

Design und Synthese von Matrix Metalloproteinase Inhibitoren mit 1,2,4-Triazin-Grundgerüst

Dissertation

zur Erlangung des naturwissenschaftlichen Doktorgrades
an der Universität Bielefeld

vorgelegt von
Tim Fischer
aus Elsterwerda

Arbeitsgruppe Prof. Dr. H. Tschesche
Biochemie I, Fakultät für Chemie
Universität Bielefeld
September 2004

Danksagung

An erster Stelle gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. H. Tschesche für die freundliche Überlassung des interessanten Themas, der Bereitstellung des Arbeitsplatzes und der finanziellen Mittel sowie seinem steten Interesse am Fortgang der Arbeit.

Weiterhin danke ich Herrn Prof. Dr. N. Sewald für die freundliche Übernahme des Koreferats.

Herrn Dr. H. Wenzel und Herrn R. Beckmann danke ich für die ständige Hilfsbereitschaft bei wissenschaftlichen und technischen Fragen. Mein besonderer Dank gilt Dr. H. Wenzel für das Lesen des Skripts.

Matze und Peterchen danke ich für Ihre engagierte Arbeit, ohne die eine Fertigstellung dieser Arbeit in der vorliegenden Form nicht möglich gewesen wäre.

Für das hervorragende Arbeitsklima danke ich dem gesamten Arbeitskreis BC I von Herrn Prof. Dr. H. Tschesche. Dieses wurde maßgeblich vom Brummi-Sklaven, Firefighter, Marktleiter oder Bademeister positiv geprägt und wird mir immer in guter Erinnerung bleiben.

Frau M.L. Wilke und K. Böker danke ich für die gute Zusammenarbeit und die Bereitstellung der Enzyme.

Für die hervorragende und fruchtbare Zusammenarbeit danke ich Dr. med. M. Kapischke der onkologischen Abteilung der Universität Kiel sowie seinen MitarbeiterInnen.

Herrn Prof. Dr. J. Wienands und seinen MitarbeiterInnen danke ich für die gute Zusammenarbeit.

Herrn P. Mester danke ich für die Durchführung der vielen NMR-Spektren, Herrn Dr. M. Letzel, E. Westermeier und Frau Sandra Heitkamp für das Messen der Massenspektren sowie Frau B. Michel für die Durchführung der CHN-Analysen.

Ein besonderer Dank gilt meiner Familie, ohne deren Unterstützung und Verständnis meine Ausbildung nicht möglich gewesen wäre. Mein ganz spezieller Dank gilt Claudia für Ihre Geduld und Ihren Einsatz während der gesamten Promotionszeit.

1	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	1
2	EINLEITUNG	2
2.1	Die extrazelluläre Matrix	2
2.2	Die Matrixmetalloproteinasen	4
2.2.1	Domänenstruktur der MMPs	5
2.2.2	Aktivierung und Regulation der MMPs.....	11
2.2.3	Biologische Funktionen	13
2.2.4	Inhibierung der MMPs.....	14
2.3	Synthetische Inhibitoren	16
3	ERGEBNISSE UND DISKUSSION	24
3.1	Leitstruktur und deren Modifizierung	24
3.1.1	1,2,4-Triazine.....	24
3.2	Inhibitoren vom 1,2,4 - TRIAZIN-Typ.....	26
3.2.1	Modifizierung der Amino-Gruppe.....	26
3.2.2	Modifizierung der 5-Methyl-Gruppe	28
3.2.3	Inhibitoren mit 1,2,4-Triazin-Kern	29
3.3	Inhibitoren vom AZAURACIL-Typ	31
3.3.1	Syntheseweg 1	31
3.3.2	Syntheseweg 2	33
3.4	Röntgenstrukturanalyse.....	37
3.5	Wirksamkeit im orthotopen Pankreaskarzinom-Modell.....	39
3.6	<i>In vitro</i> Messungen	39
3.7	<i>In vivo</i> Messungen.....	43
3.8	Metabolische Stabilität	45
3.9	Einordnung der Ergebnisse in den medizinischen Kontext.....	46
4	ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK.....	48
5	EXPERIMENTELLER TEIL	51
5.1	Allgemeine Methoden, verwendete Geräte.....	51

5.2	Chromatographie.....	51
5.2.1	Dünnschichtchromatographie	51
5.2.2	HPLC	51
5.3	Spektroskopie	52
5.4	Massenspektrometrie.....	52
5.5	Elementaranalysen.....	53
5.6	Röntgenstrukturanalyse.....	53
5.7	Hemmtest.....	53
5.7.1	Bestimmung der K_i -Werte	54
5.7.2	MMPs.....	55
5.8	<i>In vitro</i> und <i>in vivo</i> Messungen	56
5.8.1	Zellen	56
5.8.2	<i>In vitro</i> Zellwachstumsassay.....	56
5.8.3	Invasions Assay	57
5.8.4	Versuchstiere	58
5.8.5	Orthotopes Mäuse Pankreaskrebs-Modell	58
5.9	Messung der metabolischen Stabilität gegenüber Lebermikrosomen	58
5.9.1	Materialien, Lösungen	58
5.9.2	Stabilitätsmessung	59
5.10	Darstellung <i>N</i>-{[(1,2,4-triazin-3-yl)amino]carbonyl}-benzenesulfonamide. 61	
5.11	Darstellung 6-methyl-5-(phenylsulfonyl)-1,2,4-triazin-3-amine.....	63
5.12	Darstellung der Inhibitoren mit 1,2,4-Triazin-Kern	65
5.13	Darstellung der Inhibitoren vom 6-Azurazil-Typ.....	68
5.14	Darstellung der Inhibitoren vom 6-Azurazil-Typ über Sulfonsäurederivate	76
5.14.1	Darstellung von 4-(Acetylamino)benzolsulfinsäure.....	76
6	LITERATURLISTE	87
7	ANHANG	100

