereiten würden, wurden verschiedene Fließmittel und Gradienten ohne Pufferzusatz getestet. In der Literatur sind für die Trennung von unterschiedlichen Fluorchinolonen neben dem Einsatz von Phosphatpuffer-Gemische vor allem Acetonitril-Ameisensäure-Wasser-Gemische zu finden.^{94; 96; 98; 99; 100} Die Einstellung eines pH-Wertes von 3.5 mit Hilfe von Ameisensäure schien insofern auch im vorliegenden Fall sinnvoll, da dieser theoretisch sowohl für basische als auch für saure Stoffe die besten Bedingungen liefern sollte. Sowohl die sauren Analyten als auch mögliche freie Silanolgruppen des Kieselgels liegen in undissoziierter Form vor. Basische Analyte hingegen liegen in protonierter Form vor,

so dass keine elektrostatischen Wechselwirkungen stattfinden können, die zu Peak tailing führen würden. Darüber hinaus dient Ameisensäure zugleich als Ionisierungshilfsmittel für die späteren ESI-LC-MS-Messungen. Der Einsatz von 0.2% Ameisensäure im wässrigen Eluenten lieferte hierbei die besten Peakformen und reproduzierbare Retentionszeiten bei der HPLC-Trennung sowie optimale Signalintensität bei der massenspektrometrischen Detektion. Zur Verbesserung der Signalintensität bei der massenspektrometrischen Detektion wurden neben Ameisensäure auch Ammoniumacetatlösungen in Konzentrationen von 5-10 mM als mögliche wässrige Fließmittel untersucht. Da hierbei jedoch keine Verbesserung auf die Signalintensität beobachtet werden konnte, wurde der Ansatz zur Verwendung von Ammoniumacetat als wässriges Fließmittel nicht weiter verfolgt.

Als organisches Fließmittel wurde neben Acetonitril auch Methanol getestet. Acetonitril verfügt über eine niedrige Viskosität, eine hohe UV-Transmission bei $\lambda = 230$ nm (99%) und eine hohe Elutionskraft. Methanol besitzt demgegenüber zwar eine höhere Viskosität, ist aber deutlich preiswerter als Acetonitril. Im Hinblick auf die späteren präparativen HPLC-Trennungen, in denen das Solvent die größte Rolle bezüglich der Kosten spielt, wurde deshalb versucht Acetonitril durch Methanol zu ersetzen.¹⁰¹ Dies führte allerdings in allen untersuchten Trennungen zu weitaus schlechteren Auflösungen. Die Peaks waren deutlich unschärfer und das Tailing stärker als beim Einsatz von Acetonitril.

Um eine optimale Elution aller Komponenten der Substanzbibliothek zu erlangen, kamen zum Teil Gradientenelutionen zum Einsatz. Die Elutionsrate wurde je nach Probe so gewählt, dass alle Komponenten möglichst gut getrennt eluierten, was bei einer Flussrate von 0.7 ml/min optimal gegeben war. Da die thermische Stabilität der einzelnen Substanzen nicht bekannt war, wurde bei 25 °C chromatographiert.

2.2.2.3 HPLC-Trennung und Up-Scaling

Nach Optimierung sämtlicher Parameter wurden schließlich folgende Bedingungen zur ersten Fraktionierung der Substanzbibliothek von Chinolon **1** verwendet.

Säule: NUCLEOSIL[®] C₁₈AB, 250 × 4.0 mm, 5 µm; *Fließmittel:* A: 0.2% wässrige Ameisensäure, pH = 3.5; B: Acetonitril; *UV-Detektion:* 254 nm; *Temperatur:* 25 °C; *Flussrate:* 0.7 ml/min; isokratisch A/B (80:20) für 20 min

Das erhaltene Chromatogramm (siehe Abbildung 11) zeigte deutlich, dass auch nach der Umsetzung mit Fentons Reagenz ein Großteil des eingesetzten Chinolons **1** erhalten bleibt. Es war aber auch eine Vielzahl neu gebildeter Substanzen zu erkennen, wengleich deren Signalintensitäten im Vergleich zum Eduktchinolon relativ gering waren. Um das komplexe Substanzgemisch den ersten biologischen Testungen zuzuführen, wurde es daraufhin zunächst fraktioniert.

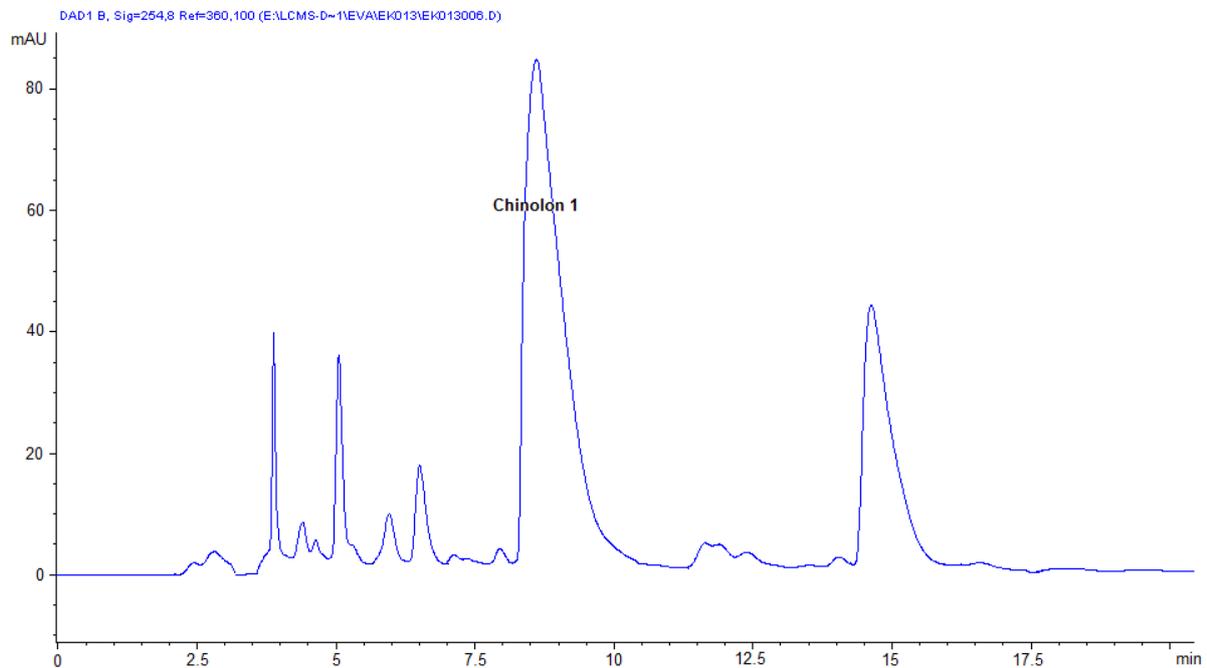


Abbildung 11 HPLC-Chromatogramm der Substanzbibliothek des Chinolons **1**

Um in annehmbaren Zeiten ausreichende Substanzmengen für die bioaktivitätsgeleitete Fraktionierung isolieren zu können, wurde die analytische HPLC-Methode in einen semi-präparativen Maßstab übertragen. Mit Hilfe der (semi)präparativen HPLC ist es möglich, Substanzen nicht nur auf ihre Reinheit hin zu überprüfen, sondern auch Substanzgemische in relativ kurzer Zeit quantitativ zu trennen.

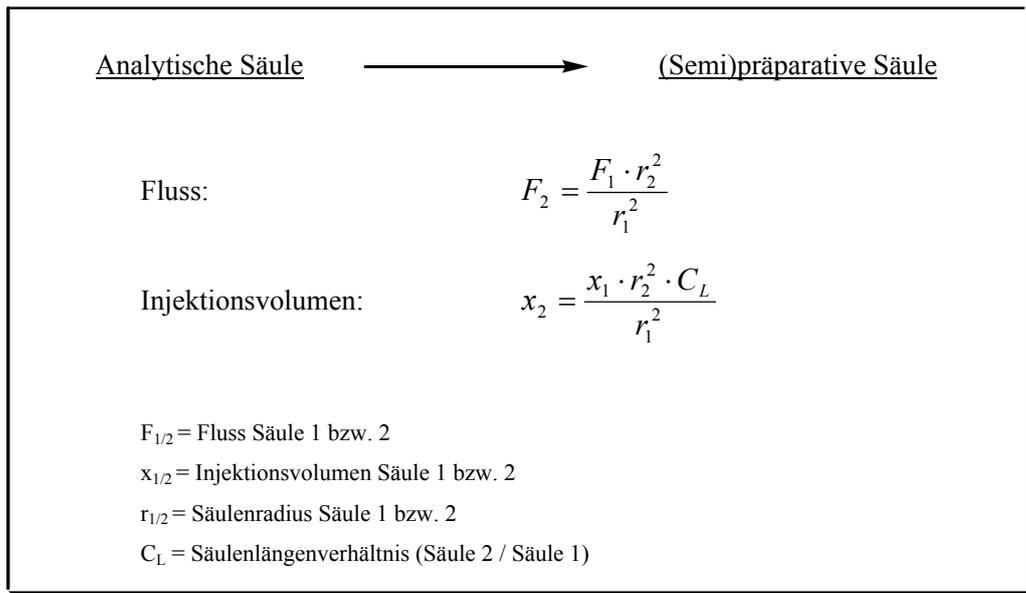


Abbildung 12 „Up-Scaling“ einer analytischen Trennung¹⁰²

Da bei der analytischen HPLC die Substanzmenge im Verhältnis zur Menge der stationären Phase gering ist, werden sehr gute Trennleistungen erreicht. Bei der (semi)präparativen HPLC beginnt man mit einer Substanzmenge von 10^{-5} - 10^{-6} g Substanz pro g Sorbens.¹⁰³ Die „Scale-up“-Berechnung der Flussrate und des Injektionsvolumens erfolgt analog zu der in Abbildung 12 dargestellten Methodik.

Da für die (semi)präparativen HPLC-Säulen von Macherey-Nagel das speziell quervernetzte AB-Material nicht geliefert werden konnte, wurde mit einer leicht abgewandelten NUCLEOSIL[®] C₁₈ EC Säule (250 × 10.0, 5 μm) gearbeitet. Dabei ist das Füllmaterial der Standard-NUCLEOSIL-Säule nicht quervernetzt, sondern größtenteils nachsilyliert (siehe Abbildung 13).

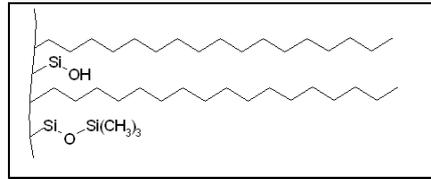


Abbildung 13 Phase der NUCLEOSIL[®] Standard C₁₈-Säule¹⁰⁴

Die Benutzung der NUCLEOSIL[®] C₁₈ EC Säule (250 × 10.0 mm, 5 μm) entsprach nach obiger Gleichung einem Scale-Up-Faktor von 6.25. Entsprechend wurden der Eluentenfluss und das Dosiervolumen angepasst. Die Fraktionierung der Substanzbibliothek wurde demnach unter folgenden Bedingungen durchgeführt.

Säule: NUCLEOSIL[®] C₁₈ EC, 250 × 10.0 mm, 5 μm; *Fließmittel:* A: 0.2% Wässrige Ameisensäure, pH = 3.5; B: Acetonitril; *UV-Detektion:* 254 nm; *Temperatur:* 25 °C; *Flussrate:* 4.5 ml/min; isokratisch A/B (80:20) für 20 min

Der Vergleich der beiden Chromatogramme aus dem analytischen und dem semipräparativen Lauf zeigt die zu erwartende Verschlechterung der Auflösung durch die Verwendung des nicht quervernetzten Säulenmaterials. Durch das verstärkt auftretende Peaktailing sind deutlich weniger Peaks basisliniengetreunt. Da jedoch nach den ersten Fraktionierungsschritten ohnehin keine Reinsubstanzen zu erwarten sind, das Ziel vielmehr in der Lokalisierung aktiver Verbindungen liegt, war die erzielte Auflösung ausreichend.

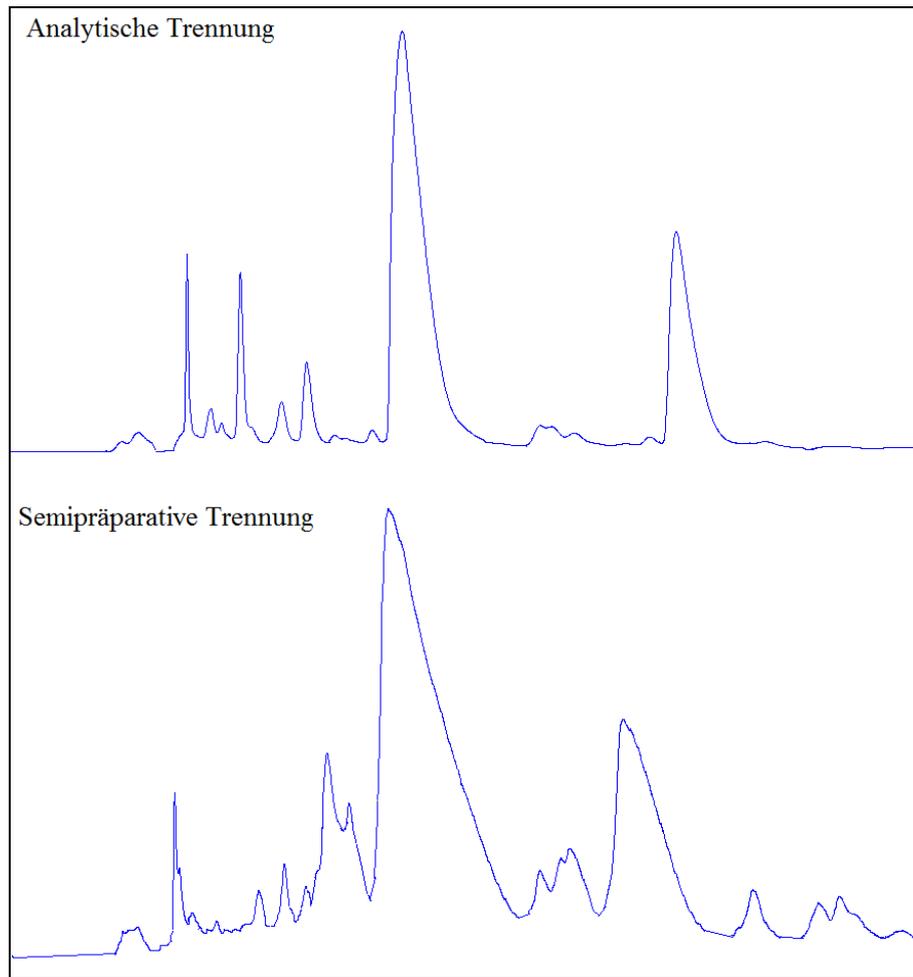


Abbildung 14 Up-Scaling des HPLC-Chromatogramms der Substanzbibliothek des Chinolons **1**

2.2.2.4 Fraktionierung der Substanzbibliothek und 1. Aktivitätstestung

Zur Lokalisierung der aktiven Substanzen wurden nun zunächst 10 Fraktionen gesammelt (siehe Abbildung 15), die schließlich der Testung gegen *Staphylococcus aureus*, *Trypanosoma brucei brucei* und *Leishmania major* zugeführt wurden.

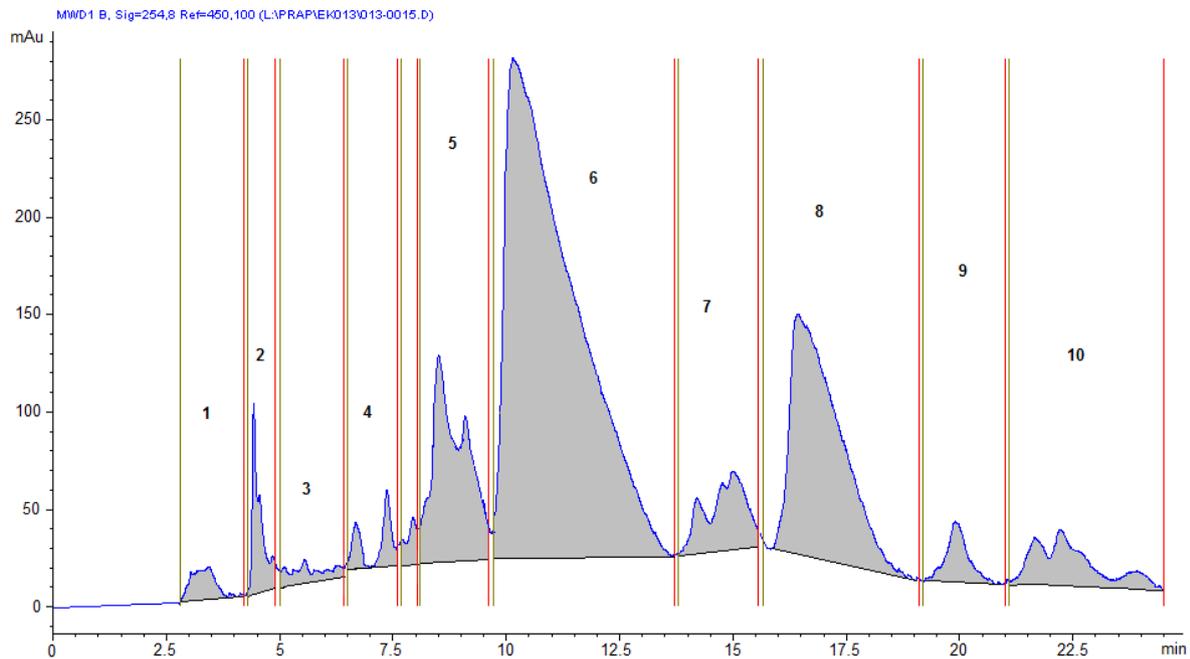


Abbildung 15 1. Fraktionierung der Substanzbibliothek von Chinolon 1

Die Ergebnisse der Testungen zeigten, dass keine der Fraktionen gegen *Leishmania major* aktiv war, wohingegen gegen *Staphylococcus aureus* in den Fraktionen 5 bis 10 eine Aktivität festgestellt werden konnte.

Tabelle 4 Testergebnisse Antibakterielle Wirkung (*Staphylococcus aureus*); Minimale Hemmkonzentration (MHK)

	<i>Staphylococcus aureus</i> NCTC 8325 MHK, μM	<i>Staphylococcus aureus</i> 08-00713(CIP-R, MFL-S) MHK, μM
<i>Frk1-1</i>	>160	>160
<i>Frk1-2</i>	>160	>160
<i>Frk1-3</i>	>160	>160
<i>Frk1-4</i>	>160	>160
<i>Frk1-5</i>	>160	>160
<i>Frk1-6</i>	<160	>160
<i>Frk1-7</i>	<160	<160

<i>Frk1-8</i>	<160	<160
<i>Frk1-9</i>	<160	<160
<i>Frk1-10</i>	<160	<160

Gegen *Trypanosoma brucei brucei* fand sich wiederum in mehreren Fraktionen eine leichte Steigerung der Aktivität im Vergleich zum in Fraktion Frk1-6 enthaltenen Eduktchinolon 1. Die entsprechenden IC₅₀-Werte sind mit 40-55 µM zwar noch nicht sonderlich niedrig, doch muss bedacht werden, dass es sich auf dieser Stufe noch um Substanzgemische und keine Reinsubstanzen handelt. Die entsprechenden Aktivitäten können demnach beispielweise auch von Substanzen verursacht worden sein, die nur in Spuren in den Fraktionen enthalten sind und in Reinform eine deutlich größere Wirkung zeigen.

Tabelle 5 Ergebnisse der 1. Testung gegen *Trypanosoma brucei brucei* TC221

	<i>Trypanosoma brucei brucei</i> TC221			
	48h		72h	
	IC ₅₀ (µM)	STABW (µM)	IC ₅₀ (µM)	STABW (µM)
<i>Frk1-1</i>	>100	n.d.	>100	n.d.
<i>Frk1-2</i>	>100	n.d.	>100	n.d.
<i>Frk1-3</i>	80	55	>100	n.d.
<i>Frk1-4</i>	>100	n.d.	>100	n.d.
<i>Frk1-5</i>	>100	n.d.	>100	n.d.
<i>Frk1-6</i>	54	15	>100	n.d.
<i>Frk1-7</i>	>100	n.d.	>100	n.d.
<i>Frk1-8</i>	44	24	>100	n.d.
<i>Frk1-9</i>	52	20	>100	n.d.
<i>Frk1-10</i>	49	5	>100	n.d.

Letztlich zeigen die Ergebnisse der 1. Testung, dass vor allem in den „späten“ Fraktionen, d. h. in den unpolarerer Fraktionen 8-10 Substanzen enthalten waren, die eine leicht höhere Aktivität gegenüber Trypanosomen hervorriefen als das Ausgangs-

chinolon 1. Es wurde deshalb versucht, diese spät eluierenden und positiv getesteten Fraktionen weiter aufzutrennen, um die genauere Position aktiver Komponenten im Chromatogramm zu identifizieren.

2.2.2.5 Subfraktionierung und 2. Aktivitätstestung

Zur besseren Auftrennung der Fraktionen Frk1-8, Frk1-9 und Frk1-10 wurde versucht, eine schnelle Elution der Komponenten zu erzielen und gleichzeitig eine Basislinientrennung sämtlicher Substanzen zu erhalten. Trotz zahlreicher Variationen der Fließmittelzusammensetzung, Fließgeschwindigkeit und des Gradienten konnte keine verbesserte Trennung der einzelnen Probenkomponenten an der NUCLEOSIL[®] C₁₈ Phase erreicht werden. Die Peaks waren grundsätzlich zu breit, zeichneten sich durch Tailing aus und waren nicht genügend voneinander getrennt. Deshalb wurde eine andere stationäre Phase getestet.

Die Säule SYNERGI[™] MAX-RP besitzt ein C12-„reversed phase“-Trägermaterial (siehe Abbildung 16), das wie die anderen Umkehrphasen (C18 und C8) auf dem hydrophoben Retentionsmechanismus beruht und gute Langzeitstabilität aufweist. Die Restsilanolaktivität dieser stationären Phase ist um 25% vermindert und das Material in einem pH-Bereich von 1.5 – 10 stabil. Entscheidend ist jedoch vor allem, dass das Material bei basischen Substanzen zu einer besseren Peaksymmetrie im Vergleich zu den üblichen Umkehrphasen führt und so das Tailing verringert wird.¹⁰⁵ Da diese Eigenschaften für das vorliegende Trennproblem besonders geeignet erschienen, wurden die weiteren Trennungen mit dieser Säule durchgeführt.

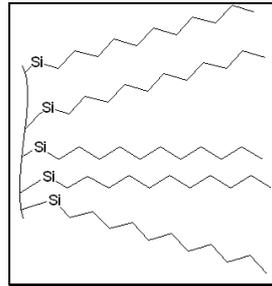


Abbildung 16 C12-Phase der SYNERGI™ MAX-RP Säule¹⁰⁵

Mit Hilfe der polareren stationären Phase konnte nach Optimierung des pHs und der Flussrate schließlich folgende Methode zur Auftrennung der „spät“ eluierenden Fraktionen Frk1-8 bis Frk1-10 ermittelt werden.

Säule: SYNERGI™ MAX-RP, 150 × 10.0 mm, 4 µm; *Fließmittel:* A: 0.2% wässrige Ameisensäure, pH = 2.5; B: Acetonitril; *UV-Detektion:* 280 nm; *Temperatur:* 25 °C; *Flussrate:* 4.7 ml/min; A/B (81:19) für 5 min, A/B (81:19) auf 39% B in 2 min, A/B (61:39) für 6 min

Abbildung 17 zeigt, dass der gesamte Lauf zu deutlich kürzeren Retentionszeiten hin verschoben ist, da unter anderem das Eduktchinolon **1** bereits nach 4.7 min eluiert und nicht erst nach 8.8 min wie in der ersten Fraktionierung. Gleichzeitig wurden die Fraktionen, die später als das Edukt eluieren, deutlich besser voneinander getrennt. Dadurch konnten die ursprünglich drei Fraktionen Frk1-8, Frk1-9 und Frk1-10 aus der 1. Auftrennung nun in fünf Fraktionen aufgeteilt werden und erneut der Testung auf Aktivität gegen *Trypanosoma brucei brucei* zugeführt werden.

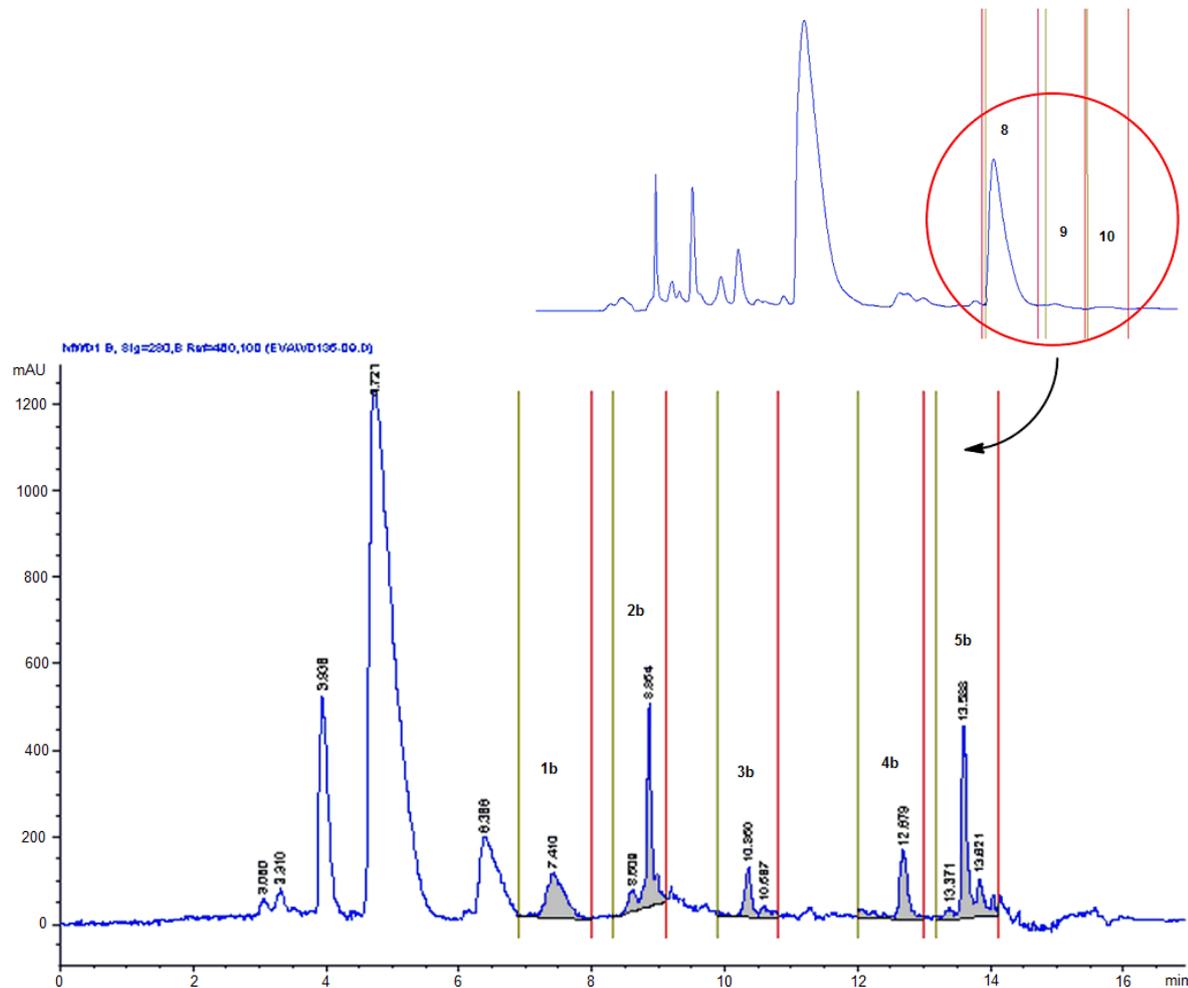


Abbildung 17 HPLC-Chromatogramm der 2. Fraktionierung zur besseren Auftrennung der Fraktionen Frk1-8, Frk1-9 und Frk1-10

Die Testungsergebnisse gegen *Trypanosoma brucei brucei* zeigten wiederum eine deutliche Steigerung der Aktivitäten im Vergleich zum Eduktchinolon **1**. Die IC_{50} -Werte reichen von 16 μM in Frk1-4b bis zu 8 μM in Frk1-2b (siehe Tabelle 6). In allen Fraktionen konnte demnach eine Steigerung der Aktivität bezüglich des Eduktchinolons **1** um mindestens den Faktor 2.5 erreicht werden. Zieht man die Testergebnisse der 1. Testreihe hinzu, in dem die Eduktchinolonfraktion einen IC_{50} -Wert von 54 μM besaß, kann man sogar von einer minimalen Steigerung der Aktivität um den Faktor 3.38 bis hin zu einer Steigerung der Aktivität um den Faktor 6.75 sprechen. Durch die Umsetzung mit

Fentons Reagenz sind also zweifelsfrei Substanzen entstanden, die in eine deutliche antitrypanosomale Aktivität zeigen.

Tabelle 6 Ergebnisse der 2. Testung gegen *Trypanosoma brucei brucei* TC221

	<i>Trypanosoma brucei brucei</i> TC221			
	48h		72h	
	IC ₅₀ (µM)	STABW (µM)	IC ₅₀ (µM)	STABW (µM)
<i>Frk1-1b</i>	10	0.3	14	1.5
<i>Frk1-2b</i>	8	1.9	13	2.4
<i>Frk1-3b</i>	14	0.6	17	1.4
<i>Frk1-4b</i>	16	2.5	17	0.4
<i>Frk1-5b</i>	11	0.6	18	2.9
1 (Edukt)	>40	n.d.	>40	n.d.

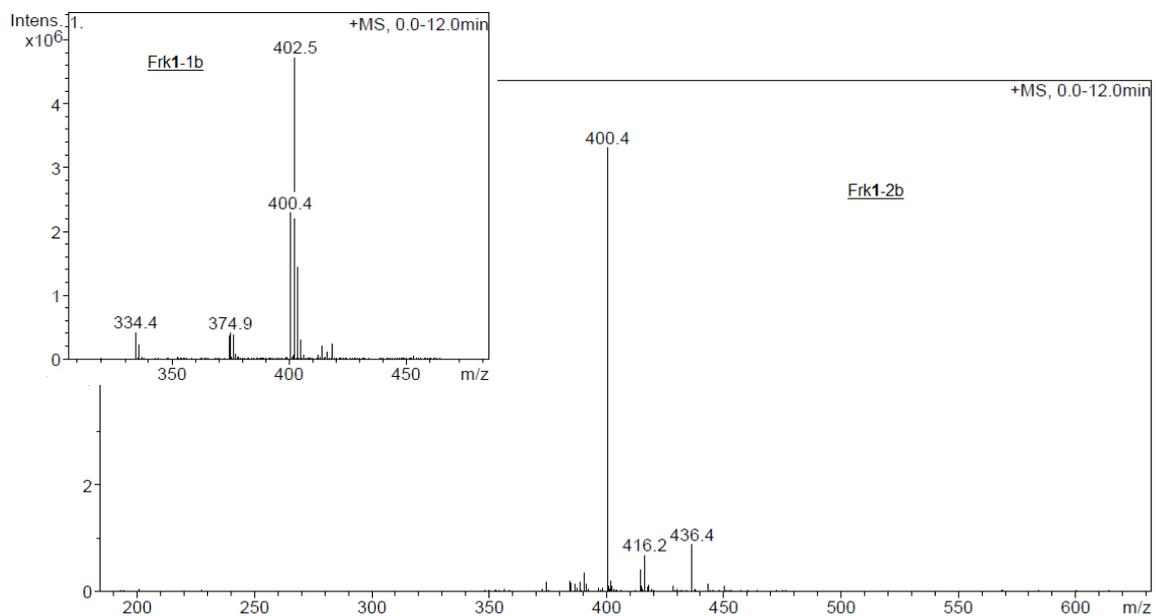
Zur Untersuchung der einzelnen Fraktionen und zur Abklärung, wie viel Substanzen noch in den einzelnen Fraktionen enthalten waren, wurden LC/ESI-MS-Messungen durchgeführt. Dafür wurden die Bedingungen zur analytischen Trennung der Substanzbibliothek verwendet. Die LC/MS-Analysen der einzelnen Fraktionen machten deutlich, dass es sich bei allen Fraktionen noch um Substanzgemische handelte, so dass die Beurteilung der tatsächlichen Aktivität noch schwierig ist.

In Tabelle 7 sind die in den Fraktionen hauptsächlich enthaltenen Molekülmassen als detektierte Masse-zu-Ladungsverhältnisse angegeben. Die Tatsache, dass nur eine Masse angegeben ist, bedeutet hier noch nicht, dass bereits Reinsubstanzen vorlagen. Die erhaltenen Massen ließen jedoch erste Spekulationen über die möglicherweise entstandenen Substanzen zu.

Tabelle 7 Als Masse-zu-Ladungsverhältnis detektierte Molekülmassen der einzelnen Fraktionen

	m/z
<i>Frk1-1b</i>	400, 402
<i>Frk1-2b</i>	400, 416
<i>Frk1-3b</i>	317, 384, 388
<i>Frk1-4b</i>	414
<i>Frk1-5b</i>	428
1 (Edukt)	386

Die Ergebnisse der 2. Testung gegen *Trypanosoma brucei brucei* zeigen, dass in Fraktion **Frk1-2b** die größte inhibitorische Aktivität ist. Aller Wahrscheinlichkeit nach ist diese Aktivität zurückzuführen auf die Substanz mit m/z 400, da diese vorherrschend vorliegt. Möglicherweise lässt sich so auch die Aktivität der Fraktion **Frk1-1b** erklären, da hier ebenfalls die Verbindung mit m/z 400 nachzuweisen ist (siehe Abbildung 18).

**Abbildung 18** MS-Spektren der Subfraktionen **Frk1-1b** und **Frk1-2b**

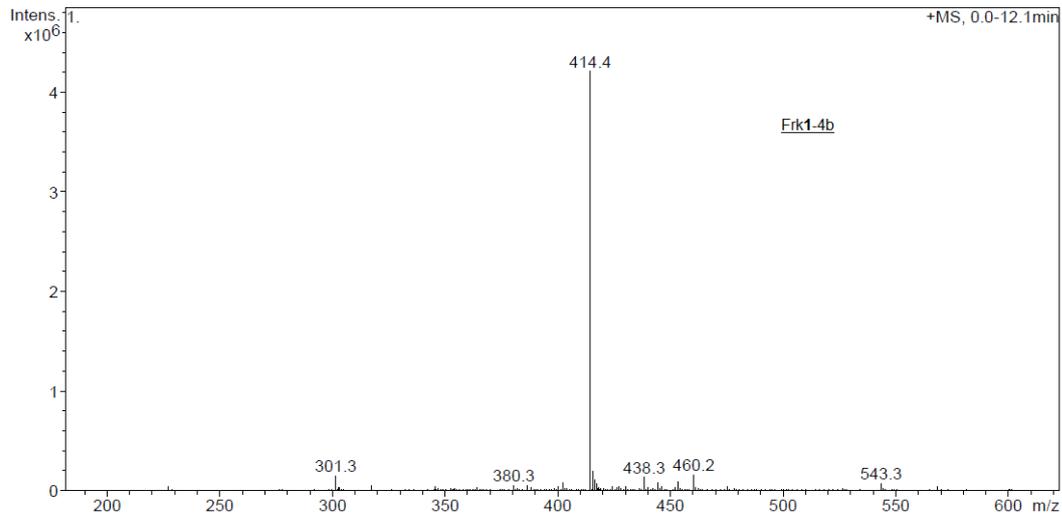


Abbildung 19 MS-Spektrum der Subfraktion Frk1-4b

Einen nahezu idealen Fall stellte die Subfraktion Frk1-4b dar, da hier fast ausschließlich nur eine Substanz mit m/z 414 vorlag, so dass deren Aktivität mit aller Wahrscheinlichkeit auf diese Verbindung zurückzuführen ist (siehe Abbildung 19).

Die Fraktion Frk1-5b war hingegen eine Mischfraktion, da hier auch die Substanzen der Fraktion Frk1-3b, also die Substanzen mit m/z 317 und m/z 384, zu erkennen waren (siehe Abbildung 20).

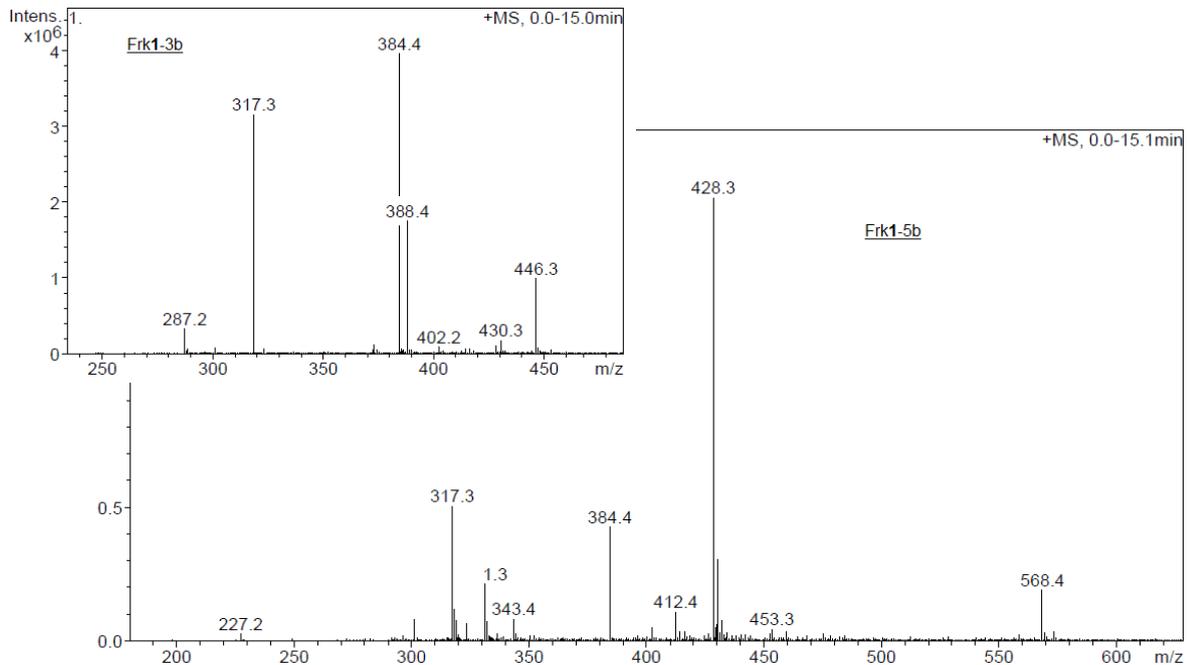


Abbildung 20 MS-Spektren der Subfraktionen Frk1-3b und Frk1-5b

Unter Berücksichtigung von Literaturdaten^{99; 106; 107; 108; 109; 110; 111} zu typischen Zerfalls- oder Abbauprodukten von Chinolonen, sowie den gemessenen LC/MSⁿ-Spektren der einzelnen Fraktionen und Überlegungen, welche Strukturvariationen durch die Radikale der Fenton-Reaktion erzeugt werden können, konnten für die gefundenen Massen unterschiedliche Strukturvorschläge gemacht werden (siehe Abbildung 21).

Über die Hälfte der möglichen Strukturen trägt dabei eine Carboxy- bzw. Amidfunktion in Position 7 des Chinolons (vgl. Abbildung 21). Um zu untersuchen, ob solche Strukturvariationen für die Aktivitätssteigerung gegen *Trypanosoma brucei brucei* verantwortlich sind, wurden in einem Teilprojekt dieser Arbeit (vgl. Kapitel 2.2.6.1) Chinolone mit Amidfunktion in Position 7 synthetisiert, die auf ihre Aktivität gegen *Trypanosoma brucei brucei* hin untersucht werden sollten, um anschließend eventuelle Strukturwirkungsbeziehungen aufstellen zu können.

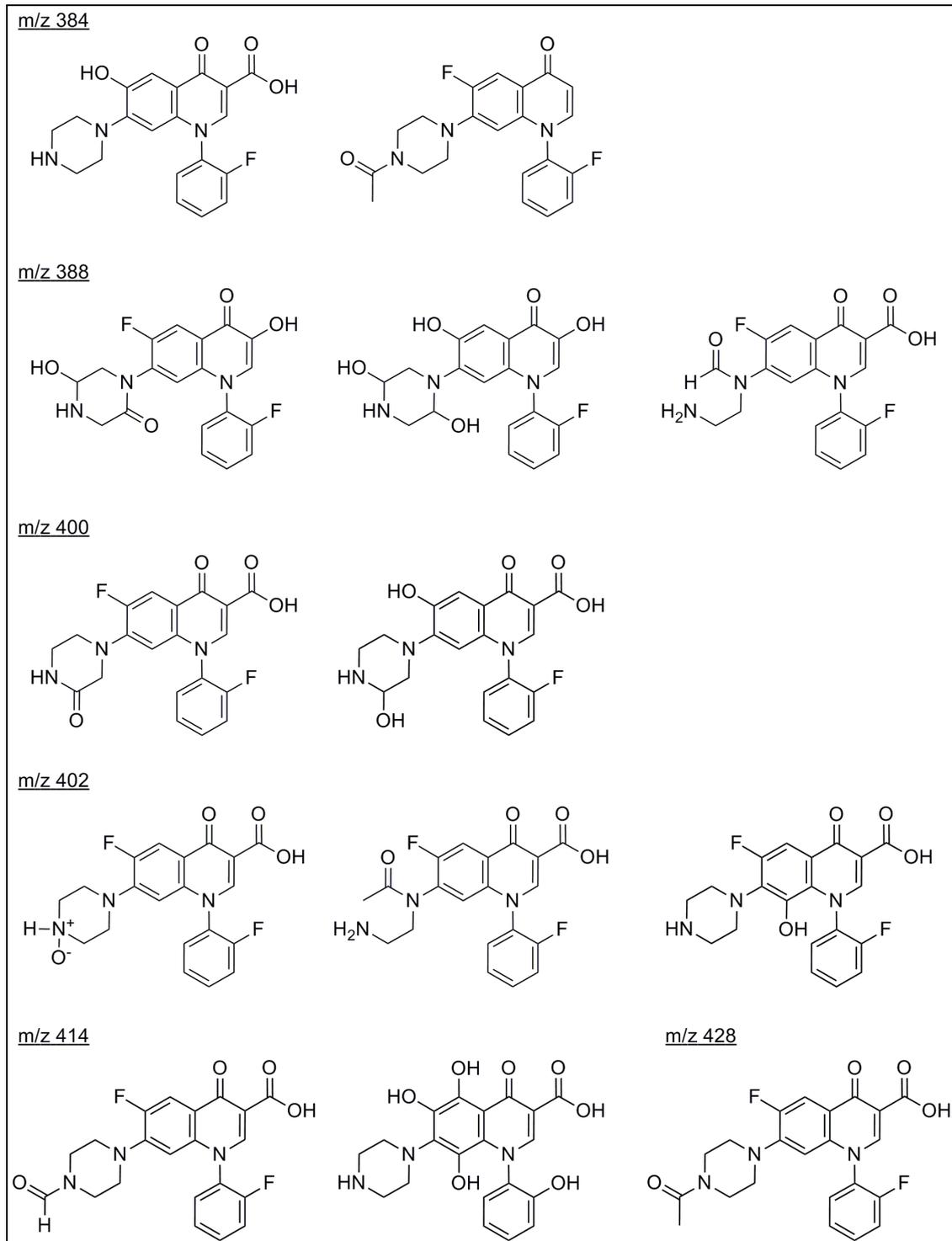


Abbildung 21 Mögliche Strukturen der aktiven Fraktionen Frk1- 1b-6b

2.2.3 Isolierung der biologisch aktiven Substanzen

Um möglichst reine Substanzen zu erhalten, wurde im Folgenden die sogenannten „peak-based“-Fraktionierung mit „time slicing“-Funktion angewandt. Dabei wird ein Peak in kurzen Zeitabständen geschnitten, wodurch auch das Sammeln von breiten, nicht basisliniengetrennten Peaks möglich wird. Würde man im Falle von breiten, sich überlappenden Peaks nur jeweils zwei Fraktionen von einem Peak sammeln, dann wären diese gegenseitig stark verunreinigt. Deshalb bietet es sich an, nur den Anfang eines Peaks zu sammeln und den zum benachbarten Peak sich nähernden Abschnitt in kleine Abschnitte aufzuteilen und separat zu sammeln. Dies führt zwar zu einer größeren Anzahl von Fraktionen mit sehr geringen Substanzmengen, doch erhält man deutlich reinere Fraktionen. Um auf diese Weise ausreichend Substanzmenge für die NMR-Experimente und die Testungen zu erhalten, sind dann allerdings zahlreiche Trennläufe notwendig.

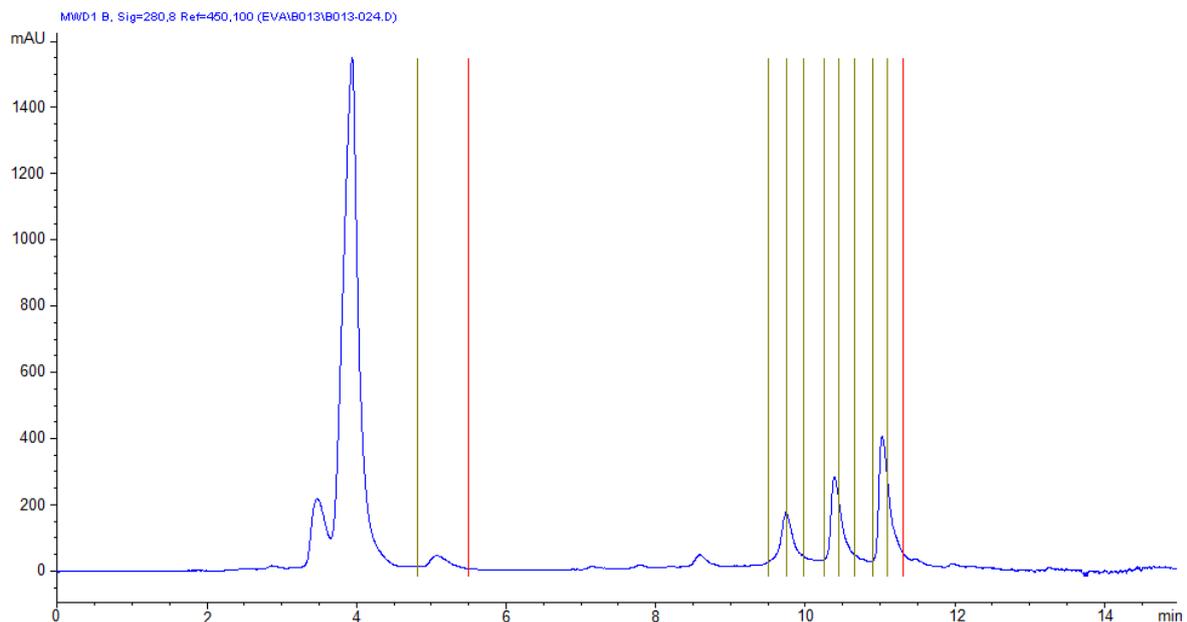


Abbildung 22 “Peak-based“-Fraktionierung mittels „time-slicing“

Mit folgender Methode und „time-slicing“-Funktion konnten vier, gemäß LC/MS-Messung reine Fraktionen isoliert werden.

Säule: SYNERGI™ MAX-RP, 150 × 10.0 mm, 4 µm; *Fließmittel:* A: 0.2% wässrige Ameisensäure, pH = 2.5; B: Acetonitril; *UV-Detektion:* 280 nm; *Temperatur:* 25 °C; *Flussrate:* 4.7 ml/min; A/B (65:35) für 3 min, A/B (65:35) auf 90% B in 9 min

Die reinen Fraktionen Frk1-1c bis Frk1-4c beinhalteten schließlich die in Tabelle 8 aufgeführten Substanzen mit Masse-zu-Ladungsverhältnissen 402, 388, 317 und 414. Es wurden also drei Substanzen isoliert, die eine größere Masse als das Ausgangschinolon **1** (m/z 387) besitzen und folglich durch Einbau und/oder Umwandlung eine erweiterte Struktur aufweisen müssen. Fraktion Frk1-3c hingegen enthält eine Substanz mit geringerer Masse und demnach eine Struktur mit reduzierter Chinolongrundstruktur bzw. abgebauten Resten in Position 1 und/oder 7.

Tabelle 8 m/z-Verhältnisse der reinen Fraktionen

	m/z
<i>Frk1-1c</i>	402
<i>Frk1-2c</i>	388
<i>Frk1-3c</i>	317
<i>Frk1-4c</i>	414

2.2.4 Identifizierung der isolierten Substanzen

Zur Strukturaufklärung und Identifizierung der isolierten Substanzen wurden neben MSⁿ-Messungen vor allem 1D- und 2-D-NMR-Messungen durchgeführt. Um Substanzverluste zu vermeiden, wurde zunächst versucht, die Substanzen für die NMR-Messungen in deuteriertem Chloroform zu lösen. So wären sie nach den Messungen leicht vom Lösungsmittel zu befreien und den anschließenden pharmakologischen Testungen zuzuführen. Deshalb wurde zunächst von Fraktion Frk1-1c ausreichend Substanz isoliert, in CDCl₃ gelöst und den NMR-Messungen am 600 MHz-NMR mit Kryoprobekopf zugeführt. Die Löslichkeit der Substanz in Chloroform war jedoch sehr schlecht, wodurch nur sehr wenig der Substanz mit m/z 402 in Lösung ging und damit die NMR-

Spektren nicht auswertbar waren. Daraufhin wurde versucht, eine der unpolaren Fraktionen, d. h. Fraktion Frk1-4c mit der darin enthaltenen Substanz mit m/z 414 in CDCl_3 zu lösen und zu vermessen. Die Substanz zeigte eine deutlich bessere Löslichkeit in Chloroform, doch ließ das ^1H -Spektrum im Aromatenbereich keine eindeutige Zuordnung der einzelnen H-Atome zu (siehe Abbildung 23).