1 Abkürzungsverzeichnis

Å	Angström
ADAM	<i>a disintegrin and metalloproteinase</i>
APMA	p-Aminophenyl-Quecksilberacetat
CA	<i>cysteine array</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
Dpa	3-(2,4-Dinitrophenyl)-L-2,3-diaminopropionyl
ECM	extrazelluläre Matix
ESI	<i>electronspray ionisation</i>
FCS	<i>fetal calf serum</i>
GPI	glykosylphosphatidylinositol
HEPES	2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]ethansulfonsäure
Mca	(7-Methoxycoumarin-4-yl)-acetyl
MMP	Matrix Metalloproteinase
MMPI	Matrix Metalloproteinase Inhibitor
MT-MMP	membranständige Matrix Metalloproteinase
NMR	<i>nuclear magnetic resonance</i>
ORTEP	<i>Oak Ridge Thermal-Ellipsoid Plot Program</i>
p.A.	<i>pro analysis</i>
PEG	Polyethylenglykol
ppm	<i>parts per million</i>
Scid	<i>severe combined immunodeficiency</i>
TFA	Trifluoressigsäure
TIMP	<i>tissue inhibitor of metalloproteinase</i>
TMS	Trimethylsilan
uPA	Urokinase-Plasminogenaktivator
uPAR	Urokinase-Plasminogenaktivator Rezeptor
ZBF	Zinkbindende Funktion

2 Einleitung

2.1 Die extrazelluläre Matrix

In höheren Organismen sind Organe bzw. verschiedene Gewebeverbände aus einer Vielzahl von Zellen aufgebaut. Die Morphologie und die physikalischen Eigenschaften dieser Gewebe wird dabei jedoch nicht von den Zellen selbst, sondern von dem sie umgebenden Medium, der extrazellulären Matrix, bestimmt. Diese extrazelluläre Matrix kann je nach Gewebetyp und dessen Aufgaben die verschiedensten Formen annehmen und in ihrer Zusammensetzung erheblich variieren. So findet man neben den kollagenreichen Sehnen, welche eine enorme Zugfestigkeit aufweisen, eine durchsichtige Matrix in der vorderen Augenhornhaut oder ein durch Kalzifizierung hervorgerufenes hartes Gewebe in den Zähnen und Knochen. Dabei kann die extrazelluläre Matrix innerhalb eines Gewebetyps mehr Raum einnehmen, als die Zellen, welche von ihr umgeben werden. Als Beispiel sei das Bindegewebe genannt, welches bei Wirbeltieren als Strukturgerüst im Körper fungiert und in Knochen oder Haut fast ausschließlich zu finden ist. Demgegenüber stellt Bindegewebe nur einen geringen Anteil an der Gesamtmasse des Gehirns¹ oder des Rückenmarks. Die Variabilität in Funktion und Struktur der extrazellulären Matrix wird ermöglicht durch mehr als 100 verschiedene Makromolekülarten:

Man unterscheidet zwei Hauptklassen, die Proteoglykane und die Faserproteine². Proteoglykane enthalten Polysaccharide, welche an ein Proteingerüst gebunden sind. Auf Grund ihrer hydrophilen Eigenschaften können sie durch Einlagerung von interstitieller Flüssigkeit hydratisierte Gele bilden. Dieser gelartige Aufbau ist dafür verantwortlich, dass Ionen, Nährstoffe, Metabolite und Botenstoffe durch diese Matrix diffundieren können³.

Die Faserproteine lassen sich je nach Funktion in Adhäsionsmoleküle, wie z.B. Laminin oder Fibronectin und Strukturproteine, wie z.B. Kollagen oder Elastin, einteilen. Adhäsionsmoleküle vermitteln die Anheftung von Zellen an die sie umgebende Matrix; sie können jedoch auch nur mit Matrixkomponenten wechselwirken. Durch die

Bindungsmöglichkeit von Fibronectin an Integrine, Proteoglykane, Laminin und Kollagen können sich Zellen durch die extrazelluläre Matrix entlang von Kollagenbahnen fortbewegen. Derartige Mechanismen sind beispielsweise während der Embryonalentwicklung von besonderer Bedeutung. Demgegenüber verleihen Strukturproteine der Matrix besondere mechanische Eigenschaften, wie z.B. Stabilität durch Kollagen oder Elastizität durch Elastin. Mit einem Anteil von 25 % in Säugetieren stellen die Kollagene die häufigsten Proteine überhaupt dar. Die Synthese der Kollagene beginnt in den Fibroblasten und man findet eine Vielzahl von Kollagentypen (Fibrilläre Kollagene, z.B. Typ I, II und III, oder netzbildende Kollagene z.B. Typ IV), deren Vernetzung und Anordnung die Grundlage für die Morphologie und die Eigenschaften der Gewebe bildet.

Der oben beschriebene komplexe Aufbau wie auch die aktive Rolle der extrazellulären Matrix bei Entwicklung, Funktion, Form, Bewegung und Stoffwechsel der Zellen macht ein dynamisches, fein reguliertes System notwendig, welches für Auf-, Ab-, und Umbau der einzelnen Komponenten der Matrix verantwortlich ist. Der Abbau von strukturellen Makromolekülen des interstitiellen Bindegewebes kann dabei auf verschiedenen Wegen erfolgen. Nichtmineralisierte Komponenten können über einen MMP-abhängigen, einen Plasmin-abhängigen oder einen Serinproteinasen-abhängigen Stoffwechselweg abgebaut werden⁴. Mineralisierte Komponenten werden über einen osteoklastischen Stoffwechselweg, d.h. unter Beteiligung von Cysteinproteinasen, abgebaut⁵. Die exakte Regulierung von Auf- und Abbau zeigt sich in physiologischen Prozessen, z.B. der Wundheilung, der Angiogenese oder der Embryogenese. Eine Störung des Gleichgewichts von Auf- und Abbau zeigt sich beispielsweise bei rheumatoider Arthritis, Tumorwachstum, Metastasierung oder Zirrhose. Bei diesen pathologischen Ereignissen kann ein verstärkter Abbau bzw. Aufbau der extrazellulären Matrix beobachtet werden.