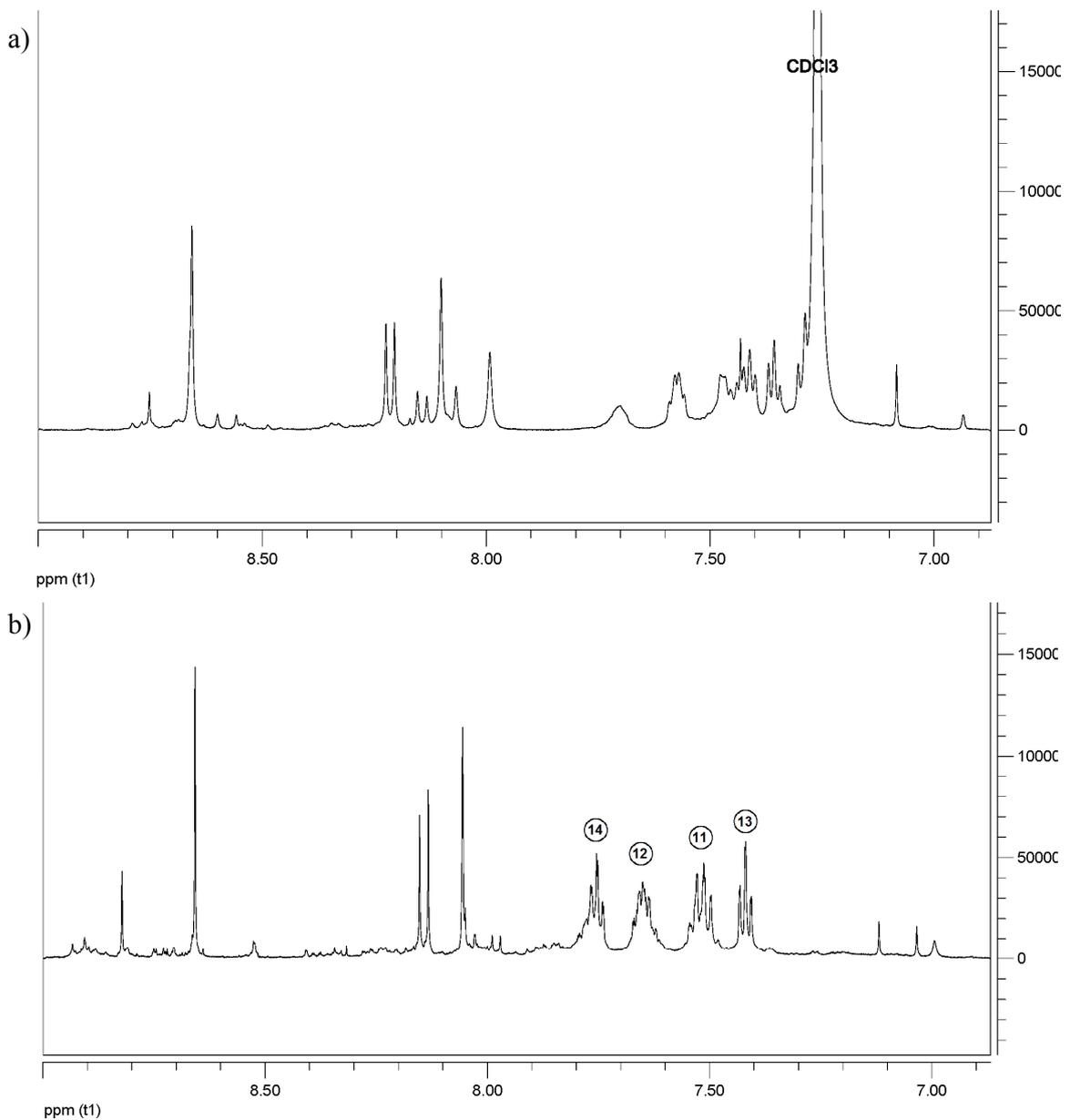


Abbildung 23 Aromatenbereich des ^1H -Spektrums von Frk1-4c in a) CDCl_3 und b) DMSO (Zuordnung siehe Abbildung 25)

Da dies für die Strukturaufklärung einer unbekanntes Substanz allerdings unerlässlich ist, wurde dazu übergegangen, die NMRs in deuteriertem DMSO zu vermessen, auch wenn sich die Aufarbeitung bzw. Rückgewinnung der Substanz für die anschließenden Testungen dadurch problematischer gestaltet.

Nachdem die beiden Fraktionen Frk1-1c und Frk1-4c wieder vom CDCl_3 befreit worden waren, mussten sie aufgrund von Verunreinigungen im CDCl_3 erneut der HPLC zugeführt werden, um die Substanzen noch einmal aufzureinigen. Der dabei auftretende Substanzverlust musste mit vollständig neuen Fraktionierungen und Isolierungen ausgeglichen werden. Anschließend wurden die NMR-Messungen in deuteriertem DMSO wiederholt. In DMSO konnte der Aromatenbereich nun eindeutig den einzelnen H-Atomen zugeordnet werden (siehe Abbildung 23), so dass eine Strukturaufklärung möglich war. Ebenso wurden Messungen der Fraktionen Frk1-2c und Frk1-3c in DMSO durchgeführt.

Von der Fraktion Frk1-3c mit der enthaltenen Substanz mit m/z 317 konnte letztendlich doch nicht genügend Substanz isoliert werden. Anorganische Salze hatten beim Auswiegen der Substanz fälschlicherweise eine Substanzmenge von 1.5 mg vorgetäuscht. Die damit durchgeführten ^1H -NMR-Messungen brachten jedoch auch bei einer erhöhten Scanzahl (512) noch keine guten Signalintensitäten. Deshalb konnten ^{13}C -Messungen gar nicht durchgeführt werden. Die gemessenen ^1H -, COSY-, HMQC- und HMBC-Spektren weisen zwar auf die Chinolongrundstruktur und den Aromaten in Position 1 hin, jedoch war hiermit eine exakte Strukturaufklärung nicht möglich.

Die Vermessungen der Fraktion Frk1-4c mit der Substanz mit m/z 414 offenbarten, dass ein doppelter Signalsatz vorlag, der eine genaue Zuordnung der einzelnen Peaks schwierig machte. Zwar konnten wiederum alle Signale des Chinolongrundgerüsts identifiziert und zugeordnet werden, doch war eine darüberhinausgehende Aussage über die vorliegenden Strukturvariationen nicht möglich.

2.2.4.1 Identifizierung von Substanz Frk1-2c

2.2.4.1.1 NMR-Messungen

Zwar war die ^1H -Signalintensität bei Fraktion Frk1-2c äußerst gering, was an den intensiveren Satellitensignalen des DMSO zu erkennen ist, jedoch war in diesem Fall trotzdem eine exakte Zuordnung der Signale möglich.

Bei den Messungen in diesem niedrigen Konzentrationsbereich waren allerdings auch Verunreinigungen des deuterierten DMSOs bei 1.23 und 0.85 ppm zu erkennen, wie Messungen von reinem deuteriertem DMSO bestätigen. Bei NMR-Messungen im üblichen Konzentrationsbereich sind diese meist vernachlässigbar klein.

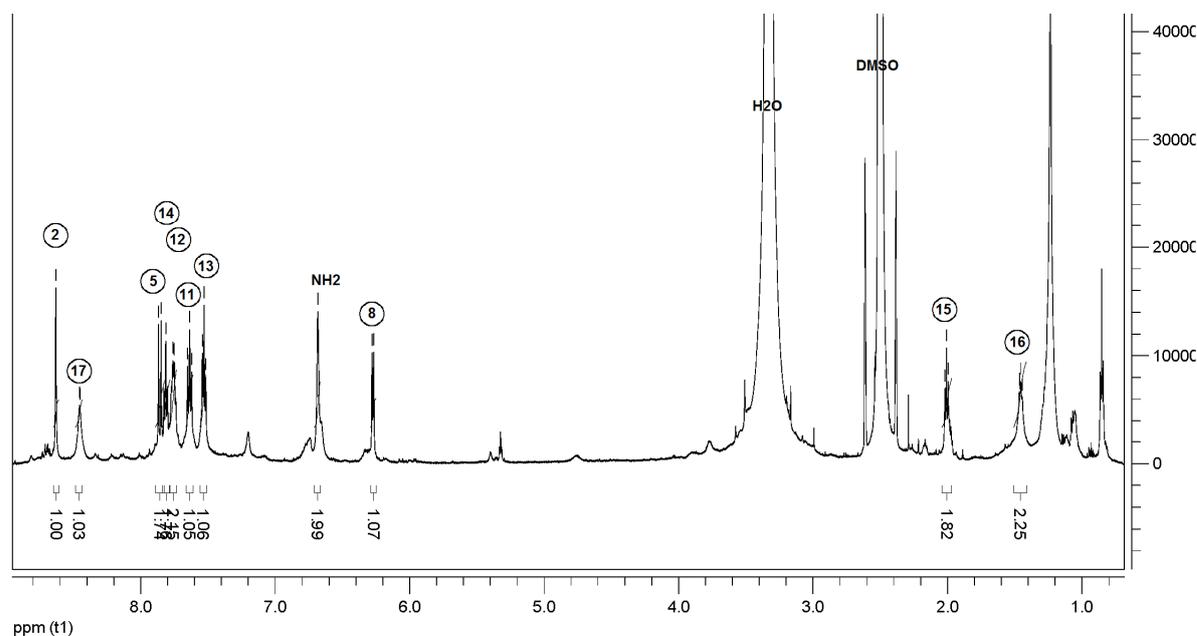
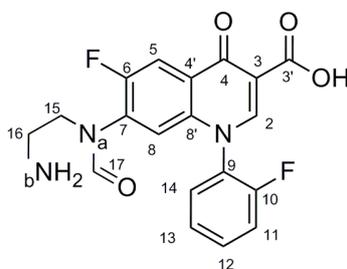


Abbildung 24 ^1H -Spektrum der Substanz aus Fraktion Frk1-2c

Das ^1H -Spektrum (siehe Abbildung 24) belegt das Vorhandensein des Chinolongrundgerüsts sowie des Fluorphenylrests in Position 1 mit den Wasserstoffatomen H-2, H-5, H-8 und H-11 bis H-14, die ein vergleichbares Muster bei den ^1H -Spektren des Eduktchinolons **1** zeigten. Ebenso lassen sich in den ^{13}C -, DEPT- und HMQC-Spektren die Kohlenstoffatome C-2 bis C-14 zuordnen. Unterschiede im Vergleich zu den Spektren des Eduktchinolons zeigen sich im aliphatischen Bereich sowie durch zwei zusätzliche

Signale im ^1H -Spektrum bei 8.45 und bei 6.68 ppm. Der Kreuzpeak im HMQC zwischen dem Wasserstoffsignal bei 8.45 ppm und dem Kohlenstoffsignal bei 164.9 ppm, legt das Vorhandensein einer Amidgruppe nahe, da diese in diesem Bereich (155 ppm – 185 ppm)¹¹² erscheinen. Das Signal bei 6.68 ppm hingegen koppelt im HMQC mit keinem Kohlenstoffatom, was in Zusammenhang mit dem Integral von 2 auf eine NH_2 -Gruppe hinweist. Die Auswertung des aliphatischen Bereichs bezeugt darüber hinaus sowohl im ^1H -Spektrum (siehe H-15 und H-16 in Abbildung 24), als auch im DEPT- und im HMQC-Experiment das Vorhandensein zweier CH_2 -Gruppen.

Damit deuten die gemessenen NMR-Spektren auf folgende Struktur:



m/z 388

Abbildung 25 Mögliche Struktur der isolierten Substanz aus Fraktion Frk1-2c

Die Tatsache, dass die Carbonylgruppe am Stickstoff a sitzt und nicht am Stickstoff b (vgl. Abbildung 25), lässt sich damit begründen, dass die Integrale im ^1H -Spektrum eindeutig das Vorliegen einer NH_2 -Gruppe bei 6.68 ppm belegen. Wäre die Carbonylfunktion am Stickstoff b koordiniert, müssten im Spektrum zwei unterschiedliche NH - und keine NH_2 -Gruppe zu beobachten sein. Kopplungen der NH_2 -Gruppe im COSY mit den H-16 oder aber eine Kopplung des H-17 mit dem C-7 im HMBC sind aufgrund der geringen Signalintensitäten jedoch nicht beobachtbar.

^1H -NMR (600 MHz, δ (ppm), J (Hz), DMSO): 8.63 (s, 1H, H-2); 8.45 (s, 1H, H-17); 7.86 (d, 1H, $^3J_{\text{H,F}}=11.4$, H-5); 7.81 (t, 1H, $^3J=7.6$, H-14); 7.75 (dd, 1H, $^3J=6.6$, H-12); 7.64 (t, 1H, $^3J_{\text{H,F}}=9.2$, H-11); 7.53 (t, 1H, $^3J=7.4$, H-13); 6.68 (s, 2H, NH_2); 6.27 (d, 1H, $^4J_{\text{H,F}}=7.1$, H-8); 2.01 (t, 2H, $^3J=7.4$, H-15); 1.45 (t, 2H, $^3J=6.4$, H-16)

^{13}C -NMR (100 MHz, δ (ppm), J (Hz), DMSO): 176.5 (C-4); 165.9 (C-3'); 164.9 (C-17); 156.9 (d, $^1J_{\text{C,F}} = 249$ Hz, C-10); 149.2 (d, $^1J_{\text{C,F}} = 244$ Hz, C-6); 148.0 (C-2); 144.2 (C-8'); 139.8 (C-4'); 132.8 (C-12); 129.9 (C-14); 127.4 (C-9); 126.2 (C-13); 117.3 (d, $^2J_{\text{C,F}} = 18.7$ Hz, C-11); 113.8 (C-3); 109.8 (d, $^2J_{\text{C,F}} = 19.9$ Hz, C-5); 99.8 (C-8); 35.1 (C-15); 25.1 (C-16)

Verbindung Frk1-2c bildet sich aller Wahrscheinlichkeit nach unter Fenton-Bedingungen analog zu der in der Literatur bereits mehrfach beschriebenen Bildung des *N*-(2-Aminoethyl)formamid-Metaboliten von Ciprofloxacin.^{108; 109; 110; 113} Dabei kommt es zunächst zur Oxidation am Piperazinring, gefolgt von der Einführung einer Hydroxylgruppe. Aus dem so gebildeten Hydroxy-Keto-Derivat entsteht schließlich durch Decarboxylierung Verbindung Frk1-2c.

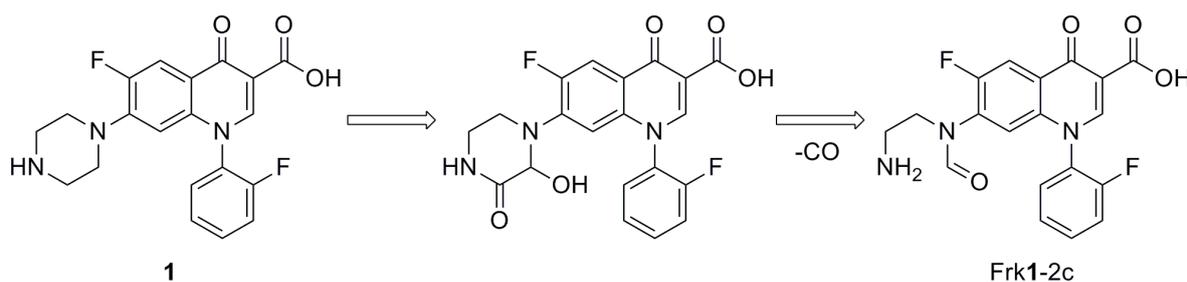


Abbildung 26 Möglicher Mechanismus der Bildung von Substanz Frk1-2c unter Fenton-Bedingungen

2.2.4.1.2 MSⁿ-Messungen

Die MSⁿ-Messungen der Substanz mit m/z 388 zeigten eine Abspaltung von 18 u zum Produktions mit m/z 370, was einer wenig aussagekräftigen, aber für ESI-Experimente typischen Abspaltung eines Wassermoleküls entspricht. Die weitere Fragmentierung dieses Produktions in MS³-Experimenten führte jedoch zur Bildung von Produktions der 2. Generation, die die Abspaltung von HF $[\text{M}+\text{H}-18-20]^+$ bezeugen, sowie die Abspaltung von CO $[\text{M}+\text{H}-18-28]^+$ und damit die Bildung eines Produktions mit m/z 342. Darüber hinaus konnte die Bildung eines Produktions mit m/z 317 beobachtet

werden, was der Abspaltung der Ethylendiamin-formaldehyd-Gruppe bis auf den direkt anhängenden Stickstoff in Position 7 entspricht. Damit untermauern die erhaltenen MSⁿ-Daten die vorgeschlagene Struktur.

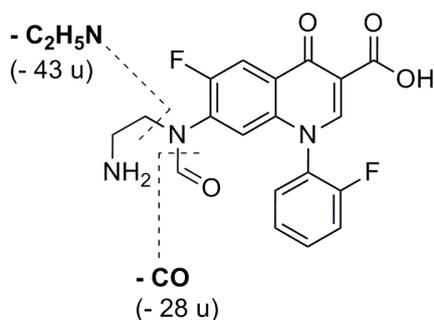


Abbildung 27 Bildung des Produktions mit m/z 317

2.2.4.1.3 Synthese der isolierten Substanz Frk1-2c

2.2.4.1.3.1 Synthese von 7-((2-Aminoethyl)amino)-6-fluor-1-(2-fluorphenyl)-4-oxo-1,4-dihydrochinolin-3-carbonsäure **8**

Zur Absicherung der postulierten Struktur in Abbildung 27 wurde nun auf klassischem Wege versucht die Substanz zu synthetisieren. Der Einbau von Resten in Position 7 erfolgte grundsätzlich analog zu den von Niedermeier *et al.*¹¹⁴ beschriebenen Synthesen. Zur Synthese von Verbindung **8** wurde deshalb zu einer Lösung von Verbindung **5** in absolutiertem DMSO ein achtfacher Überschuss an Ethylendiamin gegeben und der Reaktionsansatz für 3 h in der Mikrowelle auf 110 °C erhitzt.

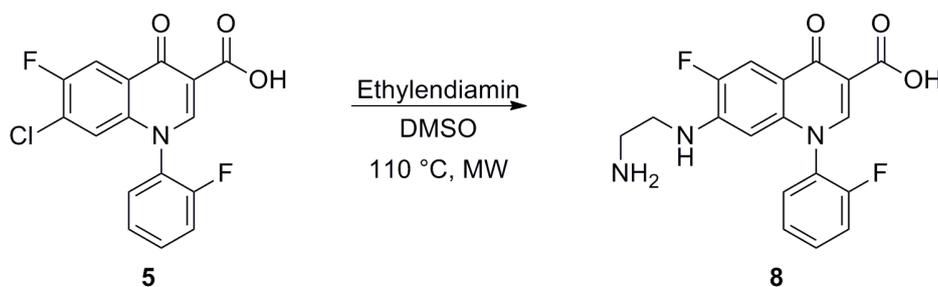


Abbildung 28 Syntheseweg zur Herstellung von Verbindung **8**

Nach erfolgter Reaktion wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und Verbindung **8** durch Zugabe von Wasser ausgefällt. Zur Vervollständigung der Fällung wurde die Lösung 24 h bei 4 °C aufbewahrt. Nach Abfiltrieren und Waschen mit Wasser wurde der erhaltene Feststoff im Vakuum getrocknet. Die beige Kristalle fielen schließlich in einer Ausbeute von 62% an. Die MS-Daten belegten eindeutig die Bildung von Substanz **8**, da vornehmlich das Masse-zu-Ladungsverhältnis 360 detektiert wurde und damit etwa eine Dimerisierung unter Bildung von m/z 659 ausgeschlossen werden kann.

2.2.4.1.3.2 Synthese von 7-(N-(2-Aminoethyl)formamido)-6-fluor-1-(2-fluorphenyl)-4-oxo-1,4-dihydrochinolin-3-carbonsäure **9**

Verbindung **9** wurde in Anlehnung an die Synthesen von Koga *et al.*¹¹⁵ durch Umsetzung von Substanz **8** mit 2.8 Moläquivalenten Triethylamin und 90 Moläquivalenten Ameisensäure erhalten, indem für 30 h zum Rückfluss erhitzt wurde. Nachdem anschließend das Lösungsmittel im Vakuum entfernt worden war, wurde Verbindung **9** in Wasser umkristallisiert. So erhielt man graubraune Kristalle in Ausbeuten von 62%. Die Zugabe von Triethylamin war hierbei essenziell, da anfängliche Versuche ohne entsprechende Hilfsbase scheiterten.

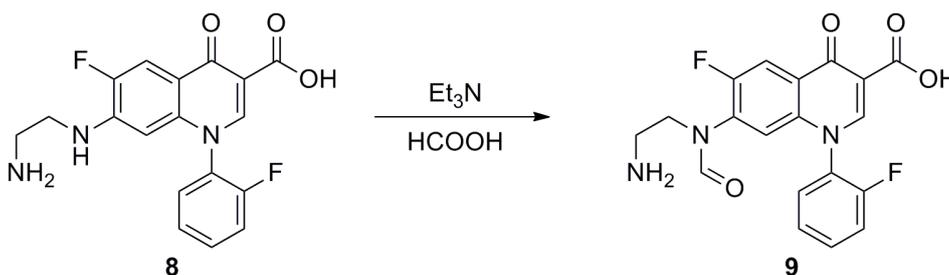


Abbildung 29 Syntheseweg zur Herstellung von Verbindung **9**

Die Zuordnung der Carbonylfunktion an den sekundären Stickstoff konnte eindeutig durch die Kopplung des Aldehyd-Wasserstoffs mit C7 in entsprechenden HMBC-NMR-Spektren bewiesen werden. Eine Zyklisierung des Restes konnte anhand der NMR-Daten und des gemessenen m/z-Verhältnisses ausgeschlossen werden. Die MS-Daten belegten

darüber hinaus, dass der Überschuss an Ameisensäure zu keinerlei Mehrfachacetylierung führte.

Die NMR-Daten von Verbindung **9** stimmen mit denen der isolierten Substanz aus Fraktion Frk1-2c überein, so dass deren Struktur als gesichert angesehen werden kann.

2.2.4.1.4 Spiken

Anschließend wurden wiederum HPLC-Messungen durchgeführt, bei denen die isolierte Substanz Frk1-2c mit Verbindung **9** „gespiket“ wurde. Die so erhaltenen Chromatogramme zeigten eindeutig, dass es sich bei der isolierten Substanz um Verbindung **9** handelt, da sowohl die Retentionszeit als auch der zu beobachtende Massenpeak übereinstimmten (siehe Abbildung 30).

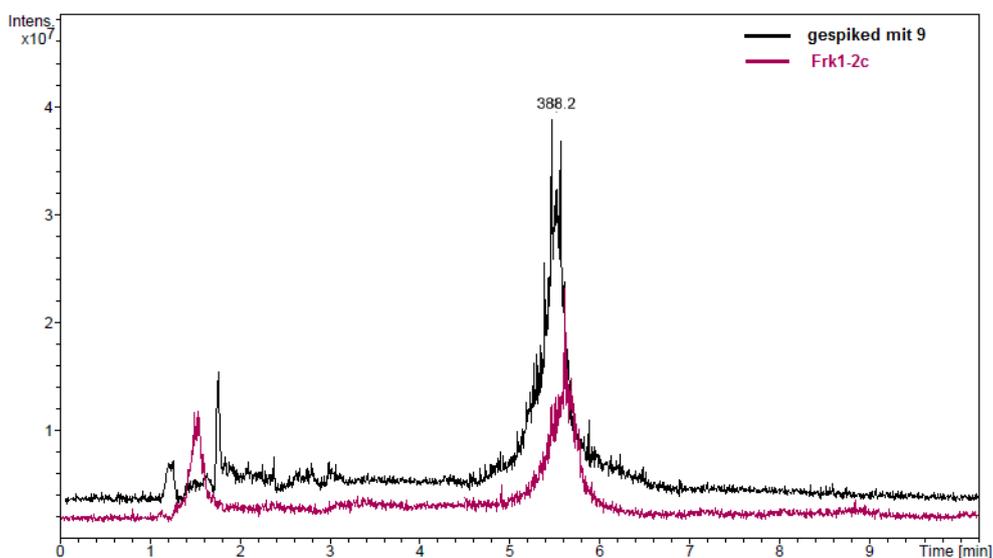


Abbildung 30 Vergleich des LC/MS-Chromatogramms von Frk1-2c mit dem mit Verbindung **9** gespikten Lauf

2.2.4.2 Identifizierung von Substanz Frk1-1c

2.2.4.2.1 NMR-Messungen

Eine Zuordnung der ^1H -NMR-Signale war auch bei Fraktion Frk1-1c möglich, nachdem diese in deuteriertem DMSO vermessen wurde. Hier waren die Signalintensitäten noch geringer als bei Fraktion Frk1-2c, was am Verhältnis der DMSO-Satellitensignale zu den Substanzsignalen deutlich wurde. Dieser Umstand erschwerte die Differenzierung zwischen Signalen der Substanz mit m/z 402 und Verunreinigungssignalen des DMSO weiter.

Das ^1H -Spektrum der Substanz ließ wieder die typischen Chinolongrundgerüstsignale H-2, H-5 und H-8, sowie die Signale des Aromaten in Position 1, H-11 bis H-14, erkennen. Zusätzlich konnten durch Auswertung der ^1H -, DEPT- und HMQC-Spektren im aliphatischen Bereich drei CH_2 -Gruppen sowie eine Methylgruppe identifiziert werden.

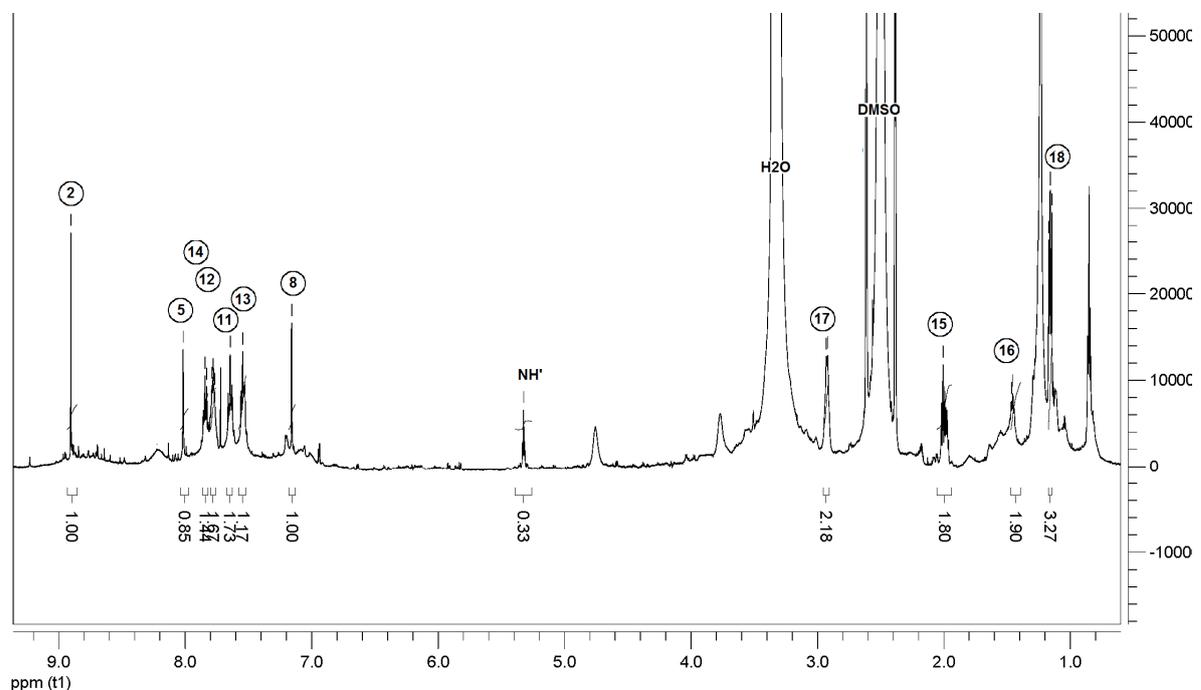


Abbildung 31 ^1H -NMR-Spektrum der Substanz aus Fraktion Frk1-1c

Im COSY-Spektrum sieht man außerdem eine Kopplung der beiden CH₂-Gruppen H-15 und H-16 bei 1.45 und 2.01 ppm untereinander, sowie die Kopplung der Methylgruppe H-18 bei 1.16 ppm mit der CH₂-Gruppe H-17 bei 2.92 ppm. Eine Kopplung dieser CH₂-Gruppe (H-17) mit den beiden anderen CH₂-Gruppen H-15 und H-16 konnte nicht beobachtet werden. Die CH₂-Gruppen H-15 und H-16 koppeln darüber hinaus mit einem Protonensignal bei 5.32 ppm, das im HMQC-Spektrum keinerlei Kopplung zu einem Kohlenstoffatom zeigt und folglich einer NH-Gruppe (NH⁺) zugeschrieben werden kann. Das ¹³C-Spektrum belegt desweiteren, dass im Vergleich zum Eduktchinolon **1** die Kohlenstoffe C-5 und C-6 deutlich tieffeldverschoben erscheinen, was den Verdacht einer Substitution des Fluors in Position 6 gegen eine Hydroxylgruppe nahe legt. Diese Beobachtungen führten zu der Annahme, dass es sich bei der Substanz mit m/z 402 um folgende Struktur handelt:

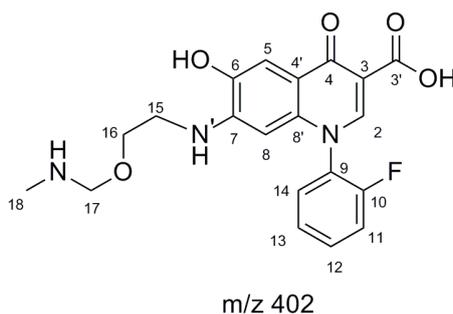


Abbildung 32 Mögliche Struktur der isolierten Substanz aus Fraktion Frk1-1c

¹H-NMR (600 MHz, δ (ppm), J (Hz), DMSO): 14.63 (br, 1H, OH); 8.90 (s, 1H, H-2); 8.02 (H-5); 7.84 (t, 1H, ³J = 7.2, H-14); 7.79 (dd, 1H, ³J = 4.2, H-12); 7.65 (t, 1H, ³J_{H,F} = 9.6, H-11); 7.54 (t, 1H, ³J = 7.2, H-13); 7.16 (H-8); 5.32 (NH⁺); 2.92 (d, 2H, ³J = 6.6, H-17); 2.01 (m, 2H, H-15); 1.46 (t, 2H, ³J = 6.6, H-16); 1.16 (t, 3H, ³J = 6.6, H-18)

¹³C-NMR (100 MHz, δ (ppm), J (Hz), DMSO): 177.1 (C-4); 165.1 (C-3'); 155.8 (C-10); 149.7 (C-2); 146.6 (C-6); 135.4 (C-8'); 133.1 (C-12); 129.6 (C-14); 126.2 (C-9); 124.4 (C-13); 124.1 (C-4'); 119.7 (C-8); 117.4 (d, ²J_{C,F} = 12.1 Hz, C-11); 116.0 (C-5); 108.6 (C-3); 41.3 (C-17); 35.0 (C-15); 26.5 (C-16); 11.0 (C-18)

Die Substitution der Fluorgruppe gegen eine Hydroxylgruppe scheint bei der Verwendung von Hydroxylradikalen einleuchtend. Allerdings mussten zahlreiche Überlegungen angestellt werden, um zu klären, ob sich der vorgeschlagene Rest in Position 7 unter den Bedingungen einer Fenton-Reaktion bilden kann.

Ein typischer Abbauweg der Piperazineinheit ist die Abspaltung eines Aziridinrestes.^{99; 110; 111; 116} Kommt es zu solch einer Abspaltung (siehe Abbildung 33) und wird der nun am Molekül verbleibende Aziridinrest anschließend von Hydroxylradikalen angegriffen, bildet sich ein Ethanolamin-Radikal, das nach Wasserstoffumlagerung das vormals abgespaltene Aziridin wieder angreifen kann. Auf diese Weise lässt sich letztendlich die Bildung der vorgeschlagenen Struktur für die Substanz mit m/z 402 plausibel erklären.

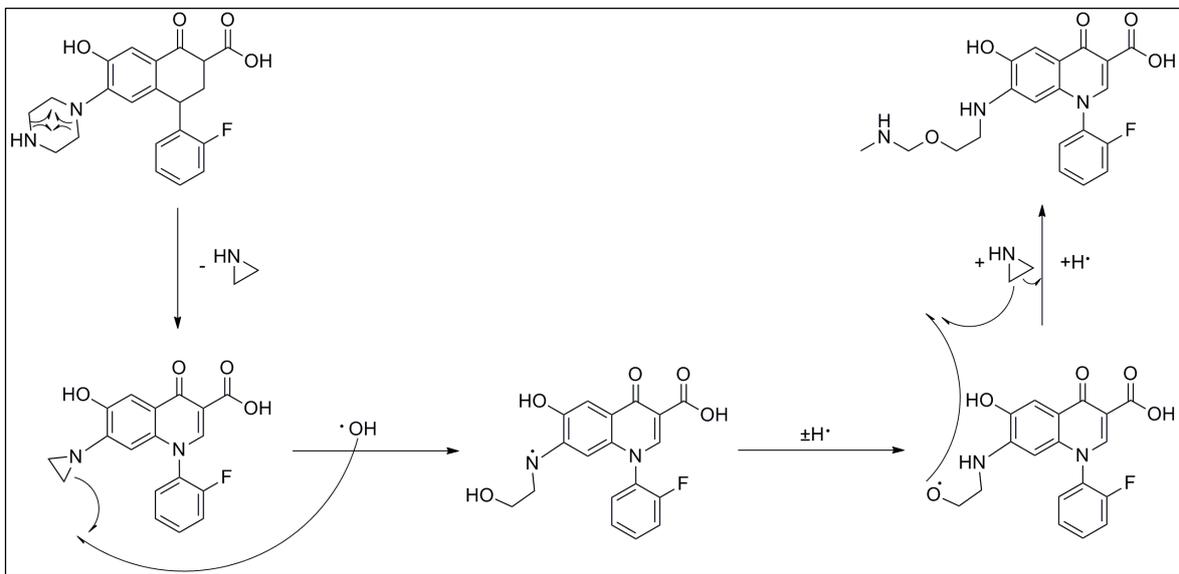


Abbildung 33 Möglicher Mechanismus der Bildung der Substanz mit m/z 402 durch Fentons Reagenz

2.2.4.2.2 MSⁿ-Messungen

Die MS²- und MS³-Spektren belegen die Struktur insofern, als dass sich zunächst eine Wasserabspaltung von 18 u beobachten lässt und im Anschluss daran die Abspaltung von 103 u, was wiederum zu einer Produktion mit m/z 281 führte (siehe Abbildung 34). Die

Abspaltung von 103 u entspricht dabei der Abspaltung des kompletten (2-((Methylamino)methoxy)ethyl)amino-Restes R1 in Position 7.

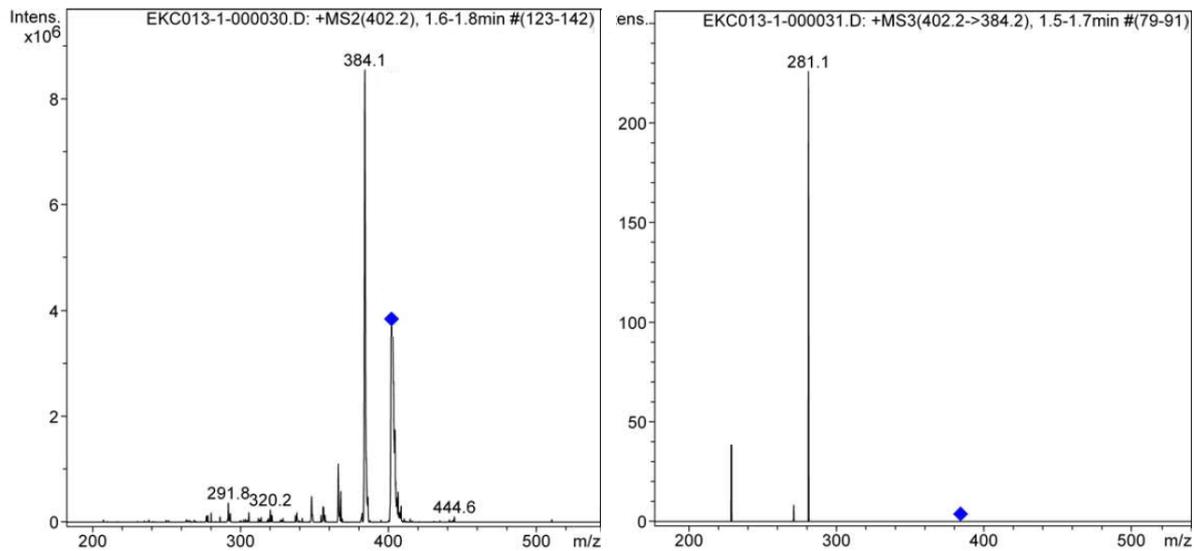
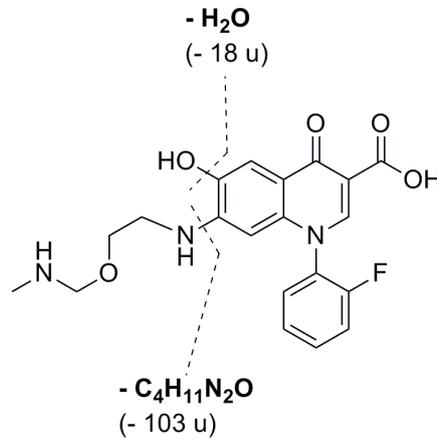


Abbildung 34 Fragmentierung anhand der MS²(402)- und MS³(384)-Spektren der Substanz mit m/z 402

2.2.4.2.3 Synthese der isolierten Substanz Frk1-1c

Zur Bestätigung der vorgeschlagenen Struktur sollte nun versucht werden, die Substanz auf klassischem Wege zu synthetisieren. Die Einführung einer Hydroxylgruppe in Position 6 ist bereits des Öfteren in der Literatur beschrieben. Diese kann über die

Reaktion eines Methoxy-Derivats mit HBr eingeführt werden¹¹⁷, durch die Reaktion eines Amin-Derivats über sein entsprechendes Diazoniumsalz¹¹⁸ oder via einer photochemischen Reaktion.^{119; 120} Problematischer gestaltet sich hingegen die Einführung des entsprechenden Restes R1 in Position 7.

Zunächst wurde versucht, den Rest R1 im Ganzen aufzubauen, um ihn im Anschluss durch eine nukleophile Substitution in Position 7 einzuführen, so wie es auch für die Einführung von Piperazin bei der Synthese des Eduktchinolons **1** der Fall war. Der Aufbau des Restes sollte nach folgender Reaktionssequenz ablaufen.

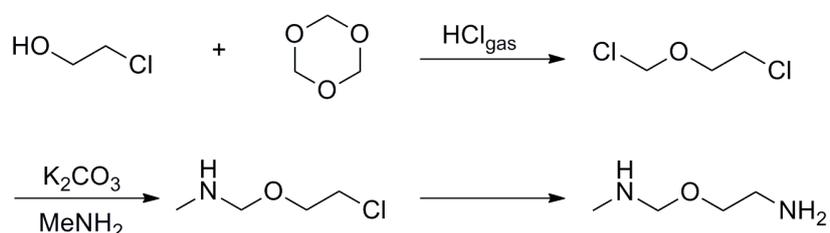


Abbildung 35 Möglicher Syntheseweg zur Herstellung des Restes R1 von Substanz mit m/z 402

Die Umsetzung von 2-Chlorethanol mit 1,3,5-Trioxan ist literaturbekannt und sollte durch Reaktion mit Chlorwasserstoffgas durchgeführt werden.^{121; 122} Anschließend sollte selektiv am Chlormethanolrest Methylamin eingeführt werden. Eine ähnlich selektive Reaktion ist bereits von Liu *et al.*¹²³ beschrieben, allerdings wird hier 2,4-Di(trimethylsilyloxy)-5-fluorpyrimidin, ein sterisch deutlich anspruchsvolleres Amin, eingeführt. Die anschließende zweite Einführung eines Amins sollte durch eine einfache nukleophile Substitution möglich sein.

In Schritt 1 wurde versucht die Reaktion, um die Freisetzung von Chlorwasserstoffgas zu vermeiden, mit Hilfe von etherischer HCl-Lösung durchzuführen. Dazu wurde 2-Chlorethanol zu einer äquimolaren Lösung von Trioxan in Dichlormethan gegeben und auf 0-5 °C gekühlt. Nach dem Zutropfen von 4.8 Moläquivalenten HCl-Lösung wurde weitere 8.5 h bei 0-5 °C gerührt und über Nacht unter Rühren auf RT erwärmen lassen. Anschließend wurde nach Zugabe von Wasser mehrmals mit Dichlormethan extrahiert und die vereinigten organischen Phasen vom Lösungsmittel befreit. Die NMR- und MS-spektrometrischen Daten belegten jedoch, dass nur Edukt isoliert wurde. Daraufhin

wurde ein zweiter Reaktionsansatz unter Einsatz von Zinkchlorid als Katalysator analog zu Literatur^{124; 125; 126} durchgeführt. Das Zutropfen wurde bei Raumtemperatur durchgeführt und nach 3.5 h Rühren wurde die Lösung für 1 h auf 70 °C Ölbadtemperatur erwärmt. Analog einer Blanc-Reaktion sollte sich so das entsprechende Produkt bilden (siehe Abbildung 36).

Nachdem 20 Minuten erwärmt worden war, hatte sich die Reaktionslösung gelb, nach einer Stunde braun gefärbt. Die aufgenommenen Massenspektren belegten einen minimalen Umsatz der Reaktion, doch fanden sich vornehmlich die Edukte wieder.

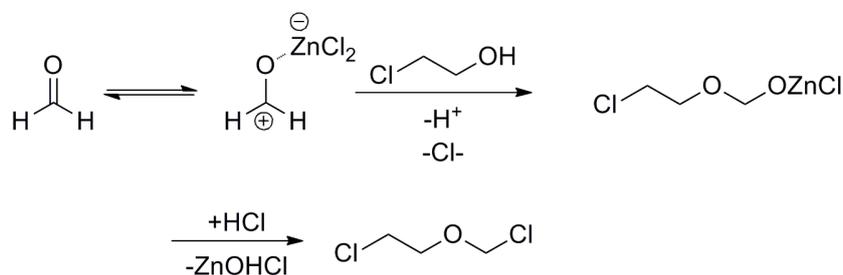


Abbildung 36 Blanc-Reaktion zur Herstellung des Restes R1 in Position 7 von Substanz mit m/z 402

Daraufhin wurde versucht, zunächst einen leichter zugänglichen symmetrischen Rest R2 in Position 7 anzubauen. Dieser symmetrische Rest R2 sollte via Gabriel-Synthese erhalten werden.^{127; 128; 129; 130}

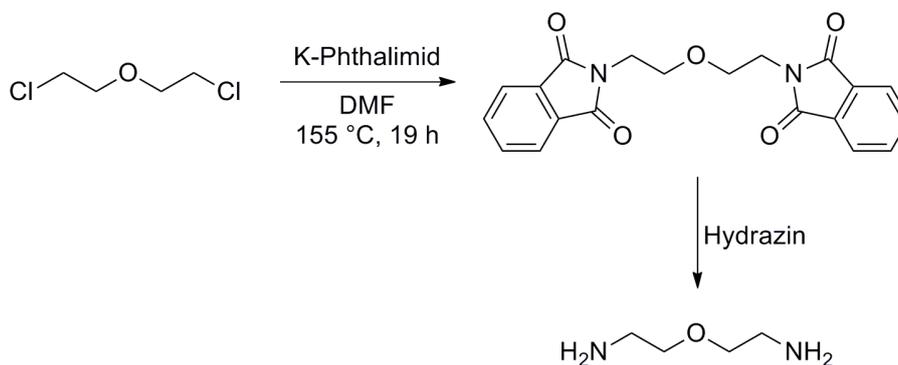


Abbildung 37 Gabriel-Synthese zur Herstellung eines symmetrischen Restes R2

Dazu wurde zunächst eine Lösung von Bis(2-chlorethyl)ether in DMF mit 2.3 Mol-äquivalenten Kaliumphthalimid versetzt und für 19 h auf 155 °C erhitzt. Anschließend wurde der Reaktionsansatz auf Eis gegossen, der entstandene Niederschlag abfiltriert und mit NaOH und Wasser gewaschen. Die darauffolgende Freisetzung des Diamins wurde durch Umsetzung des Phthalimidderivats mit Methylamin versucht, indem man 25 min auf 85 °C Ölbadtemperatur erwärmte. Anschließend wurde die Lösung 3 h bei Raumtemperatur gerührt und anschließend das Lösungsmittel im Vakuum eingeeengt und der Ansatz zur Ausfällung im Kühlschrank bei 4 °C gelagert. Der so isolierte Feststoff wurde mit Wasser versetzt und mit konz. Salzsäure auf pH 2 eingestellt. Anschließend wurde einmal mit Diethylether extrahiert. Die Etherphase wurde verworfen und die wässrige Phase mit KOH auf pH 10 gebracht und dreimal mit Diethylether extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit Natriumchloridlösung gewaschen und über Magnesiumsulfat getrocknet.¹²⁹ Es wurde anschließend jedoch sowohl in der wässrigen, als auch in der organischen Phase immer nur eine Mischung des Diamin- und des *N*-Methyldiamin-Derivats erhalten. Deshalb wurde versucht, das Diamin wie bei Tsiakopoulos *et al.*¹²⁸ durch Umsetzung mit Hydrazin freizusetzen. Dazu wurde das Phthalimidderivat in Methanol mit der doppelten Menge an Hydrazin-Monohydrat versetzt und 0.5 h zum Rückfluss erhitzt. Bereits in der Hitze begann sich ein Niederschlag zu bilden, der anschließend abfiltriert und getrocknet wurde. Der so erhaltenen Feststoff war das Bisphthalylhydrazid-Salz von 2,2'-Oxydiethanamin. Dieses Salz wurde zur anschließenden Umsetzung mit Chinolon **5** verwendet.¹²⁸ Um aus dem Bisphthalylhydrazid-Salz *in situ* das nukleophile Amin freizusetzen, ist die Verwendung einer Hilfsbase notwendig.

Folglich wurde zu einer Lösung von Substanz **5** in DMSO ein 8-facher Überschuss des Bisphthalylhydrazid-Salzes von 2,2'-Oxydiethanamin sowie ein 16-facher Überschuss an Triethylamin gegeben und das Reaktionsgemisch für 3 h in der Mikrowelle auf 110 °C erhitzt. Anschließend wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der Rückstand zunächst in Wasser und ein zweites Mal in Ethanol umkristallisiert. Weder im so erhaltenen weißen Feststoff, noch in der Mutterlauge, konnte jedoch massenspektroskopisch bzw. NMR-spektroskopisch die Zielverbindung identifiziert werden.

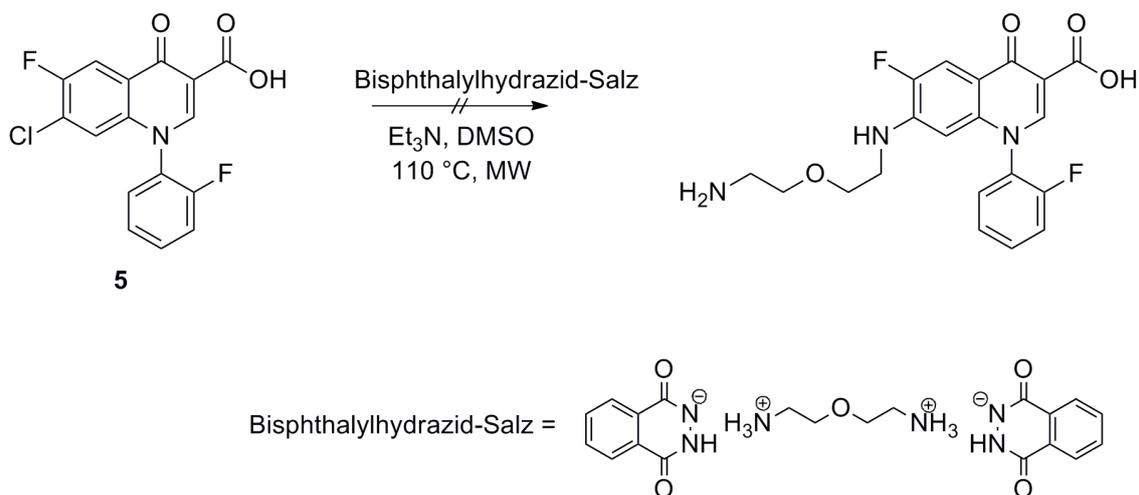


Abbildung 38 Syntheseweg zur Herstellung des Chinolons mit symmetrischem Rest R2 in Position 7

Massenspektroskopisch fand sich vor allem eine Substanz mit m/z 345, die jedoch keiner Struktur zugeordnet werden konnte. Im Gegensatz zur Umsetzung von Tsiakopoulos *et al.*¹²⁸ sollte kein Angriff des 2,2'-Oxydiethanamin an einen Ester, sondern an ein aromatisches Kohlenstoffatom (C-7) stattfinden. Dieses Kohlenstoffatom scheint jedoch für den Angriff eines nicht sonderlich starken Nucleophils nicht elektrophil genug zu sein, so dass keinerlei Umsetzung beobachtet werden konnte.

Daraufhin wurde versucht, den tatsächlichen Rest R1 schrittweise am Chinolon aufzubauen. Dazu wurde zunächst ein 2-Methoxyethylaminrest in Position 7 eingebaut, da dies relativ schnell und einfach zu bewerkstelligen war. Dafür wurde zu einer Lösung von Verbindung **5** in DMSO ein achtfacher Überschuss an 3-Methoxyethylamin gegeben und das Reaktionsgemisch für 3 h in der Mikrowelle auf 110 °C erhitzt. Nach erfolgter Reaktion wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und Verbindung **10** durch Zugabe von Wasser ausgefällt. Zur Vervollständigung der Fällung wurde der Ansatz 24 h bei 4 °C gelagert. Nach Abfiltrieren, Waschen mit Wasser und Trocknen wurde **10** als hellgelber Feststoff in einer Ausbeute von 29% erhalten.

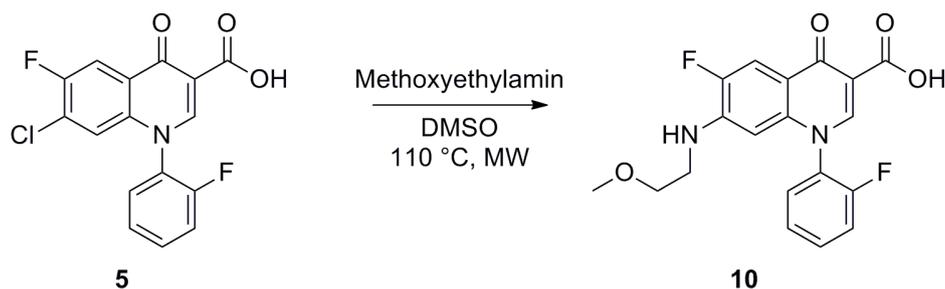


Abbildung 39 Syntheseweg zur Herstellung von Verbindung **10**

Da an diesem Rest jedoch schlecht „weitergebaut“ werden konnte, wurde in Position 7 statt 2-Methoxyethylamin zunächst Ethanolamin angefügt.

Dazu wurde zu einer Lösung von 7-Chlor-6-fluor-1-(2-fluorphenyl)-4-oxo-1,4-dihydrochinolin-3-carbonsäure **5** in DMSO ein elfacher Überschuss an Ethanolamin gegeben und das Reaktionsgemisch für 1 h in der Mikrowelle auf 110 °C erhitzt. Nach erfolgter Reaktion wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und Verbindung **11** in Wasser umkristallisiert. Zur Ausfällung wurde mit Ameisensäure leicht angesäuert. Zur Vervollständigung der Fällung wurde die Lösung 4 Tage bei 4 °C aufbewahrt. Nach dem Abfiltrieren, Waschen mit Wasser und Trocknen erhielt man **11** als beigen Feststoff in einer Ausbeute von 37%.

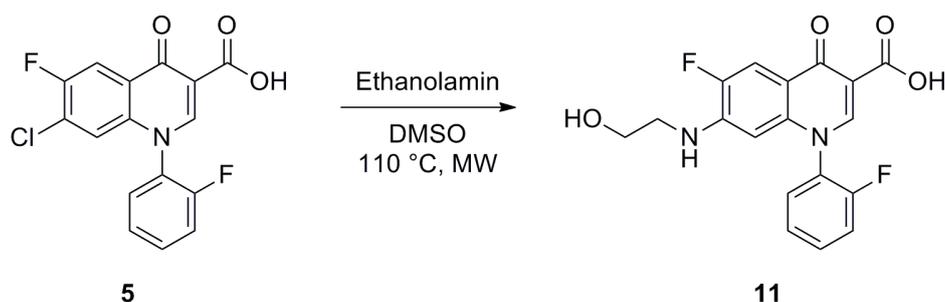


Abbildung 40 Syntheseweg zur Herstellung von Verbindung **11**

In einer mannich-ähnlichen Reaktion wurde nun versucht, ein Iminiumsalz an den Ethanolaminrest einzubauen.

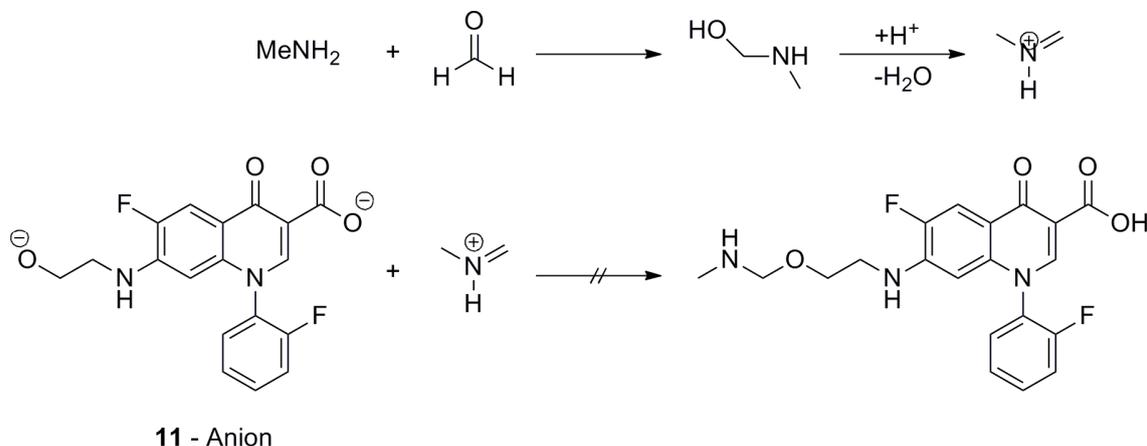


Abbildung 41 Syntheseweg zur Herstellung der Verbindung mit m/z 402

Dafür wurde Verbindung **11** in DMSO gelöst und mit der zweifachen Menge an Kalium-*tert.*-butanolat versetzt, um nicht nur die Säurefunktion zu deprotonieren sondern auch den Alkohol. Parallel dazu wurden äquimolare Mengen an Methylamin und Formaldehyd zusammengegeben, um das entsprechende Iminiumsalz im dreifachen Überschuss herzustellen. Nach 30 min wurde die Formaldehydlösung langsam zur Chinolonlösung gegeben und für 3 h auf 80 °C Ölbadtemperatur erwärmt. Anschließend ließ man die Reaktionslösung über Nacht bei Raumtemperatur rühren. Dünnschichtchromatographisch konnte jedoch keinerlei Umsetzung beobachtet werden. Daraufhin wurde in einem zweiten Versuchsansatz die Reaktionslösung mit Kupfersulfat-pentahydrat als Katalysator versetzt und für 7 h auf 80 °C Ölbadtemperatur erhitzt.¹³¹ Da auch hier keinerlei Umsetzung beobachtet werden konnte, wurde ein dritter Ansatz durchgeführt, in dem versucht wurde, das Iminiumsalz durch Erwärmen einer Mischung aus Methylamin, 1.2 Moläquivalent Formaldehyd und 0.01 Moläquivalent Salzsäure auf 80 °C zu erhalten. Anschließend wurde das in Lösung erhaltene Iminiumsalz direkt weiter mit deprotoniertem Chinolon umgesetzt. Da die Iminiumsalzbildung nicht dünnschichtchromatographisch verfolgt werden konnte, war schwer festzustellen, ob die Reaktion am nicht gebildeten Iminiumsalz scheiterte oder aber am fehlgeschlagenen Einbau an das Chinolon.

Deshalb wurde daraufhin versucht, kommerziell erhältliches Eschenmosersalz mit Chinolon umzusetzen.

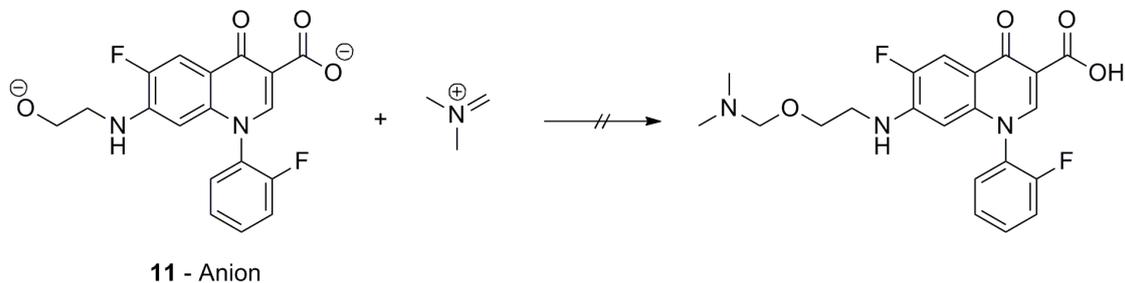


Abbildung 42 Umsetzung von Substanz **11** mit Eschenmosersalz

Wiederum wurde Verbindung **11** in DMSO gelöst und mit einem dreifachen Überschuss an Kalium-*tert.*-butanolat versetzt und für 45 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde ein 1,3-facher Überschuss an Eschenmosersalz (N,N-Dimethylmethylenammoniumiodid) zugegeben und der Ansatz für 100 h bei Raumtemperatur gerührt. Der Verlauf der Reaktion wurde dünnschichtchromatographisch verfolgt (Kieselgel; EtOAc : EtOH : FA = 20 : 1 : 0.1). Mit einem R_f -Wert von 0.58 bildete sich ein fluoreszierender Fleck, der sich deutlich vom andersfarbig schwach fluoreszierenden Edukt mit einem R_f -Wert von 0.48 unterschied. Jedoch schien sich dieser Stoff mit der Zeit zu zersetzen, da der Fleck nach längerem Lagern der DC-Platte nicht mehr beobachtet werden konnte. Deshalb konnte diese Substanz auch nicht isoliert werden. In einem weiteren Ansatz wurde die gleiche Umsetzung durchgeführt, allerdings wurde im Bombenrohr für 4 Tage auf 125 °C erhitzt. Hier zeigte sich jedoch dasselbe Bild. Es erschien eine fluoreszierende Substanz auf dem Dünnschichtchromatogramm, die sich jedoch nach kurzer Zeit wieder zersetzt und deshalb nicht isoliert werden konnte.

2.2.5 Mikrobiologische Testung der Reinsubstanzen

Die Reinsubstanz Frk1-2c zeigte eine antitrypanosomale Aktivität mit einem IC_{50} -Wert von 20.69 μ M, der damit höher als bei der letzten Testung der Fraktion Frk1-3b mit

einem IC_{50} -Wert von $14 \mu\text{M}$ war. Daraus lässt sich schließen, dass entweder synergistische Effekte der unterschiedlichen Substanzen die höhere Aktivität ausgelöst hatten oder aber eine der anderen, in dieser Fraktion enthaltenen Substanzen eine deutlich höhere Aktivität aufweist und für die höhere Aktivität der Fraktion verantwortlich war. Nichtsdestotrotz erzeugte die Strukturvariation, d. h. die Umwandlung der Piperazineinheit in Position 7 in eine Ethylendiaminformaldehyd-Gruppe, eine deutliche Aktivitätssteigerung gegenüber *Trypanosoma brucei brucei* im Vergleich zum Eduktchinolon **1**.

Die isolierte Substanz Frk1-1c zeigte darüber hinaus bei den Testungen gegen *Trypanosoma brucei brucei* einen IC_{50} -Wert von $17.29 \mu\text{M}$. Auch hier ist der IC_{50} -Wert etwas höher als der gemessene Wert der noch leicht verunreinigten Fraktion ($10 \mu\text{M}$). Dennoch ist gegenüber dem Eduktchinolon **1** wiederum eine deutliche Aktivitätssteigerung zu erkennen.

2.2.6 Synthese

2.2.6.1 Synthese von Amidien in Position 7

Da die MS-Messungen der antitrypanosomalen Substanzfraktionen der Umsetzung mit Fentons Reagenz die mögliche Bildung von Amidien in Position 7 des Chinolons andeuteten, sollte eine kleine Bibliothek an Substanzen synthetisiert werden, die in Position 7 eine Amidfunktion trugen. Hiermit sollte der Einfluss dieser Substituenten auf die trypanozide Wirkung untersucht werden.

Normalerweise erfolgt der Einbau eines Substituenten in Position 7 durch einen nukleophilen Angriff des Substituenten an den Aromaten. Mit Chlor befindet sich in Position 7 zunächst eine gute Abgangsgruppe, die leicht ausgetauscht werden kann. Amide an sich sind jedoch nicht nukleophil, weshalb ein direkter Einbau eines Substituenten mit Amidfunktion in Position 7 nicht möglich ist.

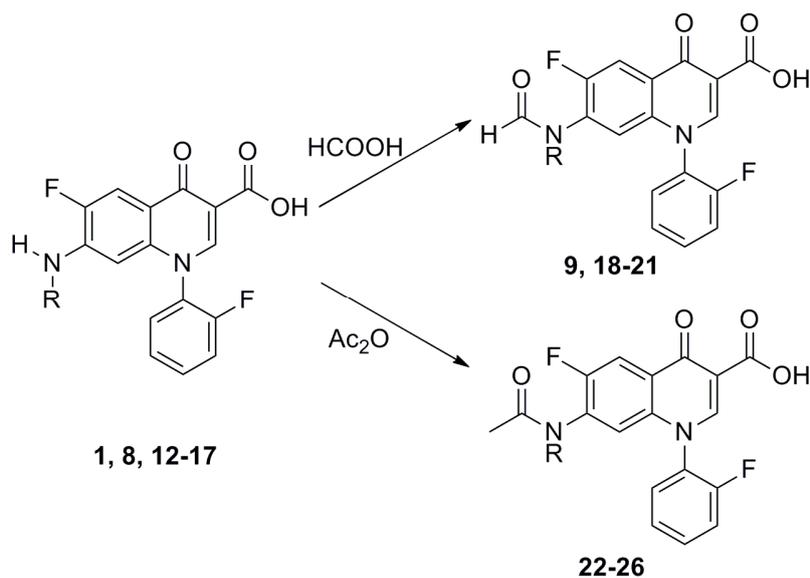


Abbildung 43 Syntheseweg zur Herstellung von formylierten und acetylierten Derivaten

Deshalb wurde zunächst immer der entsprechende Aminrest eingeführt, der dann durch Reaktion mit Ameisensäure bzw. Essigsäureanhydrid, wie von Koga *et al.*¹¹⁵ bzw. von Loskutov *et al.*¹³² für analoge Verbindungen beschrieben, in ein entsprechendes Amid umgewandelt wurde (siehe Abbildung 43).

2.2.6.1.1 Synthese der Amine

Die Umsetzung mit Amin geschah beim Großteil der Synthesen durch Lösen des Chinolons **5** in absolutiertem DMSO und Umsetzung mit einem 8-fachen Überschuss an Reagenz bei 110 °C in der Mikrowelle. Dies war nahezu für alle eingesetzten Amine in unterschiedlichen Ausbeuten möglich.

So konnten neben Piperazin (**1**) und Ethylendiamin (**8**) auch die Reste Methylamin (**12**), Propylamin (**13**), *N,N*-Dimethylethylendiamin (**14**) und Benzylamin (**15**) (siehe Tabelle 9) eingefügt werden.

Tabelle 9 Reagenzien und Parameter der durchgeführten Reaktionen

Zielsubstanz	R	Dauer	Ausbeute	Reagenz
1	-CH ₂ CH ₂ NHCH ₂ CH ₂ -	3 h	62%	Piperazin
8	-CH ₂ CH ₂ NH ₂	3 h	62%	Ethylendiamin
12	-CH ₃	1 h	61%	Methylamin
13	-CH ₂ CH ₂ CH ₃	1.5 h	92%	Propylamin
14	-CH ₂ CH ₂ N(CH ₃) ₂	1 h	82%	<i>N,N</i> -Dimethylethylendiamin
15	-CH ₂ C ₆ H ₅	4.5 h	49%	Benzylamin
16	-C ₆ H ₅	2.5 h	k.A.	Anilin

Lediglich bei Anilin (**16**) scheiterte die Umsetzung, hier konnte nur Edukt isoliert werden. Dies kann sowohl auf die sterische Hinderung des nukleophilen Angriffs durch den Aromaten zurückzuführen sein oder aber mit großer Wahrscheinlichkeit vor allem auf den starken Rückgang der Basizität des Anilins und die damit sinkende Nukleophilie im Vergleich zu den aliphatischen Aminen. Diese sinkende Basizität begründet sich auf dem +M-Effekt der NH₂-Gruppe und der damit einhergehenden Mesomeriestabilisierung durch Wechselwirkungen zwischen dem Aromaten und dem freien Elektronenpaar des Stickstoffs. Die Einführung einer zusätzlichen CH₂-Gruppe, d. h. die Umsetzung mit Benzylamin verhindert beide Effekte. So wird die sterische Hinderung durch den Aromaten verringert, indem der Abstand zwischen dem eingeführten Aromaten und dem Chinolongrundgerüst vergrößert wird, und es kann zu keiner Mesomeriestabilisierung des freien Elektronenpaares des Stickstoffs mehr kommen, so dass eine ausreichende Nukleophilie des Amins gegeben ist, um eine Reaktion herbeizuführen.

Die Synthese des primären Amins in Position 7 (**17**) erfolgte durch die Umsetzung des Chinolons **5** in DMSO mit 25%iger Ammoniaklösung im Bombenrohr bei 130 °C für 210 h. Um die Reaktionszeit zu verringern bzw. die Ausbeute zu steigern wurden entsprechende Umsetzungen in Pyridin als Lösungsmittel, wie von Al-Hiari *et al.*¹³³ vorgeschlagen unter stufenweiser Zugabe des Ammoniaks bei Raumtemperatur durchgeführt. Dabei konnte jedoch keinerlei Umsetzung beobachtet werden. Ebenso führte die Umsetzung des Chinolons mit Natriumamid in konzentriertem Ammoniak bei

-78 °C, wie bei Grier und Alvarez¹³⁴ empfohlen, nicht zum Erfolg. Essenziell für die Umsetzung scheint das Erwärmen des Reaktionsgemisches zu sein, auch wenn hier die Reaktion immer noch sehr langsam abläuft. Infolgedessen sind lange Reaktionszeiten von mehreren Tagen notwendig. Unter Einhaltung dieser Bedingungen konnte Verbindung **17** jedoch schließlich als brauner Feststoff in Ausbeuten von 62% isoliert werden.

Im anschließenden Schritt wurde versucht, eine Carbonylfunktion an das jeweilige Amin anzubauen, um schließlich ein Amid zu erhalten. Dies wurde im Großteil der Fälle durch Umsetzung mit Ameisensäure oder Acetanhydrid durchgeführt.

2.2.6.1.2 Synthese der Formamido-Derivate

Zur Reaktion mit Ameisensäure wurden die Amin-Derivate **1**, **8**, **12**, **13** und **17** mit je 2 Moläquivalenten Triethylamin und 50 Moläquivalenten Ameisensäure versetzt und im Bombenrohr zum Rückfluss erhitzt. Anschließend wurde im Vakuum bis zur Trockne eingengt und der Rückstand mit Wasser versetzt, kurz ins Ultraschallbad gegeben und der verbliebene Rückstand abfiltriert, gewaschen und getrocknet. Zum Teil wurde zur Aufreinigung noch aus DMF umkristallisiert.

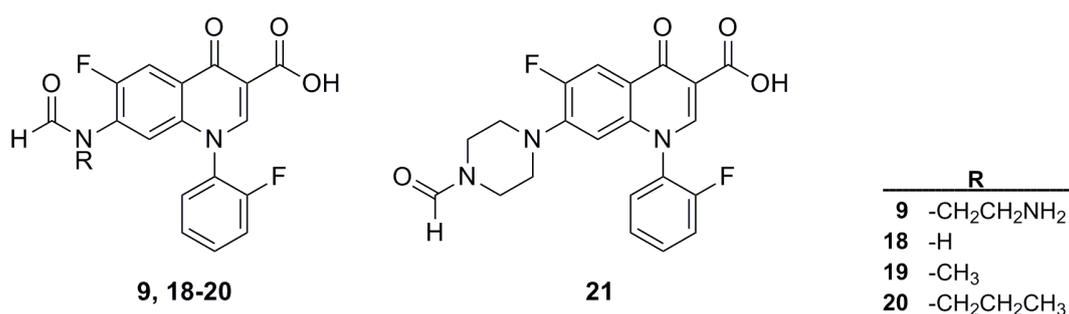


Abbildung 44 Allgemeine Struktur der Formamido-Derivate **9** und **18-21**

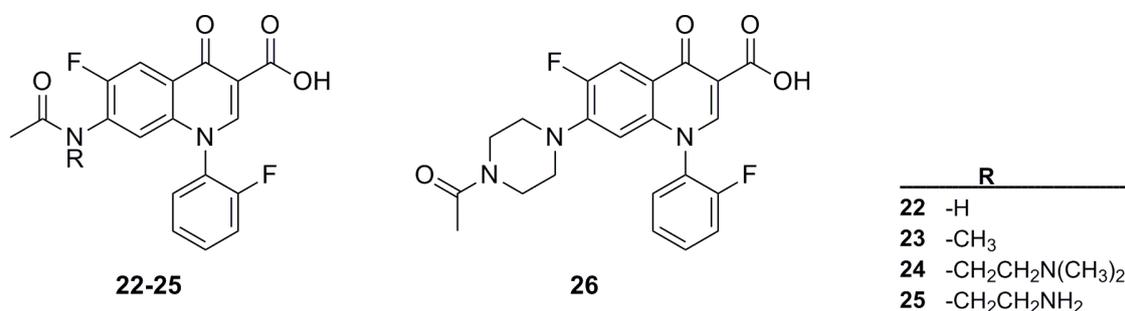
Auf diese Weise wurden die in Tabelle 10 aufgeführten Umsetzungen durchgeführt.

Tabelle 10 Parameter der durchgeführten Reaktionen

Zielsubstanz	R	Dauer	Ausbeute
9	-CH ₂ CH ₂ NH ₂	30 h	62%
18	-H	5 h	Nur in der Masse zu sehen; zu wenig, um es sauber zu isolieren
19	-CH ₃	8 h	Nur in der Masse zu sehen; zu wenig, um es sauber zu isolieren
20	-CH ₂ CH ₂ CH ₃	23 h	Nur in der Masse zu sehen; zu wenig, um es sauber zu isolieren
21	--	7 h	75%

2.2.6.1.3 Synthese der Acetamido-Derivate

Die Umsetzung mit Acetanhydrid wurde bei Raumtemperatur durchgeführt, indem die Chinolone **1**, **8**, **12**, **14** und **17** jeweils mit einem 50-fachen Überschuss an Acetanhydrid für mehrere Stunden gerührt wurden. Anschließend wurde im Vakuum bis zur Trockne eingengt, der Rückstand mit Wasser versetzt und kurz ins Ultraschallbad gegeben. Der so verbliebene Feststoff wurde abfiltriert, gewaschen und getrocknet und falls notwendig zur Aufreinigung aus DMF umkristallisiert. Auf diese Weise wurden die Substanzen **22**, **23**, **25** und **26** erhalten.

**Abbildung 45** Allgemeine Struktur der Acetamido-Derivate

Die Substanz **23** wurde zunächst 160 h bei Raumtemperatur gerührt. Da jedoch keinerlei Reaktion beobachtet werden konnte, wurde nach weiteren 160 h bei Raumtemperatur 2 h zum Rückfluss erhitzt und anschließend über Nacht noch einmal bei Raumtemperatur gerührt. Zur Aufreinigung des entstandenen Substanzgemisches wurde zunächst in Ethanol umkristallisiert und ein zweites Mal in DMF. So erhielt man **23** schließlich als weiße Kristalle mit einer Ausbeute von 31%.

Bei der Umsetzung zu Substanz **24** wurde zunächst 120 h bei Raumtemperatur gerührt. Da sich dünnschichtchromatographisch jedoch keinerlei Umsetzung beobachten ließ, wurde weitere 120 h bei Raumtemperatur gerührt, doch auch hier erfolgte keinerlei Umsetzung. In einem zweiten Ansatz wurde das Reaktionsgemisch für 5 Tage zum Rückfluss erhitzt, und anschließend für 5 weitere Tage bei Raumtemperatur gerührt, doch auch hier konnte keine Umsetzung zur gewünschten Zielstruktur beobachtet werden.

Tabelle 11 Parameter der durchgeführten Reaktionen

	R	Dauer	Ausbeute
22	-H	76 h	93%
23	-CH ₃	14 d	31%
24	-CH ₂ CH ₂ N(CH ₃) ₂	10 d	k.A.
25	-CH ₂ CH ₂ NH ₂	119 h	66%
26	--	115 h	69%

2.2.6.1.5 Versuch der Synthese eines Butyramido-Derivats

Zur Einführung einer weiteren Amidfunktion-Variante wurde das Aminderivat **12** mit Buttersäureanhydrid umgesetzt. Dazu wurde Substanz **12** mit einem 56-fachen Überschuss an Buttersäureanhydrid versetzt und für 115 h bei Raumtemperatur gerührt. Da bis dahin keinerlei Umsetzung stattgefunden hatte, wurde weitere 120 h im Bombenrohr auf

125 °C Ölbadtemperatur erhitzt. Anschließend wurde das überschüssige Buttersäureanhydrid im Vakuum entfernt und der Rückstand in Wasser umkristallisiert.

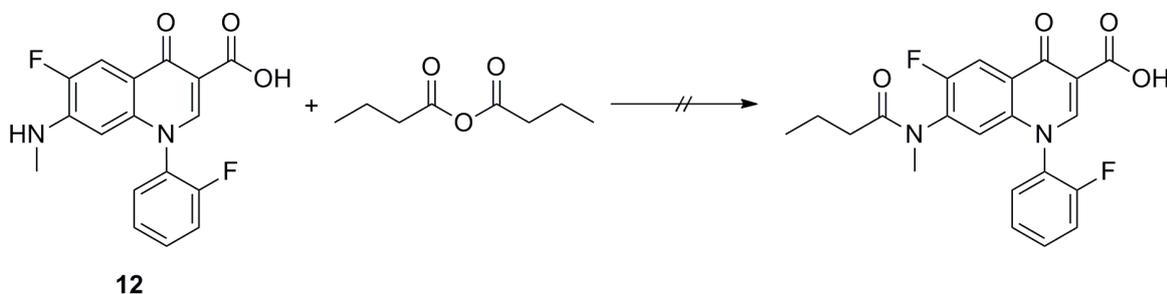


Abbildung 46 Versuch der Synthese eines Butyramido-Derivats

Anschließend durchgeführte massenspektroskopische Messungen zeigten neben dem Edukt eine Vielzahl an Substanzen mit unterschiedlichsten Massen, jedoch konnte keine der gewünschten Zielstruktur zugeordnet werden.

2.2.6.1.5 Direkte Einführung der Amide

Einige Derivate konnten auch durch direkten Einbau einer Amidfunktion erhalten werden, indem Verbindung **5** in DMSO gelöst und mit einem 8-fachen Überschuss an 2-Oxopiperazin (**27**) bzw. Piperidin-4-carbonsäureamid (**28**) bei 110 °C in der Mikrowelle für 3-6 h erhitzt wurde (siehe Abbildung 47). Anschließend wurde im Vakuum das Lösungsmittel entfernt und der Rückstand in Wasser umkristallisiert. Substanz **28** musste dazu vorher zur Ausfällung leicht mit Ameisensäure angesäuert werden. So konnten die Derivate **27** und **28** in Ausbeuten von 56% bzw. 31% synthetisiert werden.

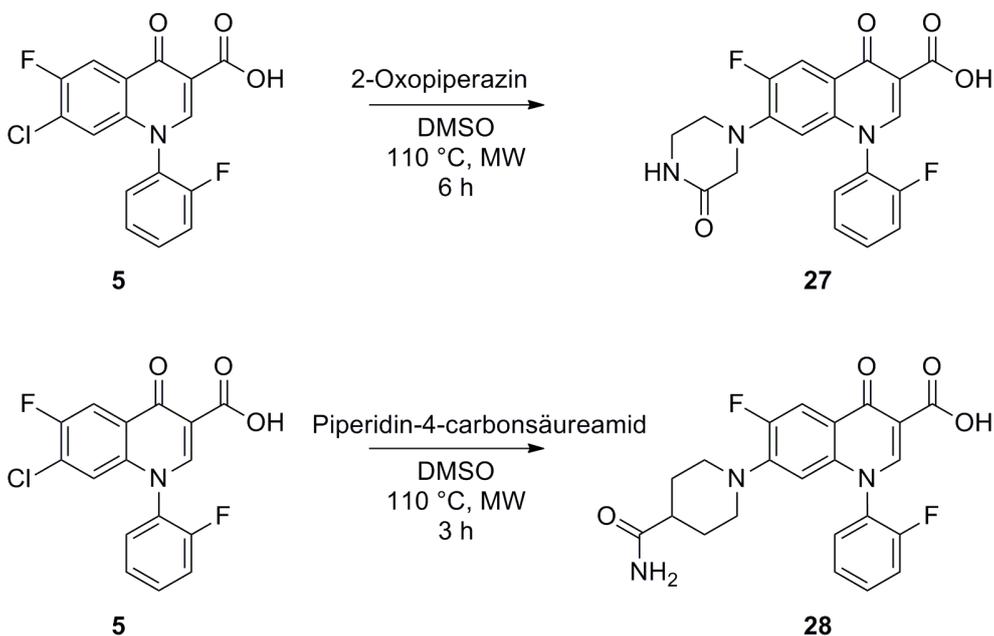


Abbildung 47 Syntheseweg zu Herstellung der Verbindungen 27 und 28

Befand sich die Amidfunktion des Substituenten, der in Position 7 eingeführt werden sollte, zu nahe am nukleophil-angreifenden Stickstoff, fand keine Reaktion statt. So konnte mit dem zum 2-Oxopiperazin analogen Fünfring, dem 2-Imidazolidon, keine Reaktion herbeigeführt werden (siehe Abbildung 48). Ebenso wenig konnte Glycinamid-Hydrochlorid in Position 7 eingebaut werden. Die Amidgruppe scheint in beiden Fällen zu nahe am nukleophilen Stickstoff zu sein, so dass dieser durch den elektronenziehenden Charakter der Carbonyl- bzw. Amidfunktion nicht mehr nukleophil genug ist, um einen entsprechenden Angriff auszuführen. Daran konnte weder eine lange Reaktionszeit von 7 h in der Mikrowelle, noch die Verlängerung der Reaktion bis auf 210 h im Bombenrohr bei 130 °C etwas ändern.

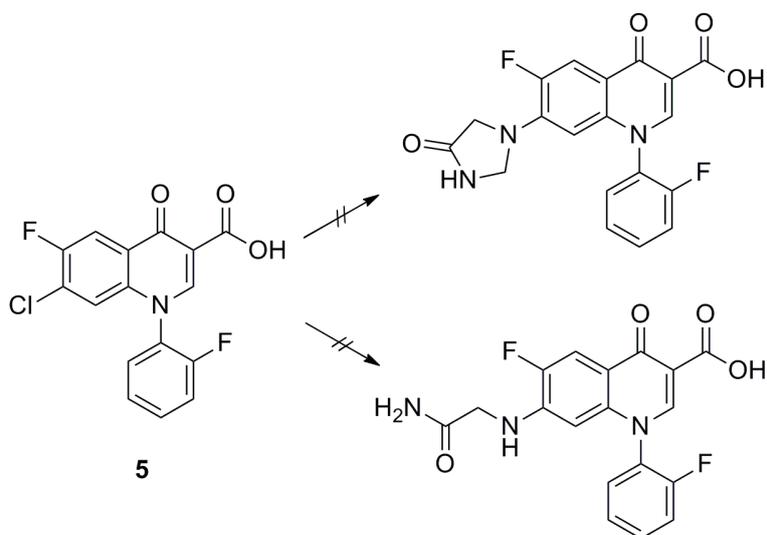


Abbildung 48 Versuch der Synthese eines 2-Imidazolidon bzw. eines Glycinamid -Derivats

2.2.6.2 Synthese von Amidin in Position 7 und 3

Arbeiten von unter anderem Schohe-Loop *et al.*¹³⁵ und Niedermeier *et al.*^{114; 136} zeigten, dass die Einführung einer Amidfunktion in Position 3 in einigen Fällen eine Steigerung antiviraler aber auch antitrypanosomaler Aktivität herbeiführen kann. Deshalb wurde von einigen der in Kapitel 2.2.6.1 synthetisierten Verbindungen das entsprechende Amid in Position 3 dargestellt.

Dazu wurde das entsprechende Ausgangschinolon mit einem 1.2-fachen Überschuss an Peptidkuppelungsreagenz PyBOP sowie einem 3-fachen Überschuss an 2,4-Dichlorbenzylamin in DMF versetzt. Die Reaktionsmischung wurde 20 h bei Raumtemperatur gerührt und anschließend 6-20 h auf 120 °C erhitzt. Dabei zeigte sich, dass eine längere Reaktionsdauer zu einer deutlichen Ausbeutesteigerung führen kann. So konnte die Ausbeute von 30% bei sechsständigem Erhitzen auf 65% bei 20-stündigem Erhitzen gesteigert werden. Auf diese Weise konnten folgende Derivate isoliert werden:

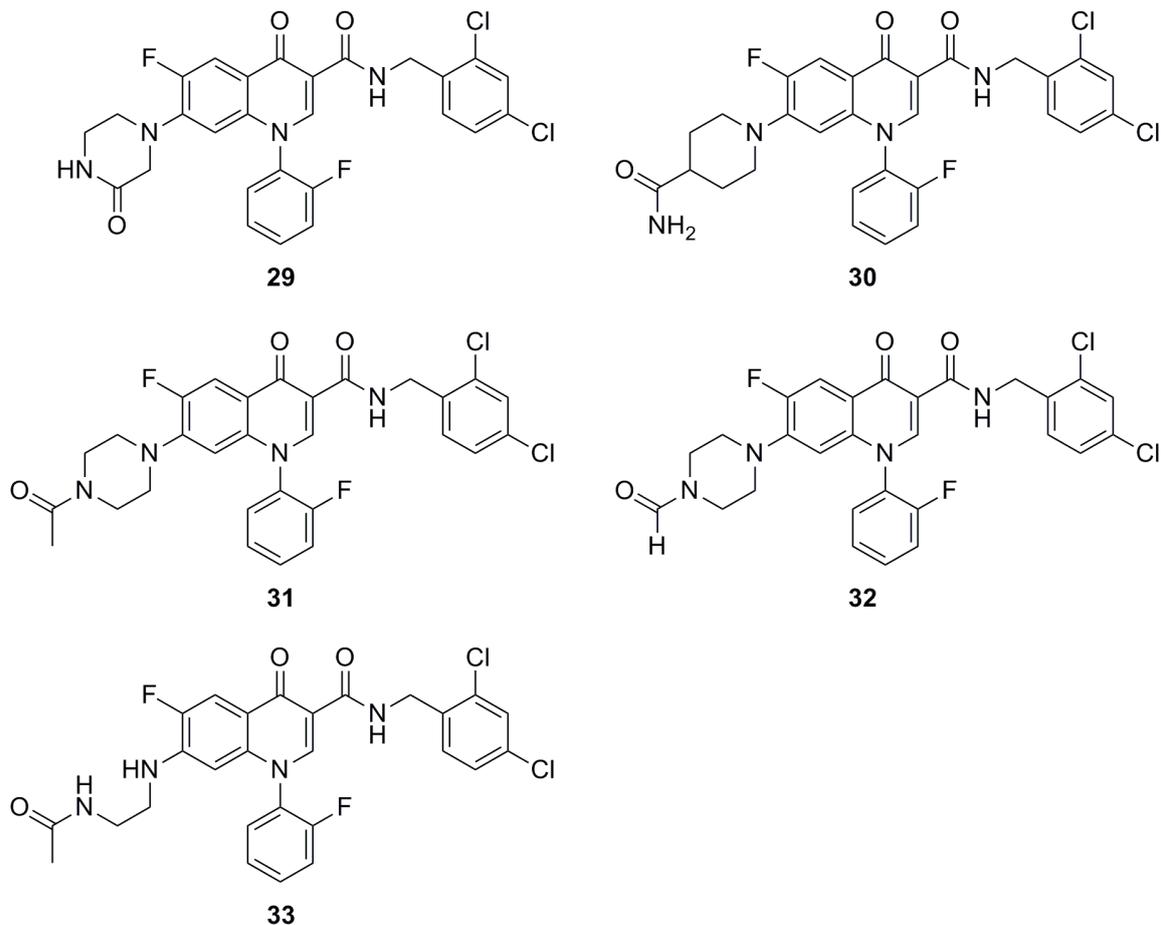


Abbildung 49 Strukturformeln der synthetisierten Amide in Position 3 und 7

2.2.6.3 Mikrobiologische Testungen

Die *In-vitro*-Untersuchungen an *Trypanosoma brucei brucei* wurden am Missionsärztlichen Institut, Würzburg, durchgeführt. Zur Testung wurde die trypomastigote Form des Trypanosomen-Stamms *TC 221* in 96-Well Mikrotiterplatten pipettiert (pro well ca. 10^4 Trypanosomen). Diese wurden mit verschiedenen Konzentrationen an Inhibitorlösung versetzt und mit Baltz-Medium¹³⁷ auf ein Endvolumen von 200 μ l dispergiert. Zur Herstellung der Inhibitorlösungen wurden die Testverbindungen in einer Konzentration von 20 mM in DMSO gelöst. Diese Stammlösung wurde 1:10 mit Baltz-Medium verdünnt und daraus wiederum eine Verdünnungsreihe erstellt. Die

Lösungen der Verdünnungsreihe wurden so zur Trypanosomensuspension pipettiert, dass nach Auffüllen auf das Endvolumen Proben in Konzentrationen von 100 μM , 10 μM , 1 μM , 100 nM, 10 nM, 1 nM, 100 pM und 10 pM vorlagen. Pro Konzentration wurden jeweils drei Experimente durchgeführt. Als Positiv- und Negativkontrolle wurden in jeweils drei Versuchen Trypanosomen mit reinem Kulturmedium bzw. Inhibitorlösungen ohne Trypanosomen untersucht. Die Mikrotiterplatten wurden bei 37 °C in einer 5%igen CO_2 -Atmosphäre 72 h inkubiert. Nach 24 h wurden 20 μl Alamar-Blue zugegeben. Die Aktivität der Testsubstanzen wurde zum ersten Mal nach 48 h und schließlich nach 72 h durch Messung der Absorption von Licht der Wellenlänge 550 nm gemessen. Die IC_{50} -Werte wurden durch lineare Interpolation der erhaltenen Daten aus jeweils drei Experimenten pro Wirkstoffkonzentration ermittelt.^{138; 139}

Die Ergebnisse der Testungen (siehe Tabelle 12) zeigen, dass zur Erzeugung einer Aktivität gegen *Trypanosoma brucei brucei* das Vorhandensein eines Piperazinrings in Position 7 nicht ausreichend ist. Substanz **1** zeigt folglich keine Aktivität. Ebenso wenig erzeugen kleinere Reste in Position 7 Aktivitäten gegen *Trypanosoma brucei brucei*. Dies belegen die Daten der Substanzen **8**, **10**, **11**, **12** und **13**. Von den Substanzen, die einen IC_{50} -Wert größer 40 μM hervorriefen, zeigten einige jedoch noch geringe Hemmwirkung. Allerdings ließen sich hier keine Struktur-Wirkungsbeziehungen aufstellen, da sich sehr gegensätzliche Bilder zeigten. So konnte zum einen mit Substanz **16**, d. h. mit einem Benzylaminrest in Position 7 eine schwache Hemmung von noch 28% erreicht werden. Zum Anderen erreichte man mit einem primären Aminrest in Position 7 (**17**) ebenfalls eine Hemmung von 29%. Alle anderen Substituenten in dieser Position konnten nur geringere bis gar keine Hemmung gegen *Trypanosoma brucei brucei* bewirken.

Erst durch die Kombination aus *N*-Sechsring und Amidfunktion, lässt sich Aktivität beobachten. Diese Tatsache wird bei den Substanzen **26**, **27** und **28** ersichtlich. Die Daten deuten außerdem darauf hin, dass ein Piperazinring größere Aktivitäten hervorruft als ein Piperidinring. Der zweite Stickstoff scheint demnach in seiner Position wichtig für die Koordination des Chinolons an die Zielstruktur zu sein. Der Vergleich der Substanz **21** und **26** zeigt, dass die Einführung einer Acetamidgruppe bessere Aktivitäten hervorruft als die Einführung einer Formamidgruppe.

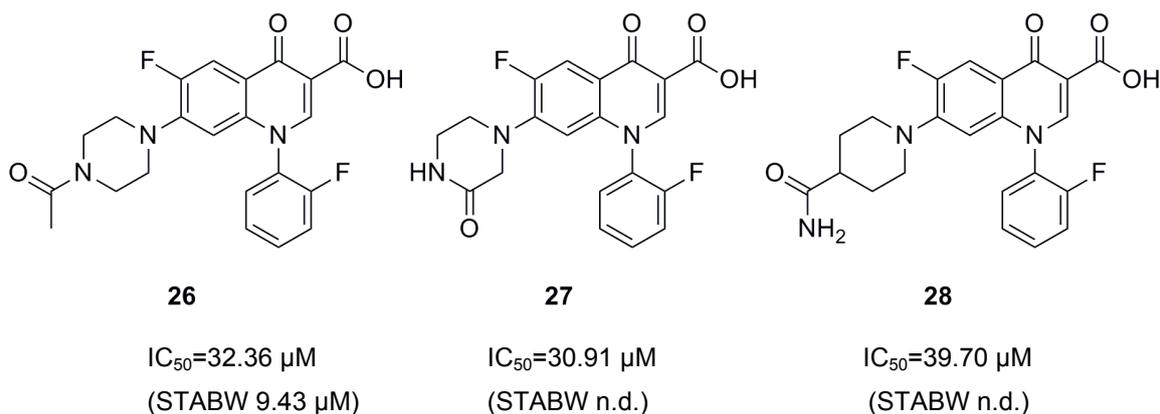
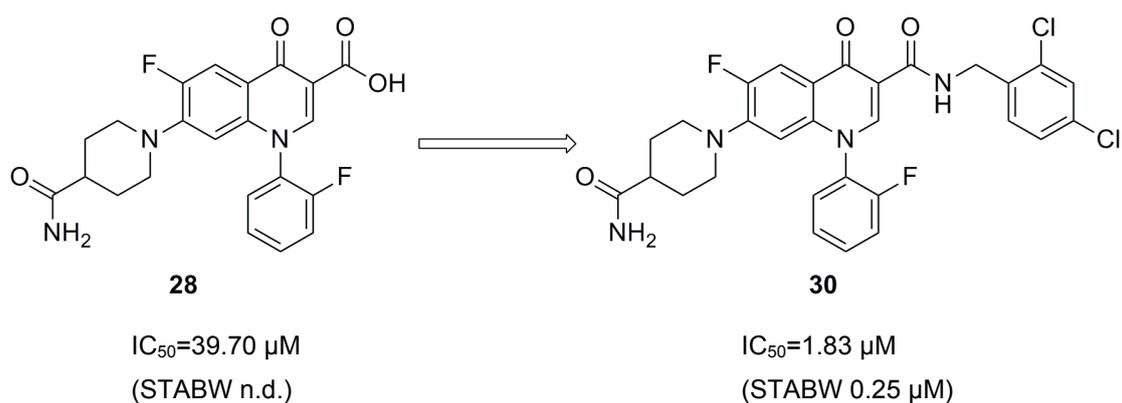


Abbildung 50 Ergebnisse der pharmakologischen Testung der Verbindungen **26**, **27** und **28**

Die besten Aktivitäten zeigten allerdings die Derivate, die in Position 3 eine zusätzliche Amidfunktion aufwiesen. Hier konnte man bei sämtlichen Derivaten eine Aktivitätssteigerung bis um den Faktor 22 erreichen (siehe Abbildung 51 und Tabelle 12). Dies steht in Einklang mit den Arbeiten von Schohe-Loop *et al.*¹³⁵ und Niedermeier *et al.*¹¹⁴ Demnach scheint für die Wirkung gegen *Trypanosoma brucei brucei* die Carboxyfunktion in Position 3 nicht notwendig, sondern eher hinderlich zu sein. Der Wirkmechanismus der Trypanosomenhemmung erfolgt daher allem Anschein nach nicht durch eine Bindung der Carboxyfunktion an die DNA, sondern auf eine andere bis dato unbekannte Weise.



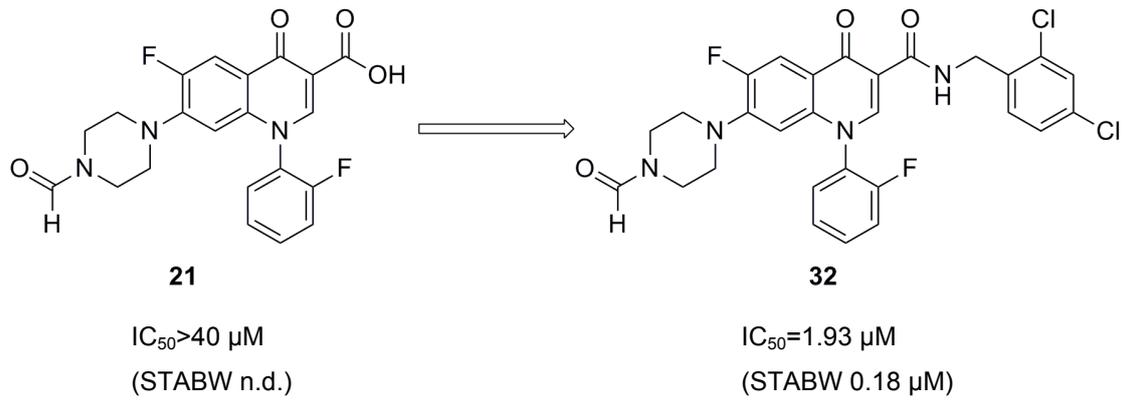
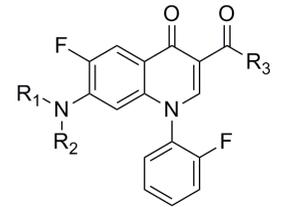
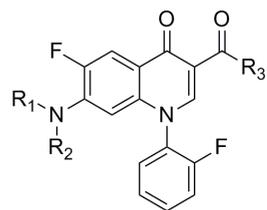


Abbildung 51 Aktivitätssteigerung bezüglich *Trypanosoma brucei brucei* durch Einführung einer Amidfunktion in Position 3

Tabelle 12 Ergebnisse der pharmakologischen Testung gegen *Trypanosoma brucei brucei* TC221

				<i>Trypanosoma brucei brucei</i> TC221				
	R₁	R₂	R₃	48h IC₅₀ (μM)	STABW (μM)	72h IC₅₀ (μM)	STABW (μM)	% Hemmung
1	-CH ₂ CH ₂ NHCH ₂ CH ₂ -		-OH	>40	n.d.	>40	n.d.	-
8	-CH ₂ CH ₂ NH ₂	-H	-OH	>40	n.d.	>40	n.d.	-
9	-CH ₂ CH ₂ NH ₂	-CHO	-OH	>40	n.d.	>40	n.d.	24.60
10	-CH ₂ CH ₂ OMe	-H	-OH	>40	n.d.	>40	n.d.	-
11	-CH ₂ CH ₂ OH	-H	-OH	>40	n.d.	>40	n.d.	-
12	-CH ₃	-H	-OH	>40	n.d.	>40	n.d.	-
13	-CH ₂ CH ₂ Me	-H	-OH	>40	n.d.	>40	n.d.	-
14	-CH ₂ CH ₂ NMe ₂	-H	-OH	>40	n.d.	>40	n.d.	20.25
16	-Benzyl	-H	-OH	>40	n.d.	>40	n.d.	28.02
17	-H	-H	-OH	>40	n.d.	>40	n.d.	29.19
21	-CH ₂ CH ₂ NCHOCH ₂ CH ₂ -		-OH	>40	n.d.	>40	n.d.	-
22	-COMe	-H	-OH	>40	n.d.	>40	n.d.	-
23	-COMe	-Me	-OH	>40	n.d.	>40	n.d.	-



R₁

R₂

R₃

Trypanosoma brucei brucei TC221

48h

72h

IC₅₀

STABW

IC₅₀

STABW

% Hemmung

(μM)

(μM)

(μM)

(μM)

	R₁	R₂	R₃	48h IC₅₀ (μM)	STABW (μM)	72h IC₅₀ (μM)	STABW (μM)	% Hemmung
25	-CH ₂ CH ₂ NHCOMe	-H	-OH	>40	n.d.	>40	n.d.	-
26	-CH ₂ CH ₂ NCOMeCH ₂ CH ₂ -		-OH	32.36	9.43	37.17	4.9	-
27	-CH ₂ CH ₂ NHCOCH ₂ -		-OH	30.91	n.d.	30.91	n.d.	-
28	-CH ₂ CH ₂ NCHCONH ₂ CH ₂ -		-OH	39.70	n.d.	>40	n.d.	-
29	-CH ₂ CH ₂ NHCOCH ₂		-NH-2,4-Dichlorbenzyl	4.26	0.84	6.52	1.75	-
30	-CH ₂ CH ₂ NCHCONH ₂ CH ₂ -		-NH-2,4-Dichlorbenzyl	1.83	0.25	2.82	0.22	-
31	-CH ₂ CH ₂ NCOMeCH ₂ CH ₂ -		-NH-2,4-Dichlorbenzyl	9.16	0.96	11.26	0.55	-
32	-CH ₂ CH ₂ NCHOCH ₂ CH ₂ -		-NH-2,4-Dichlorbenzyl	1.93	0.18	2.85	0.16	-
33	-CH ₂ CH ₂ NHCOMe	-H	-NH-2,4-Dichlorbenzyl	5.26	1.58	8.12	1.44	-
34	-CH ₂ CH ₂ NHCH ₂ CH ₂ -		-	>40	n.d.	>40	n.d.	-

2.3 Analyse der Umsetzung von Chinolon 2

2.3.1 Umsetzung mit Fentons Reagenz

Verbindung **2** wurde in einer Mischung aus Methanol und DMSO gelöst, die zur besseren Löslichkeit mit konzentrierter Schwefelsäure angesäuert wurde. Diese Lösung wurde anschließend mit Eisen(II)-sulfat und Wasserstoffperoxid versetzt und bei Raumtemperatur 2 h gerührt. Um die entstandene Substanzbibliothek den HPLC-Messungen zuführen zu können, wurden die in der Lösung enthaltenen Eisenionen durch säulenchromatographische Reinigung über Kieselgel mit einem Fließmittelgemisch bestehend aus Dichlormethan und Methanol (4:1) entfernt.

2.3.2 Fraktionierung der Substanzbibliothek und Hit-Suche

2.3.2.1 HPLC-Trennung der Substanzbibliothek und Up-Scaling

Zur Fraktionierung der erhaltenen Substanzbibliothek verwendete man, nach Optimierung sämtlicher Parameter (vgl. Kapitel 2.2.2.2 und 2.2.2.5), folgende Bedingungen:

Säule: SYNERGI™ MAX-RP, 150 × 4.6 mm, 4 µm; *Fließmittel:* A: 0.2% wässrige Ameisensäure, pH = 2.5; B: Acetonitril; *UV-Detektion:* 254 nm; *Temperatur:* 25 °C; *Flussrate:* 1.0 ml/min; A/B (55:45) für 5 min, A/B (55:45) auf 87% B in 2 min, A/B (13:87) für 7 min

Das erhaltene Chromatogramm (siehe Abbildung 52) belegte, dass ein Großteil des eingesetzten Chinolons **2** nicht umgesetzt worden war, dennoch aber zugleich eine Vielzahl neuer Substanzen entstanden war, wenn auch in geringen Konzentrationen.

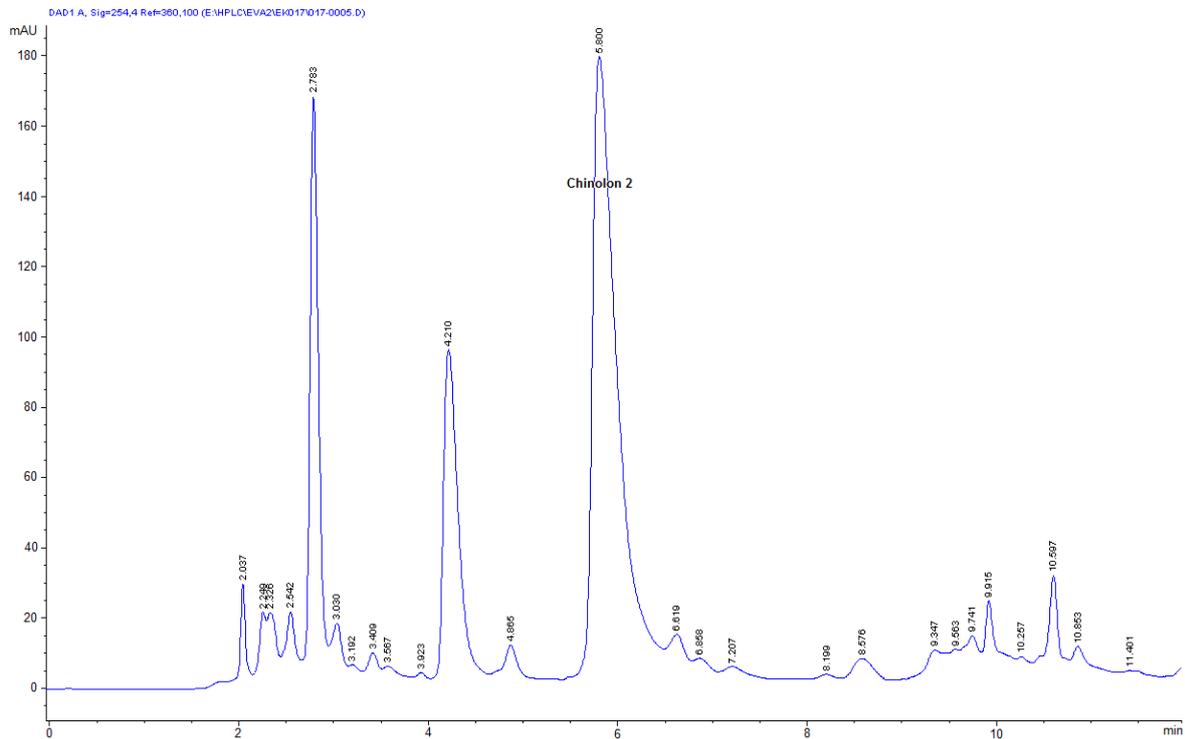


Abbildung 52 HPLC-Chromatogramm der Substanzbibliothek des Chinolons 2

Um das komplexe Substanzgemisch den ersten biologischen Testungen zuzuführen, musste es zunächst fraktioniert werden. Dazu wurde, wie in Kapitel 2.2.2.3 beschrieben, die analytische HPLC-Methode in einen semi-präparativen Maßstab übertragen.

Die Benutzung einer baugleichen Säule mit vergrößertem Durchmesser, d. h. mit einer SYNERGI™ MAX-RP Säule, 150 × 10.0 mm, entsprach einem Scale-Up-Faktor von 4.7. Entsprechend wurden der Eluentenfluss und das Dosiervolumen angepasst. Die präparative Fraktionierung der Substanzbibliothek wurde demnach unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

Säule: SYNERGI™ MAX-RP, 150 × 10 mm, 4 µm; *Fließmittel:* A: 0.2% wässrige Ameisensäure, pH = 2.5; B: Acetonitril; *UV-Detektion:* 254 nm; *Temperatur:* 25 °C; *Flussrate:* 4.7 ml/min; A/B (55:45) für 5 min, A/B (55:45) auf 87% B in 2 min, A/B (13:87) für 7 min

Vergleicht man das Chromatogramm der analytischen Trennung (siehe Abbildung 52) mit dem Chromatogramm der semipräparativen Trennung (siehe Abbildung 53), erkennt man durch ein verstärkt auftretendes Tailing einen Verlust an Auflösung.