2.2 Die Matrixmetalloproteinasen

Die Matrixmetalloproteinasen (MMPs, Matrixine) gehören neben den Astacinen, den Serralysinen sowie den Adamalysinen/ADAMs zu den Metzinkinen⁶⁻⁹. Diese Bezeichnung wurde auf Grund der Ähnlichkeiten in der Topologie dieser Enzymfamilie 1993 vorgeschlagen¹⁰. Bei allen Vertretern handelt es sich um Endopeptidasen, welche ihre proteolytische Aktivität extrazellulär mit Hilfe eines im aktiven Zentrum befindlichen Zink-Ions entwickeln. Darüber hinaus weisen alle Enzyme als ein gemeinsames Strukturmerkmal die Aminosäuresequenz HExxHxxGxxH in der Zinkbindungsregion auf, sowie eine konservierte 1,4- β -Schleife (*Met-turn*), welche ein konserviertes Methionin enthält¹¹.

Eine der frühesten Erwähnungen von MMPs geht auf das Jahr 1949 zurück, in welchem Gersh et al. ein depolymerisierendes Enzym fanden, von welchem sie annahmen, dass dieses Enzym das Tumorwachstum beschleunigen konnte, indem es die „connective tissue stroma“ von „small blood vessels“ durchlässiger machte. Dreizehn Jahre später wurde die erste Vertebraten MMP, Kollagenase, isoliert und charakterisiert als das Enzym, welches für die Resorption des Schwanzes der Kaulquappe verantwortlich ist¹². Derzeit umfasst die Familie der Matrixmetalloproteinasen 28 Enzyme, von welchen 22 im humanen Gewebe vorkommen. Als proteolytisch aktive Proteine sind sie am Aufbau bzw. der Degradation von Proteinen der extrazellulären Matrix, zu denen z.B. Kollagene, Glykoproteine (wie Laminin, Fibronectin und Entaktin), Proteoglykane und Glukosamine zählen, beteiligt. Auf Grund ihrer breiten Substratspezifität spielen MMPs in vielen physiologischen, aber auch pathologischen Prozessen eine entscheidende Rolle.

Die Spezifität der verschiedenen MMPs gegenüber unterschiedlichen Komponenten der extrazellulären Matrix führte zu einer Einteilung dieser Enzyme in Kollagenasen, Gelatinasen, Stromelysine und Matrilysine (siehe Tabelle 2.1).

MMP	Enzym	Substrat
MMP-1	Fibroblasten Kollagenase	Fibrilläres und nicht fibrilläres Kollagen (Typ I, II, III, VI, X), Gelatin
MMP-2	Gelatinase A, 72 kDa Gelatinase	Basement Membran und nicht fibrilläres Kollagen (Typ IV, V, VII, X), Fibronectin, Elastin
MMP-3	Stromelysin-1	Proteoglykane, Laminin, Fibronectin, Kollagen (Typ III, IV, V, IX), Gelatin, pro-MMP-1
MMP-7	Matrilysin (PUMP)	Fibronectin, Gelatin, Proteoglykane, pro-MMP-1
MMP-8	Neutrophile Kollagenase	Fibrilläres Kollagen (Typ I, II, III)
MMP-9	Gelatinase B, 92 kDa Gelatinase	Basement membran kollagen (Typ I, IV), Gelatin
MMP-10	Stromelysin-2	Fibronectin, Kollagen (Typ III, IV), Gelatin, pro-MMP-1
MMP-11	Stromelysin-3	Serpine
MMP-12	Metalloelastase	Elastin
MMP-13	Kollagenase-3	Fibrilläres Kollagen (Typ I, II, III), Gelatin
MMP-14	MT1-MMP	Pro-MMP-2
MMP-15	MT2-MMP	-
MMP-16	MT3-MMP	Pro-MMP-2
MMP-17	MT4-MMP	-
MMP-18	Kollagenase-4	-
MMP-19	RASI 1	Gelatin
MMP-20	Enamelysin	Amelogenin, Gelatin

Tab. 2.1 Einteilung der Matrixmetalloproteinasen ausgehend von ihrer Substratspezifität

Da jedoch die Liste der Substrate in der Vergangenheit erweitert worden ist und die MMPs eine hohe Homologie in ihrer Proteinsequenz, sowie eine definierte Domänenstruktur aufweisen¹³, werden heutzutage die strukturellen Merkmale der MMPs zur Klassifizierung herangezogen¹⁴. Im Jahr 1994 konnten Röntgenstrukturanalysen der MMP-1 und MMP-8 erstmals erfolgreich durchgeführt werden. Derzeit sind die Strukturen der katalytischen Domänen der MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-7, MMP-8, MMP-9, MMP-11, MMP-12, MMP-13, MMP-14 sowie der humanen pro MMP-2 und der MMP-1 des Schweines bekannt¹⁵⁻²⁵.

2.2.1 Domänenstruktur der MMPs

Wie in Abbildung 2.1 zu erkennen ist, teilt man die MMPs in acht Klassen ein, von denen fünf sezernierte Enzyme und drei membranständige Proteine umfassen: Minimaldomän MMPs, einfache hämopexinähnliche Domänen enthaltende MMPs, gelatinbindende MMPs, furinaktivierte MMPs und vitronektinähnliche MMPs gehören zu den sezernierten MMPs. Die membrangebundenen MMPs umfassen die Typ I

transmembranen MMPs (MT-MMPs), die glykosylphosphatidylinositol gebundenen MMPs (GPI-MMPs) und die CA (*cysteine array*) transmembrane MMP.

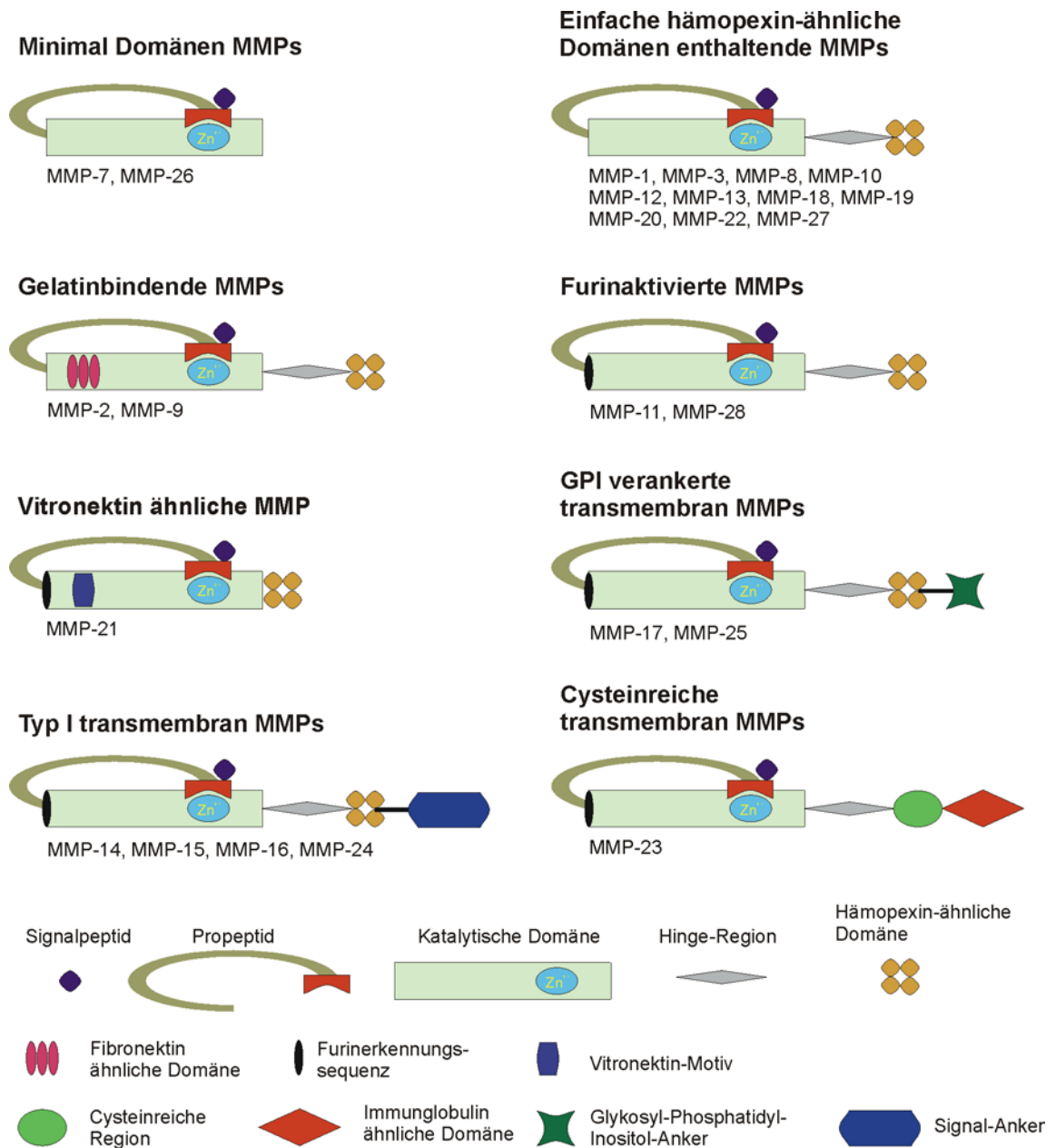


Abb. 2.1 Domänenstruktur der Matrixmetalloproteinasen

2.2.1.1 Das Signalpeptid

Alle MMPs werden als Prä-Proenzyme intrazellulär synthetisiert und anschließend in den extrazellulären Raum als inaktive Proenzyme sezerniert. Das etwa 25 Aminosäuren große hydrophobe Signalpeptid ist für die Sekretion verantwortlich und wird während diesen Vorgangs abgespalten.

2.2.1.2 Das Propeptid

Die folgende, etwa 80 Aminosäuren umfassende Propeptiddomäne besitzt das hochkonservierte Motiv PRCGVPG. Um die Latenz des Enzyms aufrecht zu erhalten, wird das anfänglich ungepaarte Cystein dieses Motivs derart gegenüber dem Zink-Ion des aktiven Zentrums positioniert, dass die Thiol-Gruppe die vierte Koordinationsstelle des Zink-Ions besetzen kann. Dadurch wird das für die katalytische Aktivität essentielle Wassermolekül aus dem katalytischen Zentrum verdrängt. Die Aktivierung der Enzyme kann auf verschiedenen Wegen, z.B. durch Oxidation, Proteolyse oder mit Hilfe von Quecksilberverbindungen geschehen. Der zugrunde liegende Mechanismus ist als *cysteine-switch* bekannt²⁶.

2.2.1.3 Die Furin-Spaltstelle

Die MMP-11 und MMP-28 besitzen am C-terminalen Ende des Propeptids ein Erkennungsmotiv für furin-ähnliche Serinproteasen und können vor der Sekretion in den extrazellulären Raum aktiviert werden²⁷. Dieses Motiv wird auch bei den vitronektin-ähnlichen MMPs (MMP-20) sowie bei den MT-MMPs gefunden.