2.3.2.2 Fraktionierung der Substanzbibliothek und 1. Aktivitätstestung

Zur Eingrenzung möglicher aktiver Substanzen wurden zunächst sechs Fraktionen gesammelt, die der Testung gegen *Staphylococcus aureus*, *Trypanosoma brucei brucei* und *Leishmania major* zugeführt wurden.

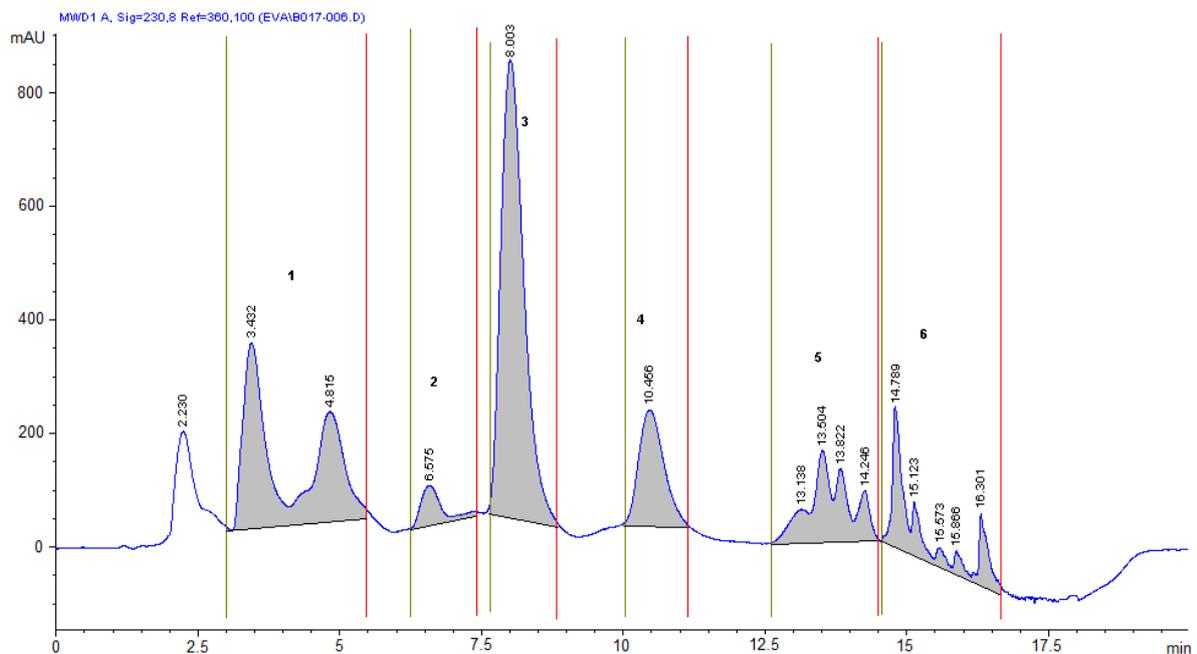


Abbildung 53 1. Fraktionierung der Substanzbibliothek von Chinolon 2

Die Ergebnisse der mikrobiologischen Testungen gegen *Trypanosoma brucei brucei* zeigten nur in zwei der sechs Fraktionen eine leichte Steigerung der Aktivität im Vergleich zu Fraktion Frk2-3, in der vornehmlich das Eduktchinolon 2 enthaltenen ist (siehe Tabelle 13). Die entsprechenden IC_{50} -Werte zeugten zwar von keiner großen

Aktivität, doch muss bedacht werden, dass es sich um Fraktionen und noch keine Reinsubstanzen handelt.

Tabelle 13 Ergebnisse der 1. pharmakologischen Testung gegen *Trypanosoma brucei brucei* TC221

	<i>Trypanosoma brucei brucei</i> TC221			
	48h		72h	
	IC ₅₀ (µM)	STABW (µM)	IC ₅₀ (µM)	STABW (µM)
Frk2-1	>40	n.d.	>40	n.d.
Frk2-2	>40	n.d.	24.55	9.74
Frk2-3	>40	n.d.	>40	n.d.
Frk2-4	>40	n.d.	>40	n.d.
Frk2-5	>40	n.d.	>40	n.d.
Frk2-6	30.72	7.1	22.89	4.46
2	>40	n.d.	>40	n.d.

Gegen *Leishmania major* und *Staphylococcus aureus* konnte in keiner der Fraktionen eine Aktivität festgestellt werden.

2.3.2.3 Subfraktionierung und 2. Aktivitätstestung

Die MS-Messungen der einzelnen Fraktionen zeigten, dass sich in nahezu allen Fraktionen noch Substanzgemische befanden, was die Beurteilung der tatsächlichen Aktivität auf dieser Stufe schwierig machte.

In Tabelle 14 sind die in den Fraktionen enthaltenen Molekülmassen als detektierte Masse-zu-Ladungsverhältnisse angegeben. Die Tatsache, dass in Frk2-5 nur eine Masse angegeben ist, bedeutet hier nicht, dass bereits Reinsubstanzen vorlagen. Die erhaltenen Massen ließen jedoch erste Spekulationen über die möglicherweise entstandenen Substanzen zu.

Tabelle 14 Als Masse-zu-Ladungsverhältnis detektierte Molekülmassen der einzelnen Fraktionen

	m/z
Frk2-1	198, 243
Frk2-2	146, 160, 174, 204
Frk2-3	160, 174, 218, 190
Frk2-4	190, 204
Frk2-5	204
Frk2-6	190, 218, 265

Um die Aktivitäten besser lokalisieren zu können, wurde versucht, die primär positiv getesteten Fraktionen Frk2-2 und Frk2-6 besser aufzutrennen, um Reinsubstanzen isolieren zu können.

Aufgrund der zwischenzeitlich auftretenden weltweiten Knappheit an Acetonitril musste eine Methode mit Methanol als organisches Fließmittel entwickelt werden, auch wenn dies in schlechteren Auflösungen resultierte. Es wurden für beide Fraktionen eigenständige, leicht unterschiedliche Methoden entwickelt, um in kurzer Zeit, möglichst reine Fraktionen zu erhalten. Die verwendeten Methoden sahen schließlich wie folgt aus:

Fraktionierung von Frk2-2:

Säule: SYNERGI™ MAX-RP, 150 × 10.0 mm, 4 µm; *Fließmittel:* A: 0.2% wässrige Ameisensäure, pH = 2.5; B: MeOH; *UV-Detektion:* 254 nm; *Temperatur:* 25 °C; *Flussrate:* 4.7 ml/min; A/B (62:38) für 5 min, A/B (62:38) auf 55% B in 5 min

Fraktionierung von Frk2-6:

Säule: SYNERGI™ MAX-RP, 150 × 10.0 mm, 4 µm; *Fließmittel:* A: 0.2% wässrige Ameisensäure, pH = 2.5; B: MeOH; *UV-Detektion:* 254 nm; *Temperatur:* 25 °C; *Flussrate:* 4.7 ml/min; A/B (55:45) für 5 min, A/B (55:45) auf 76% B in 9 min

Mit diesen Methoden ließen sich jedoch noch keine Reinsubstanzen isolieren. So konnten die Substanzen mit den Massen m/z 146 und m/z 160 in Frk2-2 nicht voneinander getrennt werden, unabhängig davon, welche Variationen an Fließmittel, Fließmittel-

zusammensetzung, Flussrate und Säule durchgeführt wurden. Ebenso ließen sich die Substanzen mit den Massen m/z 204 und m/z 174 nicht voneinander trennen. Deshalb wurden diese Substanzen noch einmal als gemischte Fraktionen zur Testung gegeben. Lediglich von der vorherrschenden Substanz der Fraktion Frk2-6 (m/z 218) konnte eine reine Fraktion isoliert und zum Testen gegeben werden. Die zweite Testungsreihe brachte schließlich folgende Ergebnisse:

Tabelle 15 Ergebnisse der 2. pharmakologischen Testung gegen *Trypanosoma brucei brucei* TC221

	<i>Trypanosoma brucei brucei</i> TC221				m/z
	48h		72h		
	IC ₅₀ (µM)	STABW (µM)	IC ₅₀ (µM)	STABW (µM)	
Frk2-1b	36.68	4.69	>40	n.d.	146, 160
Frk2-2b	>40	n.d.	>40	n.d.	174, 204
Frk2-3b	>40	n.d.	>40	n.d.	218

Hier ist zu erkennen, dass sich lediglich in der Fraktion mit den beiden Substanzen mit m/z 146 und m/z 160 noch Aktivität finden lässt. Dies ist überraschend, da die ursprünglich aktivste Fraktion Frk2-6, in der sich unter anderem die Substanz mit m/z 218 befand, nun bei der rein isolierten Substanz keinerlei Aktivität mehr zeigt. Daraus ist zu schließen, dass die ursprüngliche Aktivität in dieser Fraktion entweder auf eine der in geringerem Maße enthaltenen Substanzen zurückzuführen ist oder aber durch das Zusammenspiel unterschiedlicher Substanzen entstanden war.

2.3.3 Identifizierung der Substanzen

2.3.3.1 Synthese möglicher Substanzen

Die MS-Messungen der ersten Fraktionierung ließen wieder Spekulationen über die Strukturen der durch Fentons Reagenz gebildeten Substanzen zu. Durch Kenntnis typischer Zerfallsprodukte von Chinolonen (vgl. Kapitel 2.2.2.5) und begleitenden

Überlegungen, welche Strukturvariationen durch die Radikale der Fenton-Reaktion überhaupt erzeugt werden können, konnten die in Abbildung 54 aufgeführten möglichen Strukturen ausgemacht werden. Diese wurden versucht auf klassischem Wege zu synthetisieren, um einerseits durch einen Vergleich der NMR-Spektren und durch Spiken die Strukturen der durch Fentons Reagenz erzeugten Substanzbibliothek zu identifizieren und zum anderen die synthetisierten Reinsubstanzen den Testungen zuzuführen.

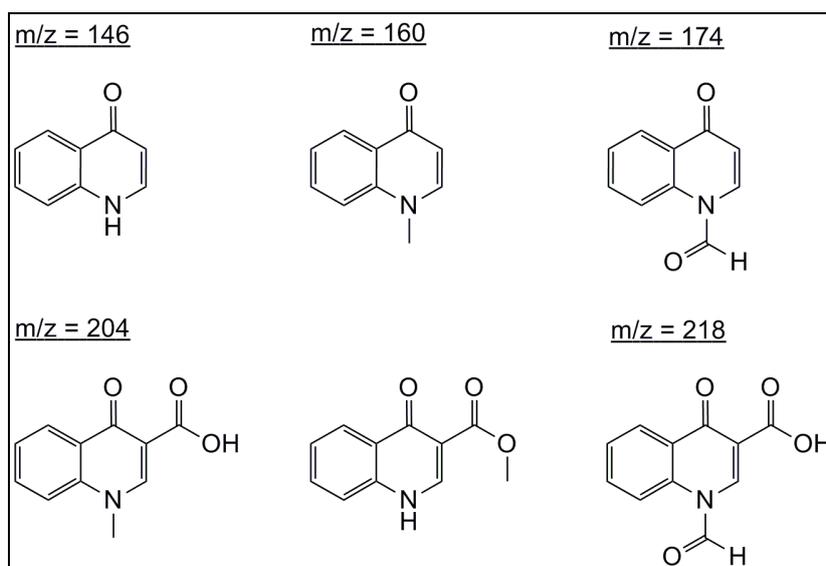


Abbildung 54 Mögliche Strukturen der aktiven Fraktionen Frk2- 1-6

Das 1-Methyl-Derivat des Chinolongrundgerüst **2** wurde versucht, wie von Markees und Schwab¹⁴⁰ beschrieben, analog einer Gould-Jacobs-Reaktion aufzubauen. Ausgehend von *N*-Methylanilin wurde Diethylethoxymethylenmalonat unter Abspaltung von Ethanol eingebaut, indem beide Edukte für 12 h auf 140 °C erhitzt wurden.

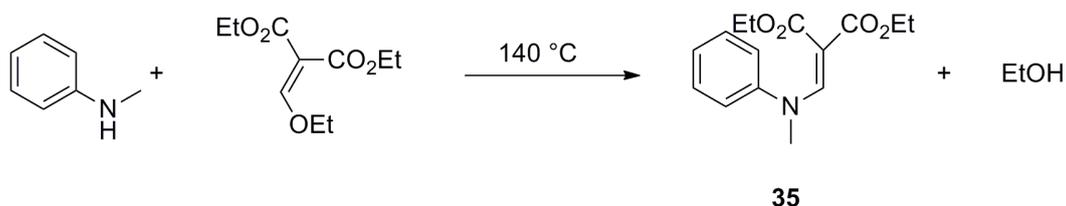


Abbildung 55 Syntheseweg zur Herstellung von Verbindung **35**

Anschließend sollte, analog zur Umsetzung von **7**, der Ringschluss durch Erhitzen in siedendem Dowtherm A erreicht werden. Bei der Reaktion zu Verbindung **7** zieht die entstehende Aromatizität die Reaktion auf die Produktseite. Diese Triebkraft fehlt bei der Ringschlussreaktion von Verbindung **35**, weshalb die Reaktion in nur geringem Maße stattfand. Das entstandene Produkt erwies sich darüber hinaus als praktisch unlöslich in allen Lösungsmitteln. Zwar konnte in Wasser eine geringe Menge in Lösung gebracht werden, aber die anschließende Verseifung des Esters scheiterte an dieser schlechten Löslichkeit. Deshalb wurde nach einem alternativen Syntheseweg gesucht. Dieser bestand in der Umsetzung von Verbindung **35** mit Phosphorpentoxid.¹⁴⁰ In einer exotherm ablaufenden Reaktion unter starkem Aufschäumen und starker Raucherentwicklung kam es direkt zur Bildung der entsprechenden Säure **36**. Der rosa Feststoff wurde so in einer Ausbeute von 29% erhalten.

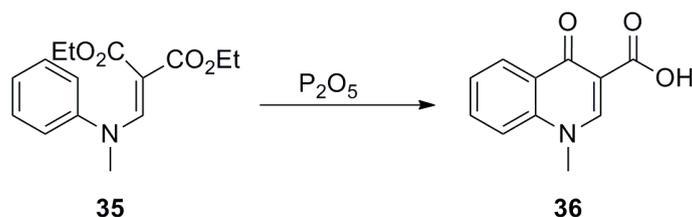


Abbildung 56 Syntheseweg zur Herstellung von **36**¹⁴⁰

Um hieraus die decarboxylierte Variante (**37**) herzustellen, wurde Substanz **36** anschließend für 30 Minuten auf 200 °C erhitzt, bis kein CO₂ mehr entwich. Die anschließende Aufarbeitung erfolgte analog zu Markees *et al.*¹⁴⁰ mittels Aktivkohle, um die beim trockenen Erhitzen entstandenen Zersetzungsprodukte auszuwaschen.

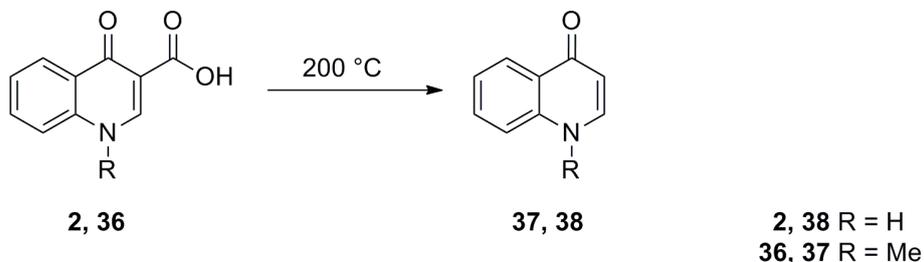


Abbildung 57 Syntheseweg zur Herstellung der Verbindungen **37** und **38**

Auf die gleiche Weise wurde auch das decarboxylierte Derivat von **2**, Verbindung **38** in Ausbeuten von 69%, hergestellt.⁸⁷

Den Methylester (**39**) von Verbindung **2** erhält man durch eine säurekatalysierte Veresterung. Dazu wurde Verbindung **2** zwei Tage mit Methanol und Salzsäure zum Rückfluss erhitzt und anschließend über Kieselgel mit einem Fließmittelgemisch bestehend aus Ethylacetat und Ethanol (2:1) säulenchromatographisch aufgereinigt.

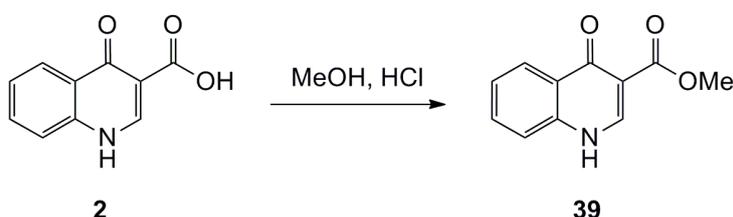


Abbildung 58 Syntheseweg zur Herstellung der Verbindung **39**

Schwieriger gestaltete sich die Darstellung der formylierten Derivate. Zunächst wurde versucht, wie bei der Synthese von **21**, die Umsetzung mithilfe von Triethylamin und Ameisensäure zu erreichen. Dazu wurde die Substanz in Lösung für 100 h zum Rückfluss erhitzt und anschließend durch Umkristallisation in Wasser aufgearbeitet. Es konnte jedoch nur Edukt isoliert werden.

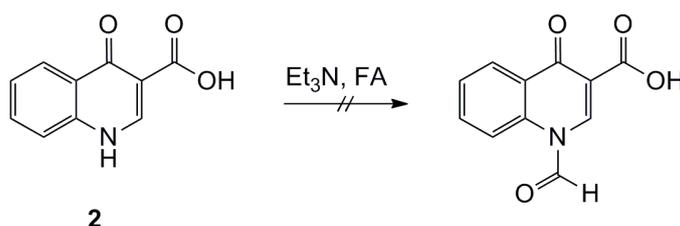


Abbildung 59 Versuch der Synthese des formylierten Derivats von Chinolon **2**

Die Reaktion erfolgt theoretisch durch einen nukleophilen Angriff des Stickstoffs an die Carboxyeinheit der Ameisensäure. Im Falle von Substanz **2** ist der Stickstoff N1 jedoch nicht nukleophil genug, um solch einen Angriff auszuführen. Substanz **2** kann eine tautomere Struktur ausbilden, die deutlich stabiler, jedoch nicht nukleophil ist (siehe

Abbildung 60), weshalb keine Umsetzung stattfand. Dies ist ebenfalls der Fall für Substanz **36**, so dass auch hier keine Formylierung am Stickstoff durchgeführt werden kann.



Abbildung 60 Mögliche Grenzstrukturen von Verbindung **2**

2.3.3.2 Identifizierung durch Spiken

Die Identifizierung der durch Fentons Reagenz erzeugten Substanzen sollte durch Spiken der Fraktionen mit den synthetisierten Substanzen erfolgen. Dazu wurden die Fraktionen der Umsetzung von Substanz **2** mit den Verbindungen **36**, **37**, **38** und **39** versetzt und mittels LC/MS vermessen. Die Messungen wurden dabei mit einer SYNERGI™ MAX-RP Säule und 0.2% Wässrige Ameisensäure und Acetonitril als Fließmittel durchgeführt. Dabei konnte gezeigt werden, dass es sich bei der Substanz mit m/z 146 in Fraktion Frk2-1b um Substanz **38** handelt, da diese im Chromatogramm zur selben Zeit eluiert und eben dieser Peak durch Spiken wächst. Ebenso stimmen die zu beobachtenden Massenpeaks überein.

Bei Substanz **37** handelt es sich hingegen nicht um die Substanz, die ebenfalls in Fraktion Frk2-1b enthalten ist. Die LC/MS-Messungen der mit Substanz **37** gespikten Substanzbibliothek belegen, dass Substanz **37** circa eine Minute später eluiert als die Substanz mit m/z 160.

Für die mögliche Substanz mit m/z 204 in Fraktion Frk2-2b konnten hingegen zwei mögliche Substanzen synthetisiert werden, Substanz **36** und **39**.

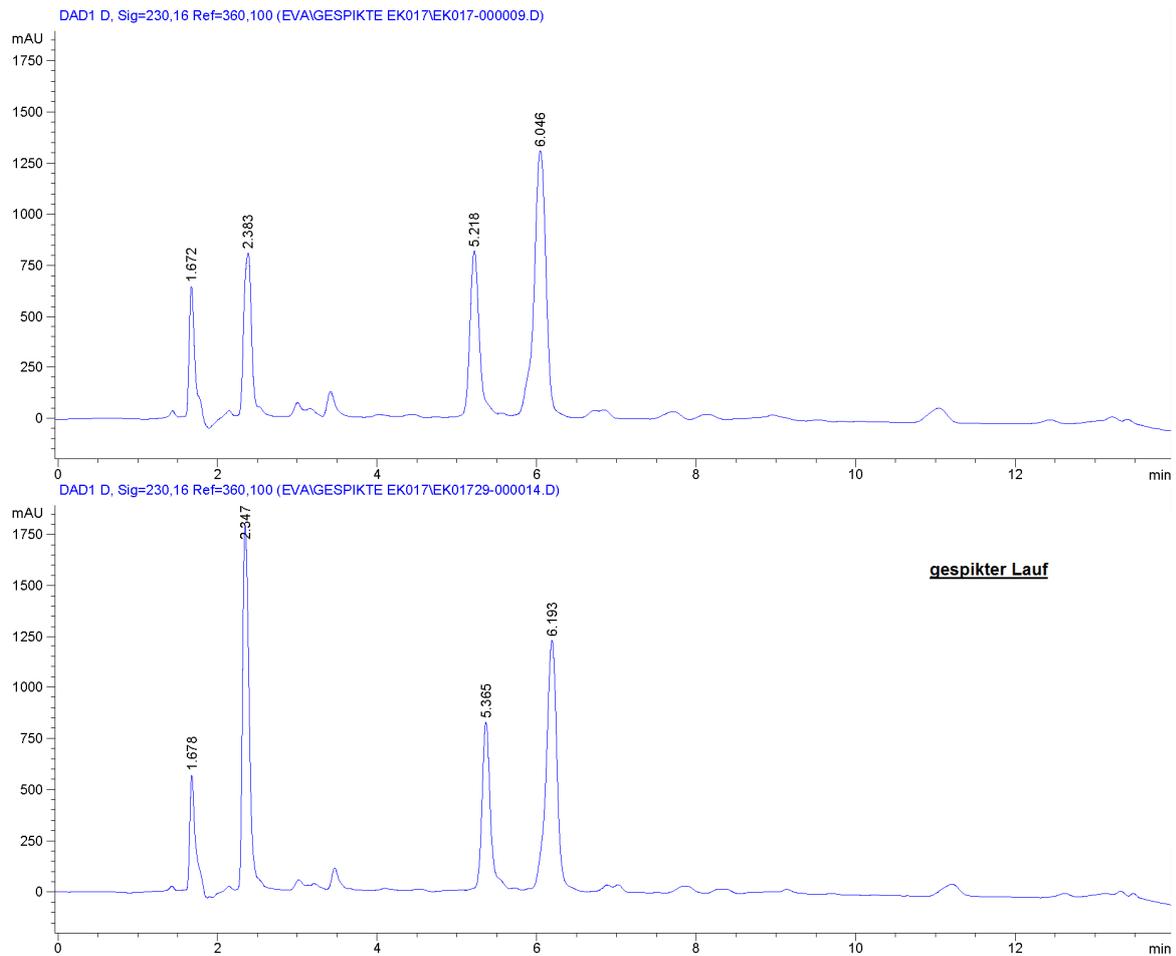


Abbildung 61 Mit Verbindung **38** gespikter LC/MS-Lauf

Das Spiken mit diesen beiden Substanzen zeigte, dass es sich bei der Substanz mit m/z 204 um Substanz **39** handelt. Diese eluierte zur selben Zeit wie die durch Fentons Reagenz erzeugte Substanz bei knapp über drei Minuten (siehe Abbildung 62), wohingegen Verbindung **36** erst nach über sechs Minuten eluierte.

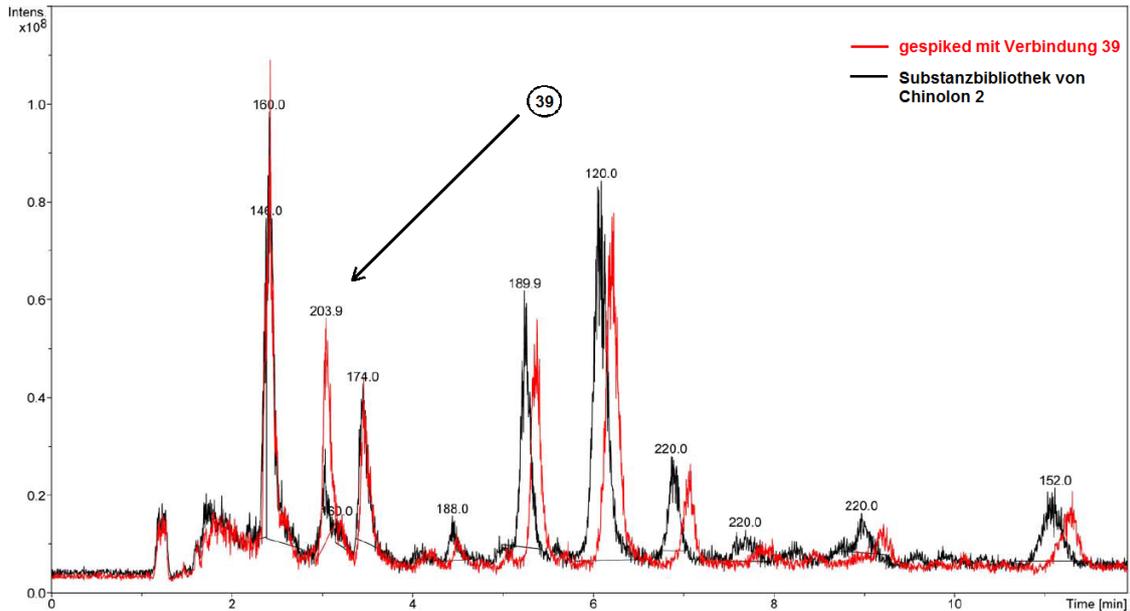


Abbildung 62 Vergleich des LC/MS-Chromatogramms der Substanzbibliothek von Chinolon **2** mit dem, mit Verbindung **39**, gespikten Lauf

2.3.4 Mikrobiologische Testungen

Die Aktivität in Fraktion Frk2-1b kann durch die beiden Substanzen mit m/z 146 und/oder m/z 160 erzeugt werden. Da die gespikten LC/MS-Messungen ergaben, dass es sich bei der Substanz mit m/z 146 um Substanz **38** handelt, kann durch Testung der Aktivität der synthetisierten Substanz **38** überprüft werden, ob die in Fraktion Frk2-1b erzeugte Aktivität von Substanz **38** herrührt. Folglich wurden sämtliche synthetisierte Substanzen den Testungen gegen *Trypanosoma brucei brucei* zugeführt.

Es konnte jedoch für keine der synthetisierten Substanzen eine Aktivität gegen *Trypanosoma brucei brucei* festgestellt werden. Deshalb kann die in Fraktion Frk2-1b gefundene Aktivität nicht von der Substanz mit m/z 146, d. h. von Substanz **38** herrühren. Folglich muss die Aktivität von der Substanz mit m/z 160 stammen, deren Struktur jedoch unbekannt ist, da sie nicht Substanz **37** entspricht.

Tabelle 16 Ergebnisse der pharmakologischen Testung gegen *Trypanosoma brucei brucei* TC221

	<i>Trypanosoma brucei brucei</i> TC221				
	48h		72h		% Hemmung
	IC ₅₀ (μM)	STABW (μM)	IC ₅₀ (μM)	STABW (μM)	
36	>40	n.d.	>40	n.d.	33.58
37	>40	n.d.	>40	n.d.	
38	>40	n.d.	>40	n.d.	
39	>40	n.d.	>40	n.d.	

2.4 Zusammenfassung und Diskussion

Das Verfahren der Random Chemistry eignet sich hervorragend zur Erzeugung kleiner Substanzbibliotheken und ermöglicht schnell, ökonomisch und mit konstanter Chance auf Erfolg neue, aktivere Verbindungen zu erhalten, die über die klassischen kombinatorischen Syntheschemata bzw. die gängigen Reaktionsmechanismen nur schwer zugänglich sind. Unter der Voraussetzung, dass eine ausreichende Löslichkeit von sowohl der Ausgangssubstanz als auch den Eisenionen erreicht werden kann, eröffnet der Einsatz des Fentons Reagenz dabei unter Einhaltung der geeigneten Bedingungen eine deutlich kostengünstigere und im Laboralltag jederzeit anwendbare Alternative zur technologisch aufwendigen Verwendung von γ -Strahlen zur Initialisierung der Zufallsreaktion. So konnten mit Hilfe der Fenton-induzierten Random Chemistry sowohl bei der Umsetzung des Chinolons **1** als auch des Chinolons **2** Substanzen mit verbesserter Aktivität gegenüber *Trypanosoma brucei brucei*, im Vergleich zum jeweiligen Ausgangschinolon, isoliert werden. Die Strukturaufklärung dieser Substanzen mittels NMR- und Tandem-ESI-Massenspektrometrie belegten die Bildung eines Chinolon-derivats mit *N*-(2-Aminoethyl)formamid-Rest in Position 7 (Frk**1**-2c) sowie eines Derivats mit (2-((Methyl-amino)methoxy)ethyl)amino-Rest in Position 7 und einer Hydroxylgruppe in Position 6 (Frk**1**-1c). Basierend auf Struktur Frk**1**-2c wurde deshalb der Einfluss einer Reduzierung des Piperazinrestes sowie der Einfluss der Einführung

einer Amidfunktion in Position 7 bzw. in Position 3 auf die Aktivität gegen *Trypanosoma brucei brucei* untersucht. Dabei wurde deutlich, dass die beste antitrypanosomale Wirkung bei gleichzeitigem Vorhandensein einer Amidfunktion in Position 7 und in Position 3 erzeugt wird (Verbindungen **29-33**). Für die Wirkung gegen *Trypanosoma brucei brucei* scheint demnach die Carboxyfunktion in Position 3 ungeeignet zu sein, da der Wirkmechanismus der Trypanosomenhemmung allem Anschein nach nicht durch eine Bindung der Carboxyfunktion an die DNA erfolgt, sondern auf andere bisher unbekannt Weise. Die erhaltenen Verbindungen **29-33** können zukünftig als Leitstrukturen für weitere strukturelle Modifizierungen herangezogen werden.

3 METABOLISMUSVORHERSAGE MIT FENTONS REAGENZ

Bei der Suche nach neuen Leitstrukturen mit Hilfe von Fentons Reagenz fiel auf, dass ein Großteil der in den Substanzbibliotheken gebildeten neuen Strukturen literaturbekannten Metaboliten der Fluorchinolone ähneln. Die zugrunde liegende Chemie der Ein-Elektronen-Oxidation von Fentons Reagenz (vgl. Kapitel 1.4.2) gleicht darüber hinaus stark der Verstoffwechslung mittels des Hauptmetabolismusenzym Cytochrom-P450. Folglich sollte die Möglichkeit untersucht werden, ob sich die Fenton-Reaktion zur Erzeugung des metabolischen Profils neuer biologisch aktiver Substanzen eignet. Um dieser Frage nachzugehen, ist es hilfreich, eingangs den Katalysezyklus des zentralen Cytochrom-P450 zu beleuchten.

3.1 Cytochrom-P450-Katalysezyklus

Cytochrom-P450-Enzyme sind Hämproteine, die an der Oxidation einer Vielzahl von Arzneistoffen, Karzinogenen, Steroiden, Pestiziden und anderen Chemikalien beteiligt sind. Bis heute sind 57 humane P450-Gene identifiziert und von vielen sind ihre Expression und ihre katalytische Information bereits bekannt.¹⁴¹ Jedoch ist nur ein sehr geringer Teil dieser humanen Cytochrome für die oxidative Metabolisierung von Arzneistoffen^{141; 142} und Karzinogenen¹⁴³ verantwortlich.

Es kann ein allgemeiner chemischer Mechanismus für den P450-Katalysezyklus formuliert werden (siehe Abbildung 63), der einen Großteil der stattfindenden Oxidationen, Hydroxylierungen, Dealkylierungen, Epoxidierungen und die Hämdegradierung erklärt.¹⁴² Dieser Zyklus beginnt mit dem Ruhezustand (**I**) (siehe Abbildung 63), in dem ein Wassermolekül an ein Eisenion gebunden ist. Der hexakoordinierte Eisenkomplex besitzt dabei in den d-Orbitalen fünf Elektronen. Wird das Wassermolekül von Substrat RH verdrängt, bildet sich ein pentakoordinierter Eisen-Porphyrin-Komplex, der deutlich bessere Elektronenakzeptoreigenschaften besitzt als der anfängliche Ruhezustand. Durch

die Aufnahme eines Elektrons einer NADPH-Reduktase wird so der High-spin-Eisenkomplex (II) erzeugt. Die anschließende Bindung von molekularem Sauerstoff ergibt einen Eisendisauerstoffkomplex (III), der wiederum durch seinen Singulett-Spin-Zustand ein guter Elektronenakzeptor ist (siehe Abbildung 63).

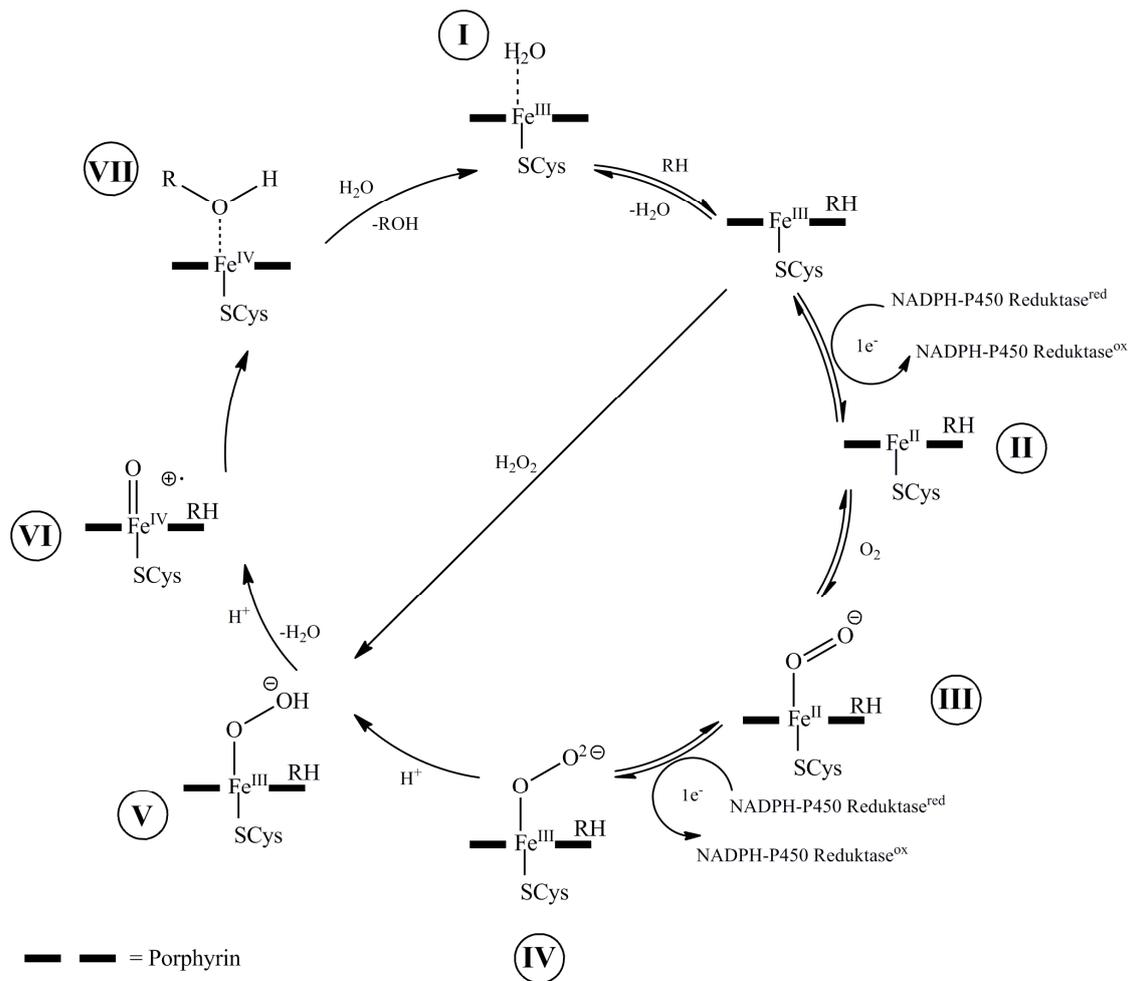


Abbildung 63 Allgemeiner Katalysezyklus von P450-Reaktionen (modifiziert nach^{142; 144; 145})

In einer zweiten Reduktion wird die Eisenperoxoanionspezies (IV) erzeugt. Diese Lewisbase wird nun meist schnell zur Eisenhydroperoxidspezies (V) protoniert. Da dieser Komplex noch immer eine sehr gute Lewisbase darstellt, wird ein zweites Mal protoniert, um durch anschließende Wasserabspaltung einen sehr reaktiven Perferryl-Sauerstoff-Komplex FeO^{3+} (VI) zu bilden. Dieser Komplex wird als eine $\text{Fe}^{\text{IV}}=\text{O}$ /Porphyrin-

Radikal-Spezies beschrieben, die allerdings eine sehr geringe Halbwertszeit besitzt.¹⁴⁶ Im entscheidenden oxidativen Schritt wird nun ein Sauerstoffatom an das Substrat RH übertragen (VII). Dies geschieht durch die Abstraktion eines Wasserstoffatoms vom Substrat, so dass sich ein FeO^{3+} /Radikal-Paar bildet, das jedoch sehr schnell zum entsprechenden Produkt rekombiniert. Ist dies geschehen, verlässt das oxidierte Substrat die Enzymtasche. Ein Wassermolekül lagert ein und der Ruhezustand des Enzyms ist wiederhergestellt (siehe Abbildung 63). Die exakten Mechanismen der Schritte (IV) bis (I) sind jedoch noch nicht eindeutig geklärt.

Das Cytochrom-P450-Enzym ist demnach als Monooxygenase in der Lage den Einbau eines Sauerstoffatoms in das Substrat durch die Reduktion eines zweiten Sauerstoffatoms durch zwei Elektronen des NADPH zu katalysieren. In Analogie dazu kommt es bei der Fenton-Reaktion ebenfalls zur Reduktion eines Sauerstoffatoms unter Freisetzung eines Hydroxylradikals, welches als hochreaktive Spezies ebenfalls schnell mit dem Substrat wechselwirken und etwa unter Hydroxylierung eingebaut werden kann (vgl. Kapitel 1.3.2). In beiden Fällen bilden Hydroxylierungen, Epoxidierungen und die Abstraktion von Wasserstoff-, Halogen- oder Alkylsubstituenten die Hauptprodukte der jeweils durch Eisenionen katalysierten Oxidation.^{147; 148}

3.2 Umsetzungen mit Fentons Reagenz

Um das prädiktive, metabolische Screeningvermögen von Fentons Reagenz zu untersuchen, wurden drei strukturell unterschiedliche Antibiotika Cinoxacin (Cin), Linezolid (Lin) und Ciprofloxacin (Cip) (siehe Abbildung 64) mit Fentons Reagenz umgesetzt und die dabei entstandenen Substanzbibliotheken mittels LC/MS/MS Messungen untersucht.

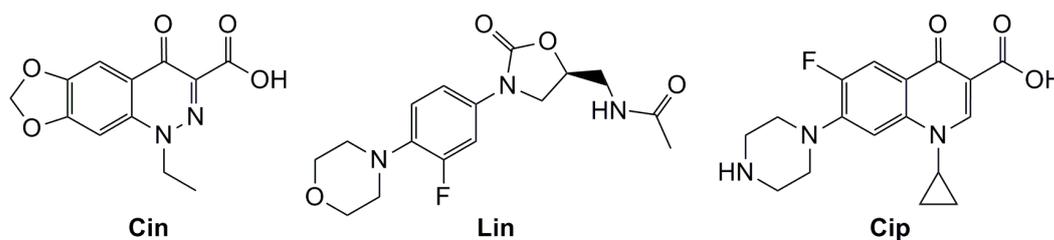


Abbildung 64 Strukturen von Cinoxacin (Cin), Linezolid (Lin) und Ciprofloxacin (Cip)

3.2.1 Umsetzung von Cinoxacin mit Fentons Reagenz

Die Unlöslichkeit von Cinoxacin im wässrigen Milieu sowie in sämtlichen organischen Lösungsmittel¹⁴⁹ und seine damit bedingte ausschließliche Löslichkeit im alkalischen Milieu führte zu konzeptionellen Problemen bei der Umsetzung mit Fentons Reagenz. Im alkalischen Milieu kommt es zur Ausfällung von Eisenhydroxid, was die Fenton-Reaktion verhindert. Eine Umsetzung im alkalischen Milieu ist mit Fentons Reagenz folglich nicht möglich. Zur Verbesserung der Löslichkeit im wässrigen Medium wurde Cinoxacin deshalb in sein entsprechendes Ammoniumsalz überführt.¹⁵⁰ Das Ammoniumsalz konnte zumindest teilweise in Wasser in Lösung gebracht, mit Eisen(II)-sulfat und Wasserstoffperoxid versetzt und für 2 h bei Raumtemperatur gerührt werden. Um anschließend die überschüssigen Eisenionen zu entfernen, wurde der Reaktionsansatz säulenchromatographisch über Kieselgel, mit einem Fließmittelgemisch bestehend aus Acetonitril, Wasser und Ammoniak (20 : 7 : 1.6)¹⁴⁹, aufgereinigt. Die so erhaltene Eluatlösung wurde schließlich den HPLC-Analysen zugeführt. Zur Fraktionierung der entstandenen Substanzbibliothek via LC/MS wurde eine in Anlehnung an van Vyncht *et al.*¹⁵¹ modifizierte Methode verwendet.

Säule: NUCLEOSIL[®], 250 × 4.0 mm, 5 µm; *Fließmittel:* A: 0.2% wässrige Ameisensäure, pH = 2.5; B: ACN; *UV-Detektion:* 264 nm; *Temperatur:* 25 °C; *Flussrate:* 1.0 ml/min; A/B (90:10) auf 70% B in 5 min, A/B (30:70) für 5 min

Von Cinoxacin sind bis dato nur wenige Metabolite literaturbekannt (siehe Abbildung 65).^{152; 153} Da der Glucuronid-Metabolit nicht durch Fentons Reagenz gebildet werden kann, bleiben die drei in Abbildung 65 dargestellten Metabolite, nach denen gescreent werden sollte. Ein reduzierter Metaboliten **Cin1**, ein Metabolit **Cin2**, bei dem das ehemalige Acetal als 1,2-Diol vorliegt und ein dritter Metabolit **Cin3**, bei dem die Acetal-Funktion gespalten wurde.

Die LC/MS-Messungen zeigten, dass die Umsetzung von Cinoxacin mit Fentons Reagenz in nur sehr geringem Umfang stattfand. So konnten nach der Aufarbeitung

neben dem Edukt (m/z 263) nur zwei Substanzen mit den Masse-zu-Ladungsverhältnissen von 225 und 233 detektiert werden. Diese konnten jedoch keinem bekannten Metaboliten zugeordnet werden.

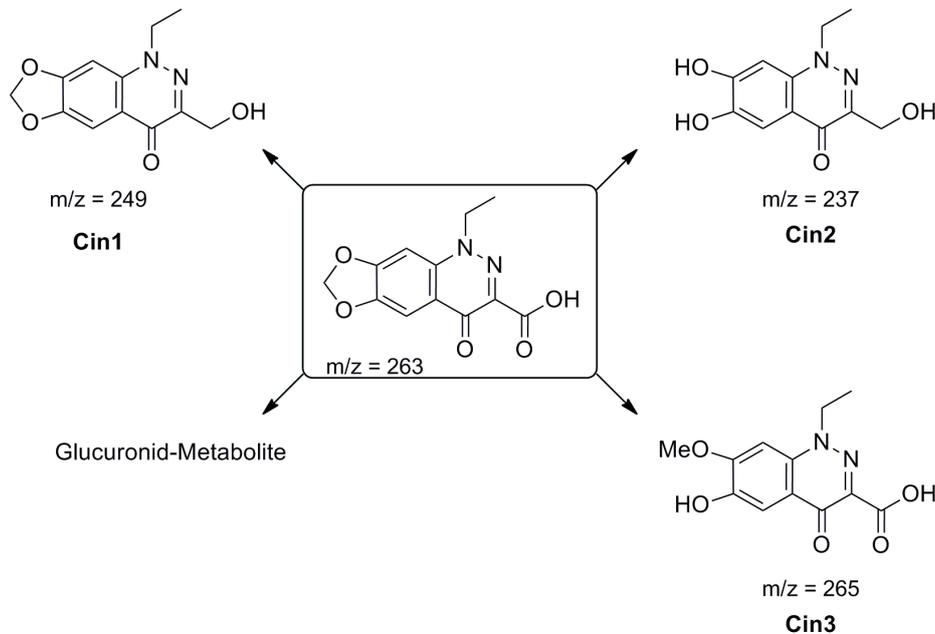


Abbildung 65 Literaturbekannte Metabolite von Cinoxacin

3.2.2 Umsetzung von Linezolid mit Fentons Reagenz

Die Umsetzung von Linezolid mit Fentons Reagenz gestaltete sich deutlich einfacher als von Cinoxacin. Linezolid ist in Ethanol gut löslich, so dass die Umsetzung durch Zugabe einer wässrigen Lösung von Eisen(II)-sulfat und anschließendem Zutropfen von Wasserstoffperoxidlösung problemlos durchgeführt werden konnte. Zur Entfernung der Eisenionen wurde der Ansatz säulenchromatographisch über Kieselgel, mit einem Fließmittelgemisch bestehend aus Ethanol und Ammoniak (9 : 1) aufgereinigt. Die anschließenden LC/MS-Messungen wurden, wie von Borner *et al.*¹⁵⁴ und Boak *et al.*¹⁵⁵ vorgeschlagen, mit einem Fließmittelgemisch bestehend aus Acetonitril und wässriger Ameisensäure unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

Säule: NUCLEOSIL[®], 250 × 4.0 mm, 5 µm; *Fließmittel:* A: 0.2% wässrige Ameisensäure, pH = 2.5; B: ACN; *UV-Detektion:* 254 nm; *Temperatur:* 25 °C; *Flussrate:* 1.0 ml/min; isokratisch A/B (80:20) 30 min

Von Linezolid sind elf Metabolite literaturbekannt¹⁵⁶, die je nach Abbaumechanismus in vier Gruppen eingeteilt werden können:

- 1) Abbau der Acetamidgruppe (**L1**),
- 2) Hydroxylierung oder Oxidation (**L2**),
- 3) Abbau der Morpholingruppe (**L3**) und
- 4) Defluorierung (**L4**).

Die Umsetzung mit Fentons Reagenz erzeugte eine kleine Substanzbibliothek, in der fünf dieser literaturbekannten Metaboliten mittels LC/MSⁿ-Messungen zugeordnet werden konnten (siehe Abbildung 66).

Um die Struktur der entstandenen Metabolite massenspektrometrisch aufklären zu können, wurde zuerst die Fragmentierung von Linezolid untersucht. Dieses zeigt charakteristische Fragmentierungsmuster in den LC/MSⁿ-Messungen. Diese beinhalten den Verlust der Acetamid- [M+H-58]⁺ beziehungsweise der Acetaldehydgruppe [M+H-42]⁺ oder aber typische Abbauschritte der Morpholineinheit wie [M+H-44]⁺ und [M+H-86]⁺.

Folglich sind in der Literatur als Produktionen von Linezolid hauptsächlich das Produktion mit m/z 296 ([337+H-42]⁺), das den Verlust der Acetaldehydgruppe darstellt^{157; 158} und das Produktion mit m/z 195, welches den simultanen Verlust der Acetamidgruppe und der Morpholingruppe widerspiegelt, beschrieben.^{159; 160} Werden diese Fragmentierungsschritte in den MSⁿ-Spektren der unbekannt, durch Fentons Reagenz erzeugten Substanzen gefunden, spricht dies entweder für die Existenz einer intakten Acetamid- bzw. Morpholingruppe.

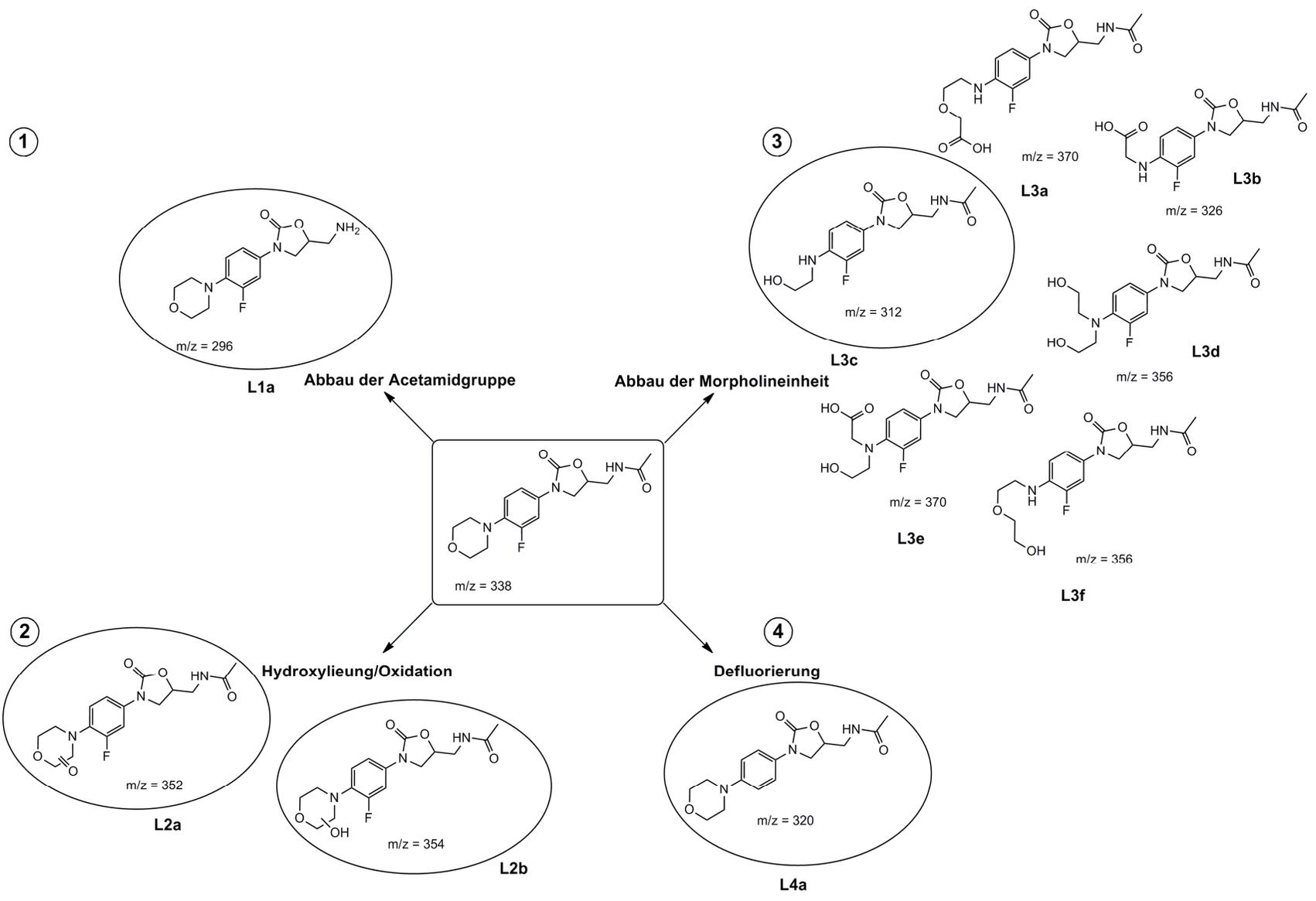


Abbildung 66 Metabolite von Linezolid (durch Fentons Reagenz erzeugte Metabolite sind eingekreist)

Die Zuordnung der unbekannt Verbindungen aus den erzeugten Substanzbibliotheken zu literaturbekannten Metaboliten erfolgte durch die Auswertung der erhaltenen MSⁿ-Daten.