2.2.1.4 Die Katalytische Domäne

Auf das Propeptid folgt die katalytische Domäne. Dieser Sequenzabschnitt umfaßt ca. 170 Aminosäuren und beherbergt die für die katalytische Aktivität essentiellen Metall-Ionen. Die Gelatinasen verfügen darüber hinaus über einen etwas 175 Aminosäuren großen eingeschobenen Abschnitt. Diese Domäne besteht aus drei zum Typ II – Motiv der kollagenbindenden Domäne des Fibronektins homologen Sequenzen und ist vor dem Zinkbindungsmotiv positioniert und für die Substratspezifität der Gelatinasen verantwortlich²⁸. Grundsätzlich unterscheiden sich die katalytischen Domänen der MMPs nur unwesentlich. Alle beherbergen im aktiven Zentrum das Zink-Bindungsmotiv HELGHxxGxxH, in welchem die drei für die Bindung essentiellen Histidine positioniert sind, sowie einen für die Proteolyse wichtigen Glutaminsäurerest²⁹. Neben dem für die Katalyse verantwortlichen Zink-Ion findet man ein weiteres strukturelles Zink-Ion³⁰, sowie je nach MMP ein, zwei oder drei Calcium-Ionen³¹, welche ebenfalls strukturstabilisierenden Charakter besitzen und für das proteolytische Potential der Enzyme essentiell sind. Die gesamte Domäne zeigt als Raumstruktur ein fünfsträngiges β -Faltblatt, wobei der katalytische Spalt durch einen für die Aktivität essentiellen „Met-turn“, eine α -Helix sowie einen β -Strang gebildet wird.

Der vermutete katalytische Mechanismus, welcher der Proteolyse zugrunde liegt, wurde 1994 auf Basis von Röntgenstrukturanalysen vorgeschlagen^{32,33} und ist in Abbildung 2.2 schematisch dargestellt.

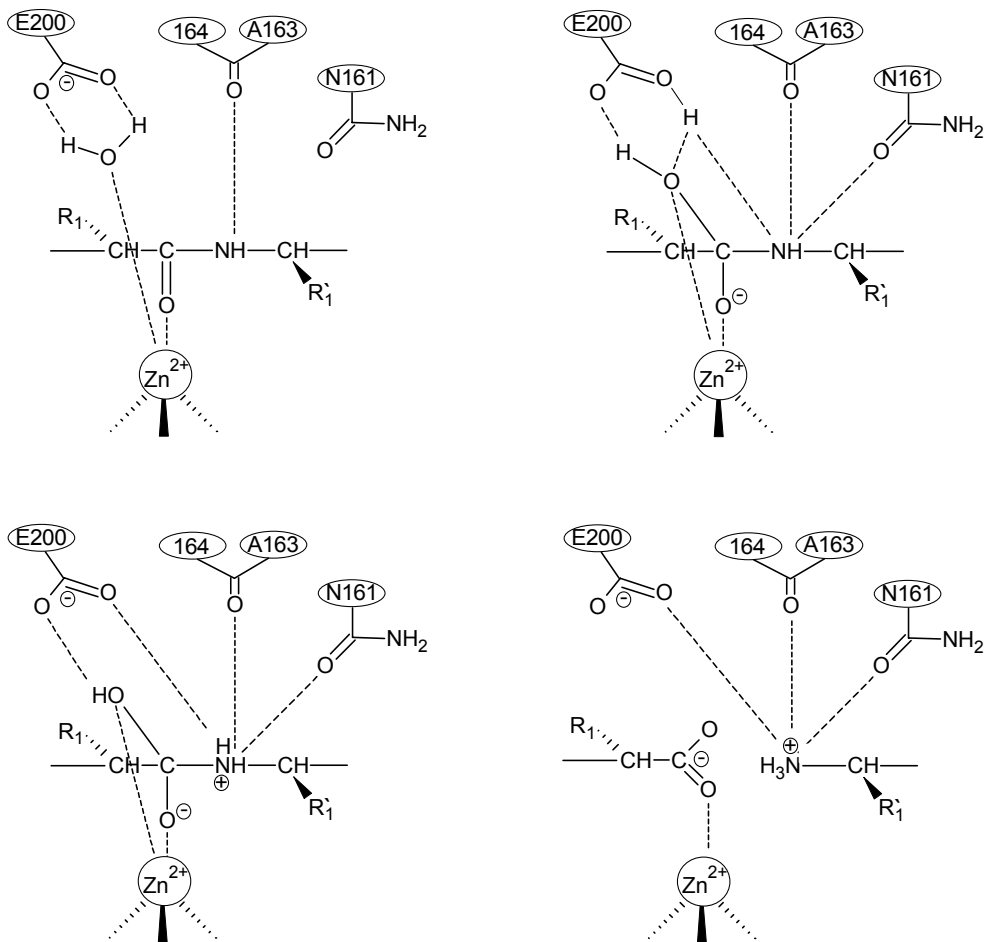


Abb. 2.2 Schematische Darstellung des Katalysemechanismus nach Lovejoy et al. 1994

Dabei wird das Substratmolekül in das katalytische Zentrum derart eingelagert, dass der Sauerstoff der Carbonylgruppe der zu spaltenden Bindung an das katalytische Zink-Ion koordiniert. Der Carbonyl-Kohlenstoff wird anschließend von einem Wassermolekül nucleophil angegriffen, welches sowohl von Wasserstoffbrücken zu einem konservierten Glutamatrest als auch dem katalytischen Zink-Ion stabilisiert wird. Während der Katalyse überträgt der Glutamatrest beide Wasserstoffe des Wassermoleküls auf das Stickstoffatom der zu spaltenden peptidischen Bindung. Die positive Ladung des Zink-Ions stabilisiert während der Katalyse die negativ geladene Carbonyl-Gruppe der zu spaltenden Bindung, während der konservierte Alaninrest die positive Ladung des Stickstoffs stabilisiert.

2.2.1.5 Die hämopexinähnliche Domäne

Bei fast allen MMPs schließt sich C-terminal an die katalytische Domäne eine hämopexinähnliche Domäne an. Als Linker fungiert eine prolinreiche, flexible Verbindungsregion, die hinge-Region. Die hämopexinähnliche Domäne weist ca. 200 Aminosäuren auf und besitzt die Form eines vierblättrigen Propellers. Jedes Propellerblatt besteht aus einer α -Helix sowie vier antiparallelen β -Strängen³⁴. Die hämopexinähnliche Domäne ist für die Substratspezifität verantwortlich, hat jedoch keine Auswirkung auf die Aktivität der MMPs^{35,36}. Darüber hinaus beeinflusst diese Domäne die Bindung der TIMPs an die MMP³⁷.

2.2.1.6 Die Transmembran-Domäne

Derzeit sind 3 Vertreter von membrangebundenen MMPs bekannt. MT1-MMP (MMP-14) wurde 1994 erstmals beschrieben, wobei gleichzeitig deren Fähigkeit entdeckt wurde, pro-MMP-2 auf der Zelloberfläche von invasiven Lungen-Karzinom-Zellen zu aktivieren³⁸. Die Untergruppe der membrangebundenen MMPs kann, ausgehend von der unterschiedlichen Verankerung in der Membran in drei Gruppen eingeteilt werden. MT1-MMP, MT2-MMP, MT3-MMP und MT5-MMP gehören zur Gruppe der Typ-I-transmembran-MMPs, welche neben der Transmembran-Domäne eine etwa 20 Aminosäuren lange cytoplasmatische Domäne aufweisen. Demgegenüber weist MMP-23 (CA-MMP) eine cysteinreiche Domäne auf und besitzt N-terminal der Pro-Domäne eine hydrophobe Region von 17 Aminosäuren, welche für die Verankerung in der Membran verantwortlich ist³⁹. Die dritte Untergruppe bilden MT4-MMP und MT6-MMP⁴⁰, welche durch einen Glykosylphosphatidylinositol-Anker (GPI-Anker) mit der Membran verbunden sind. Dabei wird die Verankerung von zwei bis drei im GPI-Anker vorhandenen Fettsäuren bewerkstelligt.

2.2.2 Aktivierung und Regulation der MMPs

Fast alle MMPs werden als latente Proenzyme in den extrazellulären Raum sezerniert und anschließend aktiviert. Ausnahmen bilden MMP-11 und MMP-14, für welche eine intrazelluläre Aktivierung nachgewiesen werden konnte^{27,41}. Mit einiger Wahrscheinlichkeit können auch membranständige MMPs intrazellulär aktiviert werden, da auch bei ihnen die RR(K/R)R-Sequenz C-terminal der Prodomäne gefunden werden kann, welche als Erkennungsmotiv für Mitglieder der Proprotein-Convertasen (z.B. Furin) dient.

Die sezernierten Zymogene können *in vivo* durch Proteinasen oder *in vitro* chemisch aktiviert werden. Die chemische Aktivierung geschieht mit Hilfe von Thiol-modifizierenden Agenzien wie Quecksilber(II)chlorid oder 4-Aminoquecksilberacetat (APMA). Diese Verbindungen reagieren mit dem Cysteinrest des Propeptids, welches die vierte Koordinationsstelle des Zink-Ions im aktiven Zentrum besetzt. Dadurch wird die Verbindung gelöst und das für die katalytische Aktivität essentielle Wassermolekül kann diese Stelle besetzen. Im Folgenden kommt es zur intramolekularen Spaltung des Propeptids und anschließender voller Aktivierung durch intermolekulare Abspaltung des verbleibenden Propeptid-Restes⁴².

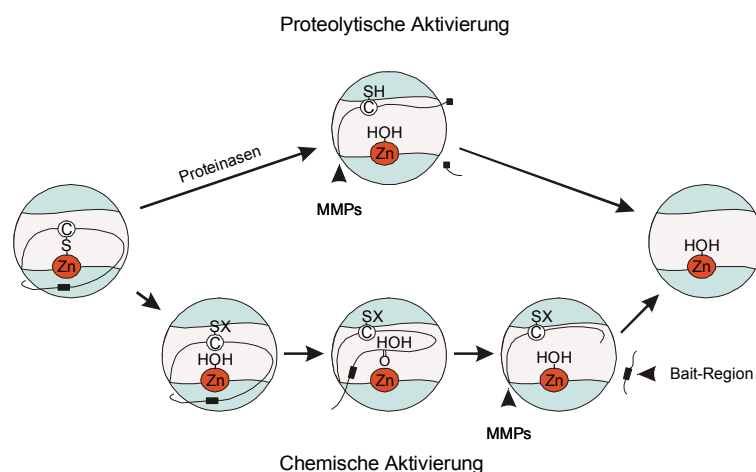


Abb. 2.3 Schematische Darstellung des *cysteine switch* Aktivierungsmechanismus

Die proteolytische *in vivo* Aktivierung der MMPs erfolgt durch Spaltung des Propeptids in der Bait-Region. Die Sequenz dieser Region findet man in allen MMPs. Nach dem

Entfernen eines Teils des Propeptids wird vermutlich die verbleibende Propeptid-Domäne einschließlich des *cysteine switch* destabilisiert. Dies hat zur Folge, dass das essentielle Wasser-Molekül die vierte Koordinationsstelle des Zink-Ions besetzen kann. Die Abspaltung des verbleibenden Propeptid-Restes erfolgt durch teilaktivierte oder aktive MMP. Dieser Aktivierungsmechanismus wurde von van Wart 1990 als *cysteine switch* formuliert.

Eine Ausnahme bildet pro-MMP-2. Die Aktivierung dieser MMP erfolgt auf der Zelloberfläche mit Hilfe aller MT-MMPs, ausgenommen MT4-MMP und CA-MMP. Besonders gut wurde die Aktivierung mit MT1-MMP untersucht. Hier bindet pro-MMP-2 an einen Komplex von MT1-MMP/TIMP-2 auf der Zelloberfläche. Nach Anlagerung einer weiteren MT1-MMP erfolgt die Aktivierung.