1) Die durch Fentons Reagenz erzeugte Substanz mit m/z 296 kann so Metabolit **L1a** zugeordnet werden (siehe Abbildung 66). Es konnten hier typische Fragmentierungsschritte beobachtet werden, wie etwa der Verlust von 44 u ($[M+H-44]^+$), was dem Abbau der Morpholineinheit entspricht oder aber der Abbau der 5-(Aminomethyl)oxazolidin-2-on-Einheit $[M+H-101]^+$. Folglich scheinen diese Gruppen noch intakt vorzuliegen (siehe Abbildung 67). Es konnte kein Verlust von 42 u detektiert werden (siehe Anhang, Tabelle 1), was auf eine fehlende Acetaldehydgruppe hindeutet. Somit handelt es sich bei der Substanz aller Wahrscheinlichkeit nach um Metabolit **L1a**.

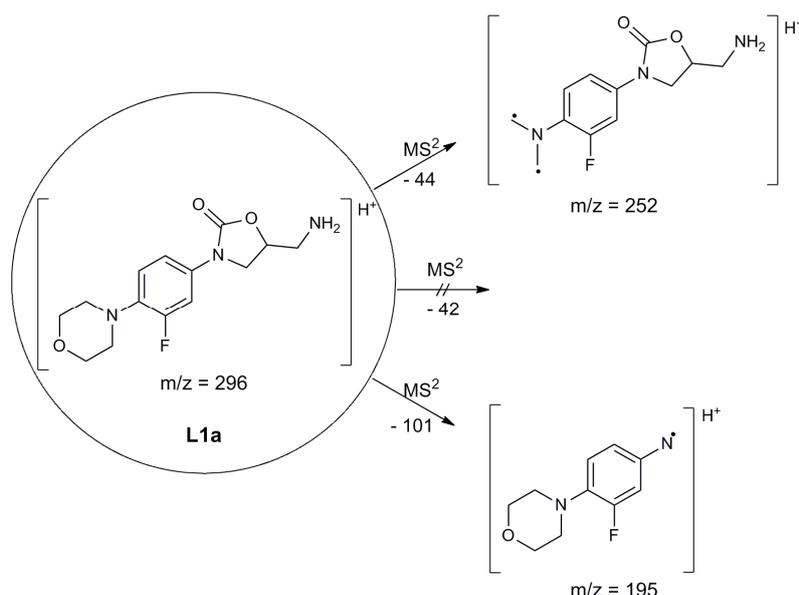


Abbildung 67 MSⁿ-Fragmentierungsschema des Produktions mit m/z 296

2a) Die Substanzen mit m/z 352 und m/z 354 zeigten beide charakteristische Fragmentierungsschritte, wie den Verlust von 42 u, d. h. den Verlust der Acetaldehydgruppe, und einen typischen Abbauschritt des Morpholinrings $[M+H-44]^+$. Jedoch konnte kein Produktion $[M+H-86]^+$, welches für den Abbau des vollständigen Morpholinrings steht, beobachtet werden (siehe Abbildung 68).

Stattdessen zeigten MS^3 -Messungen für die Substanz mit m/z 352 den Verlust von 100 u (siehe Anhang, Tabelle 1). Folglich befindet sich anstatt des Morpholinrings eine Morpholinon-Einheit am Benzolring (siehe Abbildung 68). Dies wiederum erlaubt die Zuordnung der Substanz mit m/z 352 zu Metabolit **L2a**; es kann nicht unterschieden werden, ob sich die Carbonylgruppe in Position 2 oder 3 am Morpholinring befindet (siehe Abbildung 66).

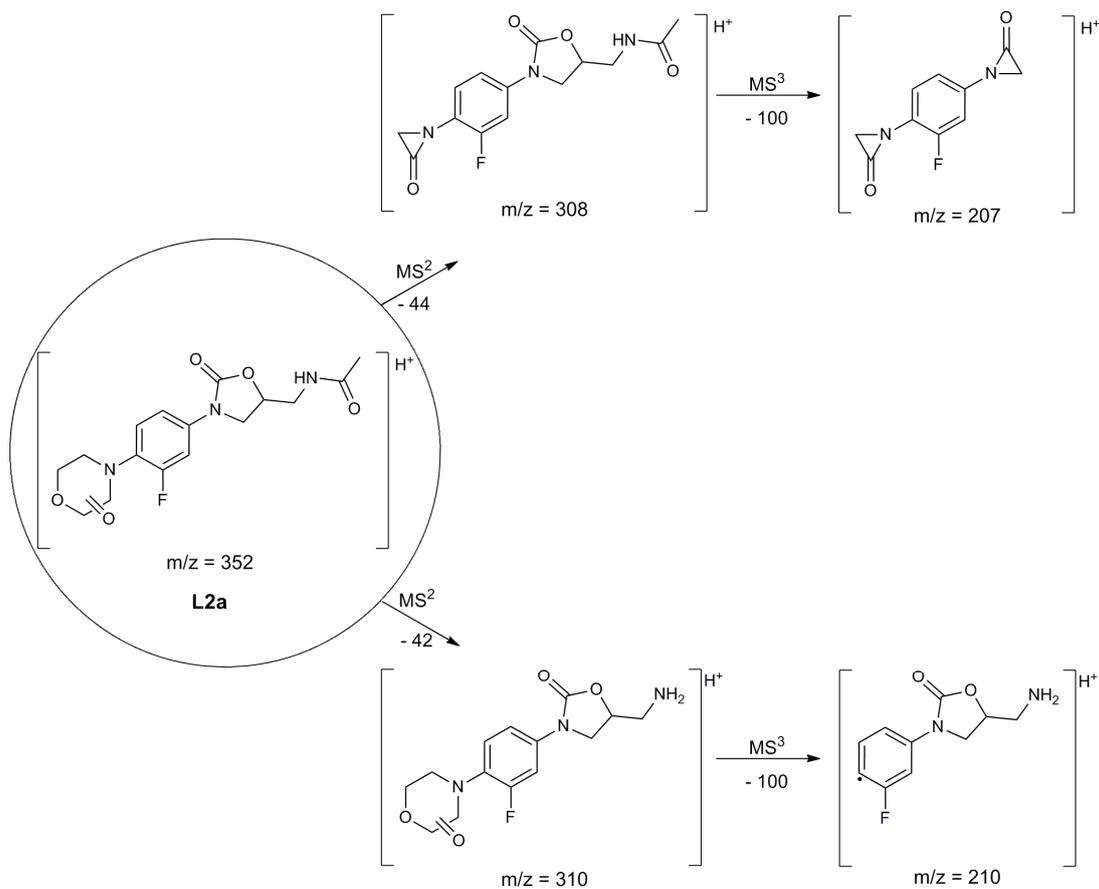


Abbildung 68 MS^n -Fragmentierungsschema des Produkts mit m/z 352

2b) Die Substanz mit m/z 354 kann von der Substanz mit m/z 352 deutlich unterschieden werden, da zum einen ein eindeutiger Verlust von H_2O beobachtet werden konnte und die MS^3 -Messungen zum anderen den Verlust von $[M+H-102]^+$ zeigten. Dieser Fragmentierungsschritt steht für den Abbau einer Hydroxymorpholin-Einheit. Dies wiederum erlaubt die Zuordnung zu Metabolit **L2b**. Die Fragmentierungsschritte lassen wiederum

keine exakte Zuordnung der Position der Hydroxylgruppe am Morpholinring zu. Weitere MS^3 -Fragmentierungen sind der Abbildung 69 zu entnehmen.

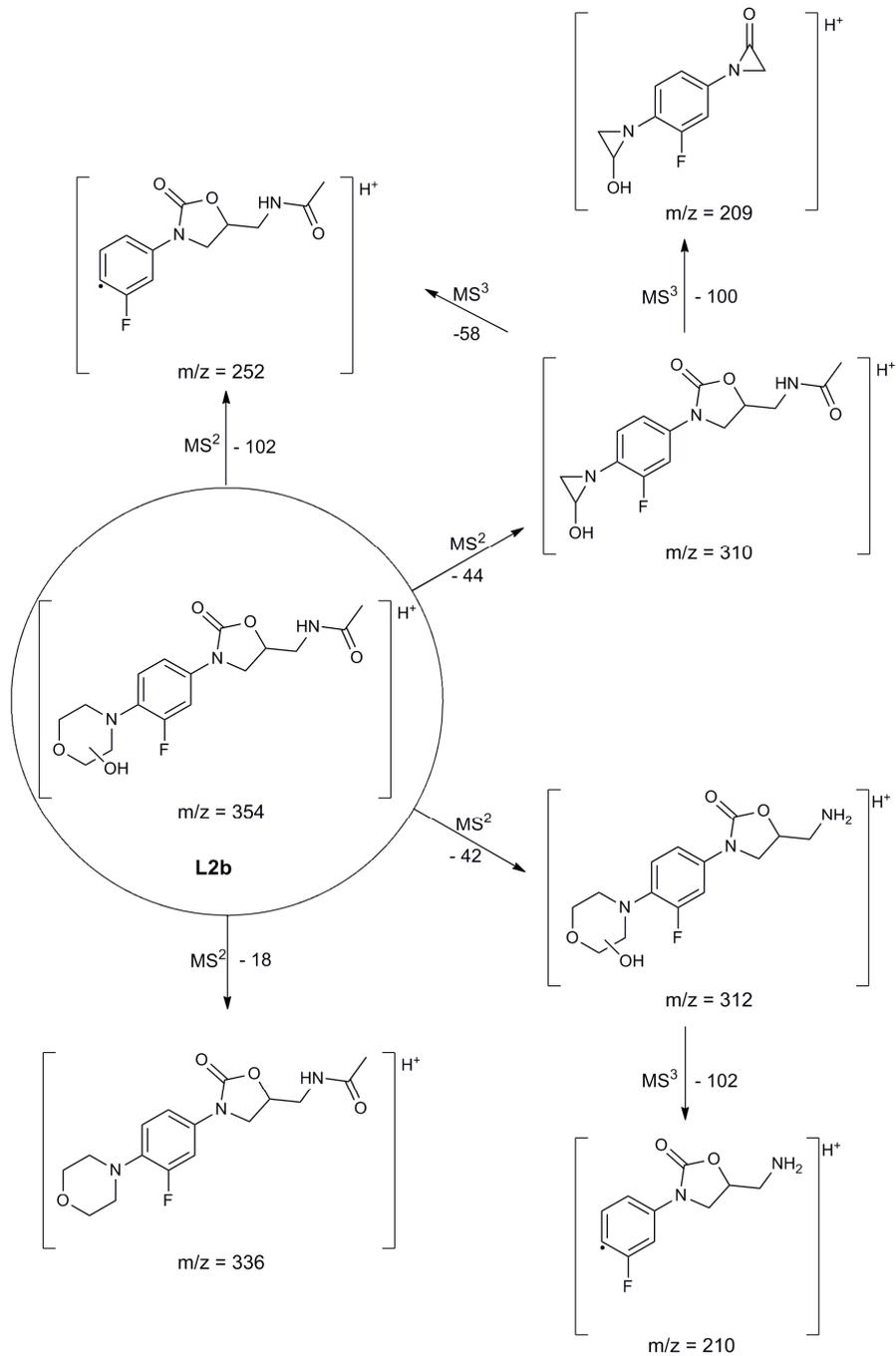


Abbildung 69 MS^n -Fragmentierungsschema des Produktions mit m/z 354

3) Das Fehlen des Fragmentierungsschritts $[M+H-44]^+$ bei der Substanz mit m/z 312 deutet auf eine Struktur mit fehlender bzw. teilweise zersetzter Morpholineinheit. Der Verlust der Acetaldehydgruppe $[M+H-42]^+$ hingegen führt zu einem Produktion der 1. Generation mit m/z 270 (siehe Abbildung 70).

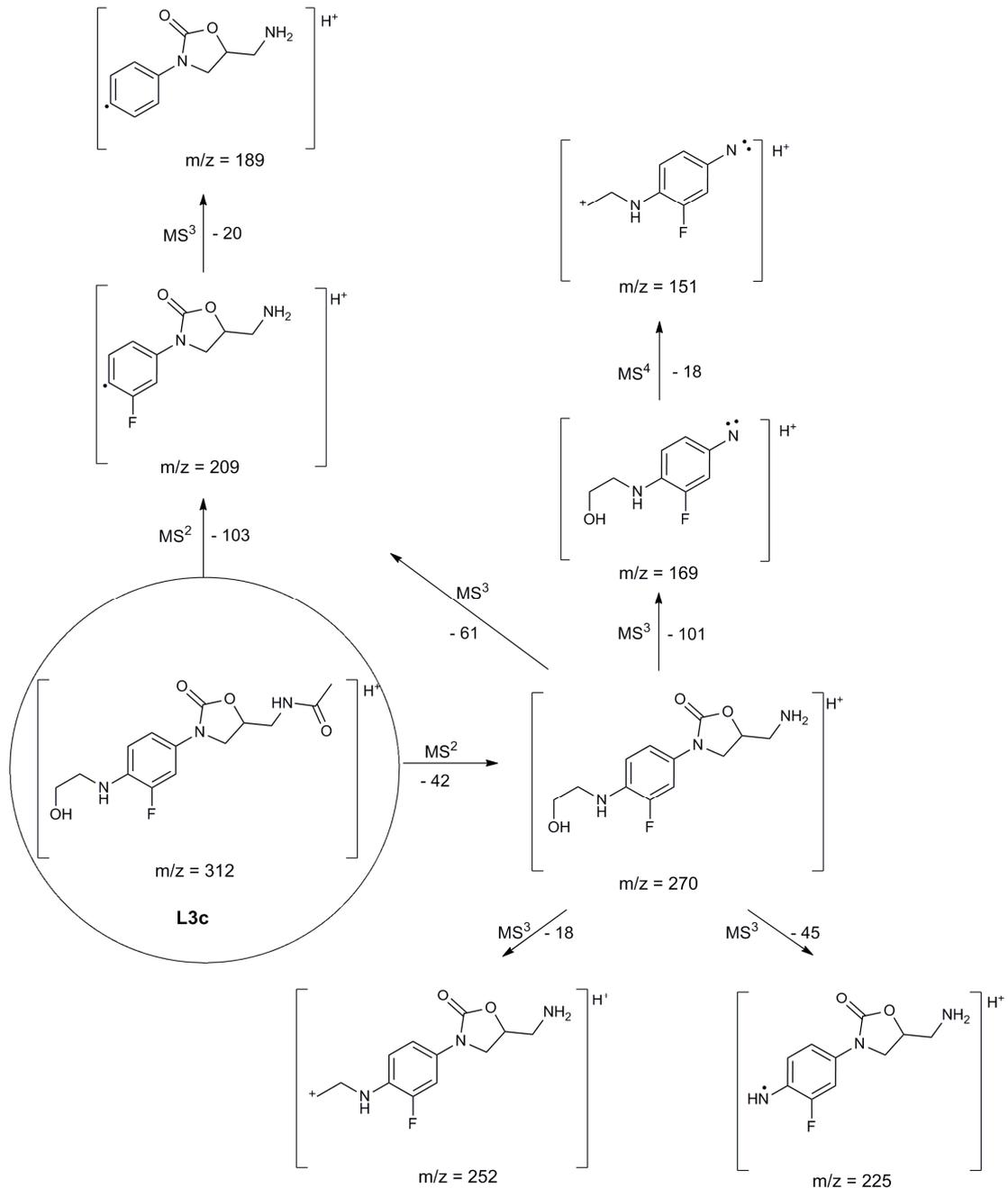


Abbildung 70 MSⁿ-Fragmentierungsschema des Produktions mit m/z 312

Die entstandenen Tochterionen mit m/z 252, m/z 225 und m/z 209 repräsentieren folglich die Abspaltung von zunächst Wasser, Ethanol und schließlich des kompletten 2-Aminoethanolrestes (siehe Anhang, Tabelle 1). Das Produktion mit m/z 209 konnte dabei sowohl in MS^2 - als auch in MS^3 -Experimenten ausgehend von der Substanz mit m/z 270 gefunden werden. Dies wiederum zeigt, dass der Verlust der Acetaldehydgruppe und des 2-Aminoethanolrestes in einem, aber auch in zwei Schritten erfolgen kann (siehe Abbildung 70). Die weitere Fragmentierung des Produktions mit m/z 209 wiederum führt zu einem Produktion mit m/z 189, das schließlich aus dem zusätzlichen Verlust des Fluorids entstanden ist. Folglich besitzt die Substanz mit m/z 312 ein Fluoridion, die Acetamidgruppe und anstelle der Morpholineinheit einen 2-Aminoethanolrest. Diese Erkenntnisse erlauben die Zuordnung der Substanz zu Metabolit **L3c**.

4) MS^n -Messungen der Substanz mit m/z 320 zeigten alle charakteristischen Fragmentierungsschritte von Linezolid (siehe Anhang, Tabelle 1). Folglich sind sowohl die Acetamide als auch die Morpholingruppe noch erhalten. Das Auftreten eines Produktions mit m/z 177 (siehe Abbildung 71) untermauert dies, da dieses Produktion durch den kombinierten Verlust der Acetamid- und der Morpholingruppe entsteht. Dies und die Tatsache, dass das Molekulargewicht 18 u geringer ist als bei Linezolid, legen die Zuordnung der Substanz mit m/z 320 zum defluorierten Metaboliten **L4a** nahe.

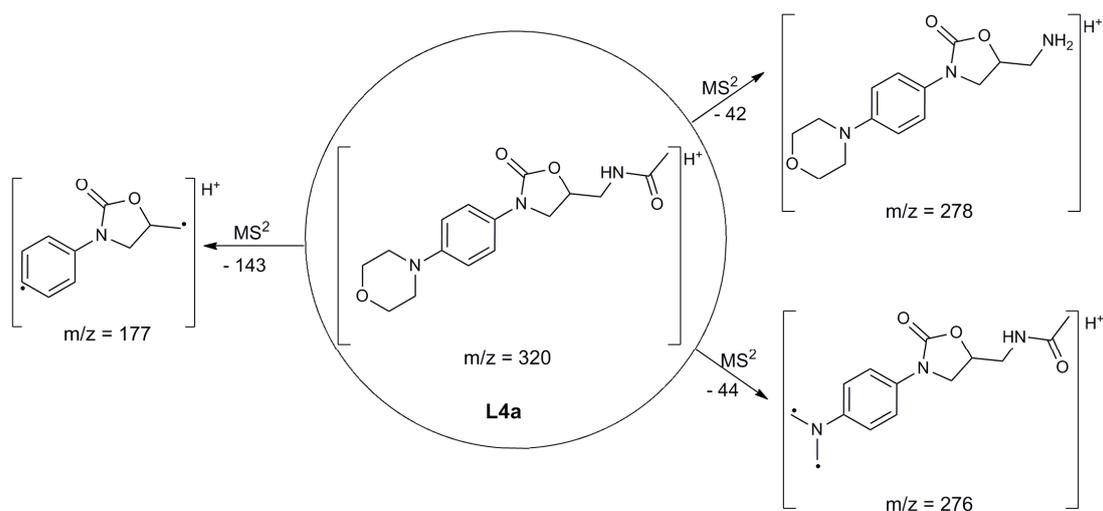


Abbildung 71 MS^n -Fragmentierungsschema des Produktions mit m/z 320

Neben den so zugeordneten Metaboliten konnten durch Fentons Reagenz einige weitere Substanzen erzeugt werden, die jedoch keinem literaturbekannten Metaboliten zugeordnet werden können (siehe Abbildung 72).

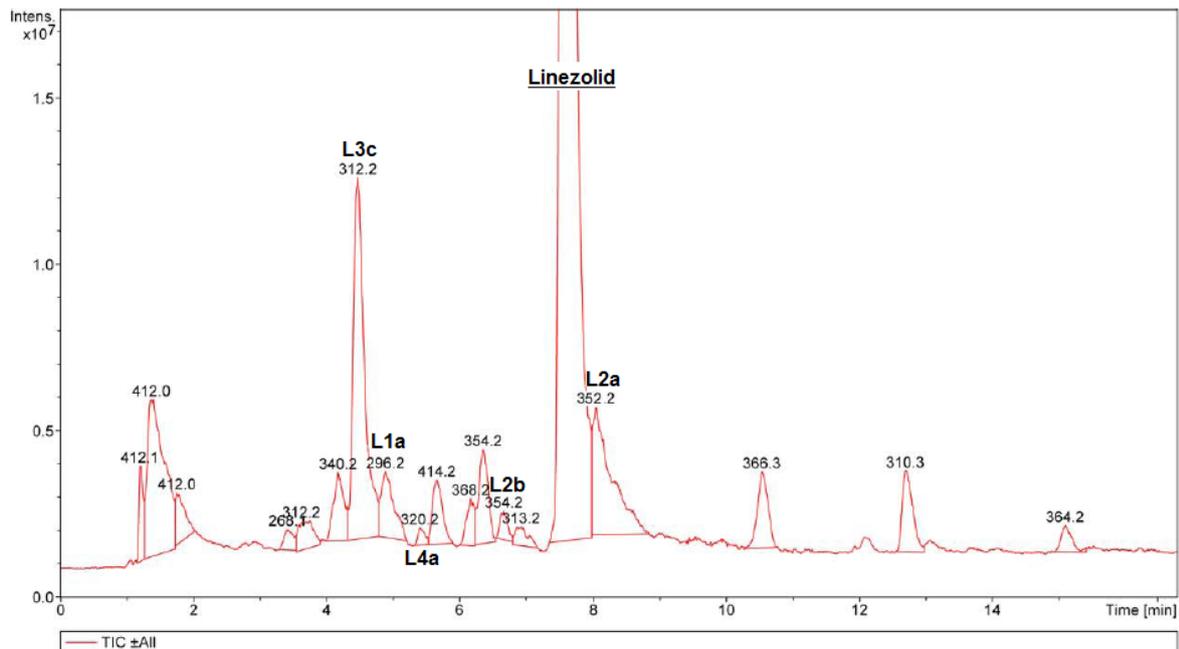


Abbildung 72 LC/MS-Chromatogramm der Substanzbibliothek von Linezolid

3.2.3 Umsetzung von Ciprofloxacin mit Fentons Reagenz

Ciprofloxacin konnte in einer Mischung aus Dimethylsulfoxid und Methanol (14:1) gelöst werden, die mit konzentrierter Schwefelsäure angesäuert wurde. Nach der Zugabe einer wässrigen Eisen(II)-sulfatlösung sowie der Wasserstoffperoxidlösung wurde für zwei Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Zur Aufarbeitung wurde der Ansatz über Kieselgel, mit einem Fließmittelgemisch bestehend aus Wasser, Diethylamin, Toluol, Chloroform und Methanol im Verhältnis 8 : 14 : 20 : 40 : 40, säulenchromatographisch aufgereinigt.⁹¹ Von der erhaltenen Eluatlösung wurde das Lösungsmittel abdestilliert und der Rückstand der HPLC-Analyse zugeführt. Die LC/MS-Messungen wurden in Anlehnung an 2.3.2 unter den folgenden Bedingungen durchgeführt:

Säule: SYNERGYTM Max-RP, 150 × 4.6 mm, 4 µm; *Fließmittel:* A: 0.2% wässrige Ameisensäure, pH = 2.5; B: MeOH; *UV-Detektion:* 254 nm; *Temperatur:* 25 °C; *Flussrate:* 1.0 ml/min; A/B (80:20) auf 30% B in 20 min

Von Ciprofloxacin sind in der Literatur eine Vielzahl von Metaboliten beschrieben.^{99; 100; 106; 110; 161; 162; 163} Diese können in vier unterschiedliche Gruppen (siehe Abbildung 73) eingeteilt werden:

- 1) decarboxylierte Metabolite **C1**,
- 2) Metabolite mit abgebauter Piperazineinheit **C2**,
- 3) ein Metabolit mit Ringverengung der Chinolongrundstruktur (Indolinstruktur) **C3** und
- 4) hydroxylierte bzw. oxidierte Metabolite **C4**.

Die Hauptmetabolite, die in menschlichen Körperflüssigkeiten wiedergefunden werden, sind **C2c**, **C4b**, **C4f** und ein Sulfonylderivat, welches nicht in Abbildung 73 aufgeführt ist, da es nicht durch Fentons Reagenz gebildet werden kann.^{99; 164} Bei der Umsetzung von Ciprofloxacin mit Fentons Reagenz konnten zahlreiche dieser Metabolite mittels LC/MS identifiziert werden (siehe eingekreiste Substanzen in Abbildung 73); die entsprechenden MSⁿ-Fragmentierungen, mit deren Hilfe die Zuordnungen erreicht wurden, sind in Tabelle 2 (siehe Anhang) aufgeführt.

Als charakteristische Fragmentierungswege von Fluorchinolonen gelten der Verlust der Carboxyeinheit [M+H-44]⁺ und der Verlust von Fluorid [M+H-20]⁺. Darüber hinaus zeigt speziell Ciprofloxacin den typischen Verlust der Cyclopropylgruppe [M+H-41]⁺ und spezifische Abbauschritte der Piperazineinheit [M+H-42]⁺ und [M+H-84]⁺.^{99; 110; 165} Kommt es zum Auftreten dieser Fragmentierungen in den MSⁿ-Spektren der durch Fentons Reagenz erzeugten Substanzen, spricht dies folglich für die Existenz der Carboxy- oder Piperazineinheit.¹¹⁶

Die Zuordnung der unbekanntem Verbindungen aus der erzeugten Substanzbibliothek von Ciprofloxacin zu literaturbekanntem Metaboliten konnte schließlich durch die Auswertung der folgenden MSⁿ-Daten erreicht werden.

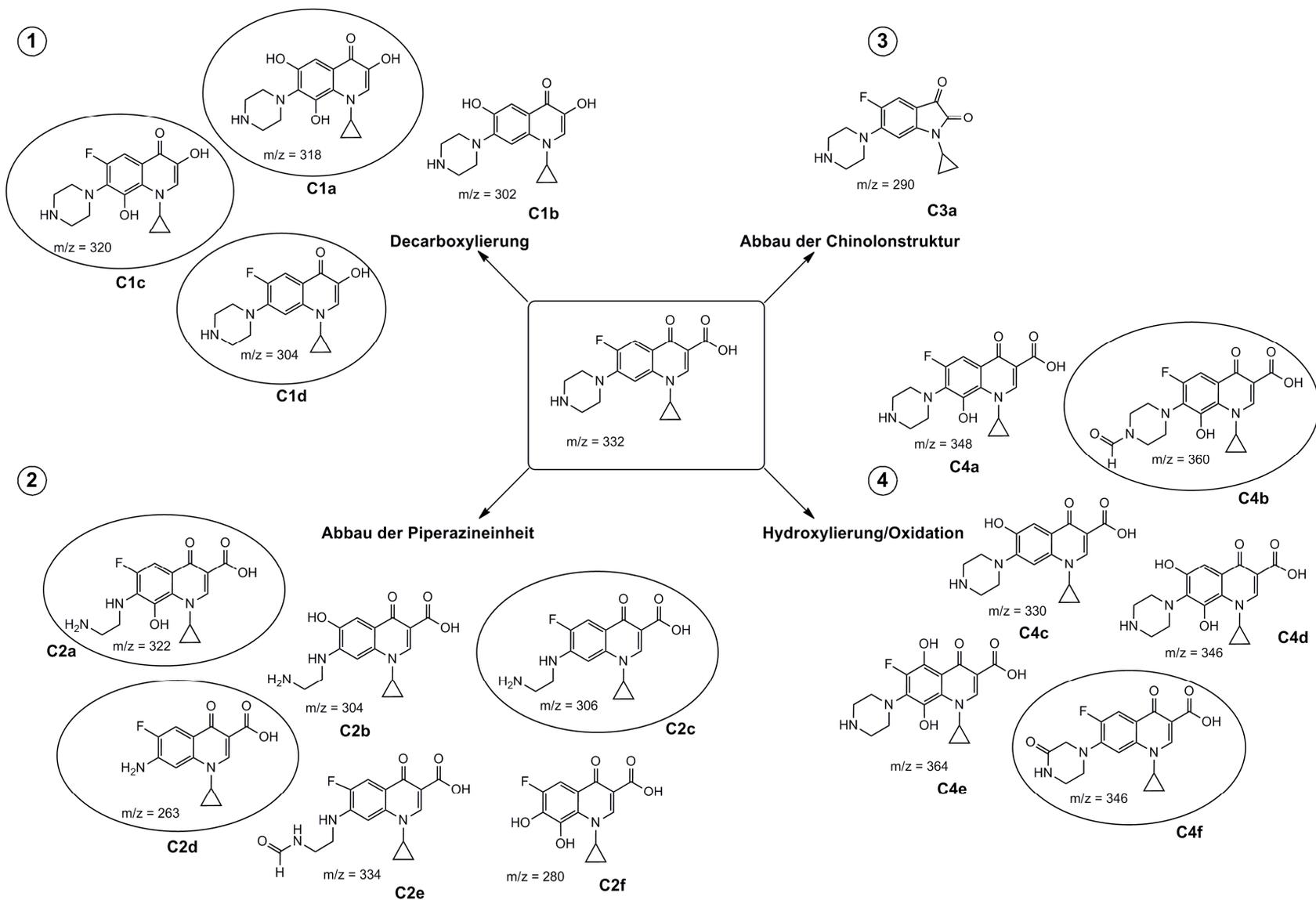


Abbildung 73 Metabolite von Ciprofloxacin (durch Fentons Reagenz erzeugte Metabolite sind eingekreist)

1) Die Substanz mit m/z 304 kann, wenn man nur die Molekülmassen betrachtet, zwei unterschiedliche Metabolite des Ciprofloxacin repräsentieren, und zwar **C1d** oder **C2b** (siehe Abbildung 73). Das MS/MS-Spektrum dieser Substanz (siehe Abbildung 74 und Anhang, Abbildung 82) zeigte jedoch den Abbau einer Piperazineinheit $[M+H-42]^+$, den Verlust von Wasser, was zum Produktion mit m/z 286 führt und den Verlust der kompletten Piperazineinheit $[M+H-85]^+$. Darüber hinaus konnte der parallele Verlust der Piperazin- und der Cyclopropyleinheit $[M+H-84-41]$ beobachtet werden, der zu m/z 179 führt (siehe Abbildung 74 und Anhang, Abbildung 82). Da ferner kein Signal für den Verlust der Carboxygruppe registriert werden konnte, ist eine Zuordnung der Substanz mit m/z 304 zum decarboxylierten Metaboliten **C1d** eindeutig möglich, da dieser eine intakte Piperazineinheit sowie eine Hydroxylgruppe in Position 3 besitzt, jedoch keine Carboxygruppe.

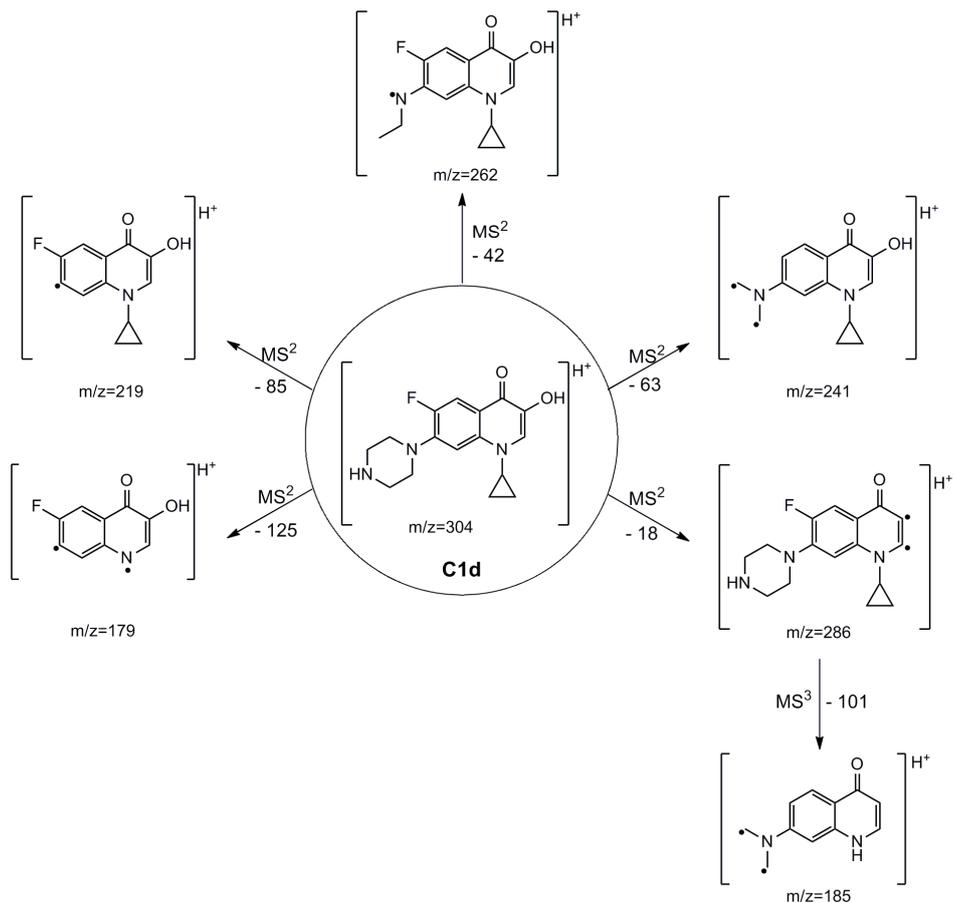


Abbildung 74 Fragmentierungswege des Fluorchinolonmetaboliten **C1d** mit m/z 304

2) Die Substanzen mit m/z 318 und m/z 320 können dementsprechend den Metaboliten **C1a** und **C1c** (siehe Abbildung 73) zugeordnet werden. In beiden Fällen konnte in den MS^2 -Spektren kein Decarboxylierungs-Fragment $[M+H-44]^+$ identifiziert werden. Darüber hinaus fehlte der Substanz mit m/z 318 das typische Fragment $[M+H-20]^+$, das für den Verlust des Fluoridions steht (siehe Abbildung 76). Demzufolge muss die Substanz mit m/z 318 eine Ciprofloxacin-derivat ohne Fluoridion und ohne Carboxygruppe sein. Dies trifft für Metabolit **C1a** zu. Das MS^2 -Spektrum der Substanz mit m/z 320 wiederum zeigte den Verlust von Fluorid $[M+H-20]^+$, sowie verschiedene Abspaltungen von Wasser $[M+H-18]^+$ und den Verlust der Cyclopropyleinheit $[M+H-41]^+$ (siehe Abbildung 75). Diese Beobachtungen erlauben die Zuordnung der Substanz zu Metabolit **C1c** (siehe Anhang, Tabelle 2). In allen decarboxylierten Metaboliten war die Carboxygruppe ersetzt durch eine Hydroxylgruppe.

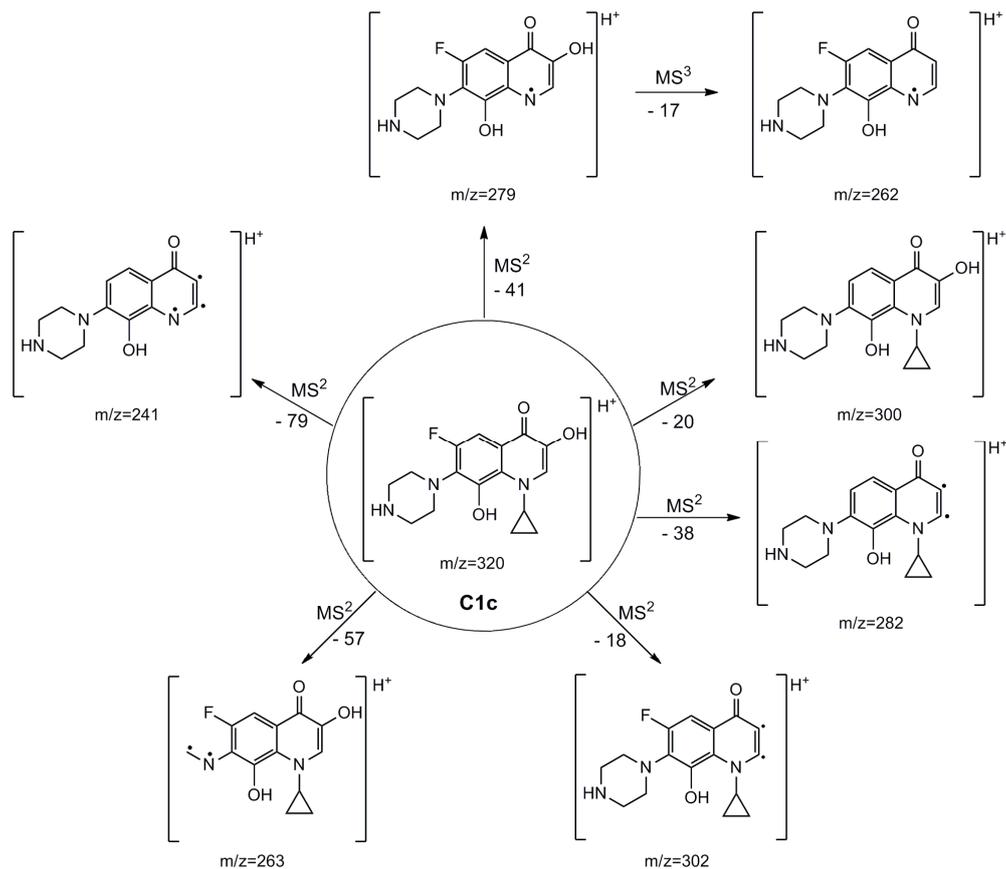


Abbildung 75 Fragmentierungswege des Fluorchinolonmetaboliten **C1c** mit m/z 320

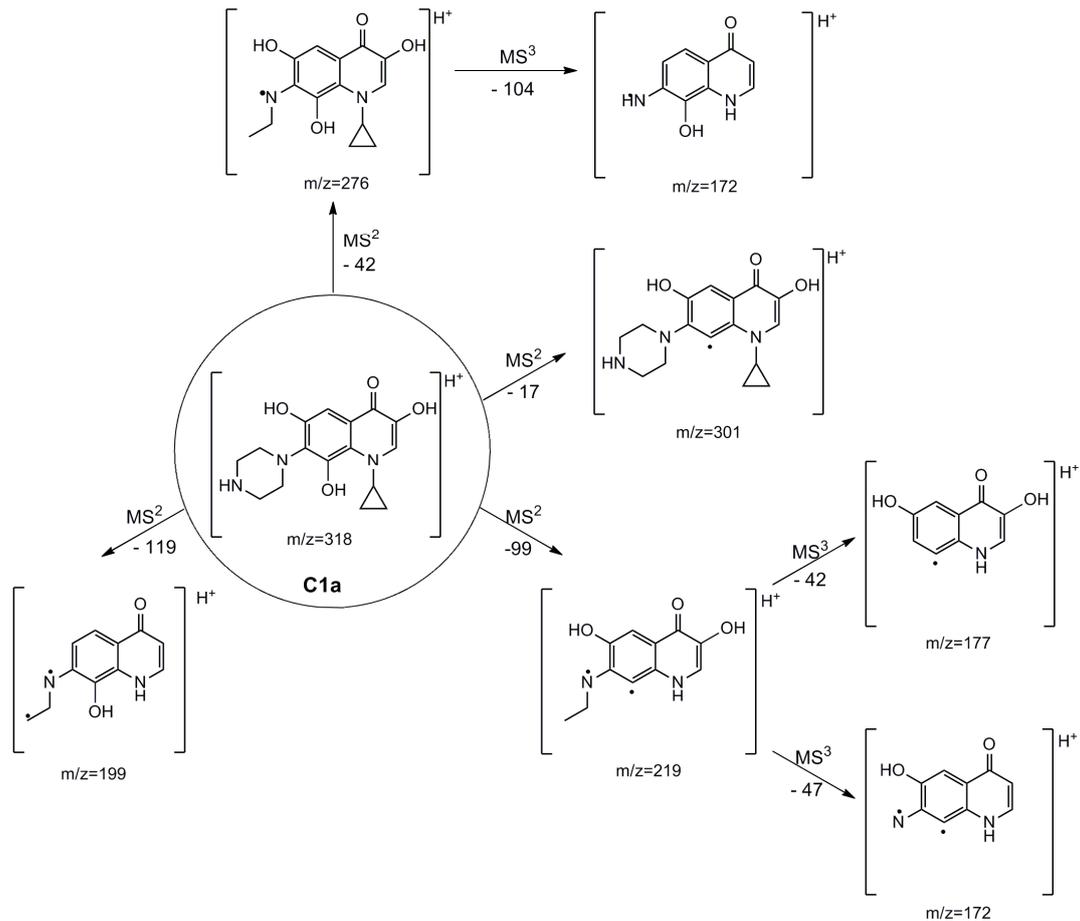


Abbildung 76 Fragmentierungswege des Fluorchinolonmetaboliten **C1a** mit m/z 318

3) Die Substanz mit m/z 306 besaß die Fragmentationen der Decarboxylierung $[M+H-44]^+$, des Verlusts von Wasser $[M+H-18]^+$ und des Verlusts von Fluorid $[M+H-20]^+$. Es fehlten jedoch die typischen Produktionen der Abspaltung der Piperazineinheit $[M+H-42]^+$ oder $[M+H-84]^+$. MS³-Messungen zeigten hingegen den Verlust eines $[M+H-59]^+$ -Ions, das dem Verlust einer Ethylendiamineinheit entspricht (siehe Abbildung 77). Die Substanz mit m/z 306 kann deshalb dem Metabolit **C2c** (siehe Abbildung 73) zugeordnet werden. Dies deckt sich mit Beobachtungen von Volmer *et al.*⁹⁹, der entsprechende Produktionen des Metaboliten **C2c** beschreibt. So wird etwa vom Verlust von Wasser, der zum Produktion mit m/z 288 führt berichtet, sowie dem gleichzeitigen Verlust von Wasser und Fluorid, der zum Produktion mit m/z 268 führt. Darüber hinaus wurde von ihm der simultane Verlust von Ethylendiamin und Wasser

beobachtet, der schließlich zur Produktion mit m/z 277 führt (vgl. Anhang Tabelle 2). Gau *et al.*¹⁶⁴ bestätigen für den Metaboliten **C2c** außerdem, in Übereinstimmung mit unseren Beobachtungen, das Auftreten des Produkts mit m/z 262, das den Verlust der Carboxygruppe repräsentiert.

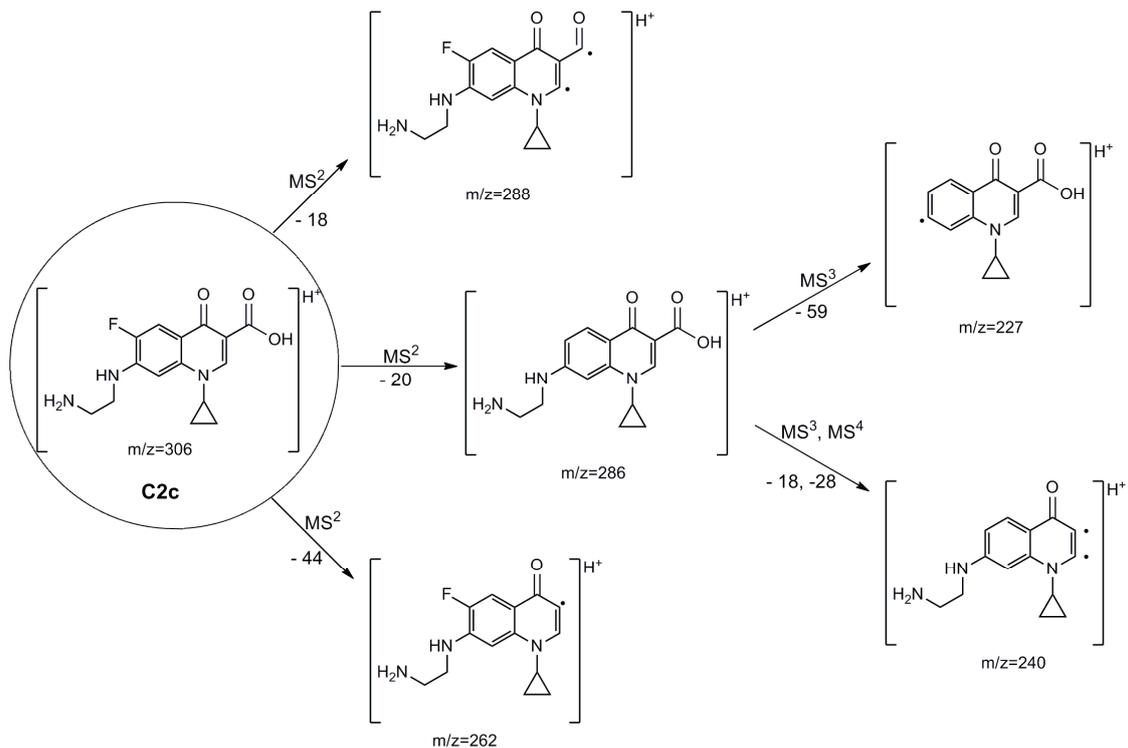


Abbildung 77 Fragmentierungswege des Fluorchinolonmetaboliten **C2c** mit m/z 306

4) Die Substanz mit m/z 322 zeigte annähernd dieselben Fragmentationen wie der Metabolit **C2c**, was auf eine ähnliche Struktur hindeutet. Zusätzlich konnte der Verlust von Wasser detektiert werden (siehe Abbildung 78). Diese strukturellen Anforderungen decken sich vollständig mit Metabolit **C2a** (siehe Abbildung 73), der im Vergleich zu Metabolit **C2c** in Position 8 eine zusätzliche Hydroxylgruppe besitzt, weshalb die entsprechende Identifizierung als gesichert betrachtet werden darf.

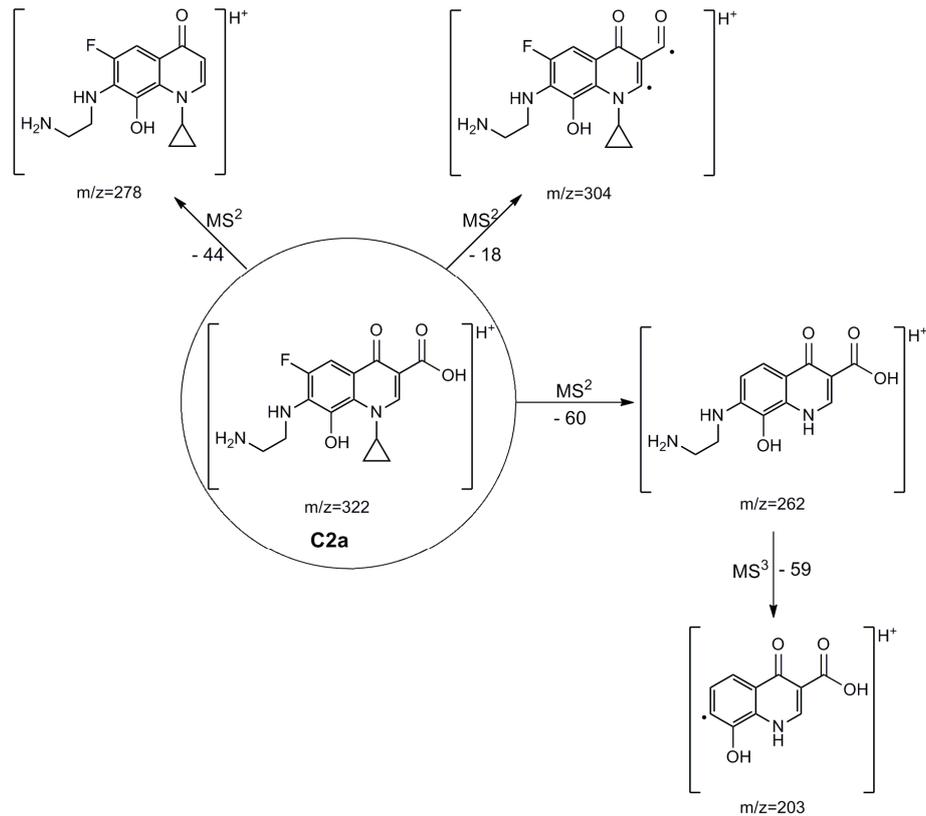


Abbildung 78 Fragmentierungswege des Fluorchinolonmetaboliten **C2a** mit m/z 322

5) Die Substanz mit m/z 263 zeigte alle typischen Produktionen für Ciprofloxacin bis auf den Abbau der Piperazineinheit. Diese spezifischen Fragmentierungen $[M+H-42]^+$ und $[M+H-84]^+$ fehlten (siehe Abbildung 79). Konsequenterweise muss es sich also bei der Substanz mit m/z 263 um ein Derivat des Ciprofloxacins handeln, das in Position 7 keinen Piperazinrest, sondern allenfalls einen kleineren Substituenten aufweist. Diese Beobachtungen decken sich alle mit Metabolit **C2d** (siehe Abbildung 73).

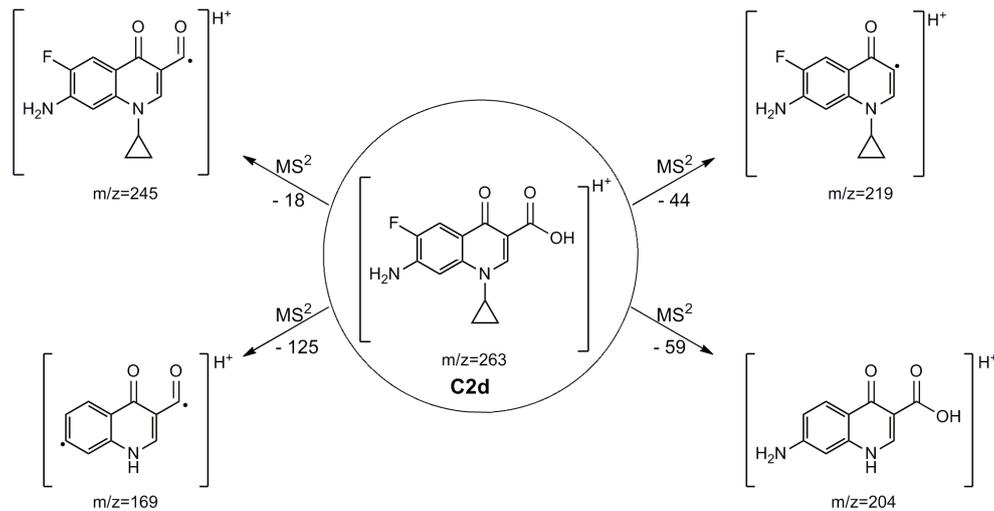


Abbildung 79 Fragmentierungswege des Fluorchinolonmetaboliten **C2d** mit m/z 263

6) Die Substanz mit m/z 346 kann, wenn man zunächst nur die Molekülmasse betrachtet, ebenfalls zwei literaturbekannte Metabolite des Ciprofloxacins widerspiegeln; **C4d** bzw. **C4f**. Die MS^n -Messungen zeigten die typischen Fragmentierungsschritte für den Verlust von Wasser $[M+H-18]^+$ oder die Abspaltung der Carboxygruppe $[M+H-44]^+$. Diese Fragmentierungen erlauben jedoch keine Differenzierung zwischen den beiden Metaboliten **C4d** und **C4f**. Der simultane Verlust von Cyclopropyl und Fluorid, der zum Produktion mit m/z 285 führt, sowie der Verlust von $[M+H-101]^+$, der den Verlust einer Piperazinoneinheit widerspiegelt (siehe Abbildung 80), deuten jedoch darauf hin, dass die Substanz mit m/z 346 dem Metaboliten **C4f** (siehe Abbildung 73) entsprechen muss. Diese Fragmentierungen waren außerdem in Übereinstimmung mit den Produktionen m/z 245, m/z 285 und m/z 328, die von Volmer *et al.*⁹⁹ für **C4f** gefunden wurden. Gau *et al.*¹⁶⁴ beschrieb darüber hinaus das ebenfalls identifizierte Produktion mit m/z 302.

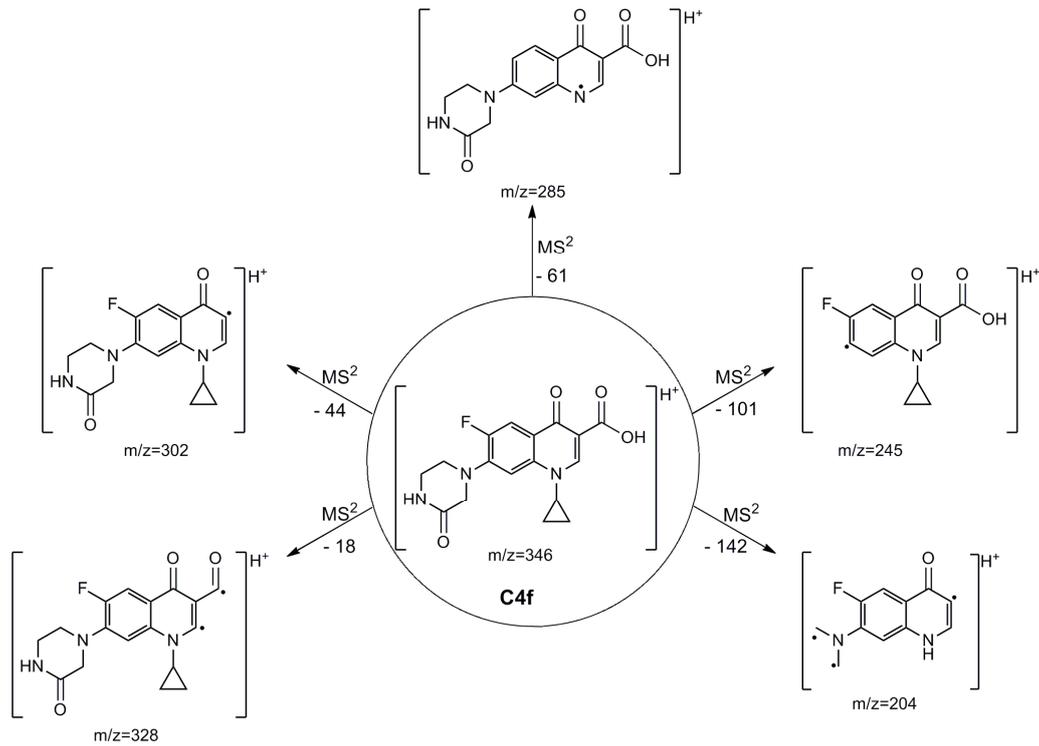


Abbildung 80 Fragmentierungswege des Fluorchinolonmetaboliten **C4f** mit m/z 346

Zusätzlich zu den identifizierten Metaboliten **C1a, c, d, C2a, c, d, C4b** und **f** erzeugte die Umsetzung mit Fentons Reagenz eine Vielzahl weiterer Substanzen (siehe Abbildung 81). Unter diesen befinden sich auch zwei Substanzen mit m/z 334 und m/z 348, die aufgrund der Molekülmassen den Metaboliten **C2e** und **C4a** (siehe Abbildung 73) zugeordnet werden können, jedoch lassen die MS/MS-Experimente keine eindeutige Identifizierung zu.

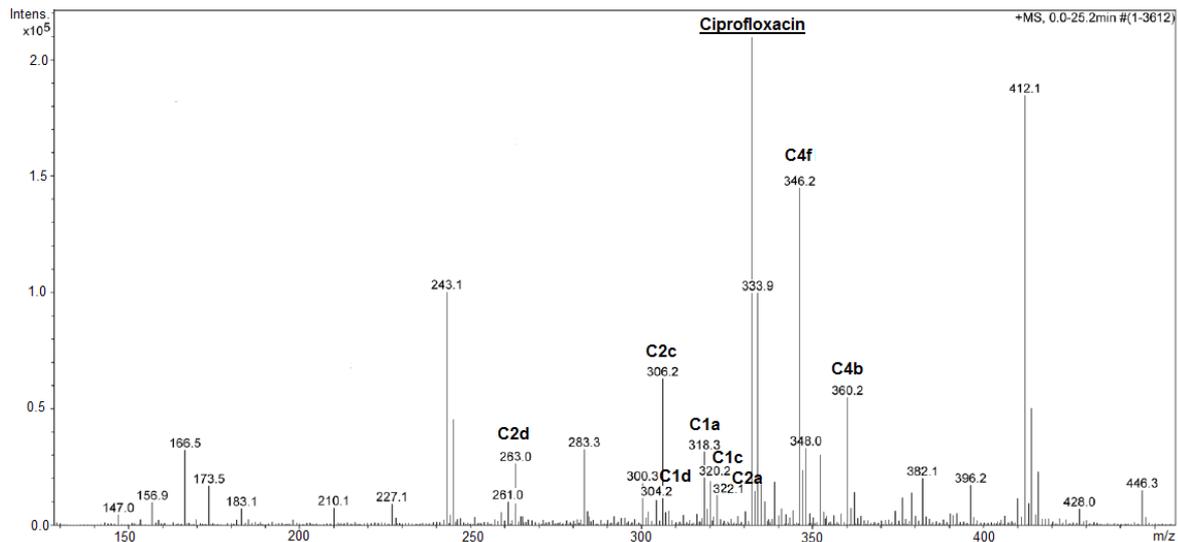


Abbildung 81 TIC der Substanzbibliothek von Ciprofloxacin

3.3 Zusammenfassung und Diskussion

Für Linezolid und Ciprofloxacin konnten die Hälfte der in der Literatur beschriebenen Metabolite mit Hilfe von Fentons Reagenz erzeugt werden. Dies trifft vor allem auf Metabolite zu, die bei der Verstoffwechslung durch den Cytochrom-P450-Enzym-Komplex, d. h. durch Hydroxylierung, Oxidation oder Hydrolyse entstehen. Auch wenn keine Aussage darüber gemacht werden kann, welches CYP-Isoenzym für den Metabolismus verantwortlich ist bzw. ob es andere CYP-Isoenzym-bezogene Wechselwirkungen gibt, bietet der Fenton Ansatz einige Vorteile. Alternative Methoden zur *In-vitro*-Untersuchung des metabolischen Profils potentieller Wirkstoffe wie etwa die Inkubation mit Lebermikrosomen, isolierten CYP-Enzymen oder intakten Zellen benötigen immer humanes Lebergewebe. Die Verwendung von Hepatozyten und Leberschnitten setzen darüber hinaus die Verfügbarkeit möglichst frischen Gewebes voraus, was sich beim Einsatz von humanem Lebergewebe als häufig sehr schwierig erweist. Lebermikrosome wiederum können zwar bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ über Jahre hinweg gelagert werden, ohne dabei entscheidend an Aktivität der CYP-Enzyme zu verlieren, jedoch kann

die Inkubation nur innerhalb einer sehr kurzen Zeitspanne (< 1 h) durchgeführt werden, weshalb Metabolite von metabolisch stabilen Wirkstoffen nur schwer beobachtet werden können.^{166;167} Ebenso benötigt die Präparation und Anwendung wachsender Zellkulturen immer eine spezielle Ausstattung und meist teure Reagenzien.

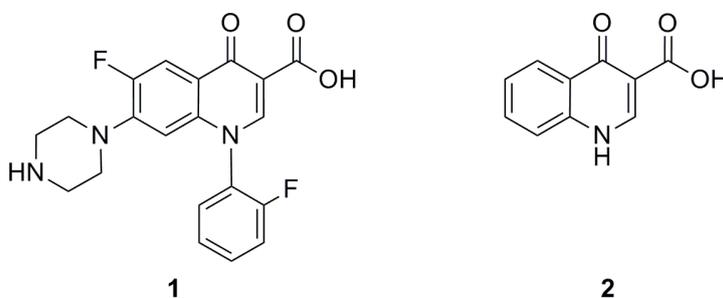
Die Metabolismusvorhersage mit Hilfe von Fentons Reagenz erfordert hingegen keine Verwendung von humanem Lebergewebe und erweist sich stattdessen als stabile, kostengünstige und einfach zu handhabende Methode, die reproduzierbare Ergebnisse liefert. Limitierender Faktor aller *In-vitro*-Methoden ist die Löslichkeit organischer Substanzen und potentieller Wirkstoffe in wässrigen Lösungen, auch wenn neu synthetisierte Wirkstoffe eine ausreichende Wasserlöslichkeit besitzen sollten, um eine später eine zufriedenstellende orale Bioverfügbarkeit zu gewährleisten. Im Gegensatz zur Verwendung von Enzymen und Zellkulturen, ermöglicht der Einsatz von Fentons Reagenz die Anwendung von Lösungsmittelgemischen und damit auch die Zugabe substantieller Mengen an DMSO. Dies wiederum erlaubt die Untersuchung einer größeren Bandbreite möglicher Wirkstoffkandidaten und erhöht damit die Chancen auf einen Treffer bei der Wirkstoffsuche.

Der Ansatz mit Fentons Reagenz kann die klassischen Biotransformationsstudien nicht ganz ersetzen, bietet aber eine schnelle und kostengünstige Alternative zum Screening nach Metaboliten. Die Darstellung und Identifizierung der Metabolite ermöglicht wiederum eine frühzeitige Abklärung möglicher Toxizitäten der Metabolite und stellt damit ein weiteres frühzeitiges Kriterium zur Optimierung und zur Klassifizierung einer Substanz als möglichen Wirkstoffkandidaten dar.

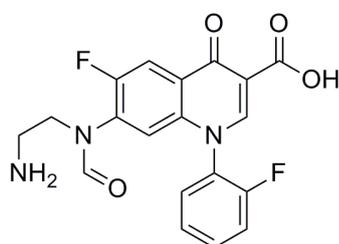
4 ZUSAMMENFASSUNG

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der Suche nach neuen Leitstrukturen im Bereich der 4-Chinolone mit dem Verfahren der Random Chemistry.⁶⁴ Die zugrunde liegende Idee hinter diesem Verfahren besteht darin, neue, potentiell wirksamere Strukturen durch die zufällige Erzeugung einer Substanzbibliothek zu erhalten. Die Substanzbibliothek entsteht dabei durch die Kombination bzw. Reaktion einer mäßig aktiven Ausgangsverbindung mit einem Initiator, der eine Zufallsreaktion in Gang setzt. Vorangegangene Untersuchungen dazu belegten, dass bei der Nutzung von γ -Strahlen als auslösende Spezies vornehmlich durch Radiolyse des Lösungsmittels erzeugte Radikale für die Bildung neuartiger Substanzen verantwortlich waren. Diese als Initiator dienenden Radikale können auch mit herkömmlichen Radikalstartern wie dem Fentons Reagenz erzeugt werden.⁷⁴ Fentons Reagenz erweist sich dabei als deutlich kostengünstigere und einfacher zu handhabende Alternative, die ohne jeglichen technischen Aufwand genutzt werden kann. Durch die Reaktion von Wasserstoffperoxid und Eisen(II)-Ionen entstehen Hydroxylradikale, die als hochreaktive Spezies durch die Addition an Doppelbindungen oder durch die Abstraktion von Wasserstoffradikalen und die dadurch ausgelösten Sekundärreaktionen eine Vielzahl neuer Verbindungen erzeugen.

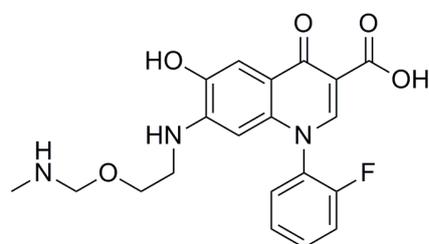
Zur Leitstruktursuche wurden als Ausgangssubstanzen zum einen ein Vertreter der 6-Fluor-7-(piperazin-1-yl)-chinolone (**1**) und zum anderen das 4-Chinolon-Grundgerüst (**2**) gewählt, um sowohl den Einfluss möglicher Strukturvariationen am Chinolongrundkörper als auch an möglichen Substituenten zu ermitteln.



Aus den nach der Umsetzung mit Fentons Reagenz entstandenen Substanzbibliotheken konnten zunächst Fraktionen erhalten werden, die bei der Testung gegen *Trypanosoma brucei brucei* Aktivitäten mit geringeren IC_{50} -Werten als die Ausgangschinolone zeigten. Die Strukturen der mittels HPLC isolierten Reinsubstanzen wurden aufgeklärt und ihre biologische Wirkung ermittelt. Auf diese Weise konnten ein Chinolonderivat mit *N*-(2-Aminoethyl)formamid-Rest in Position 7 (Frk1-2c) sowie ein Derivat mit (2-((Methylamino)methoxy)ethyl)amino-Rest in Position 7 und einer Hydroxylgruppe in Position 6 (Frk1-1c) identifiziert werden, die eine antitrypanosomale Aktivität mit einem IC_{50} -Wert von 20.69 μ M bzw. 17.29 μ M aufweisen.



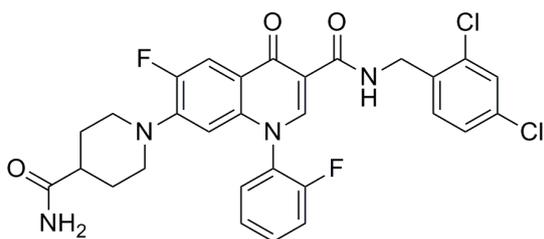
Frk1-2c

 $IC_{50}=20.69 \mu$ M

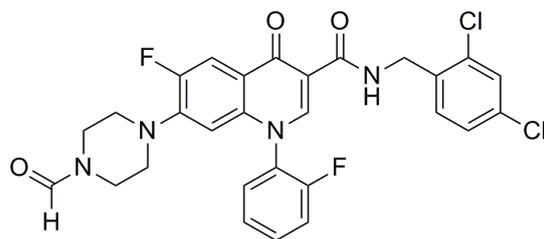
Frk1-1c

 $IC_{50}=17.29 \mu$ M

Neusynthetisierte Chinolone mit einem amidofunktionalisiertem Piperazinring in Position 7 zeigten eine noch bessere Aktivität gegen *Trypanosoma brucei brucei*, welche durch Amidierung der Carbonsäure in 3-Stellung noch weiter gesteigert werden konnte.



30

 $IC_{50}=1.83 \mu$ M

32

 $IC_{50}=1.93 \mu$ M

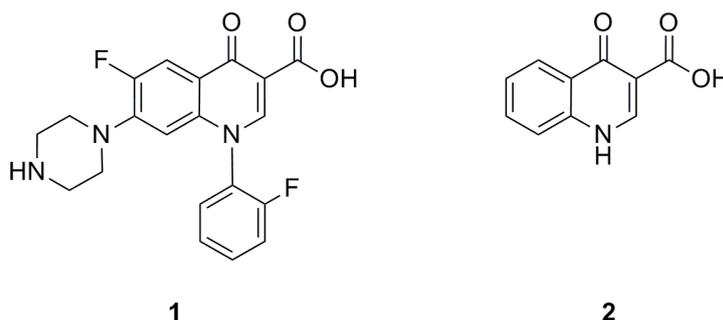
Die Suche nach neuen Leitstrukturen mit Hilfe von Fentons Reagenz offenbarte, dass ein Großteil der in den Substanzbibliotheken gebildeten neuen Strukturen literaturbekanntem Metaboliten der Fluorchinolone ähnelt. Dies scheint nicht verwunderlich, da die zugrunde liegende Chemie des Fentons Reagenz der Verstoffwechslung des Hauptmetabolismusenzym Cytochrom-P450 gleicht.

Da annähernd 50% der möglichen Wirkstoffkandidaten an einer zu geringen Bioverfügbarkeit oder aufgrund ihrer toxischen Metabolite scheitern, ist es sinnvoll bereits in einem möglichst frühen Forschungsstadium auch Parameter wie Resorption, Distribution, Metabolismus, Elimination und Toxikologie (ADMET-Parameter) einer Substanz zu berücksichtigen bzw. zu ermitteln. Deshalb wurde in einem weiteren Teil dieser Arbeit untersucht, ob Fentons Reagenz zur Erzeugung des metabolischen Profils neuer biologisch aktiver Substanzen dienen kann, um damit frühzeitig auch auf mögliche Toxizitäten der Metabolite einer Substanz schließen zu können. Dazu wurden die drei bekannten Antiinfektiva, Cinoxacin, Ciprofloxacin und Linezolid mit Fentons Reagenz umgesetzt und die entstandenen Substanzbibliotheken nach literaturbekanntem Metaboliten der jeweiligen Ausgangssubstanz gescreent. Bei einer ausreichenden Löslichkeit der Ausgangssubstanz konnten so vor allem die Metabolite erzeugt werden, die durch Hydroxylierung, Oxidation oder Hydrolyse auch bei der Verstoffwechslung durch Cytochrom-P450 erhalten werden. Da der Nachweis der Bildung literaturbekannter Metabolite durch Fentons Reagenz gelang, ist es nun möglich, einen Teil der potenziellen Metabolite neuer biologisch aktiver Substanzen bereits im Vorfeld, ohne die Nutzung von humanem Lebergewebe zu identifizieren.

5 SUMMARY

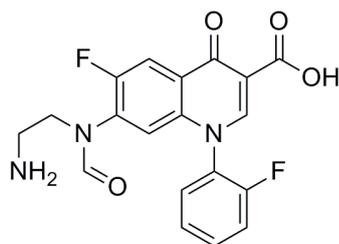
The present work is dealing with the search for new lead structures in the field of 4-quinolones via random chemistry.⁶⁴ The underlying concept of this approach was to generate compound libraries by combining an active starting compound with an initiator. Earlier experiments using γ -radiation as initializing species revealed that most of the new generated compounds were products of radical chemistry, built by the radiolysis of the solvent. Thus, the idea arose to replace the gainless γ -irradiation by an alternative radical starter such as Fenton's reagent which is cheaper and easier-to-handle. Comparing the application of Fenton's reagent with the results of the γ -irradiation revealed that similar compound libraries could be achieved.⁷⁴ The reaction of hydrogen peroxide with ferrous ions forms highly reactive hydroxyl radicals which are themselves able to generate new compounds by the addition to double bonds or the abstraction of hydrogen radicals. Numerous randomized chain reactions take place and create a compound library of great diversity.

In order to find new lead structures two different starting quinolones, **1** and **2**, were chosen, in order to examine the influence of structural variation both at the quinolone framework and at the substituents, like the piperazine ring in position 7.

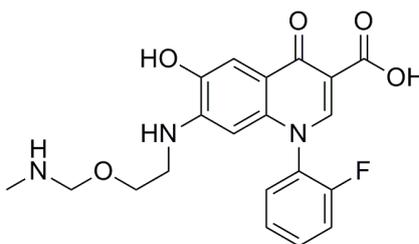


A subsequent bioassay-guided-HPLC-fractionation as a deconvolution strategy of the gained product library revealed fractions with higher activity against *Trypanosoma brucei* and therefore lower IC_{50} values than the starting compounds. The structures of the purified compounds were elucidated and their biological activity examined. Thus, a new

quinolone derivative was identified bearing an *N*-(2-aminoethyl)formamide residue in position 7 (Frk1-2c) as well as a derivative with a (2-((methylamino)methoxy)ethyl)-amino residue in position 7 beside a hydroxyl group in position 6 (Frk1-1c), possessing an antitrypanosomal activity with an IC₅₀ value of 20.69 μM and 17.29 μM, respectively.



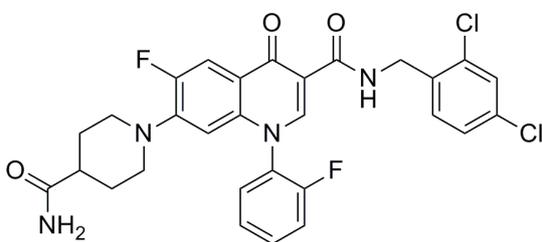
Frk1-2c

IC₅₀=20.69 μM

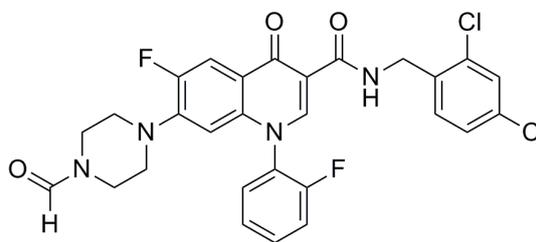
Frk1-1c

IC₅₀=17.29 μM

Newly synthesized quinolones with an amido-functionalized piperazine ring in position 7 showed an even better activity against *Trypanosoma brucei brucei*, which could be further enhanced by an amidation of the carbocyclic acid in position 3.



30

IC₅₀=1.83 μM

32

IC₅₀=1.93 μM

Within the scope of searching for new lead structures with Fenton's reagent in the field of anti-infectives it could be ascertained that a great part of the produced substances resemble known metabolites of fluoroquinolones. This is due to the fact, that the underlying chemistry of Fenton's one-electron oxidation is comparable to that of cytochrome-P450, which is the main metabolism enzyme.

As almost 50% of possible drug candidates fail due to their low bioavailability or their toxic metabolites, it is necessary to take parameters like absorption, distribution, metabolism, elimination and toxicology (ADMET parameter) into consideration as early as possible during the search for new drugs. Contemplating this fact, a further aim of this work was to explore, whether the conversion with Fenton's reagent may serve as a screening tool for the metabolic profile of new biologically active compounds. For this purpose, three structurally different antibiotics, ciprofloxacin, linezolid and cinoxacin were chosen for treatment with Fenton's reagent. Subsequently the generated compound libraries were screened for the occurrence of known metabolites of the starting substances. If an adequate solubility of the starting compounds was guaranteed, especially metabolites could be generated that evolve from hydroxylation, oxidation or hydrolyses by the cytochrome enzyme complex. As the generation of known metabolites with Fenton's reagent could be verified, it is now feasible to create and identify possible metabolites of new bioactive compounds without using human liver tissue.

6 EXPERIMENTELLER TEIL

6.1 Allgemeine Angaben

6.1.1 Verwendete Geräte

Schmelzpunkte: Schmelzpunktapparatur MPD350:BM 3.5
Fa. Sanyo Gallenkamp BV, Holland.

Alle angegebenen Schmelzpunkte sind unkorrigiert.

IR-Spektren: Biorad PharmalyzIR FT-IR Spektrometer
Fa. Digilab GmbH, Krefeld, Deutschland.

Die Proben wurden mittels „attenuated total reflection“ (ATR) an einer Diamantoberfläche vermessen. Zur Auswertung der Spektren diente die Software Merlin Version 2.97 von Digilab.

¹H-NMR: Bruker Kernresonanzspektrometer AV 400 (400.132 MHz)
Fa. Bruker BioSpin MRI GmbH, Ettlingen, Deutschland.
Bruker Kernresonanzspektrometer DMX 600 (600.134 MHz)
Fa. Bruker BioSpin MRI GmbH, Ettlingen, Deutschland.

Als interner Standard werden die Mittelpunkte der Signale der deuterierten Lösungsmittel verwendet (CDCl₃: 7.26 ppm, DMSO-*d*₆: 2.50 ppm).

¹³C-NMR: Bruker Kernresonanzspektrometer AV 400 (100.623 MHz)
Fa. Bruker BioSpin MRI GmbH, Ettlingen, Deutschland.
Bruker Kernresonanzspektrometer DMX 600 (150.903 MHz)
Fa. Bruker BioSpin MRI GmbH, Ettlingen, Deutschland.

Als interner Standard werden die Mittelpunkte der Signale der deuterierten Lösungsmittel verwendet (CDCl₃: 77.16 ppm, DMSO-*d*₆: 39.47 ppm). Bei den Messungen an dem

DMX-600-Spektrometer wurde ein ^{13}C -empfindlicher Cryo-Probenkopf der Fa. Bruker verwendet.

Zur Beschreibung der ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektren werden folgende Abkürzungen verwendet: s = Singulett, d = Dublett, t = Triplett, dd = Dublett vom Dublett, ddd = Dublett vom Dublett vom Dublett, dt = Dublett vom Triplett, tt = Triplett vom Triplett, br = breites Signal.

Mikrowelle: Milestone MLS 1600,
Mikrowellenlaborsysteme, Leutkirch, Deutschland.

Reaktionen im offenen System wurden im Dreihalskolben durchgeführt.

6.1.2 Chromatographie

Dünnschichtchromatographie: DC-Alufolien Kieselgel 60 F₂₅₄,
Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland;
DC-Fertigplatten SIL 625 UV₂₅₄,
Fa. Macherey-Nagel, Düren, Deutschland.

Säulenchromatographie: Kieselgel 60, 0.063 - 0.2 mm (70 - 320 mesh),
Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland.

Analytische HPLC: Agilent 1100 HPLC Agilent (Waldbronn, Deutschland)
Säulen: SYNERGITM MAX-RP (150 × 4.6 mm, 4 μm),
Phenomenex (Aschaffenburg, Deutschland) und
NUCLEOSIL[®] C-18 EC (250 × 4.0 mm, 5 μm),
Macherey-Nagel (Düren, Germany)

Semi-präparative HPLC: Agilent 1100 HPLC Agilent (Waldbronn, Deutschland)

Säulen: SYNERGI™ MAX-RP (150 × 10.0 mm, 4 µm),
Phenomenex, Aschaffenburg, Deutschland und
NUCLEOSIL® C-18 EC (250 × 10.0 mm, 5 µm), Macherey-Nagel
(Düren, Germany)

LC-MS: Agilent 1100 LC/MSD Trap Agilent (Waldbronn, Deutschland)
Säule: SYNERGI™ MAX-RP (150 × 4.6 mm; 4 µm), Phenomenex
(Aschaffenburg, Deutschland)
Parameter der Ionenquelle:
Temperatur & Fluss: Trocknungsgas: N₂, 320 °C, 8.00 L/ min;
Druck des Vernebelungsgases: N₂, 20 psi;
Spannung der Kapillare (V_c): -3500 V
“Trap”-Parameter:
Quelle/Polarität: ESI, Positiv; ICC-Target: 30 000;
Max. Acc. Time: 300 ms; Scan-Bereich: 50-1000 m/z; Average: 2

MSⁿ: Agilent 1100 MSD Trap Agilent (Waldbronn, Deutschland)
Spritzenpumpe:
kdScientific Agilent (Waldbronn, Deutschland); Flussrate
der Infusion: 600 µL/h; Datenerfassung: 2-10 min
Parameter der Ionenquelle:
Temperatur & Fluss: Trocknungsgas: N₂, 320 °C, 5.00 L/ min;
Druck des Vernebelungsgases: N₂, 10 psi;
Spannung der Kapillare (V_c): - 3500 V
„Trap“-Parameter:
Quelle/Polarität: ESI, Positiv; ICC-Target: 30 000;
Max. Acc. Time: 300 ms; Average: 2;
Parameter der Fragmentierung:
Cut-Off Selection: 27%; Smart Frag: On; StartAmpl = 30%,
EndAmplit = 200%; Isolierungsparameter: Time = 40 ms;
Width = 10 m/z; Fragmentierungsamplitude: 1 V

6.1.3 Chemikalien und Lösungsmittel

Alle Chemikalien und Lösungsmittel wurden von folgenden Firmen bezogen:

Acros Organics, Geel, Belgien
 Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland
 VWR International, Darmstadt, Deutschland
 Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland

DMF wurde über Phosphorpentoxid bei 40 mbar destilliert. DMSO wurde 2 h unter Rückfluss über Calciumhydrid erhitzt und im Vakuum destilliert. Methanol wurde mit Magnesiumspänen chemisch getrocknet und destilliert. Aceton wurde mit Molekularsieb 3 Å getrocknet und destilliert. Alle angegebenen absolutierten Lösungsmittel wurden unter Argonatmosphäre gelagert.

Zur Synthese wurde ausschließlich demineralisiertes Wasser verwendet. Für HPLC und LC/MS-Messungen wurde durchgehend das mittels Millipore®-Reinigungssystem (Milli-Q, Eschborn, Deutschland) gereinigte Wasser benutzt. Für die HPLC-Messungen wurden Methanol LiChrosolv® Merck (Darmstadt, Deutschland) und Acetonitril Fisher Scientific (Schwerte, Deutschland) eingesetzt.

Folgende Substanzen wurden analog zur angegebenen Literatur synthetisiert:

Substanz	Literatur
4-Oxo-1,4-dihydrochinolin-3-carbonsäure 2	85; 86; 87
7-Chlor-6-fluor-1-(2-fluorphenyl)-4-oxo-1,4-dihydrochinolin-3-carbonsäure 5	79
Diethyl-2-((phenylamino)methylen)malonat 6	85; 86; 87
1-Methyl-4-oxo-1,4-dihydrochinolin-3-carbonsäure 36	140
1-Methylchinolin-4(1 <i>H</i>)-on 37	140
Chinolin-4(1 <i>H</i>)-on 38	87

6.1.4 Abkürzungen

Å	Längenmaß 10^{-10} Meter
Ac ₂ O	Essigsäureanhydrid
ACN	Acetonitril
ATP	Adenosintriphosphat
ATR	attenuated total reflection
CDCl ₃	deuteriertes Chloroform
COSY	correlation spectroscopy
DC	Dünnschichtchromatogramm
dem.	demineralisiert
DEPT	distortionless enhancement by polarization transfer
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EC	endcapping
ESI	Elektrospray-Ionisierung
EtOAc	Ethylacetat
EtOH	Ethanol
Et ₃ N	Triethylamin
FA	Ameisensäure, formic acid
HBr	Bromwasserstoff
HC(OEt) ₃	Orthoameisensäuretriethylester
HMBC	heteronuclear multiple bond coherence
HMQC	heteronuclear multiple quantum coherence
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
ICC	ion charge control
Intens.	Intensität des Ionensignals in MS
IR	Infrarot
k.A.	keine Angaben

K ₂ CO ₃	Kaliumcarbonat
KOH	Kaliumhydroxid
konz.	konzentriert
KO ^t Bu	Kalium- <i>tert.</i> -butanolat
MeNH ₂	Methylamin
MeOH	Methanol
MHK	minimale Hemmkonzentration
MS	Massenspektrometrie
MW	Mikrowelle
m/z	Masse-zu-Ladungsverhältnis
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NaOH	Natriumhydroxid
NMR	nuclear magnetic resonance spectroscopy
P ₂ O ₅	Phosphorpentoxid
psi	Druckeinheit (pressure per square inch)
PyBOP	Benzotriazol-1-yl-oxytripyrrolidinophosphonium
R _f	Retentionsfaktor
RP	reversed phase
SAR	structure activity relationship
STABW	Standardabweichung
THF	Tetrahydrofuran
TIC	total ion chromatogram
u	unified atomic mass unit
UDP	Uridindiphosphat
UV	Ultraviolett
V _{cap}	capillary voltage

6.2 Umsetzungen mit Fentons Reagenz

6.2.1 Umsetzung von 6-Fluor-1-(2-fluorphenyl)-4-oxo-7-(piperazin-1-yl)-1,4-dihydrochinolin-3-carbonsäure **1** mit Fentons Reagenz

0.10 g (0.26 mmol) 6-Fluor-1-(2-fluorphenyl)-4-oxo-7-(piperazin-1-yl)-1,4-dihydrochinolin-3-carbonsäure **1** (siehe Kapitel 6.3.1) werden in einer Mischung aus Dimethylsulfoxid und Methanol (14:1) gelöst, die mit 100 µl konzentrierter Schwefelsäure angesäuert wird. 0.12 g (0.43 mmol) Eisen(II)-sulfat werden in 8 ml Wasser gelöst und zur Chinolon-Lösung gegeben. Schließlich tropft man langsam 1.5 ml (48.5 mmol) einer 35%igen Wasserstoffperoxidlösung zu und rührt für 2 h bei Raumtemperatur. Anschließend wird mit 2 M Kaliumhydroxidlösung pH 7 eingestellt und die Reaktionslösung im Vakuum bis zur Trockne eingengt. Der verbleibende Rückstand wird über Kieselgel mit einem Fließmittelgemisch bestehend aus Wasser : Diethylamin : Toluol : Chloroform : Methanol = 8 : 14 : 20 : 40 : 40 säulenchromatographisch gereinigt.⁹¹ Vom so erhaltenen Eluat wird das Lösungsmittel im Vakuum abdestilliert und der Rückstand der HPLC-Analyse zugeführt.

6.2.2 Umsetzung von 4-Oxo-1,4-dihydroquinoline-3-carbonsäure **2** mit Fentons Reagenz

0.20 g (1.06 mmol) 4-Oxo-1,4-dihydroquinoline-3-carbonsäure **2** (siehe Kapitel 6.3.2) werden in einer Mischung aus Dimethylsulfoxid und Methanol (15:4) gelöst und mit 150 µl konzentrierter Schwefelsäure angesäuert. 0.12 g (0.43 mmol) Eisen(II)-sulfat werden in 8 ml Wasser gelöst und zur Chinolon-Lösung gegeben. Schließlich tropft man langsam 1.5 ml (48.5 mmol) einer 35%igen Wasserstoffperoxidlösung zu und rührt für 2 h bei Raumtemperatur. Anschließend wird mit 2 M Kaliumhydroxidlösung pH 7 eingestellt und die Reaktionslösung im Vakuum bis zur Trockne eingengt. Der verbleibende Rückstand wird über Kieselgel mit einem Fließmittelgemisch bestehend aus Dichlormethan : Methanol = 4 : 1 säulenchromatographisch gereinigt. Vom so erhaltenen

Eluat wird das Lösungsmittel im Vakuum abdestilliert und der Rückstand der HPLC-Analyse zugeführt.

6.2.3 Umsetzung von Cinoxacin mit Fentons Reagenz

6.2.3.1 Umwandlung in das Ammonium-Salz

0.11 g (0.42 mmol) Cinoxacin werden in 0.85 ml Wasser suspendiert und mit 46 μ l konzentrierter Ammoniaklösung versetzt. Anschließend werden 2.5 ml i-Propanol zugegeben und der Reaktionsansatz für 40 h zum Ausfällen bei 4 °C gelagert.¹⁵⁰ Der ausgefallene Niederschlag wird abfiltriert und feucht der Umsetzung mit Fentons Reagenz zugeführt.

6.2.3.2 Umsetzung mit Fentons Reagenz

Das noch feuchte Ammoniumsalz von Cinoxacin wird in 5 ml Wasser gelöst und mit einer Lösung aus 0.14 g (0.50 mmol) Eisen(II)-sulfat in 8 ml Wasser versetzt. Anschließend werden 3 ml (97 mmol) einer 35%igen Wasserstoffperoxidlösung zuge tropft und der Reaktionsansatz für 2 h bei Raumtemperatur gerührt. Nachdem die Reaktionslösung im Vakuum bis zur Trockne eingeeengt wurde, wird mit einem Fließmittelgemisch bestehend aus Acetonitril : Wasser : Ammoniak = 20 : 7 : 1.6 über Kieselgel säulenchromatographisch gereinigt.¹⁴⁹ Das so erhaltenen Eluat wird im Vakuum vom Lösungsmittel befreit und der Rückstand der HPLC-Analyse zugeführt.

6.2.4 Umsetzung von Linezolid mit Fentons Reagenz

Zu einer Lösung von 0.34 g (1.0 mmol) Linezolid in 15 ml Ethanol wird eine Lösung von 0.47 g (1.7 mmol) Eisen(II)-sulfat in 15 ml Wasser gegeben. Schließlich tropft man

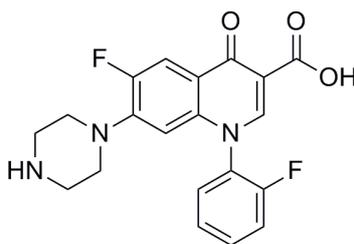
langsam 5.2 ml (0.17 mol) einer wässrigen 35%igen Wasserstoffperoxidlösung zu und rührt für 2 h bei Raumtemperatur. Anschließend wird mit 2 M Kaliumhydroxidlösung pH 7 eingestellt und die Reaktionslösung im Vakuum bis zur Trockne eingengt. Der verbleibende Rückstand wird über Kieselgel mit einem Fließmittelgemisch bestehend aus Ethanol und Ammoniak (9:1) säulenchromatographisch gereinigt.¹⁶⁸ Um die erhaltene Substanzbibliothek der HPLC-Analyse zuführen zu können, wird anschließend das Lösungsmittel im Vakuum entfernt.

6.2.5 Umsetzung von Ciprofloxacin mit Fentons Reagenz

Es werden 0.083 g (0.25 mmol) Ciprofloxacin in einer mit 100 µl konzentrierter Schwefelsäure angesäuerten Mischung aus Dimethylsulfoxid und Methanol (14:1) gelöst und mit einer Lösung von 0.12 g (0.43 mmol) Eisen(II)-sulfat in 8 ml Wasser versetzt. Anschließend tropft man langsam 1.5 ml (48.5 mmol) einer 35%igen Wasserstoffperoxidlösung zu und rührt für 2 h bei Raumtemperatur. Nachdem mit 2 M Kaliumhydroxidlösung pH 7 eingestellt wurde, wird die Reaktionslösung im Vakuum bis zur Trockne eingengt. Der verbleibende Rückstand wird über Kieselgel, mit einem Fließmittelgemisch bestehend aus Wasser : Diethylamin : Toluol : Chloroform : Methanol = 8 : 14 : 20 : 40 : 40 säulenchromatographisch gereinigt.⁹¹ Der Rückstand, der nach dem Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum erhalten wird, wird anschließend der HPLC-Analyse zugeführt.

6.3 Synthesevorschriften und analytische Daten

6.3.1 Synthese von 6-Fluor-1-(2-fluorphenyl)-4-oxo-7-(piperazin-1-yl)-1,4-dihydrochinolin-3-carbonsäure **1**



1

Es werden 0.42 g (1.25 mmol) 7-Chlor-6-fluor-1-(2-fluorphenyl)-4-oxo-1,4-dihydrochinolin-3-carbonsäure **5** (siehe 6.3.5) in 50 ml abs. DMSO gelöst und mit 0.90 g (10.4 mmol) Piperazin versetzt. Die Reaktionslösung wird in der Mikrowelle für 2 h auf 110 °C (Aufheizrate 40 °C / min, 400 Watt) erhitzt (modifiziert nach Literatur⁷⁹). Anschließend wird das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der Rückstand mit 40 ml Wasser versetzt und für 1 h zum Rückfluss erhitzt. Der ausgefallene weiße Feststoff wird abfiltriert, mit Wasser gewaschen und getrocknet.

Summenformel: C₂₀H₁₇F₂N₃O₃

Molekulargewicht: 385.4 g/mol

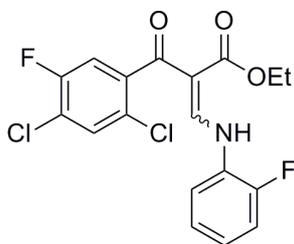
Schmelzpunkt: 209-211 °C; [Lit.: > 200 °C (Zers.)]⁷⁹

Ausbeute: 0.30 g (62%); [Lit.: 61%]⁷⁹

IR[cm⁻¹]: 730, 814, 1034, 1268, 1301, 1369, 1472, 1492, 1622, 3401

Die analytischen und spektroskopischen Daten entsprechen den in der Literatur⁷⁹ mitgeteilten Daten.

6.3.2 Synthese von Ethyl-2-(2,4-dichlor-5-fluorbenzoyl)-3-((2-fluorphenyl)amino)-acrylat **3**

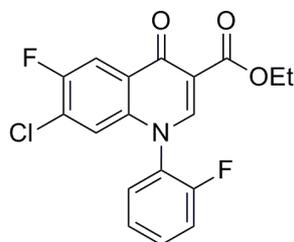
**3**

Eine Mischung aus 5.0 g (18 mmol) Ethyl-3-(2,4-dichlor-5-fluorphenyl)-3-oxopropanoat, 4.4 g (30 mmol) Orthoameisensäuretriethylester und 5.1 g (50 mmol) Acetanhydrid werden 4 h zum Rückfluss erhitzt. Anschließend wird im Vakuum bis zur Trockne eingengt. Der Rückstand wird in 25 ml Ethanol aufgenommen und auf 0 °C gekühlt. Eine Lösung von 2.0 g (18 mmol) 2-Fluoranilin in 10 ml Ethanol wird unter Kühlung zugetropft und die Reaktionslösung anschließend 2 h bei Raumtemperatur gerührt. Der entstandene weiße Feststoff wird abfiltriert, mit Ethanol gewaschen und im Vakuum getrocknet (modifiziert nach Literatur^{74; 79}).

Summenformel:	C ₁₈ H ₁₃ Cl ₂ F ₂ NO ₃
Molekulargewicht:	400.2 g/mol
Schmelzpunkt:	95 °C [Lit.: 90-92 °C] ⁷⁸
Ausbeute:	5.19 g (72%) [Lit.: 66%] ⁷⁹
IR[cm ⁻¹]:	753, 1046, 1092, 1240, 1411, 1624, 1700

Die spektroskopischen Daten entsprechen den in der Literatur⁷⁹ mitgeteilten Daten.

6.3.3 Synthese von Ethyl-7-chlor-6-fluor-1-(2-fluorphenyl)-4-oxo-1,4-dihydrochinolin-3-carboxylat **4**

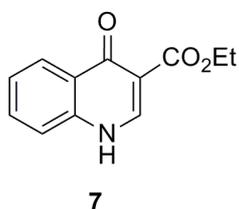
**4**

Eine Mischung aus 4.41 g (11 mmol) Ethyl-2-(2,4-dichlor-5-fluorbenzoyl)-3-((2-fluorphenyl)amino)acrylat **3** und 1.24 g (11 mmol) Kalium-*tert.*-butanolat werden in 125 ml abs. Dioxan gelöst und 4 h zum Rückfluss erhitzt. Das Volumen des Ansatzes wird unter Vakuum auf die Hälfte reduziert und anschließend in eine Mischung aus 100 ml Eiswasser, 20 ml konz. Salzsäure und 40 ml Dichlormethan gegossen. Die organische Phase wird abgetrennt und die wässrige Phase dreimal mit Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit Wasser gewaschen und über Magnesiumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt und **8** als gelblicher Feststoff erhalten (modifiziert nach Literatur^{78;79}).

Summenformel:	C ₁₈ H ₁₂ ClF ₂ NO ₃
Molekulargewicht:	363.7 g/mol
Schmelzpunkt:	243 °C [Lit.: 248-250 °C] ⁷⁹
Ausbeute:	3.00 g (75%) [Lit.: 49%] ⁷⁹
IR[cm ⁻¹]:	777, 1031, 1170, 1265, 1473, 1613, 1731

Die spektroskopischen Daten entsprechen den in der Literatur⁷⁹ mitgeteilten Daten.

6.3.4 Synthese von Ethyl-4-oxo-1,4-dihydrochinolin-3-carboxylat 7



Das Rohprodukt **6** wird zu siedendem Dowtherm A gegeben und für 1 h zum Rückfluss erhitzt. Dabei entstehendes Ethanol wird mit Argon ausgetrieben. Der ausgefallene weiße Feststoff wird abfiltriert und getrocknet (modifiziert nach Literatur^{85;86;87}).

Summenformel: C₁₂H₁₁NO₃

Molekulargewicht: 217.2 g/mol

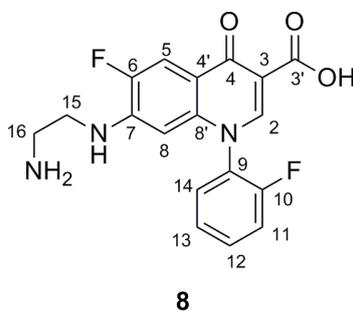
Schmelzpunkt: 272-273 °C [Lit.: 274-277 °C]⁸⁶

Ausbeute: 15.85 g (73%) [Lit.: 65%]⁸⁶

IR[cm⁻¹]: 763, 1138, 1197, 1287, 1474, 1523, 1614, 1694, 2977, 3100

Die spektroskopischen Daten entsprechen den in der Literatur¹⁶⁹ mitgeteilten Daten.

6.3.5 Synthese von 7-((2-Aminoethyl)amino)-6-fluor-1-(2-fluorphenyl)-4-oxo-1,4-dihydrochinolin-3-carbonsäure 8



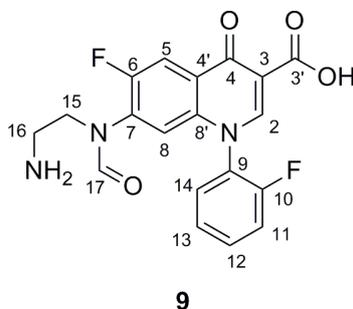
0.60 g (1.80 mmol) **5** werden in 20 ml abs. Dimethylsulfoxid gelöst, mit 1.00 ml (15.0 mmol) Ethylendiamin versetzt und 3 h in der Mikrowelle auf 110 °C (Aufheizrate 40 °C / min, 400 Watt) erhitzt. Anschließend wird das Lösungsmittel im Vakuum entfernt, der Rückstand mit 75 ml Wasser versetzt und für 1 h zum Rückfluss erhitzt. Der ausgefallene beige Feststoff wird abfiltriert, mit Wasser gewaschen und getrocknet.

Summenformel:	C ₁₈ H ₁₅ F ₂ N ₃ O ₃
Molekulargewicht:	359.3 g/mol
Schmelzpunkt:	274 °C
Ausbeute:	0.40 g (62%)
IR[cm ⁻¹]:	772, 804, 1212, 1262, 1333, 1449, 1496, 1618, 1677, 1713, 2832, 3056, 3130, 3359, 3423
ESI [M+H] ⁺ :	m/z 360.4 (100%)

¹H-NMR (400 MHz, δ (ppm), J (Hz), DMSO): 8.69 (s, 1H, H-2); 7.90 (d, 1H, ³J_{H,F} = 11.9, H-5); 7.83 (t, 1H, ³J = 7.8, H-14); 7.77 (dd, 1H, ³J = 7.8, H-12); 7.63 (t, 1H, ³J_{H,F} = 9.8, H-11); 7.53 (t, 1H, ³J = 7.6, H-13); 7.03 (s, 1H, NH oder NH₂); 5.91 (d, 1H, ⁴J_{H,F} = 7.1, H-8); 2.97 (t, 2H, ³J = 1.8, H-15); 2.77 (m, 3H, H-16/NH)

¹³C-NMR (100 MHz, δ (ppm), J (Hz), DMSO): 176.8 (C-4); 165.8 (C-3'); 160.3 (d, ¹J_{C,F} = 250, C-10); 151.6 (d, ¹J_{C,F} = 240, C-6); 143.3 (C-2); 140.8 (C-8'); 134.3 (C-4'); 132.5 (C-12); 129.7 (C-14); 127.3 (C-9); 126.2 (C-13); 125.3 (C-7); 117.3 (d, ²J_{C,F} = 18.0, C-11); 109.2 (C-5); 107.6 (C-3); 96.1 (C-8); 42.1 (C-15); 36.9 (C-16)

6.3.6 Synthese von 7-(*N*-(2-Aminoethyl)formamido)-6-fluor-1-(2-fluorphenyl)-4-oxo-1,4-dihydrochinolin-3-carbonsäure **9**



0.30 g (0.84 mmol) **8** werden mit 0.3 ml Triethylamin und 2.8 ml Ameisensäure versetzt und für 30 h zum Rückfluss erhitzt. Anschließend wird im Vakuum bis zur Trockne eingengt, der verbleibende Rückstand mit 15 ml Wasser versetzt und 1 h zum Rückfluss erhitzt. Der ausgefallene Feststoff wird abfiltriert, mit Wasser gewaschen und getrocknet.

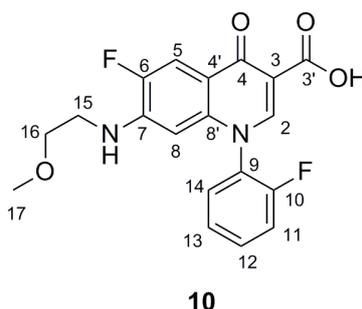
Summenformel:	C ₁₉ H ₁₅ F ₂ N ₃ O ₄
Molekulargewicht:	387.3 g/mol
Schmelzpunkt:	135-136 °C
Ausbeute:	0.09 g (28%)
IR[cm ⁻¹]:	771, 805, 1211, 1259, 1330, 1455, 1491, 1615, 1680, 2925, 3050, 3257, 3330
ESI [M+H] ⁺ :	m/z 388.2 (100%)

¹H-NMR (400 MHz, δ (ppm), J (Hz), DMSO): 15.39 (s, 1H, OH); 8.63 (s, 1H, H-2); 8.45 (s, 1H, H-17); 7.87 (d, 1H, ³J_{H,F} = 11.6, H-5); 7.81 (t, 1H, ³J = 8.0, H-14); 7.76 (m, 1H, H-12); 7.64 (t, 1H, ³J_{H,F} = 9.2, H-11); 7.53 (t, 1H, ³J = 7.20, H-13); 6.68 (b, 2H, NH₂); 6.27 (d, 1H, ⁴J_{H,F} = 6.8, H-8); 2.02 (m, 2H, H-15); 1.45 (t, 2H, ³J = 5.6, H-16)

¹³C-NMR (100 MHz, δ (ppm), J (Hz), DMSO): 176.5 (C-4); 165.8 (C-3'); 165.0 (C-17); 156.9 (d, ¹J_{C,F} = 230, C-10); 149.2 (d, ¹J_{C,F} = 210, C-6); 148.0 (C-2); 144.2 (C-8'); 139.8

(C-4'); 132.8 (C-12); 129.9 (C-14); 127.4 (C-9); 126.1 (C-13); 125.2 (C-7); 117.3 (C-11); 113.8 (C-3); 109.8 (C-5); 99.8 (C-8); 35.1 (C-15); 25.2 (C-16)

6.3.7 Synthese von 6-Fluor-1-(2-fluorphenyl)-7-((2-methoxyethyl)amino)-4-oxo-1,4-dihydrochinolin-3-carbonsäure **10**



0.50 g (1.49 mmol) **5** werden in 20 ml abs. Dimethylsulfoxid gelöst, mit 1.03 ml (11.9 mmol) 2-Methoxyethylamin versetzt und in der Mikrowelle für 3 h auf 110 °C (Aufheizrate 40 °C / min, 400 Watt) erhitzt. Anschließend wird das Lösungsmittel im Vakuum entfernt, der Rückstand mit 75 ml Wasser versetzt und für 1 h zum Rückfluss erhitzt. Nach dem Abkühlen werden 0.3 ml Ameisensäure zugegeben. Der ausgefallene, gelbliche Feststoff wird abfiltriert, mit Wasser gewaschen, getrocknet und schließlich aus DMF umkristallisiert.