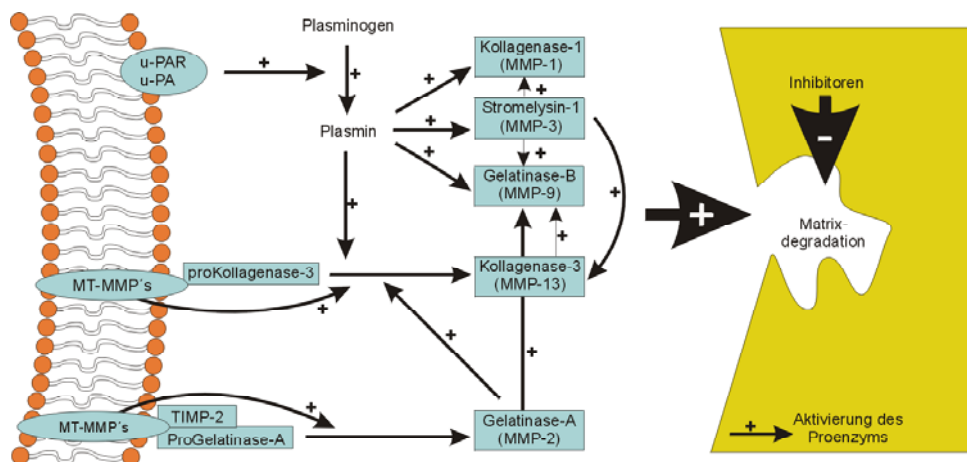


Abb. 2.4 Aktivierung und Wirkung von Matrixinen

Pro-MMPs können neben der Aktivierung durch MT-MMPs auch durch den Urokinase Plasminogen Aktivator in ihre aktive Form übergeführt werden. Abbildung 2.4 zeigt die entsprechende Aktivierungskaskade. Hier wird deutlich, dass Schlüsselenzyme häufig mit der Zelloberfläche verbunden sind. Nach erfolgter Aktivierung wird die Wirkung, in diesem Fall die Proteolyse, durch Ausschüttung entsprechender Inhibitoren gesteuert.

2.2.3 Biologische Funktionen

Die Untersuchungen bezüglich *in vitro* Substraten der Matrixine haben in den letzten Jahren ein Ausmaß erreicht, dass die Zahl von potentiellen Substraten unüberschaubar geworden ist. Daher wird eine entsprechende Liste dieser Zielmoleküle als nur mäßig relevant für die tatsächliche *in vivo* Situation erachtet. Demgegenüber ist nur sehr wenig über die natürlichen Substrate der MMPs unter *in vivo* Bedingungen bekannt. Teilweise gehen Autoren wissenschaftlicher Publikationen davon aus, dass derzeit keine gesicherte Aussage über die natürlichen Substrate der MMPs gemacht werden kann. Auf Grund der angenommenen Relevanz der MMPs bei der Degradation der extrazellulären Matrix wurde ein Hauptaugenmerk der Untersuchungen auf die entsprechenden Struktur-moleküle der ECM gelegt. In jüngerer Vergangenheit konnte das Spektrum von potentiellen MMP-Substraten erweitert werden. So wurden z.B. Bindungsproteine für Wachstumsproteine, wie das IGF-Bindungsprotein 3 oder Serinproteinase-Inhibitoren wie α_1 -Proteinaseinhibitor (α_1 -PI) oder α_1 -Antichymotrypsin MMP-Substratcharakter zugesprochen⁴³⁻⁴⁶. Allerdings konnte eine physiologische Relevanz der proteolytischen Spaltung dieser Moleküle noch nicht aufgeklärt werden. Das breite Substratspektrum gibt jedoch einen Hinweis darauf, dass den MMPs eine weitergehende Bedeutung zukommt, als bisher angenommen.

Nach derzeitigem Kenntnisstand spielen MMPs bei vielen physiologischen aber auch pathologischen Prozessen eine entscheidende Rolle. Die Bedeutung ist in den meisten Prozessen auf eine Umstrukturierung der extrazellulären Matrix zurückzuführen. Das feinregulierte Gleichgewicht von Auf- und Abbau der Bestandteile der ECM ist in pathologischen Prozessen gestört, so dass die Degradation der ECM in den Vordergrund tritt. Sowohl physiologische als auch pathologische Prozesse lassen sich in drei Gruppen unterteilen. So sind MMPs bei der Reproduktion, z.B. der Ovulation⁴⁷ und Menstruation⁴⁸ oder der Entwicklung, z.B. Embryonalentwicklung⁴⁹ und Zahnbildung⁵⁰, beteiligt. Darüber hinaus sind z.B. auch Knochenumbau und Wundheilung⁵¹, d.h. Prozesse zur Strukturhaltung der ECM mit der proteolytischen Aktivität der MMPs verknüpft.

Zu den pathologischen Prozessen zählen Tumorwachstum und Metastasierung, rheumatoide Arthritis oder Zahnerkrankungen. Hierbei wird eine massive Gewebeerstörung⁵²⁻⁵⁵ beobachtet. Zur zweiten Gruppe, welche mit einer Schwächung der Matrix einhergeht, zählen z.B. aortische Aneurysmen⁵⁶ oder Herzversagen⁵⁷. Schließlich bilden fibrotische Erkrankungen die dritte Gruppe pathologischer Prozesse. Beispiele in diesem Zusammenhang sind Leberfibrosen⁵⁸ oder multiple Sklerose⁵⁹.

2.2.4 Inhibierung der MMPs

Die Beteiligung der MMPs an vielen physiologischen Prozessen macht eine exakte Regulierung ihrer Aktivität unerlässlich. Man kann zwischen zwei Klassen von endogenen Inhibitoren der MMPs unterscheiden. Die erste Klasse wird von unspezifischen Inhibitoren gebildet, als Beispiel sei α_2 -Makroglobulin genannt. Diese Proteine gehören zur Klasse der Endopeptidase-Inhibitoren und als solche werden die meisten Proteinaseen inhibiert. Dabei wird die Bait-Region des Inhibitors proteolytisch gespalten und anschließend die MMP durch das Makroglobulin aufgenommen. Die Wirksamkeit dieses Mechanismus wird durch die Reaktion von MMP-1 mit α -Makroglobulin verdeutlicht, deren Geschwindigkeit die der Reaktion von MMP-1 mit TIMP-1 in Lösung wesentlich übertrifft.