Summenformel: C₁₉H₁₆F₂N₂O₄

Molekulargewicht: 372.3 g/mol

Schmelzpunkt: 231-234 °C

Ausbeute: 0.16 g (29%)

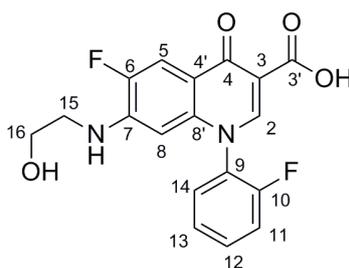
IR[cm⁻¹]: 778, 804, 1255, 1463, 1489, 1598, 1715, 2900, 3085, 3404

¹H-NMR (400 MHz, δ (ppm), J (Hz), DMSO): 15.06 (s, 1H, OH); 8.72 (s, 1H, H-2); 7.84 (t, 1H, ³J = 7.8, H-14); 7.76 (m, 1H, H-12); 7.63 (t, 1H, ³J_{H,F} = 9.3, H-11); 7.53 (m, 1H,

H-13); 7.50 (s, 1H, H-5); 7.02 (s, 1H, H-8); 6.03 (t, 1H, $^3J=5.6$, NH); 3.59 (t, 2H, $^3J=5.6$, H-16); 3.47 (m, 2H, H-15), 3.31 (s, 3H, H-17)

^{13}C -NMR (100 MHz, δ (ppm), J (Hz), DMSO): 177.2 (C-4); 165.8 (C-3'); 156.7 (d, $^1J_{\text{C,F}}=220$, C-10); 153.0 (d, $^1J_{\text{C,F}}=248$, C-6); 147.4 (C-2); 143.3 (C-7); 135.6 (C-8'); 133.1 (C-12); 131.7 (C-4'); 129.7 (C-14); 126.9 (C-8'); 126.3 (C-13); 125.5 (C-9); 118.6 (C-8); 117.3 (d, $^2J_{\text{C,F}}=19.0$, C-11); 107.5 (C-3); 103.0 (C-5); 69.9 (C-16); 58.2 (C-17); 42.6 (C-15)

6.3.8 Synthese von 6-Fluor-1-(2-fluorphenyl)-7-((2-hydroxyethyl)amino)-4-oxo-1,4-dihydrochinolin-3-carbonsäure **11**



11

0.75 g (2.24 mmol) **5** werden in 35 ml abs. Dimethylsulfoxid gelöst, mit 1.50 ml (24.6 mmol) Ethanolamin versetzt und in der Mikrowelle für 1 h auf 110 °C (Aufheizrate 40 °C / min, 400 Watt) erhitzt. Anschließend wird das Lösungsmittel im Vakuum entfernt, der Rückstand mit 100 ml Wasser versetzt und für 2 h zum Rückfluss erhitzt. Nach dem Abkühlen werden 1.0 ml Ameisensäure zugegeben. Der ausgefallene beige Feststoff wird abfiltriert, mit Wasser gewaschen und getrocknet.

Summenformel: $\text{C}_{18}\text{H}_{14}\text{F}_2\text{N}_2\text{O}_4$

Molekulargewicht: 360.3 g/mol

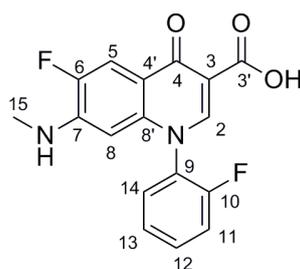
Schmelzpunkt: 182 °C

Ausbeute: 0.30 g (37%)
 IR[cm⁻¹]: 766, 801, 1205, 1450, 1487, 1517, 1616, 1634, 1718, 2942, 3049,
 3274, 3458
 ESI [M+H]⁺: m/z 361.1 (88%)

¹H-NMR (400 MHz, δ (ppm), J (Hz), DMSO): 15.42 (s, 1H, OH); 8.66 (s, 1H, H-2); 7.87 (d, 1H, ³J_{H,F} = 11.6, H-5); 7.82 (t, 1H, ³J = 8.0, H-14); 7.75 (m, 1H, H-12); 7.61 (t, 1H, ³J_{H,F} = 10.4, H-11); 7.52 (t, 1H, ³J = 7.6, H-13); 6.99 (b, 1H, NH oder OH); 6.00 (d, 1H, ⁴J_{H,F} = 6.4, H-8); 4.73 (t, 1H, NH oder OH); 3.45 (m, 2H, H-16); 2.97 (m, 2H, H-15)

¹³C-NMR (100 MHz, δ (ppm), J (Hz), DMSO): 176.3 (C-4); 165.7 (C-3'); 156.8 (d, ¹J_{C,F} = 280, C-10); 149.8 (d, ¹J_{C,F} = 240, C-6); 147.9 (C-2); 143.3 (C-7); 140.0 (C-8'); 132.9 (C-12); 129.6 (C-14); 127.2 (C-9); 126.1 (C-13); 117.1 (d, ²J_{C,F} = 18.8, C-11); 113.4 (C-4'); 109.0 (C-5); 107.3 (C-3); 95.9 (C-8); 58.7 (C-16); 44.9 (C-15)

6.3.9 Synthese von 6-Fluor-1-(2-fluorphenyl)-7-(methylamino)-4-oxo-1,4-dihydrochinolin-3-carbonsäure 12



12

0.20 g (0.60 mmol) **5** werden in 20 ml abs. Dimethylsulfoxid gelöst und mit 1.9 ml 2 M Methylamin in THF (3.80 mmol) versetzt und 65 h auf 125 °C erhitzt. Anschließend wird das Lösungsmittel im Vakuum entfernt, der Rückstand mit 20 ml Wasser versetzt und für

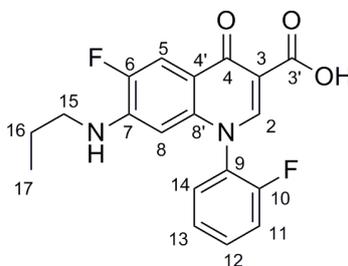
1 h zum Rückfluss erhitzt. Der ausgefallene gelbe Feststoff wird abfiltriert, mit Wasser gewaschen und getrocknet.

Summenformel:	C ₁₇ H ₁₂ F ₂ N ₂ O ₃
Molekulargewicht:	330.3 g/mol
Schmelzpunkt:	233-234 °C
Ausbeute:	0.12g (61%)
IR[cm ⁻¹]:	782, 802, 1270, 1455, 1492, 1616, 1715, 2162, 2954, 3011, 3285
ESI [M+H] ⁺ :	m/z 331.2 (93%)

¹H-NMR (400 MHz, δ (ppm), J (Hz), DMSO): 15.11 (s, 1H, OH); 8.66 (s, 1H, H-2); 7.86 (s, 1H, H-5); 7.83 (t, 1H, ³J = 6.3, H-14); 7.76 (m, 1H, H-12); 7.62 (t, 1H, ³J_{H,F} = 9.2, H-11); 7.53 (t, 1H, ³J = 7.8, H-13); 7.19 (b, 1H, NH); 5.80 (d, 1H, ⁴J_{H,F} = 7.1, H-8); 2.54 (d, 3H ³J = 5.2, H-15)

¹³C-NMR (100 MHz, δ (ppm), J (Hz), DMSO): 176.4 (C-4); 165.8 (C-3'); 156.8 (d, ¹J_{C,F} = 249, C-10); 149.9 (d, ¹J_{C,F} = 245, C-6); 147.1 (C-2); 143.9 (C-7); 140.3 (C-8'); 133.1 (C-12); 129.7 (C-14); 127.3 (C-9); 126.2 (C-13); 117.3 (d, ²J_{C,F} = 18.9, C-11); 113.4 (C-4'); 108.7 (C-5); 107.4 (C-3); 95.1 (C-8); 28.7 (C-15)

6.3.10 Synthese von 6-Fluor-1-(2-fluorphenyl)-4-oxo-7-(propylamino)-1,4-dihydrochinolin-3-carbonsäure **13**



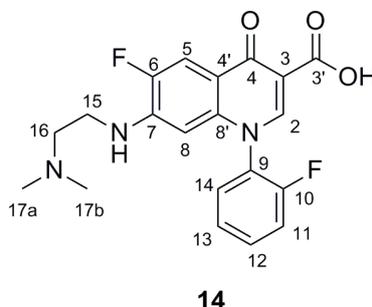
0.20 g (0.60 mmol) **5** werden in 15 ml abs. Dimethylsulfoxid gelöst, mit 0.40 ml (4.86 mmol) Propylamin versetzt und in der Mikrowelle für 1.5 h auf 110 °C (Aufheizrate 40 °C / min, 400 Watt) erhitzt. Anschließend wird das Lösungsmittel im Vakuum entfernt, der Rückstand mit 20 ml Wasser versetzt und für 1 h zum Rückfluss erhitzt. Der ausgefallene gelbe Feststoff wird abfiltriert, mit Wasser gewaschen und getrocknet und in Dimethylformamid umkristallisiert.

Summenformel: $C_{19}H_{16}F_2N_2O_3$
Molekulargewicht: 358.3 g/mol
Schmelzpunkt: 177-178 °C
Ausbeute: 0.20 g (92%)
IR[cm^{-1}]: 776, 802, 1212, 1265, 1331, 1455, 1493, 1615, 1719, 2936, 3021, 3346

1H -NMR (400 MHz, δ (ppm), J (Hz), DMSO): 15.08 (s, 1H, OH); 8.71 (s, 1H, H-2); 7.83 (t, 1H, $^3J=8.0$, H-14); 7.76 (m, 1H, H-12); 7.63 (t, 1H, $^3J_{H,F}=7.6$, H-11); 7.53 (t, 1H, $^3J=7.2$, H-13); 7.41 (s, 1H, H-5); 7.01 (s, 1H, H-8); 6.18 (t, 1H, $^3J=6.0$, NH); 3.24 (m, 2H, H-15); 1.66 (m, 2H, H-16); 0.96 (t, 3H, $^3J=7.3$, H-17)

^{13}C -NMR (100 MHz, δ (ppm), J (Hz), DMSO):): 177.2 (C-4); 166.1 (C-3'); 156.9 (d, $^1J_{C,F}=240$, C-10); 155.3 (d, $^1J_{C,F}=180$, C-6); 146.6 (C-2); 143.4 (C-7); 141.7 (C-8'); 132.6 (C-12); 129.6 (C-14); 127.4 (C-9); 126.5 (C-4'); 126.0 (C-13); 118.2 (C-8); 117.1 (C-11); 107.8 (C-3); 102.1 (C-5); 44.2 (C-15); 20.5 (C-16); 10.8 (C-17)

6.3.11 Synthese von 7-((2-(Dimethylamino)ethyl)amino)-6-fluor-1-(2-fluorphenyl)-4-oxo-1,4-dihydrochinolin-3-carbonsäure **14**



0.20 g (0.60 mmol) **5** werden in 15 ml abs. Dimethylsulfoxid gelöst und mit 0.52 ml (4.80 mmol) N,N-Dimethylethylendiamin versetzt und in der Mikrowelle für 1.5 h auf 110 °C (Aufheizrate 40 °C / min, 400 Watt) erhitzt. Anschließend wird das Lösungsmittel im Vakuum entfernt, der Rückstand mit 20 ml Wasser versetzt und für 1 h zum Rückfluss erhitzt. Der ausgefallene gelbe Feststoff wird abfiltriert, mit Wasser gewaschen und getrocknet.

Summenformel: C₂₀H₁₉F₂N₃O₃

Molekulargewicht: 387.4 g/mol

Schmelzpunkt: 236-237 °C

Ausbeute: 0.19g (82%)

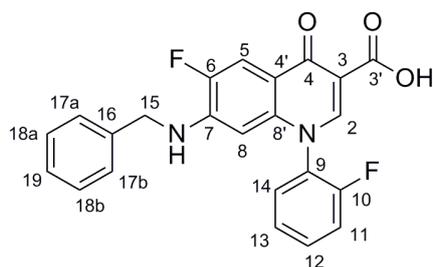
IR [cm⁻¹]: 767, 808, 1336, 1427, 1456, 1497, 1616, 1707, 2933, 3032, 3298

¹H-NMR (400 MHz, δ (ppm), J (Hz), DMSO): 16.16 (s, 1H, OH); 8.42 (s, 1H, H-2); 7.73 (t, 1H, ³J= 7.6, H-14); 7.67 (m, 1H, H-12); 7.55 (t, 1H, ³J_{H,F}= 8.8, H-11); 7.46 (t, 1H, ³J= 8.6, H-13); 7.03 (s, 1H, H-5); 5.60 (s, 1H, H-8); 3.44 (m, 2H, H-15); 3.23 (m, 2H, H-16); 2.88 (s, 3H, H-17a/b); 2.62 (s, 3H, H-17a/b)

¹³C-NMR (100 MHz, δ (ppm), J (Hz), DMSO): 175.2 (C-4); 166.7 (3'); 156.7 (d, ¹J_{C,F}= 249, C-10); 152.7 (d, ¹J_{C,F}= 190, C-6); 144.6 (C-2); 142.8 (C-7); 136.4 (C-8'); 132.7 (C-12); 129.6 (C-14); 127.4 (C-9); 126.1 (C-13); 117.2 (d, ²J_{C,F}= 19.0, C-11);

115.5 (C-4'); 106.9 (C-3); 101.3 (C-5); 93.5 (C-8); 48.6 (C-15); 47.1 (C-16); 38.9/38.2 (C-17a/b)

6.3.12 Synthese von 7-(Benzylamino)-6-fluor-1-(2-fluorphenyl)-4-oxo-1,4-dihydrochinolin-3-carbonsäure **16**



16

0.20 g (0.60 mmol) **5** werden in 15 ml abs. Dimethylsulfoxid gelöst, mit 0.52 ml (4.77 mmol) Benzylamin versetzt und in der Mikrowelle für 4.5 h auf 110 °C (Aufheizrate 40 °C / min, 400 Watt) erhitzt. Anschließend wird das Lösungsmittel im Vakuum entfernt, der Rückstand mit 20 ml Wasser versetzt und für 1 h zum Rückfluss erhitzt. Der ausgefallene gelbliche Feststoff wird abfiltriert, mit Wasser gewaschen, getrocknet und in einer Mischung aus Ethanol und Aceton umkristallisiert.

Summenformel: C₂₃H₁₆F₂N₂O₃

Molekulargewicht: 406.4 g/mol

Schmelzpunkt: 276 °C

Ausbeute: 0.12 g (49%)

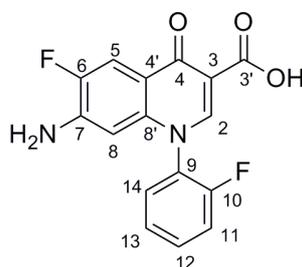
IR[cm⁻¹]: 773, 806, 1253, 1336, 1468, 1488, 1603, 1721, 2161, 2579, 3061, 3417

ESI [M+H]⁺: m/z 407.2 (100%)

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, δ (ppm), J (Hz), DMSO): 8.58 (s, 1H, H-2); 7.92 (b, 1H, NH); 7.84 (d, 1H, $^3J_{\text{H,F}} = 11.6$, H-5); 7.76 (m, 1H, H-14); 7.57 (t, 1H, $^3J = 7.6$, H-12); 7.52-7.46 (m, 2H, H-11/13); 7.21 (m, 3H, H-18a/18b/19); 6.94 (m, 2H, H-17a/17b); 5.76 (d, 1H, $^4J_{\text{H,F}} = 6.8$, H-8); 4.15 (m, 2H, H-15)

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, δ (ppm), J (Hz), DMSO): 176.3 (C-4); 165.8 (C-3'); 156.5 (d, $^1J_{\text{C,F}} = 250$, C-10); 149.9 (d, $^1J_{\text{C,F}} = 250$, C-6); 147.7 (C-2); 142.4 (C-7); 139.6 (C-8'); 137.3 (C-16); 132.5 (C-12); 129.4 (C-14); 128.5 (C-18a/18b/19); 127.0 (C-9); 126.8 (C-17a/17b); 126.0 (C-13); 117.2 (d, $^2J_{\text{C,F}} = 19.0$, C-11); 113.8 (C-4'); 108.8 (C-5); 107.7 (C-3); 97.1 (C-8); 45.9 (C-15)

6.3.13 Synthese von 7-Amino-6-fluor-1-(2-fluorphenyl)-4-oxo-1,4-dihydrochinolin-3-carbonsäure 17



17

0.30 g (0.60 mmol) **5** werden in 5 ml abs. Dimethylsulfoxid gelöst, mit 3.0 ml 25%iger Ammoniaklösung versetzt und 210 h auf 130 °C erhitzt. Anschließend wird mit Ameisensäure neutralisiert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wird mit 10 ml Wasser versetzt und für 1 h zum Rückfluss erhitzt. Der ausgefallene bräunliche Feststoff wird abfiltriert, mit Wasser gewaschen und getrocknet.

Summenformel: $\text{C}_{16}\text{H}_{10}\text{F}_2\text{N}_2\text{O}_3$

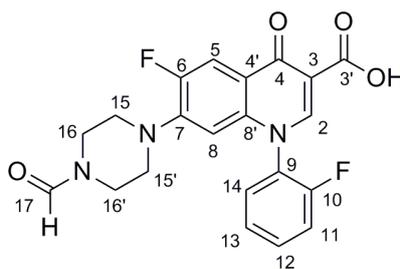
Molekulargewicht: 316.3 g/mol

Schmelzpunkt:	214 °C
Ausbeute:	0.12 g (62%)
IR[cm ⁻¹]:	734, 766, 1213, 1254, 1305, 1472, 1497, 1627, 2976, 3205, 3281
ESI [M+H] ⁺ :	m/z 316.1 (47.63%), m/z 332.1 (100%) MS ² (332.1): 314.0
[M-H] ⁻ :	m/z 314.9 (76.75%), m/z 329.9 (43.47%)

¹H-NMR (400 MHz, δ (ppm), J (Hz), DMSO): 14.32 (s, 1H, OH); 8.93 (s, 1H, H-2); 8.30 (d, 1H, ³J_{H,F} = 8.8, H-5); 7.84 (t, 1H, ³J = 8.0, H-14); 7.78 (m, 1H, H-12); 7.64 (t, 1H, ³J_{H,F} = 8.8, H-11); 7.54 (t, 1H, ³J = 8.0, H-13); 7.35 (d, 1H, ⁴J_{H,F} = 5.6, H-8)

¹³C-NMR (100 MHz, δ (ppm), J (Hz), DMSO): 178.7 (C-4); 164.8 (C-3'); 157.5 (d, ¹J_{C,F} = 195, C-10); 154.4 (d, ¹J_{C,F} = 160, C-6); 150.5 (C-2); 137.6 (C-8'); 133.3 (C-12); 129.7 (C-14); 127.3 (C-7); 126.3 (C-13); 126.2 (C-9); 120.6 (C-8); 119.4 (C-4'); 117.5 (d, ²J_{C,F} = 18.9, C-11); 112.4 (C-5); 108.9 (C-3)

6.3.14 Synthese von 6-Fluor-1-(2-fluorphenyl)-7-(4-formylpiperazin-1-yl)-4-oxo-1,4-dihydrochinolin-3-carbonsäure 21



21

100 mg (0.26 mmol) **1** werden mit 0.06 g (0.083 ml, 0.593 mmol) Triethylamin und 0.5 ml Ameisensäure versetzt und 7 h im Bombenrohr auf 120 °C erhitzt. Anschließend wird im Vakuum bis zur Trockne eingengt. Der Rückstand wird mit 4 ml Wasser

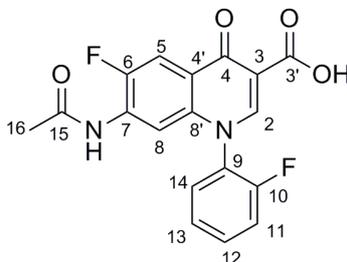
versetzt, für 10 min ins Ultraschallbad gegeben und der beige Rückstand abfiltriert, mit Wasser gewaschen und getrocknet.

Summenformel:	$C_{21}H_{17}F_2N_3O_4$
Molekulargewicht:	413.4 g/mol
Schmelzpunkt:	232-235 °C
Ausbeute:	0.08g (75%)
IR[cm^{-1}]:	786, 806, 1013, 1263, 1455, 1491, 1618, 1666, 1730, 2161, 3049
ESI [M+H] ⁺ :	m/z 414.4 (100%)

¹H-NMR (400 MHz, δ (ppm), J (Hz), DMSO): 14.92 (s, 1H, OH); 8.81 (s, 1H, H-2); 8.03 (d, 1H, ³J_{H,F} = 14.4, H-5); 8.01 (s, 1H, H-17); 7.84 (t, 1H, ³J = 7.6, H-14); 7.74 (dd, 1H, ³J = 6.4, H-12); 7.63 (t, 1H, ³J_{H,F} = 9.6, H-11); 7.53 (t, 1H, ³J = 7.6, H-13); 6.36 (d, 1H, ⁴J_{H,F} = 6.6, H-8), 3.49 (m, 4H, H-15/15'); 3.06 (m, 4H, H-16/16')

¹³C-NMR (100 MHz, δ (ppm), J (Hz), DMSO): 176.7 (C-4); 165.4 (C-3'); 160.9 (C-17); 155.8 (d, ¹J_{C,F} = 280, C-10); 152.7 (d, ¹J_{C,F} = 240, C-6); 149.2 (C-2); 145.3 (C-8'); 138.5 (C-4'); 133.0 (C-12); 129.7 (C-14); 126.8 (C-9); 126.1 (C-13); 118.2 (C-7); 117.3 (d, ²J_{C,F} = 18.0, C-11); 111.3 (d, ²J_{C,F} = 23.0, C-5); 108.0 (C-3); 106.1 (C-8); 49.6 (C-15/15'); 44.2 (C-16/16')

6.3.15 Synthese von 7-Acetamido-6-fluor-1-(2-fluorphenyl)-4-oxo-1,4-dihydrochinolin-3-carbonsäure 22

**22**

0.02 g (0.06 mmol) **17** werden mit 1.0 ml Essigsäureanhydrid versetzt und 76 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wird das Lösungsmittel im Vakuum entfernt, der Rückstand mit 6 ml Wasser versetzt und für 15 min ins Ultraschallbad gegeben. Der ausgefallene hellbraune Feststoff wird abfiltriert, mit Wasser gewaschen und getrocknet.

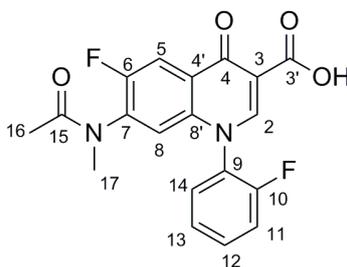
Summenformel:	C ₁₈ H ₁₂ F ₂ N ₂ O ₄
Molekulargewicht:	358.3 g/mol
Schmelzpunkt:	> 300 °C unter Zersetzung
Ausbeute:	0.02 g (93%)
IR[cm ⁻¹]:	739, 805, 1100, 1213, 1312, 1455, 1497, 1623, 1718, 2981, 3066, 3265
ESI [M-H] ⁻ :	m/z 356.9 (92.95%)

¹H-NMR (400 MHz, δ (ppm), J (Hz), DMSO): 14.75 (s, 1H, OH); 9.86 (s, 1H, NH); 8.89 (s, 1H, H-2); 8.06 (s, 1H, H-5); 7.86 (t, 1H, ³J = 7.6, H-14); 7.77 (t, 1H, ³J = 5.6, H-12); 7.64 (t, 1H, ³J_{H,F} = 10.1, H-11); 7.54 (t, 1H, ³J = 7.6, H-13); 7.17 (s, 1H, 8); 2.31 (s, 3H, 16)

¹³C-NMR (100 MHz, δ (ppm), J (Hz), DMSO): 170.8 (C-4); 163.3 (C-3'); 158.8 (C-15); 156.9 (d, ¹J_{C,F} = 214, C-10); 155.7 (d, ¹J_{C,F} = 194, C-6); 149.9 (C-2); 146.8 (C-7); 133.7

(C-12); 131.4 (C-8'); 129.7 (C-14); 127.3 (C-7); 126.5 (C-9); 126.2 (C-13); 121.1 (C-8); 118.6 (C-4'); 117.5 (C-11); 113.4 (C-5); 108.4 (C-3); 23.5 (C-16)

6.3.16 Synthese von 6-Fluor-1-(2-fluorphenyl)-7-(*N*-methylacetamido)-4-oxo-1,4-dihydrochinolin-3-carbonsäure **23**



23

0.060 g (0.182 mmol) **12** werden mit 2.0 ml Essigsäureanhydrid versetzt und 14 d bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wird abermals 1.0 ml Essigsäureanhydrid zugegeben und für 2 h zum Rückfluss erhitzt. Schließlich wird das Lösungsmittel im Vakuum entfernt, der Rückstand mit 10 ml Wasser versetzt und für 15 min ins Ultraschallbad gegeben. Der erhaltene Feststoff wird in Dimethylformamid und Wasser umkristallisiert.

Summenformel: C₁₉H₁₄F₂N₂O₄

Molekulargewicht: 372.3 g/mol

Schmelzpunkt: 281 °C

Ausbeute: 0.02 g (31%)

IR[cm⁻¹]: 747, 802, 1256, 1312, 1482, 1495, 1617, 1715, 2183, 2934, 3017

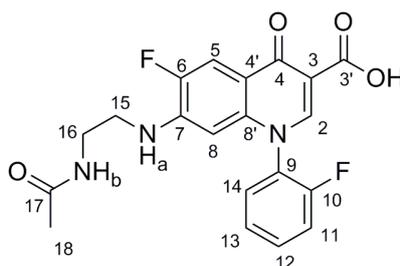
ESI [M+H]⁺: m/z 331.1 (84.76%), m/z 373.1 (57.84%), m/z 389.0 (45.75%)

¹H-NMR (400 MHz, δ (ppm), J (Hz), DMSO): 14.40 (s, 1H, OH); 8.90 (s, 1H, H-2); 8.53 (d, 1H, ³J_{H,F} = 1.6, H-5); 7.88 (m, 1H, H-14); 7.77 (m, 1H, H-12); 7.65 (t, 1H, ³J_{H,F} = 9.2,

H-11); 7.54 (t, 1H, $^3J = 7.6$, H-13); 7.32 (s, 1H, H-8); 3.13 (s, 3H, H-16); 1.71 (s, 3H, H-17)

^{13}C -NMR (100 MHz, δ (ppm), J (Hz), DMSO): 177.1 (C-4); 172.7 (C-15); 164.7 (C-3'); 159.4 (d, $^1J_{\text{C,F}} = 240$, C-10); 153.0 (d, $^1J_{\text{C,F}} = 210$, C-6); 150.8 (C-2); 143.1 (C-7); 140.3 (C-8'); 138.6 (C-7); 133.2 (C-12); 129.7 (C-14); 127.5 (C-9); 126.3 (C-13); 119.6 (C-11); 111.2 (C-4'); 109.4 (C-5); 90.8 (C-8); 35.4 (C-17); 21.8 (C-16)

6.3.17 Synthese von 7-((2-Acetamidoethyl)amino)-6-fluor-1-(2-fluorphenyl)-4-oxo-1,4-dihydro-chinolin-3-carbonsäure **25**



25

0.065 g (0.181 mmol) **8** werden mit 1.0 ml Essigsäureanhydrid versetzt und 5 d bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wird das Lösungsmittel im Vakuum entfernt, der Rückstand mit 25 ml Wasser versetzt und für 15 min ins Ultraschallbad gegeben. Der ausgefallene gelbe Feststoff wird abfiltriert, mit Wasser gewaschen und getrocknet.

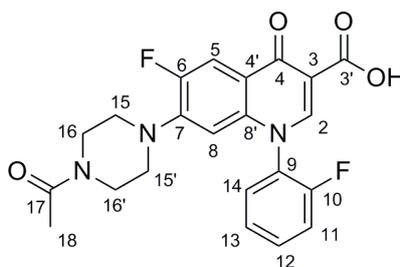
Summenformel:	$\text{C}_{20}\text{H}_{17}\text{F}_2\text{N}_3\text{O}_4$
Molekulargewicht:	401.4 g/mol
Schmelzpunkt:	202 °C
Ausbeute:	0.05 g (66%)
IR[cm^{-1}]:	802, 1104, 1208, 1454, 1495, 1616, 1636, 1719, 2934, 3072, 3298, 3370
ESI [M+H] $^+$:	m/z 402.2 (96%)

ESI [M-H]⁻: m/z 399.8 (97%)

¹H-NMR (400 MHz, δ (ppm), J (Hz), DMSO): 15.39 (s, 1H, OH); 8.65 (s, 1H, H-2); 7.92 (t, 1H, ³J = 5.56, NH_b); 7.88 (d, 1H, ³J_{H,F} = 11.6, H-5); 7.81 (t, 1H, ³J = 7.8, H-14); 7.75 (m, 1H, H-12); 7.61 (t, 1H, ³J_{H,F} = 8.8, H-11); 7.51 (t, 1H, ³J = 7.6, H-13); 7.08 (b, 1H, NH_a); 5.96 (d, 1H, ⁴J_{H,F} = 6.8, H-8); 3.13 (m, 2H, H-16); 2.96 (m, 2H, H-15); 1.74 (s, 3H, H-18)

¹³C-NMR (100 MHz, δ (ppm), J (Hz), DMSO): 176.4 (C-4); 170.1 (C-17); 165.7 (C-3'); 156.6 (d, ¹J_{C,F} = 250, C-10); 149.8 (d, ¹J_{C,F} = 250, C-6); 148.1 (C-2); 143.1 (C-7); 140.1 (C-8'); 132.8 (C-12); 129.6 (C-14); 127.2 (C-9); 126.1 (C-13); 117.3 (d, ²J_{C,F} = 19.0, C-11); 113.6 (C-4'); 109.0 (C-5); 107.4 (C-3); 95.6 (C-8); 42.2 (C-16); 37.2 (C-15); 22.5 (C-18)

6.3.18 Synthese von 7-(4-Acetylpiperazin-1-yl)-6-fluor-1-(2-fluorphenyl)-4-oxo-1,4-dihydrochinolin-3-carbonsäure **26**



26

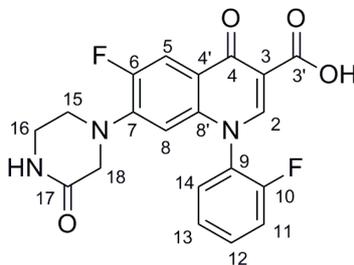
0.107 g (0.278 mmol) **1** werden mit 1.5 ml Essigsäureanhydrid versetzt und 5 d bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wird unter Vakuum bis zur Trockne eingeengt, der Rückstand mit 6 ml Wasser versetzt und für 10 min ins Ultraschallbad gegeben. Der gelbe Rückstand wird abfiltriert, mit Wasser gewaschen und getrocknet.

Summenformel:	C ₂₂ H ₁₉ F ₂ N ₃ O ₄
Molekulargewicht:	427.4 g/mol
Schmelzpunkt:	238-240 °C
Ausbeute:	0.08g (69%)
IR[cm ⁻¹]:	780, 805, 972, 1243, 1335, 1450, 1467, 1489, 1624, 1654, 1734, 2836, 3056
ESI [M+H] ⁺ :	m/z 428.4 (100%)

¹H-NMR (400 MHz, δ (ppm), J (Hz), DMSO): 14.97 (s, 1H, OH); 8.83 (s, 1H, H-2); 8.05 (d, 1H, ³J_{H,F} = 13.1, H-5); 7.87 (t, 1H, ³J = 6.6, H-14); 7.80 (m, 1H, H-12); 7.66 (t, 1H, ³J_{H,F} = 9.1, H-11); 7.56 (t, 1H, ³J = 7.6, H-13); 6.36 (d, 1H, ⁴J_{H,F} = 7.1, H-8); 3.57 (s, 4H, H-16/ H-16[′]); 3.08 (t, 4H, ³J = 5.8, H-15/ H-15[′]); 2.01 (s, 3H, H-18)

¹³C-NMR (100 MHz, δ (ppm), J (Hz), DMSO): 194.1 (C-17); 176.7 (C-4); 165.4 (C-3[′]); 159.8 (d, ¹J_{C,F} = 280, C-10); 153.0 (d, ¹J_{C,F} = 240, C-6); 149.4 (C-2); 143.8 (C-8[′]); 138.7 (C-4[′]); 133.5 (C-12); 129.7 (C-14); 126.7 (C-9); 126.2 (C-13); 118.4 (C-7); 117.3 (d, ²J_{C,F} = 18.0, C-11); 111.5 (C-5); 108.0 (C-3); 105.6 (C-8); 48.9 (C-15/ C-15[′]); 45.0 (C-16/ C-16[′]); 21.1 (C-18)

6.3.19 Synthese von 6-Fluor-1-(2-fluorphenyl)-4-oxo-7-(3-oxopiperazin-1-yl)-1,4-dihydrochinolin-3-carbonsäure 27



27

0.15 g (0.45 mmol) **5** werden in 3 ml abs. Dimethylsulfoxid gelöst und mit 0.36 g (3.62 mmol) 2-Oxopiperazin versetzt und 6 h auf 130 °C erhitzt. Anschließend wird das Lösungsmittel im Vakuum entfernt, der Rückstand mit 10 ml Wasser versetzt und für 1 h zum Rückfluss erhitzt. Der ausgefallene orange Feststoff wird abfiltriert, mit Wasser gewaschen und getrocknet.

Summenformel: $C_{20}H_{15}F_2N_3O_4$

Molekulargewicht: 399.4 g/mol

Schmelzpunkt: 203-204 °C

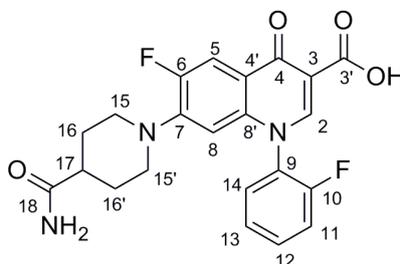
Ausbeute: 0.10g (56%)

IR[cm^{-1}]: 779, 805, 1262, 1334, 1456, 1492, 1617, 1672, 2933, 3052, 3193

1H -NMR (400 MHz, δ (ppm), J (Hz), DMSO): 15.95 (s, 1H, OH); 8.80 (s, 1H, H-2); 8.09 (s, 1H, NH); 8.02 (d, 1H, $^3J_{H,F} = 13.4$, H-5); 7.85 (d, 1H, $^3J = 8.8$, H-14); 7.77 (m, 1H, H-12); 7.64 (t, 1H, $^3J_{H,F} = 8.8$, H-11); 7.54 (m, 1H, H-13); 6.29 (d, 1H, $^4J_{H,F} = 7.1$, H-8); 3.62 (s, 2H, H-18); 3.42 (m, 2H, H-15); 3.26 (m, 2H, H-16)

^{13}C -NMR (100 MHz, δ (ppm), J (Hz), DMSO): 176.7 (C-4); 165.8 (C-17); 165.4 (C-3'); 156.7 (d, $^1J_{C,F} = 249$, C-10); 152.7 (d, $^1J_{C,F} = 190$, C-6); 149.1 (C-2); 143.6 (C-7); 138.7 (C-8'); 133.0 (C-12); 130.1 (C-14); 126.8 (C-9); 126.1 (C-13); 118.0 (C-4'); 117.3 (d, $^2J_{C,F} = 18.0$, C-11); 111.4 (d, $^2J_{C,F} = 20$, C-5); 107.9 (C-3); 104.7 (C-8); 51.7 (C-18); 46.1 (C-15); 40.0 (C-16)

6.3.20 Synthese von 7-(4-Carbamoylpiperidin-1-yl)-6-fluor-1-(2-fluorphenyl)-4-oxo-1,4-dihydrochinolin-3-carbonsäure **28**

**28**

0.20 g (0.60 mmol) **5** werden in 25 ml abs. Dimethylsulfoxid gelöst, mit 0.62 g (4.80 mmol) Piperidin-4-carbonsäureamid versetzt und in der Mikrowelle für 3 h auf 110 °C (Aufheizrate 40 °C / min, 400 Watt) erhitzt. Anschließend wird das Lösungsmittel im Vakuum entfernt, der Rückstand mit 75 ml Wasser versetzt und für 1 h zum Rückfluss erhitzt. Zur abgekühlten Lösung werden 0.3 ml Ameisensäure gegeben und der anschließend ausfallende braune Feststoff abfiltriert, mit Wasser gewaschen und getrocknet.

Summenformel: C₂₂H₁₉F₂N₃O₄

Molekulargewicht: 427.4 g/mol

Schmelzpunkt: 250-251 °C

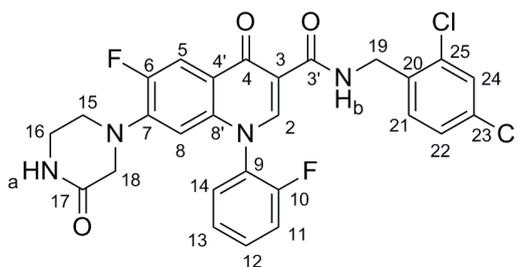
Ausbeute: 0.08 g (31%)

IR[cm⁻¹]: 767, 804, 1229, 1267, 1330, 1449, 1493, 1617, 1654, 1722, 2850, 2947, 3064, 3193, 3368

¹H-NMR (400 MHz, δ (ppm), J (Hz), DMSO): 15.00 (s, 1H, OH); 8.79 (s, 1H, H-2); 7.97 (d, 1H, ³J_{H,F} = 13.4, H-5); 7.85 (t, 1H, ³J = 7.8, H-14); 7.76 (m, 1H, H-12); 7.64 (t, 1H, ³J_{H,F} = 9.8, H-11); 7.54 (t, 1H, ³J = 8.6, H-13); 7.24/6.78 (b, 2H, NH₂); 6.31 (d, 1H, ⁴J_{H,F} = 6.6, H-8); 3.43/2.73 (m, 4H, H-15/ H-15'); 2.25 (m, 1H, H-17), 1.74/1.60 (m, 4H, H-16/ H-16')

^{13}C -NMR (100 MHz, δ (ppm), J (Hz), DMSO): 176.7 (C-4); 175.8 (C-18); 165.4 (C-3'); 156.7 (d, $^1J_{\text{C,F}} = 249$, C-10); 153.0 (d, $^1J_{\text{C,F}} = 248$, C-6); 148.9 (C-2); 145.9 (C-7); 138.7 (C-8'); 133.1 (C-12); 129.7 (C-14); 126.9 (C-9); 126.2 (C-13); 118.0 (C-4'); 117.3 (d, $^2J_{\text{H,F}} = 19.0$, C-11); 111.2 (C-5); 107.9 (C-3); 105.3 (C-8); 48.9 (C-15/ C-15'); 40.6 (C-17); 27.9 (C-16/ C-16')

6.3.21 Synthese von *N*-(2,4-Dichlorbenzyl)-6-fluor-1-(2-fluorphenyl)-4-oxo-7-(3-oxo-piperazin-1-yl)-1,4-dihydrochinolin-3-carboxamid **29**



29

0.050 g (0.125 mmol) **27** werden mit 0.073 g (0.140 mmol) PyBOP und 0.066 g (0.375 mmol) 2,4-Dichlorbenzylamin in 2.5 ml abs. DMF versetzt und 17 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wird für 6 h auf 120 °C erhitzt. Nach dem Abkühlen wird das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der Rückstand zweimal über Kieselgel säulenchromatographisch gereinigt (Fließmittel 1: Ethylacetat : Ethanol = 7 : 3 ($R_f = 0.67$) Fließmittel 2: Ethylacetat : Ethanol = 15 : 3 ($R_f = 0.29$)).

Summenformel: $\text{C}_{27}\text{H}_{20}\text{Cl}_2\text{F}_2\text{N}_4\text{O}_3$

Molekulargewicht: 557.4 g/mol

Schmelzpunkt: 219 °C

Ausbeute: 0.03 g (46%)

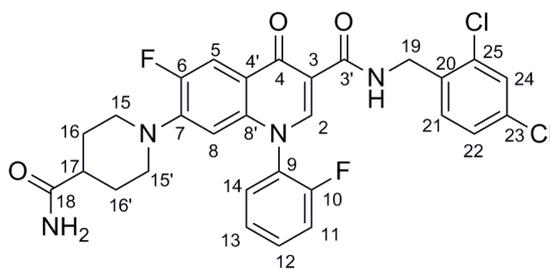
IR[cm^{-1}]: 802, 1244, 1322, 1449, 1474, 1491, 1531, 1628, 1660, 3252

ESI [$\text{M}+\text{H}$] $^+$: m/z 556.9 (76%); m/z 558.9 (49%), m/z 513.5 (43%)

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, δ (ppm), J (Hz), DMSO): 10.32 (t, 1H, $^3J = 6.0$, NH_b); 8.57 (s, 1H, H-2); 8.07 (s, 1H, NH_a); 7.97 (d, 1H, $^3J_{\text{H,F}} = 13.2$, H-5); 7.83 (t, 1H, $^3J = 8.0$, H-14); 7.74 (m, 1H, H-12); 7.66 (m, 1H, H-11); 7.63 (s, 1H, H-24); 7.53 (t, 1H, $^3J = 7.6$, H-13); 7.42 (s, 2H, H-21/ H-22); 6.27 (d, 1H, $^4J_{\text{H,F}} = 7.2$, H-8); 4.60 (d, 2H, $^3J = 6.4$, H-19); 3.58 (s, 2H, H-18); 3.36 (m, 2H, H-15); 3.26 (m, 2H, H-16)

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, δ (ppm), J (Hz), DMSO): 174.5 (C-4); 165.8 (C-17); 163.7 (C-3'); 156.3 (d, $^1J_{\text{C,F}} = 150$, C-10); 152.3 (d, $^1J_{\text{C,F}} = 260$, C-6); 147.6 (C-2); 142.6 (C-7); 137.8 (C-8'); 135.5 (C-20); 133.1 (C-25); 132.3 (C-12); 131.4 (C-21); 130.5 (C-14); 129.7 (C-9); 128.6 (C-24); 127.4 (C-22); 127.3 (C-23); 126.1 (C-13); 120.0 (C-4'); 117.4 (C-11); 110.9 (C-5); 105.5 (C-3); 104.6 (C-8); 51.8 (C-18); 46.1 (C-15); 39.7 (C-16); 39.6 (C-19)

6.3.22 Synthese von 7-(4-Carbamoylpiperidin-1-yl)-N-(2,4-dichlorbenzyl)-6-fluor-1-(2-fluorphenyl)-4-oxo-1,4-dihydrochinolin-3-carboxamid 30



30

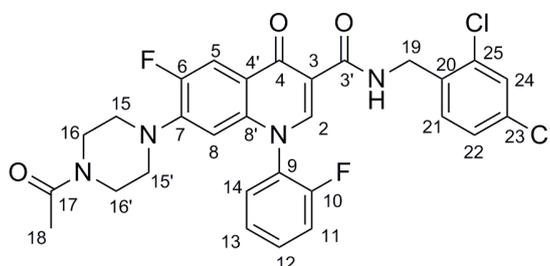
0.150 g (0.351 mmol) **28** werden mit 0.224 g (0.461 mmol) PyBOP und 0.185 g (1.05 mmol) 2,4-Dichlorbenzylamin in 7.0 ml abs. DMF versetzt und 22 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wird für 20 h auf 120 °C erhitzt. Nach dem Abkühlen wird das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der Rückstand zweimal über Kieselgel säulenchromatographisch gereinigt (Fließmittel 1: Ethylacetat : Ethanol = 15 : 3 ($R_f = 0.75$); Fließmittel 2: Ethylacetat : Ethanol = 20 : 3 ($R_f = 0.43$)).

Summenformel: $C_{29}H_{24}Cl_2F_2N_4O_3$
Molekulargewicht: 585.4 g/mol
Schmelzpunkt: 229-230 °C
Ausbeute: 0.10 g (50%)
IR[cm^{-1}]: 767, 801, 1263, 1476, 1498, 1625, 1660, 3197, 3390

1H -NMR (400 MHz, δ (ppm), J (Hz), DMSO): 10.33 (t, 1H, $^3J=6.0$, NH); 8.56 (s, 1H, H-2); 7.91 (d, 1H, $^3J_{H,F}=13.2$, H-5); 7.83 (t, 1H, $^3J=7.6$, H-14); 7.74 (m, 1H, H-12); 7.63 (m, 1H, H-11); 7.61 (s, 1H, H-24); 7.53 (t, 1H, $^3J=7.2$, H-13); 7.41 (s, 2H, H-21/ H-22); 7.26 (b, 2H, NH₂); 6.27 (d, 1H, $^4J_{H,F}=6.8$, H-8); 4.59 (d, 2H, $^3J=6.4$, H-19); 3.38/2.66 (m, 4H, H-15/ H-15'); 2.23 (m, 1H, H-17); 1.63 (m, 4H, H-16/ H-16')

^{13}C -NMR (100 MHz, δ (ppm), J (Hz), DMSO): 175.8 (C-18); 174.5 (C-4); 163.7 (C-3'); 156.7 (d, $^1J_{C,F}=249$, C-10); 152.5 (d, $^1J_{C,F}=260$, C-6); 147.4 (C-2); 145.1 (C-7); 138.7 (C-8'); 135.5 (C-20); 133.1 (C-25); 132.7 (C-9); 132.3 (C-12); 130.5 (C-21); 129.7 (C-14); 128.6 (C-24); 127.3 (C-22); 126.1 (C-13); 124.8 (C-23); 119.9 (C-4'); 117.2 (d, $^2J_{C,F}=19$ Hz, C-11); 111.4 (C-5); 110.8 (C-3); 105.1 (C-8); 49.0 (C-15/ C-15'); 40.6 (C-17); 39.7 (C-19); 27.9 (C-16/ C-16')

6.3.23 Synthese von 7-(4-Acetylpiperazin-1-yl)-N-(2,4-dichlorbenzyl)-6-fluor-1-(2-fluorphenyl)-4-oxo-1,4-dihydrochinolin-3-carboxamid **31**



31

0.051 g (0.119 mmol) **26** werden mit 0.16 g (0.307 mmol) PyBOP und 0.097 g (0.551 mmol) 2,4-Dichlorbenzylamin in 2.5 ml abs. DMF versetzt und 20 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wird für 6 h auf 120 °C erhitzt. Nach dem Abkühlen wird das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der Rückstand zweimal über Kieselgelsäulenchromatographisch gereinigt (Fließmittel 1: Ethylacetat : Ethanol = 15 : 6 ($R_f = 0.75$); Fließmittel 2: Ethylacetat : Ethanol = 10 : 1 ($R_f = 0.37$)). Man erhält ein gelbliches Öl.

Summenformel: $C_{29}H_{24}Cl_2F_2N_4O_3$

Molekulargewicht: 585.4 g/mol

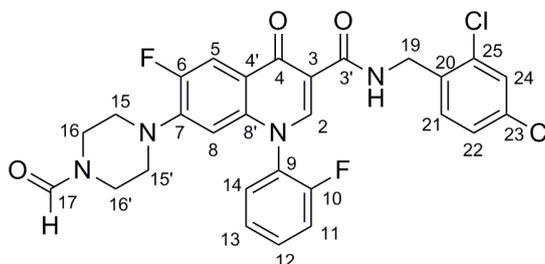
Ausbeute: 0.03 g (39%)

IR[cm^{-1}]: 805, 1245, 1331, 1450, 1469, 1489, 1528, 1624, 1657, 3288

1H -NMR (400 MHz, δ (ppm), J (Hz), DMSO): 10.31 (t, 1H, $^3J = 6.0$, NH); 8.56 (s, 1H, H-2); 7.95 (d, 1H, $^3J_{H,F} = 13.2$, H-5); 7.83 (t, 1H, $^3J = 7.6$, H-14); 7.74 (m, 1H, H-12); 7.62 (m, 1H, H-11); 7.61 (s, 1H, H-24); 7.52 (t, 1H, $^3J = 7.2$, H-13); 7.41 (s, 2H, H-21/H-22); 6.30 (d, 1H, $^4J_{H,F} = 6.8$, H-8); 4.59 (d, 2H, $^3J = 6.4$, H-19); 3.50 (m, 4H, H-15); 3.00 (m, 4H, H-16); 1.95 (s, 3H, H-18)

^{13}C -NMR (100 MHz, δ (ppm), J (Hz), DMSO): 174.5 (C-4); 168.2 (C-17); 163.6 (C-3'); 156.7 (d, $^1J_{C,F} = 250$, C-10); 152.6 (d, $^1J_{C,F} = 240$, C-6); 147.5 (C-2); 144.5 (C-8'); 137.8 (C-4'); 135.5 (C-20); 133.1 (C-25); 132.5 (C-7); 132.3 (C-12); 130.5 (C-21); 129.7 (C-14); 128.6 (C-24); 127.3 (C-22); 127.2 (C-9); 126.2 (C-13); 120.4 (C-23); 117.3 (d, $^2J_{C,F} = 19$ Hz, C-11); 111.5 (C-5); 110.9 (C-3); 105.4 (C-8); 49.0/45.7 (C-16/ C-16'); 45.7 (C-15/C-15'); 38.9 (C-19); 20.9 (C-18);

6.3.24 Synthese von *N*-(2,4-Dichlorbenzyl)-6-fluor-1-(2-fluorphenyl)-7-(4-formylpiperazin-1-yl)-4-oxo-1,4-dihydrochinolin-3-carboxamid **32**

**32**

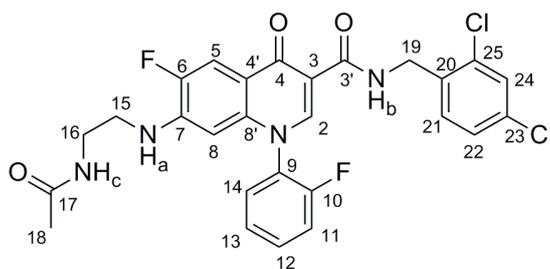
0.106 g (0.26 mmol) **21** werden mit 0.149 g (0.286 mmol) PyBOP und 0.132 g (0.751 mmol) 2,4-Dichlorbenzylamin in 5.0 ml abs. DMF versetzt und 18 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wird für 20 h auf 120 °C erhitzt. Nach dem Abkühlen wird das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der Rückstand zweimal über Kieselgel säulenchromatographisch gereinigt (Fließmittel 1: Ethylacetat : Ethanol = 4 : 1 (R_f = 0.78) Fließmittel 2: Ethylacetat : Ethanol = 5 : 1 (R_f = 0.59)).

Summenformel:	$C_{28}H_{22}Cl_2F_2N_4O_3$
Molekulargewicht:	571.4 g/mol
Schmelzpunkt:	115 °C
Ausbeute:	0.10 g (65%)
IR[cm^{-1}]:	1102, 1260, 1473, 1495, 1538, 1661, 3230
ESI [M+H] ⁺ :	m/z 570.8 (100%), m/z 513.7 (40.30%)

¹H-NMR (400 MHz, δ (ppm), J (Hz), DMSO): 10.30 (t, 1H, ³J = 6.0, NH); 8.58 (s, 1H, H-2); 8.01 (s, 1H, H-17); 7.95 (d, 1H, ³J_{H,F} = 13.2, H-5); 7.82 (t, 1H, ³J = 8.0, H-14); 7.74 (m, 1H, H-12); 7.61 (m, 1H, H-11); 7.60 (s, 1H, H-24); 7.52 (t, 1H, ³J = 7.2, H-13); 7.41 (s, 2H, H-21/ H-22); 6.32 (d, 1H, ⁴J_{H,F} = 6.4, H-8); 4.58 (d, 2H, ³J = 6.4, H-19); 3.47 (m, 4H, H-15/ H-15'); 3.00 (m, 4H, H-16/ H-16')

^{13}C -NMR (100 MHz, δ (ppm), J (Hz), DMSO): 174.5 (C-4); 163.6 (C-3'); 160.8 (C-17); 156.7 (d, $^1J_{\text{C,F}} = 250$, C-10); 152.6 (d, $^1J_{\text{C,F}} = 240$, C-6); 147.6 (C-2); 144.5 (C-8'); 137.7 (C-4'); 135.5 (C-20); 133.1 (C-25); 132.7 (C-7); 132.3 (C-12); 130.5 (C-21); 129.7 (C-14); 128.6 (C-24); 127.3 (C-22); 127.1 (C-9); 126.1 (C-13); 120.6 (C-23); 117.3 (d, $^2J_{\text{C,F}} = 19$ Hz, C-11); 111.5 (C-5); 110.9 (C-3); 105.8 (C-8); 49.7/48.8 (C-16/ C-16'); 44.2 (C-15/ C-15'); 39.6 (C-19)

6.3.25 Synthese von 7-((2-Acetamidoethyl)amino)-N-(2,4-dichlorbenzyl)-6-fluor-1-(2-fluorphenyl)-4-oxo-1,4-dihydrochinolin-3-carboxamid **33**



33

0.102 g (0.254 mmol) **25** werden mit 0.149 g (0.286 mmol) PyBOP und 0.132 g (0.751 mmol) 2,4-Dichlorbenzylamin in 5.0 ml abs. DMF versetzt und 19 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wird für 6 h auf 120 °C erhitzt. Nach dem Abkühlen wird das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der Rückstand mit einer Mischung aus Ethylacetat und Ethanol (4:1) versetzt. Der ausgefallene Feststoff wird abfiltriert, gewaschen und getrocknet.

Summenformel: $\text{C}_{27}\text{H}_{22}\text{Cl}_2\text{F}_2\text{N}_4\text{O}_3$

Molekulargewicht: 559.4 g/mol

Schmelzpunkt: 169 °C

Ausbeute: 0.05 g (33%)

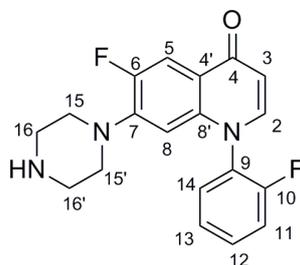
IR[cm^{-1}]: 802, 1189, 1305, 1454, 1491, 1527, 1630, 1721, 3277

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, δ (ppm), J (Hz), DMSO): 10.48 (t, 1H, $^3J=5.6$, NH_b); 8.44 (s, 1H, H-2); 7.93 (b, 1H, NH_c); 7.84 (d, 1H, $^3J_{\text{H,F}}=12.0$, H-5); 7.78-7.72 (m, 2H, H-14/ H-12); 7.63 (s, 1H, H-24); 7.60 (m, 1H, H-11); 7.49 (m, 1H, H-13); 7.42 (s, 2H, H-21/ H-22); 6.80 (b, 1H, NH_a); 5.90 (d, 1H, $^4J_{\text{H,F}}=7.2$, H-8); 4.58 (d, $2H^3J=5.6$, H-19); 3.13 (m, 2H, H-16); 2.94 (m, 2H, H-15); 1.74 (s, 3H, H-18)

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, δ (ppm), J (Hz), DMSO): 174.5 (C-4); 169.7 (C-17), 163.3 (C-3'); 156.7 (d, $^1J_{\text{C,F}}=250$, C-10); 152.6 (d, $^1J_{\text{C,F}}=240$, C-6); 146.7 (C-2); 144.5 (C-8'); 139.2 (C-4'); 135.6 (C-20); 135.0 (C-25); 133.0 (C-7); 132.3 (C-12); 130.4 (C-21); 129.6 (C-14); 128.5 (C-24); 127.3 (C-22); 127.1 (C-9); 126.7 (C-13); 120.6 (C-23); 117.0 (C-11); 110.9 (C-3); 109.0 (C-5); 94.9 (C-8); 41.9 (C-15); 39.6 (C-19); 36.9 (C-16); 22.0 (C-18)

6.3.26 Synthese von 6-Fluor-1-(2-fluorphenyl)-7-(piperazin-1-yl)chinolin-4(1H)-on

34



34

Es werden 58.0 mg (0.15 mmol) von Substanz **1** mit 2.9 ml 2 N Salzsäure versetzt und 7 d zum Rückfluss erhitzt. Anschließend wird die Reaktionslösung auf ein Drittel eingengt und mit 2 N Natronlauge auf pH 9 eingestellt. Anschließend wird dreimal mit Dichlormethan extrahiert und die vereinigten organischen Phasen im Vakuum bis zur Trockne eingengt. Der so erhaltene gelbe Feststoff wird in Wasser umkristallisiert.

Summenformel: $\text{C}_{19}\text{H}_{17}\text{F}_2\text{N}_3\text{O}$

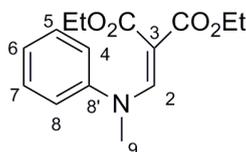
Molekulargewicht: 341.4 g/mol

Schmelzpunkt: 187-188 °C
 Ausbeute: 0.05 g (92%)
 IR[cm⁻¹]: 816, 1246, 1473, 1497, 1620, 3282

¹H-NMR (400 MHz, δ (ppm), J (Hz), DMSO): 7.91 (d, 1H, ³J = 7.84, H-2); 7.75 (d, 1H, ³J_{H,F} = 13.6, H-5); 7.73 (m, 1H, H-14); 7.70 (m, 1H, H-12); 7.60 (t, 1H, ³J_{H,F} = 8.8, H-11); 7.50 (t, 1H, ³J = 7.6, H-13); 6.19 (d, 1H, ⁴J_{H,F} = 6.1, H-8); 6.10 (d, 1H, ³J = 7.8, H-3); 2.83 (m, 4H, H-15/ H-15'); 2.76 (m, 4H, H-16/ H-16')

¹³C-NMR (100 MHz, δ (ppm), J (Hz), DMSO): 175.4 (C-4); 155.9 (C-10); 152.6 (d, ¹J_{C,F} = 240, C-6); 144.7 (C-7); 143.6 (C-2); 138.4 (C-8'); 132.2 (C-12); 130.1 (C-14); 127.9 (C-9); 126.1 (C-13); 120.0 (C-4'); 117.2 (d, ²J_{C,F} = 18.9, C-11); 110.8 (d, ²J_{C,F} = 22.5, C-5); 109.0 (C-3); 104.7 (C-8); 50.6 (C-15/ C-15'); 45.2 (C-16/ C-16')

6.3.27 Synthese von Diethyl-2-((methyl(phenyl)amino)methylen)malonat **35**¹⁴⁰



35

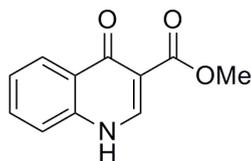
Analog Literatur.¹⁴⁰

Summenformel: C₁₅H₉NO₄
 Molekulargewicht: 277.3 g/mol
 Schmelzpunkt: Öl
 Ausbeute: 24.20 g (87%) [Lit.: 81%]¹⁴⁰
 IR [cm⁻¹]: 718, 1223, 1348, 1462, 1472, 1593, 1696, 2359, 2632

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, δ (ppm), J (Hz), DMSO): 7.64 (s, 1H, H-2); 7.41 (t, 2H, $^3J=8.4$, H-5/ H-7); 7.29-7.23 (m, 3H, H-4/ H-6/ H-8); 4.08 (q, 2H, $^3J=7.2$, H-3a); 3.91 (q, 2H, $^3J=7.2$, H-3a'); 3.31 (s, 3H, H-9); 1.17 (m, 6H, H-3b)

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, δ (ppm), J (Hz), DMSO): 165.9 (C-3'); 147.8 (C-2); 146.0 (C-8'); 129.3 (C-5/ C-7); 125.5 (C-6); 121.6 (C-4/ C-8); 97.5 (C-3); 60.7 (C-9); 60.1/59.4 (C-3a/ C-3a'); 14.2/13.7 (C-3b/ C-3b')

6.3.28 Synthese von Methyl-4-oxo-1,4-dihydrochinolin-3-carboxylat **39**



39

1.00 g (5.29 mmol) **2** werden mit 50 ml Methanol versetzt und mit konz. Salzsäure auf pH 2 eingestellt und für 2 d zum Rückfluss erhitzt. Nach Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum wird über Kieselgel mit einem Fließmittelgemisch bestehend aus Ethylacetat und Ethanol (2:1) säulenchromatographisch gereinigt.

Summenformel: $\text{C}_{11}\text{H}_9\text{NO}_3$
Molekulargewicht: 203.19 g/mol
Schmelzpunkt: 232-233 °C
Ausbeute: 0.30 g (28%)
IR[cm^{-1}]: 758, 804, 1205, 1294, 1373, 1443, 1476, 1533, 1590, 1615, 1711, 2980, 3047

Die spektroskopischen Daten entsprechen den in der in Literatur¹⁶⁹ mitgeteilten Daten.

7 ANHANG

Table 1 MS- und MSⁿ-Daten der Fragmentierung von Linezolid und seinen durch Fentons Reagenz erzeugten Metaboliten

Precursor ion	MS ²	MS ⁿ
296	195(- NH ₂ CH ₂ CHCH ₂ OCO) 252 (- COO) 278 (- H ₂ O)	151 (- CH ₂ CH ₂ O), 138 (- CH ₂ CH ₂ OCH) 221 (- H ₂ NCH ₂ CHCH ₂), 205 (- H ₂ NCH ₂ CHCH ₂ O) , 235 (- H ₂ NCH ₂ CH)
312	209 (- CH ₂ CO, -HOCH ₂ CH ₂ NH) 270 (- CH ₂ CO)	189 (- HF) 252 (- H ₂ O), 225 (- HOCH ₂ CH ₂), 169 (- NH ₂ CH ₂ CHCH ₂ OCO) (→151 (- H ₂ O)), 209 (- HOCH ₂ CH ₂ NH ₂)
320	177 (- CH ₂ CH ₂ OCH ₂ CH ₂ N, - CH ₂ CONH 276 (- CH ₂ CH ₂ O) 278 (- CH ₂ CO)	217 (- H ₃ CCONH ₂)
352	308 (- CH ₂ CH ₂ O) 310 (- CH ₂ CO)	207 (- H ₃ CCONHCH ₂ CHO), 252 (- NCH ₂ CO) 210 (- NCH ₂ CH ₂ OCOCH ₂)
354	310 (- CH ₂ CH ₂ O) 312 (- CH ₂ CO) 336 (- H ₂ O)	209 (- H ₃ CCONHCH ₂ CHO), 252 (- CH ₂ CHOHO) 210 (- CH ₂ CHOHO), 293 (- F)

Table 2 MS- und MSⁿ-Daten der Fragmentierung von Ciprofloxacin und seinen durch Fentons Reagenz erzeugten Metaboliten.

Precursor ion	MS ²	MS ⁿ
263	169 (- HF, - H ₂ O, - NH ₂ , - C ₃ H ₄) 204 (- F, - C ₃ H ₄) 219 (- COO) 245 (- H ₂ O)	
304	179 (- N(CH ₂ CH ₂) ₂ N, - C ₃ H ₅) 185 (- HF, - H ₂ O, - NCH ₂ CH ₂ , - C ₃ H ₄) 219 (- N(CH ₂ CH ₂) ₂ NH) 241 (- HF, - HNCH ₂ CH ₂) 262 (- NCH ₂ CH ₂) 286 (- H ₂ O)	
306	262 (- COO) 286 (- HF) 288 (- H ₂ O)	227 (- H ₂ NCH ₂ CH ₂ NH), 268 (- H ₂ O) (→240 (- CO))
318	199 (- H ₂ O, - H ₂ O, - HNCH ₂ CH ₂ , - C ₃ H ₄) 219 (- NCH ₂ CH ₂ , - OH, - C ₃ H ₄) 276 (- NCH ₂ CH ₂) 301 (- OH)	177 (- NCH ₂ CH ₂), 172 (- CH ₂ CH ₃ , - H ₂ O) 261 (- CH ₃), 172 (- CH ₂ CH ₂ , - H ₂ O, - H ₂ O, - C ₃ H ₄)
320	241 (- HF, - H ₂ O, - C ₃ H ₅) 262 (- H ₂ O, - C ₃ H ₄) 263 (- CH ₂ HNCH ₂ CH ₂) 282 (- HF, - H ₂ O) 300 (- HF)	
322	262 (- HF, - C ₃ H ₄) 278 (- COO) 304 (- H ₂ O)	203 (- H ₂ NCH ₂ CH ₂ NH)
346	204 (- COO, - CH ₂ NHCO, - C ₃ H ₅) 245 (- NCH ₂ CONHCH ₂ CH ₂) 285 (- HF, -C ₃ H ₅) 302 (- COO) 328 (- H ₂ O)	

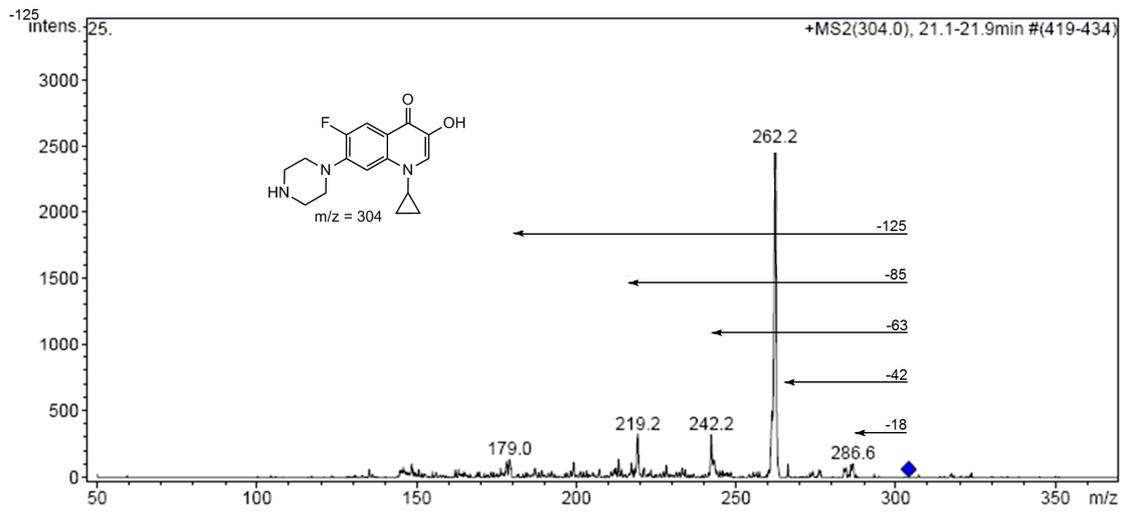


Abbildung 82 Produktions-Spektrum des Ciprofloxacinmetaboliten **C1d** mit m/z 304.

8 LITERATURVERZEICHNIS

- [1] E. Mutschler, G. Geisslinger, et al., Eds. (2001). Mutschler Arzneimittelwirkungen - Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie. Stuttgart, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH.
- [2] K. Fraatz, I. Heep, et al. (2010). Improved combination of active agents comprising an antibiotic and non-steroidal anti-inflammatory drug (NSAID). B. A. H. GmbH. Germany. **WO/2010/069493 (A1)**.
- [3] P. C. Appelbaum und P. A. Hunter (2000). "The fluoroquinolone antibacterials: past, present and future perspectives." Int. J. Antimicrob. Agents **16**: 5-15.
- [4] U. Petersen (2001). "Die Evolution der Chinolone: Von der Nalidixinsäure zu den Chinolonen der dritten Generation." Pharm. Unserer Zeit **30(5)**: 376-381.
- [5] A. M. Emmerson und A. M. Jones (2003). "The quinolones: decades of development and use." J. Antimicrob. Chemother. **51**(Suppl. S1): 13-20.
- [6] G. E. Stein (1988). "The 4-quinolone antibiotics: past, present and future." Pharmacotherapy **8**: 301-314.
- [7] U. Holzgrabe und P. Heisig (1999). "Neue 4-Chinolonderivate im Überblick." Pharm. Unserer Zeit **28(1)**: 30-35.
- [8] L. A. Mitscher (2005). "Bacterial Topoisomerase Inhibitors: Quinolone and Pyridone Antibacterial Agents." Chem. Rev. **105(2)**: 59-592.
- [9] F. Van Bambeke, J.-M. Michot, et al. (2005). "Quinolones in 2005: an update." Clin. Microbiol. Infect. **11(4)**: 256-280.

- [10] M. I. Andersson und A. P. MacGowan (2003). "Development of the quinolones." J. Antimicrob. Chemother. **51**(Suppl S1): 1-11.
- [11] T. Lu, X. Zhao, et al. (1999). "Gatifloxacin activity against quinolone-resistant gyrase: allele-specific enhancement of bacteriostatic and bactericidal activities by the C-8-methoxy group." Antimicrob. Agents Chemother. **43**: 2969-2974.
- [12] K. Naber und D. Adam (1998). "Einteilung der Fluorchinolone." Münch. Med. Wochenschr. **140**: 248-250.
- [13] J. Cairns (1963). "The chromosome of *Escherichia coli*." Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. **28**: 43-46.
- [14] P. Heisig und B. Wiedemann (2001). "Actio und Reactio: Wirkungs- und Resistenzmechanismen der Chinolone." Pharm. Unserer Zeit **30**(5): 382-393.
- [15] J. J. Champoux (2001). "DNA topoisomerases: structure, function, and mechanism." Annu. Rev. Biochem **70**: 369-413.
- [16] B. H. Schmidt, A. B. Burgin, et al. (2010). "A novel and unified two-metal mechanism for DNA cleavage by type II and IA topoisomerases." Nature **465**: 641-645.
- [17] E. Massé und M. Drolet (1999). "Relaxation of transcription-induced negative supercoiling is an essential function of *Escherichia coli* DNA topoisomerase I." J. Biol. Chem. **274**: 16654-16658.
- [18] M. Gellert, K. Mizuuchi, et al. (1976). "DNA gyrase: An enzyme that introduces superhelical turns into DNA." Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. **73**(11): 3872-3876.
- [19] L. L. Silver (2001). "Multi-targeting by monotherapeutic antibacterials." Nat. Rev. Drug Discov. **6**: 41-55.

- [20] J. A. Ali, G. Orphanides, et al. (1995). "Nucleotide binding to the 43-kilodalton N-terminal fragment of the DNA gyrase B protein." Biochemistry **34**: 9801-9808.
- [21] A. Fàbrega, S. Madurga, et al. (2009). "Mechanism of action of and resistance to quinolones." Microb. Biotechn. **2**(1): 40-61.
- [22] J. Piton, S. Petrella, et al. (2010). "Structural Insights into the Quinolone Resistance Mechanism of *Mycobacterium tuberculosis* DNA Gyrase." PLoS One **5**(8): e12245.
- [23] J. C. Wang (1996). "DNA Topoisomerases." Annu. Rev. Biochem. **65**: 635-692.
- [24] Q. Zhu, P. Pongpech, et al. (2001). "Type I topoisomerase activity is required for proper chromosomal segregation in *Escherichia coli*." Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. **98**: 9766-9771.
- [25] J. Kato, Y. Nishimura, et al. (1990). "New topoisomerase essential for chromosome segregation in *E. coli*." Cell **63**: 393-404.
- [26] C. Levine, H. Hiasa, et al. (1998). "DNA gyrase and topoisomerase IV: biochemical activities, physiological roles during chromosome replication, and drug sensitivities." Biochim. Biophys. Acta **1400**: 29-43.
- [27] C. Ullsperger und N. R. Cozzarelli (1996). "Contrasting enzymatic activities of topoisomerase IV and DNA gyrase from *Escherichia coli*." J. Biol. Chem. **271**(49): 31549-31555.
- [28] P. M. Hawkey (2003). "Mechanisms of quinolone action and microbial response." J. Antimicrob. Chemother. **51**(Suppl. S1): 29-35.

- [29] L. L. Shen, L. A. Mitscher, et al. (1989). "Mechanism of Inhibition of DNA gyrase by quinolone antibacterials: a cooperative drug-DNA binding model." Biochemistry **28**: 3886-3894.
- [30] S. Madurga, J. Sánchez-Céspedes, et al. (2008). "Mechanism of binding of fluoroquinolones to the quinolone resistance-determining region of DNA gyrase: towards an understanding of the molecular basis of quinolone resistance." ChemBioChem **9**(13): 2081-2086.
- [31] C. J. R. Willmott und A. Maxwell (1993). "A single point mutation in the DNA gyrase A protein greatly reduces binding of fluoroquinolones to the gyrase-DNA complex." Antimicrob. Agents Chemother. **37**(1): 126-127.
- [32] L. L. Shen und D. W. T. Chu (1996). "Typ II DNA Topoisomerase as Antibacterial Targets." Curr. Pharm. Des. **2**: 195-208.
- [33] S. C. Kampranis und A. Maxwell (1998). "Conformational changes in DNA gyrase revealed by limited proteolysis." J. Biol. Chem. **273**(35): 22606-22614.
- [34] K. Drlica, M. Malik, et al. (2008). "Quinolone-mediated bacterial death." Antimicrob. Agents Chemother. **52**(2): 385-392.
- [35] A. Wohlkonig, P. F. Chan, et al. (2010). "Structural basis of quinolone inhibition of type IIA topoisomerases and target-mediated resistance." Nat. Struct. Mol. Biol. **17**(9): 1152-1153.
- [36] B. D. Bax, P. F. Chan, et al. (2010). "Type IIA topoisomerase inhibition by a new class of antibacterial agents." Nature **466**: 935-943.
- [37] I. Laponogov, M. K. Sohi, et al. (2009). "Structural insight into the quinolone–DNA cleavage complex of type IIA topoisomerases." Nat. Struct. Mol. Biol. **16**(6): 667-669.

- [38] B. Wiedemann (1999). "Pharmakodynamik: Modell und Realität." CTJ **8** (Suppl. 18): 28-32.
- [39] L. L. Shen, S. K. Tanaka, et al. (1997). "Quinolones, 2-Pyridones and Resistant Type II DNA Topoisomerases." Curr. Pharm. Des. **3**: 169-176.
- [40] B. Wiedemann und P. Heisig (1999). "Bakterielle Resistenzen gegenüber Chinolonen (Ciprofloxacin)." CTJ **8**: 99-108.
- [41] N. Lehn, H.-J. Linde, et al. (2002). "Fluorchinolone: Mechanismen der Resistenzentwicklung." CTJ **11**(Suppl. 20): 15-17.
- [42] N. P. Brennwald, M. J. Gill, et al. (1998). "Prevalence of a Putative Efflux Mechanism among Fluoroquinolone-Resistant Clinical Isolates of *Streptococcus pneumoniae*." Antimicrob. Agents Chemother. **42**: 2032-2035.
- [43] F. R. Stermitz, P. Lorenz, et al. (2000). "Synergy in a medicinal plant: Antimicrobial action of berberine potentiated by 5'-methoxyhydrnocarpin, a multidrug pump inhibitor." Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. **97**: 1433-1437.
- [44] EFSA (2010). "The Community Summary Report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from animals and food in the European Union in 2008." EFSA Journal **8**(7): 1658.
- [45] M. Kresken, D. Hafner, et al. (2003). Resistenzsituation bei klinisch wichtigen Infektionserregern gegenüber Antibiotika in Deutschland und im mitteleuropäischen Raum. Bonn, Paul-Ehrlich-Gesellschaft für Chemotherapie e.V.
- [46] A. C. Rodloff, C. Eckhardt, et al. (1999). "Bedeutung der lokalen Resistenzsituation." CTJ **8** (Suppl. 18): 11-18.

- [47] K. Stroh (2002). "Antibiotika und Antibiotika-Resistenzen in Lebensmitteln und Umwelt." Fachinformation „Umwelt und Gesundheit“ von http://www.bayern.de/lfu/umwberat/data/archiv/antibiot_2002.htm.
- [48] H.-H. Frey und W. Löscher, Eds. (2002). Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie für die Veterinärmedizin. Stuttgart, Enke Verlag.
- [49] F. Sörgel, M. Kinzig-Schippers, et al., Eds. (1996). Sparfloxacin bei der Behandlung von ambulant erworbenen tiefen Atemwegsinfektionen - Grundlagen und Standortbestimmungen. Aktuelle pharmakokinetische Aspekte der Gyrasehemmer - Beziehung der Kinetik zur Struktur und physikalisch-chemischen Eigenschaften. München, Futuramed Verlag.
- [50] F. Sörgel (1989). "Metabolism of gyrase inhibitors." Rev. Infect. Dis. **11**: 1119-1129.
- [51] H. Kubinyi (1999). "Chance Favors the Prepared Mind - From Serendipity to Rational Drug Design." J. Recept. Signal Transduct. **19**: 15-39.
- [52] T. I. Oprea, A. M. Davis, et al. (2001). "Is There a Difference between Leads and Drugs? A Historical Perspective." J. Chem. Inf. Comput. Sci. **41**: 1308-1315.
- [53] J. Hodgson (2001). "ADMET - turning chemicals into drugs." Nat. Biotechnol. **19**: 722-726.
- [54] L. J. Nisbet und M. Moore (1997). "Will natural products remain an important source of drug research for the future?" Curr. Opin. Biotechnol. **8**(6): 708-712.
- [55] R. B. Merrifield (1985). "Solid phase synthesis." Angew. Chem. **24**: 799-810.

- [56] L. V. Hijfte, G. Marciniak, et al. (1999). "Combinatorial chemistry, automation and molecular diversity: new trends in the pharmaceutical industry." J. Chromatogr. B **725**: 3-15.
- [57] L. J. Gershell und J. H. Atkins (2003). "A brief history of novel drug discovery technologies." Nat. Rev. Drug Discov. **2**(4): 321-327.
- [58] C. A. Lipinski, F. Lombardo, et al. (1997). "Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings." Adv. Drug Del. Rev. **23**: 3-25.
- [59] C. A. Lipinski (2000). "Drug-like properties and the causes of poor solubility and poor permeability." J. Pharmacol. Toxicol. Methods **44**: 235-249.
- [60] S. J. Teague, A. M. Davis, et al. (1999). "Design kombinatorischer Leitstruktur-Bibliotheken." Angew. Chem. **111**(24): 3962-3967.
- [61] E. Bürgisser und G. Folkers (1994). Random generation and bio-specific selection of chemical compounds. PCT. I. Appl. Schweiz. **WO/1994/029719**.
- [62] G. Folkers, U. Kessler, et al. (2000). Thymine derivatives that possess antiviral and antitumoral effects. PCT. I. Appl. Schweiz. **WO/2000/73281**.
- [63] P. Kapkovà, E. Heller, et al. (2005). "Random Chemistry as a New Tool for the Generation of Small Compound Libraries: Development of a New Acetylcholinesterase Inhibitor." J. Med. Chem. **48**: 7496-7499.
- [64] G. Folkers und U. Kessler (2003). "Random Chemistry: look for the unexpected." Curr. Drug Disc. **1**: 1-4.

- [65] P. Kapkovà, E. Heller, et al. (2006). "Random Chemistry as a New Tool for the Generation of Small-Compound Libraries." Arch. Pharm. (Weinheim). **339**: 489-497.
- [66] B. Y. Feng und B. K. Shoichet (2006). "Synergy and Antagonism of Promiscuous Inhibition in Multiple-Compound Mixtures." J. Med. Chem. **49**: 2151-2154.
- [67] S. U. Choi und N. N. Lichtin (1964). "The Radiolysis of Methanol and Methanolic Solutions. III." J. Am. Chem. Soc. **86**(19): 3948-3953.
- [68] S. P. Ramnani, S. Dhanya, et al. (1997). "Pulse radiolytic studies on the reactions of some oxidizing and reducing radicals with sulfanilamide in aqueous medium." Radiat. Phys. Chem. **50**(3): 277-282.
- [69] T. S. Singh, B. S. Madhava Rao, et al. (2002). "A pulse radiolysis study of coumarin and its derivatives." J. Photochem. Photobiol. A: Chem. **153**: 163-171.
- [70] H. J. H. Fenton (1894). "Oxidation of Tartaric Acid in presence of Iron." J. Chem. Soc. Trans. **65**: 899-910.
- [71] F. Haber und J. Weiss (1934). "The Catalytic Decomposition of Hydrogen Peroxide by Iron Salts." Proc. R. Soc. London, Ser. A **147**: 332-351.
- [72] C. Walling (1957). Free Radicals in Solution. New York, Wiley.
- [73] E. Hecker und G. Nowoczek (1966). "Radical hydroxylation of 6-tetralol with Fenton's reagent." Z. Naturforsch. B **21**(2): 153-160.
- [74] E. Kugelmann und U. Holzgrabe (2008). "Generation of small-compound libraries via random chemistry by Fenton's reagent." Arkivoc **11**: 247-255.

[75] U. Kessler, Ed. (2000). Random synthesis and biological characterisation of nucleosid analogues - New perspectives for drug discovery. Zürich, ETHZ.

[76] P. Kapková (2004). Dissertation, "Biologische Untersuchungen zu Inhibitoren der Acetylcholinesterase und Erzeugung von neuen Leitstrukturen mittels Random Chemistry." Würzburg.

[77] K. Grohe und H. Heitzer (1987). "Synthese von 4-Chinolon-3-carbonsauren." Liebigs Ann. Chem. **1**: 29-37.

[78] D. T. W. Chu, P. B. Fernandes, et al. (1985). "Synthesis and Structure-Activity Relationships of Novel Arylfluoroquinolone Antibacterial Agents." J. Med. Chem. **28**(11): 1558-1564.

[79] J. Jürgens (1994). Dissertation, "Synthese, mikrobiologische Testung und Ableitung quantitativer Struktur-Wirkungsbeziehungen N-1 Arylsubstituierter Fluoroquinolone." Bonn.

[80] J. Jürgens, H. Schedletzky, et al. (1996). "Syntheses and Biological Activities of New N₁-Aryl Substituted Quinolone Antibacterials." Arch. Pharm. (Weinheim), **329**(4): 179-190.

[81] T. E. Renau, J. P. Sanchez, et al. (1995). "Effect of Lipophilicity at N-1 on Activity of Fluoroquinolones against Mycobacteria." J. Med. Chem. **38**: 2974-2977.

[82] P. Ganapati Reddy und S. Baskaran (2001). "Microwave assisted amination of quinolone carboxylic acids: an expeditious synthesis of fluoroquinolone antibacterials." Tetrahedron Lett. **42**: 6775-6777.

[83] R. G. Gould und W. A. Jacobs (1939). "The Synthesis of Certain Substituted Quinolines and 5,6-Benzoquinolines." J. Am. Chem. Soc. **61**(10): 2890-2895.

- [84] E. Leyva, E. Monreal, et al. (1999). "Synthesis of fluoro-4-hydroxyquinoline-3-carboxylic acids by the Gould-Jacobs reaction." J. Fluorine Chem. **94**: 7-10.
- [85] E. Büyükbingöl, N. Das, et al. (1994). "Synthesis of 1,4-Dihydro-4-oxo-quinoline-3-carboxylic Acid Derivatives as Inhibitors of Rat Lens Aldose Reductase." Arch. Pharm. (Weinheim). **327**: 129-131.
- [86] C. C. Price und R. M. Roberts (1946). "The Synthesis of 4-Hydroxyquinolones. I. Through Ethoxymethylenemalonic Ester." J. Am. Chem. Soc. **68**(7): 1204-1208.
- [87] J. Goldsworthy, W. J. Ross, et al. (1982). Quinolone derivatives and their use as pharmaceuticals. European Patent Office. L. I. LTD. Great Britain. **EP0055068 (A1)**
- [88] M. Grootveld und B. Halliwell (1986). "An aromatic assay for hydroxyl radicals utilizing high-performance chromatography (HPLC). Use to investigate the effect of EDTA on the Fenton Reaction." Free Radic. Res. Commun. **1**(4): 243-250.
- [89] C. P. Baron, H. H. Refsgaard, et al. (2006). "Oxidation of bovine serum albumin initiated by the Fenton reaction - effect of EDTA, *tert*-butylhydroperoxide and tetrahydrofuran." Free Radic. Res. Commun. **40**(4): 409-417.
- [90] H. Matsufuji und T. Shibamoto (2004). "The Role of EDTA in Malonaldehyde Formation from DNA Oxidized by Fenton Reagent Systems." J. Agric. Food. Chem. **52**: 3136-3140.
- [91] European Pharmacopoeia Commission (2008). Norfloxacin Monograph 1248. European Pharmacopoeia **6.2**. Strasbourg, Council of Europe.
- [92] G. Carlucci (1998). "Analysis of fluoroquinolones in biological fluids by high-performance liquid chromatography." J. Chromatogr. A **812**(1-2): 343-367.

- [93] J. J. Kirkland (1996). "Practical method development strategy for reversed-phase HPLC of ionizable compounds." LC-GC **14**: 486-500.
- [94] S. Zhao, H. Jiang, et al. (2007). "Simultaneous Determination of Trace Levels of 10 Quinolones in Swine, Chicken, and Shrimp Muscle Tissues Using HPLC with Programmable Fluorescence Detection." J. Agric. Food. Chem. **55**: 3829-3834.
- [95] M. K. Hassouan, O. Ballesteros, et al. (2007). "Multiresidue determination of quinolone antibacterials in eggs of laying hens by liquid chromatography with fluorescence detection." J. Chromatogr. B **852**: 625-630.
- [96] M. Ferdig, A. Kaleta, et al. (2005). "Improved liquid chromatographic determination of nine currently used (fluoro)quinolones with fluorescence and mass spectrometric detection for environmental samples." J. Sep. Sci. **28**(13): 1448-1456.
- [97] Macherey-Nagel (2009). "NUCLEOSIL® C18 AB." von <http://www.mn-net.com/HPLCStart/NUCLEOSILphases/NUCLEOSILC18AB/tabid/6122/language/DE-DE/Default.aspx>.
- [98] H. P. Tang, C. Ho, et al. (2006). "High-throughput screening for multi-class veterinary drug residues in animal muscle using liquid chromatography/tandem mass spectrometry with on-line solid-phase extraction." Rapid Commun. Mass Spectrom. **20**(17): 2565-2572.
- [99] D. A. Volmer, B. Mansoori, et al. (1997). "Study of 4-Quinolone Antibiotics in Biological Samples by Short-Column Liquid Chromatography Coupled with Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry." Anal. Chem. **69**: 4143-4155.
- [100] E. Turiel, G. Bordin, et al. (2005). "Study of the evolution and degradation products of ciprofloxacin and oxolinic acid in river water samples by HPLC-UV/MS/MS-MS." J. Environ. Monit. **7**(3): 189-195.

- [101] A. Brandt und S. Kueppers (2002). "Practical Aspects of Preparative HPLC in Pharmaceutical Development and Production." LCGC North America **20**(1): 14-22.
- [102] U. Huber (2000). "Preparative separation of binary compound mixture-recovery of pure compounds and solvent consumption." von <http://www.chem.agilent.com/Library/applications/59880638.pdf>.
- [103] U. Huber (2000). "Semi-preparative purification of synthesis products with the Agilent highthroughput analysis system." von <http://www.chem.agilent.com/Library/applications/59801660.pdf>.
- [104] Macherey-Nagel (2009). "NUCLEOSIL® Standard C18 Phasen." von <http://www.mn-net.com/tabid/6128/default.aspx>.
- [105] Phenomenex (2010). "Synergi™ Max-RP HPLC Columns." von <http://www.phenomenex.com/cms400min/synergimaxrphplc.aspx>.
- [106] H. G. Wetzstein, M. Stadler, et al. (1999). "Degradation of Ciprofloxacin by Basidiomycetes and Identification of Metabolites Generated by the Brown Rot Fungus *Gloeophyllum striatum*." Appl. Environ. Microbiol. **65**(4): 1556-1563.
- [107] T. G. Vasconcelos, D. M. Henriques, et al. (2009). "Photo-degradation of the antimicrobial ciprofloxacin at high pH: Identification and biodegradability assessment of the primary by-products." Chemosphere **76**(4): 487-493.
- [108] H. Zhang und C.-H. Huang (2005). "Oxidative Transformation of Fluoroquinolone Antibacterial Agents and Structurally Related Amines by Manganese Oxide." Environ. Sci. Technol. **39**(12): 4474-4483.

- [109] B. Dewitte, J. Dewulf, et al. (2008). "Ozonation of Ciprofloxacin in Water: HRMS Identification of Reaction Products and Pathways." Environ. Sci. Technol. **42**(13): 4889-4895.
- [110] P. Calza, C. Medana, et al. (2008). "Characterization of intermediate compounds formed upon photoinduced degradation of quinolones by high-performance liquid chromatography/high-resolution multiple-stage mass spectrometry." Rapid Commun. Mass Spectrom. **22**(10): 1533-1552.
- [111] J. B. Schilling, S. P. Cepa, et al. (1996). "Liquid Chromatography Combined with Tandem Mass Spectrometry for the Confirmation of Sarafloxacin in Catfish Tissue." Anal. Chem. **68**(11): 1905-1909.
- [112] M. Hesse, H. Meier, et al., Eds. (2005). Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie. Stuttgart, Georg Thieme Verlag.
- [113] W. Karl, J. Schneider, et al. (2006). "Outlines of an "exploding" network of metabolites generated from the fluoroquinolone enrofloxacin by the brown rot fungus *Gloeophyllum striatum*." Appl. Microbiol. Biotechnol. **71**: 101-113.
- [114] S. Niedermeier, K. Singethan, et al. (2009). "A Small-Molecule Inhibitor of Nipah Virus Envelope Protein-Mediated Membrane Fusion." J. Med. Chem. **52**(14): 4257-4265.
- [115] H. Koga, A. Itoh, et al. (1980). "Structure-Activity Relationships of Antibacterial 6,7- and 7,8-Disubstituted-1-Alkyl-1,4-dihydro-4-oxoquinoline-3-carboxylic Acids." J. Med. Chem. **23**(12): 1358-1363.
- [116] P. A. D'Agostino, J. R. Hancock, et al. (1995). "Electrospray Mass Spectrometric Characterization of Fluoroquinolone Antibiotics: Norfloxacin, Enoxacin, Ciprofloxacin and Ofloxacin." Rapid Commun. Mass Spectrom. **9**(11): 1038-1043.

- [117] S. Massari, D. Daelemans, et al. (2009). "Studies on anti-HIV quinolones: New insights on the C-6 position." Bioorg. Med. Chem. **17**(2): 667-674.
- [118] O. Tabarrini, C. Sissi, et al. (2000). "6-Hydroxy Derivative as New Desfluoroquinolone (DFQ): Synthesis and DNA-Binding Study." Nucleosides Nucleotides Nucl. Acids **19**(8): 1327-1336.
- [119] E. Fasani, F. F. Barberis Negra, et al. (1999). "Photoinduced C-F Bond Cleavage in Some Fluorinated 7-Amino-4-quinolone-3-carboxylic Acids." J. Org. Chem. **64**: 5388-5395.
- [120] M. C. Cuquerella, F. Boscá, et al. (2004). "Photonucleophilic Aromatic Substitution of 6-Fluoroquinolones in Basic Media: Triplet Quenching by Hydroxide Anion." J. Org. Chem. **69**(21): 7256-7261.
- [121] C. A. Ogle, T. E. Wilson, et al. (1990). "A Convenient One-Pot Method for the Hydroxymethylation of Grignard Reagents." Synthesis **6**: 495-496.
- [122] F. Wormstädt, U. Brinckmann, et al. (2000). "Synthesis of Acyclic Nucleoside Phosphonates as Antiviral Compounds." J. Heterocycl. Chem. **37**(5): 1187-1191.
- [123] X.-J. Liu, R.-Y. Chen, et al. (2004). "Synthesis and Antitumor Activity of Novel 1-(2'-Alkyl(or phenyl)thioethoxy)methyl-5-fluorouracils and Their Oxidation Products." Heteroat. Chem. **15**(7): 543-548.
- [124] T. Kishida, T. Yamauchi, et al. (2004). "Rare-earth metal triflates as versatile catalysts for the chloromethylation of aromatic hydrocarbons." Green Chem. **6**(1): 57-62.
- [125] H. C. Brown und K. L. Nelson (1953). "An Interpretation of Meta Orientation in the Alkylation of Toluene. The Relative Reactivity and Isomer Distribution in the

Chloromethylation and Mercuration of Benzene and Toluene." J. Am. Chem. Soc. **75**(24): 6292-6299.

[126] H. H. Szmant und J. Dudek (1949). "Relative Chloromethylation Rates of Some Aromatic Compounds." J. Am. Chem. Soc. **71**(11): 3763-3765.

[127] A. Link, P. Heidler, et al. (2009). "Synthesis of a series of N⁶-substituted adenosines with activity against trypanosomatid parasites." Eur. J. Med. Chem. **44**(9): 3665-3671.

[128] N. Tsiakopoulos, C. Damianakos, et al. (2002). "Syntheses of crowned polyamines using isolable succinimidyl esters of N-tritylated linear amino acids and peptides." Arkivoc **13**: 79-104.

[129] S. E. Sen und S. L. Roach (1995). "A Convenient Two-Step Procedure for the Synthesis of Substituted Allylic Amines from Allylic Alcohols." Synthesis **7**: 756-758.

[130] M. S. Gibson und R. W. Bradshaw (1968). "Gabriel-Synthese primärer Amine." Angew. Chem. **80**(23): 986-996.

[131] J. Klöckner, J. Schmitz, et al. (2010). "Convergent, short synthesis of the muscarinic superagonist iperoxo." Tetrahedron Lett. **51**(27): 3470-3472.

[132] V. A. Loskutov und S. A. Nekhoroshev (2002). "Acetylation of 2-(1-Piperaziny)- and 2-Morpholino-1,4-dihydroxyanthraquinones." Russ. J. Org. Chem. **38**(10): 1519-1524.

[133] Y. M. Al-Hiari, I. S. Al-Mazari, et al. (2007). "Synthesis and Antibacterial Properties of New 8-Nitrofluoroquinolone Derivatives." Molecules **12**(6): 1240-1258.

- [134] R. Griera und M. Alvarez (1995). "Nucleophilic Substitution of 7-Chloro-1-Methyl-4-Quinolone." Synth. Commun. **25**(17): 2507-2513.
- [135] R. Schohe-Loop, H. Zimmermann, et al. (2007). Substituted Quinolones II. European Patent Office. Deutschland. **WO/2007/003308**.
- [136] S. Niedermeier (2010). Dissertation, "4-Chinolone als Ausgangspunkt für antiparasitäre und antivirale Wirkstoffe." Würzburg.
- [137] T. Baltz, D. Baltz, et al. (1985). "Cultivation in a semi-defined medium of animal infective forms of *Trypanosoma brucei*, *T. equiperdum*, *T. evansi*, *T. rhodesiense* and *T. gambiense*." EMBO J. **4**(5): 1273-1277.
- [138] W. Huber und J. C. Koella (1993). "A comparison of three methods of estimating EC₅₀ in studies of drug resistance of malaria parasites." Acta Trop. **55**(4): 257-261.
- [139] B. Rätz, M. Iten, et al. (1997). "The Alamar Blue assay to determine drug sensitivity of African trypanosomes (*T.b. rhodesiense* and *T.b. gambiense*) in vitro." Acta Trop. **68**(2): 139-147.
- [140] D. G. Markees und L. S. Schwab (1972). "The Synthesis and Some Reactions of N-Alkyl-4-Quinolone-3-Carboxylic Acids." Helv. Chim. Acta **55**(4): 1319-1326.
- [141] J. A. Williams, R. Hyland, et al. (2004). "Drug-drug interactions for UDP-glucuronosyltransferase substrates: A pharmacokinetic explanation for typically observed low exposure [AUC_i/AUC] ratios." Drug Metab. Disposition **32**(11): 1201-1208.
- [142] F. P. Guengerich (2007). "Mechanisms of Cytochrome P450 Substrate Oxidation: MiniReview." J. Biochem. Mol. Toxicol. **21**(4): 163-168.

- [143] F. P. Guengerich und T. Shimada (1991). "Oxidation of toxic and carcinogenic chemicals by human cytochrome P-450 enzymes." Chem. Res. Toxicol. **4**(4): 391-407.
- [144] P. R. Ortiz de Montellano und J. J. De Voss (2005). Cytochrome P450: Structure, Mechanism, and Biochemistry. New York, KluwerAcademic/Plenum Publishers.
- [145] S. Shaik, D. Kumar, et al. (2005). "Theoretical Perspective on the Structure and Mechanism of Cytochrome P450 Enzymes." Chem. Rev. **105**(6): 2279-2328.
- [146] J. H. Dawson (1988). "Probing Structure-Function Relations in Heme-Containing Oxygenases and Peroxidases." Science **240**: 433-439.
- [147] T. Johansson, L. Weidolf, et al. (2007). "Mimicry of phase I drug metabolism – novel methods for metabolite characterization and synthesis." Rapid Commun. Mass Spectrom. **21**: 2323-2331.
- [148] W. Lohmann und U. Karst (2008). "Biomimetic modeling of oxidative drug metabolism." Anal. Bioanal. Chem. **391**: 79-96.
- [149] W. Blaschek, S. Ebel, et al. (2009). Hagers Handbuch der Drogen und Arzneistoffe. Heidelberg, Springer Medizin Verlag.
- [150] G. Kammann, G. Dietz, et al. (1987). Verfahren zur Reinigung von 1-Ethyl-6,7-methylenedioxy-4(1H)-oxo-cinnolin-3-carbonsäure. Deutschland. **DD 247001 A1**.
- [151] G. van Vyncht, A. Jànosi, et al. (2002). "Multiresidue determination of (fluoro)quinolone antibiotics in swine kidney using liquid chromatography–tandem mass spectrometry." J. Chromatogr. A **952**: 121-129.
- [152] R. Wolen, B. D. Obermeyer, et al. (1978). Drug metabolism and pharmacokinetic studies in man utilising nitrogen-15- and deuterium-labelled drugs: the metabolic fate of

cinoxacin and the metabolism and pharmacokinetics of proxyphene. Stable Isotopes: Applications in Pharmacology, Toxicology and Clinical Research. T. A. Baillie. Baltimore, University Park Press. **20**: 113-125.

[153] I. A. Parshikov, J. D. Moody, et al. (2002). "Transformation of cinoxacin by *Beauveria bassiana*." FEMS Microbiol. Lett. **214**: 133-136.

[154] K. Borner, E. Borner, et al. (2001). "Determination of linezolid in human serum and urine by high-performance liquid chromatography." Int. J. Antimicrob. Agents **18**(3): 253-258.

[155] L. M. Boak, J. Li, et al. (2006). "High-performance liquid chromatographic method for simple and rapid determination of linezolid in human plasma." Biomed. Chromatogr. **20**(8): 782-786.

[156] F. Sörgel, J. Bulitta, et al. (2001). Chemie, Pharmakokinetik und Pharmakodynamik von Linezolid. Oxazolidinone – Aktuelle Erkenntnisse zu einer neuen Klasse von Antibiotika. C. von Eiff. Wessobrunn, Socio-medico Verlag: 59-96.

[157] O. A. Phillips, M. Abdel-Hamid, et al. (2001). "Determination of linezolid in human plasma by LC-MS-MS." Analyst **126**(5): 609-614.

[158] H. Y. Ji, H. W. Lee, et al. (2004). "Liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the determination of a new oxazolidinone antibiotic DA-7867 in human plasma." Biomed. Chromatogr. **18**(2): 86-89.

[159] Y. H. Kim, H. Y. Ji, et al. (2007). "Determination of a selective Na⁺/H⁺ exchanger inhibitor, 4-cyano(benzo[*b*]thiophene-2-carbonyl)guanidine (KR-33028) in rat plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry." Biomed. Chromatogr. **21**(8): 810-815.

- [160] W. Y. Song, N. J. Kim, et al. (2009). "Liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the determination of jaceosidin in rat plasma." J. Pharm. Biomed. Anal. **49**(2): 381-386.
- [161] G. J. Krol, G. W. Beck, et al. (1995). "HPLC analysis of ciprofloxacin and ciprofloxacin metabolites in body fluids." J. Pharm. Biomed. Anal. **14**: 181-190.
- [162] A. Anadón, M. R. Martínez-Larranaga, et al. (2001). "Pharmacokinetics and residues of ciprofloxacin and its metabolites in broiler chickens." Res. Vet. Sci. **71**(2): 101-109.
- [163] F. Sörgel, J. Bulitta, et al. (2001). "Wie gut wirken Gyrasehemmer? Pharmakokinetik der Chinolone." Pharm. Unserer Zeit **30**(5): 418-427.
- [164] W. Gau, J. Kurz, et al. (1986). "Isolation and Structural Elucidation of Urinary Metabolites of Ciprofloxacin." Arzneim.Forsch. **36**: 1545-1549.
- [165] A. Albini und S. Monti (2003). "Photophysics and photochemistry of fluoroquinolones." Chem. Soc. Rev. **32**(4): 238-250.
- [166] M. T. Donato und J. V. Castell (2003). "Strategies and Molecular Probes to Investigate the Role of Cytochrome P450 in Drug Metabolism." Clin. Pharmacokinet. **42**(2): 153-178.
- [167] S. Härtter (2000). "In vitro Methoden zur Untersuchung des Phase-I Metabolismus." Pharm. Unserer Zeit **29**(6): 365-371.
- [168] L. I. Bebawy (2003). "Stability-indicating methods for the determination of linezolid in the presence of its alkaline-induced degradation products." Talanta **60**(5): 945-953.

- [169] L. Zalibera, V. Milata, et al. (1998). ^1H and ^{13}C NMR spectra of 3-substituted 4-quinolones." Magn. Reson. Chem. **36**(9): 681-684.

9 DANKSAGUNG

Die vorliegende Arbeit entstand im Zeitraum von September 2006 bis Oktober 2010 am Institut für Pharmazie und Lebensmittelchemie der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg auf Anregung und unter Anleitung von

Frau Prof. Dr. Ulrike Holzgrabe

Ich danke ihr für ihre Unterstützung, die interessante und abwechslungsreiche Aufgabenstellung, die vielen Anregungen und ihre immerwährende Gesprächsbereitschaft sowie das in mich gesetzte Vertrauen, das mir die Möglichkeit für ein selbständiges Arbeiten gab und damit die erfolgreiche Erstellung dieser Arbeit ermöglichte.

Weiterhin danken möchte ich

Dem Teilprojekt Z1 des Sonderforschungsbereichs 630 für die zahlreichen Testungen an verschiedenen Mikroorganismen.

Dem gesamten AK Holzgrabe für die gute Stimmung in den Kaffeepausen, beim Mittagessen, den Feten und den zahlreichen Weinproben.

Christine Topf, Michaela Prinz, Christina Juli, Benjamin Schaefer, Petra Kapková, Florian Diwischek, Benjamin Waibel, Darius Zlotos und Eberhard Heller für die gemeinsame Zeit und die vielen interessanten Gespräche während der Praktikumsaufsicht im 4. Semester.

Meinen Mädels, Doris Brunner, Jennifer Bauer, Monika Herb und Astrid Sunderkötter, die mich durchs Studium begleitet haben und denen ich verdanke, den Blick fürs Wesentliche nicht verloren zu haben. Danke für die zahlreichen gemeinsamen Abende,

die unzähligen Gespräche und das gegenseitige Aufbauen, wenn die Chemie, die Männer oder das Leben uns mal wieder in den Wahnsinn trieb!

Andreas Hartung, Tim Göbel und Christoph Albert, die mir durch zahlreiche intensive Gespräche in den letzten Jahren zu guten Freunden wurden. Danke dafür und für die Tatsache, dass die Freundschaften zu Jungs meist deutlich problemloser verlaufen.

Florian Diwischek, für die vielen Stunden endloser Gespräche, die damit einhergehende Hilfe in allen Lebenslagen und die dadurch entstandene Freundschaft!

Claudia Borst und Jessica Klöckner, meinen Anlaufstellen im stressigen Laboralltag. Ohne eure Freundschaft, eure so häufig gleiche Sicht der Dinge und die damit verbundenen Gespräche sowie eure Unterstützung wären die letzten Jahre viel langweiliger, nervenaufreibender und weniger lustig gewesen! Danke fürs immer Dasein!

Meinen Geschwistern, Diana, Dominik, Barbara und Anita, auf die ich immer und überall zählen kann. Trotz unserer Unterschiede, erkenne ich doch immer wieder unsere vielen Gemeinsamkeiten. Unser Zusammenhalt in schwierigen Situationen macht uns stark, lasst uns das nie verlieren! Ich bin immer bei euch!

Meinen Eltern, die mir beide - einzeln und zusammen - ein immerwährendes Vorbild und ein ständiger Ansporn sind und waren, in allen Lebenslagen nur nach dem Bestmöglichen zu Streben und die mit ihrer immerwährenden Unterstützung, die Grundpfeiler meines Lebens sind.

Michael, für seine Kraft in diesen schweren Zeiten, mit der er mir ein ständiger Halt ist, für seinen Humor, der mir dasselbe ist, seine Gelassenheit und unglaubliche Geduld, wenn mein Temperament mit mir durchgeht und die Grenzen, die er mir in solchen Fällen setzt. Danke und auf 2x26!