Zur zweiten Klasse gehören die „tissue inhibitors of metalloproteinases“ (TIMPs), spezifische Inhibitoren, welche die MMPs in einer 1:1 Stöchiometrie binden⁶⁰⁻⁶³.

Derzeit sind 4 TIMPs in Säugetieren bekannt, alle besitzen eine ca. 125 Aminosäuren große N-terminale Domäne sowie eine C-terminale Domäne, welche ca. 65 Aminosäuren umfasst. 1994 konnte erstmals mittels Röntgenstrukturanalyse die Struktur von TIMP-1, später des TIMP-1/MMP-3 Komplexes aufgeklärt werden, was zur Aufklärung des Hemmechanismus der MMPs durch TIMPs führte³⁷.

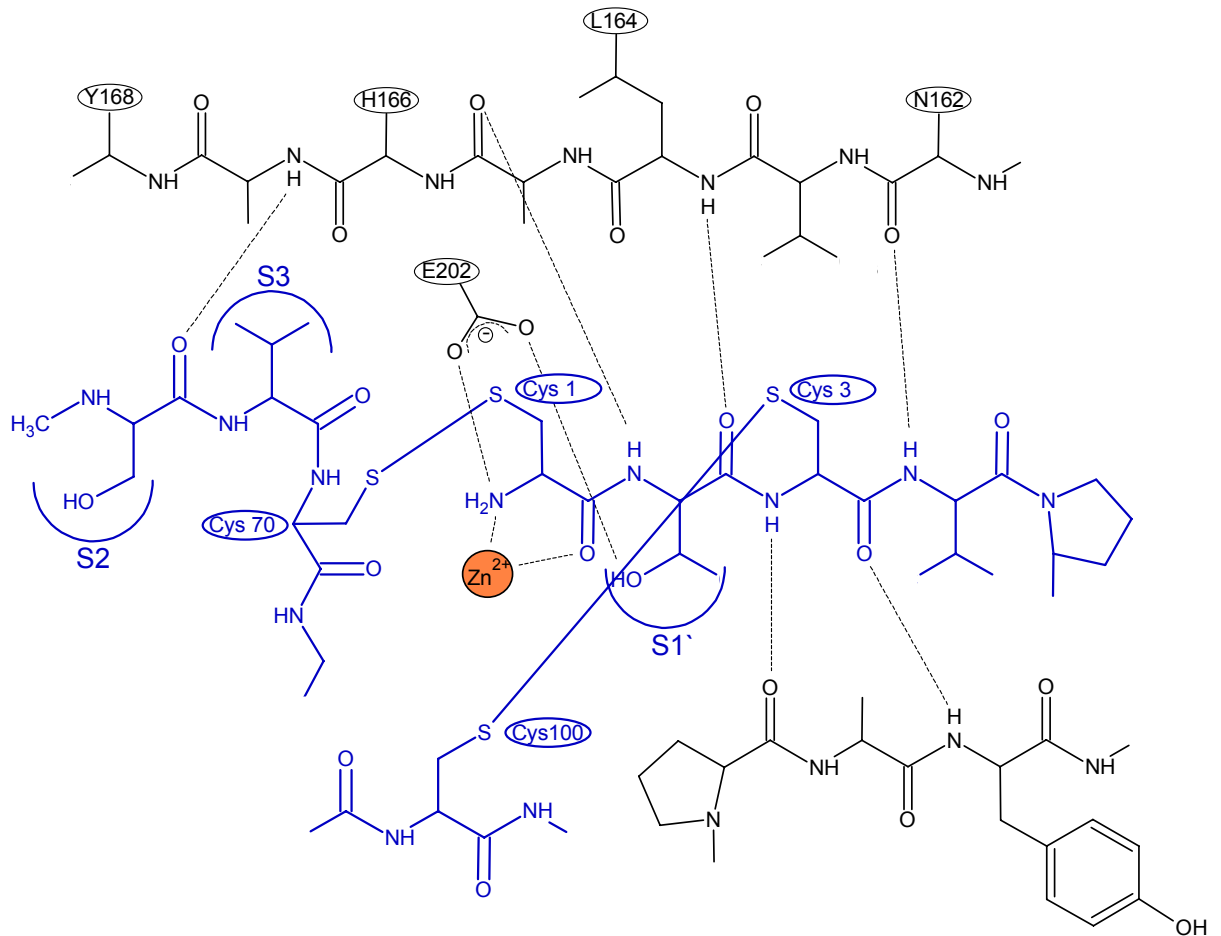
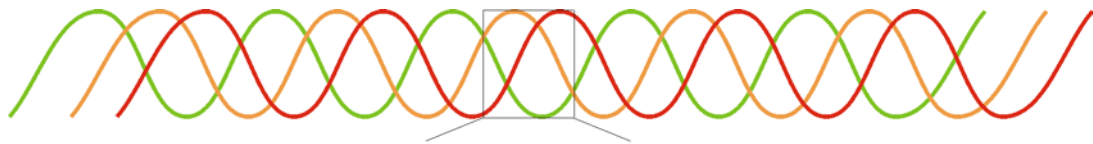


Abb. 2.5 Schematische Darstellung der Wechselwirkung von TIMP-1 mit dem aktiven Zentrum von MMP-3

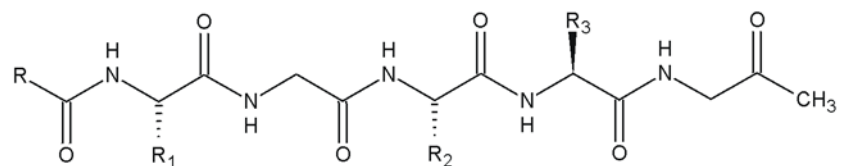
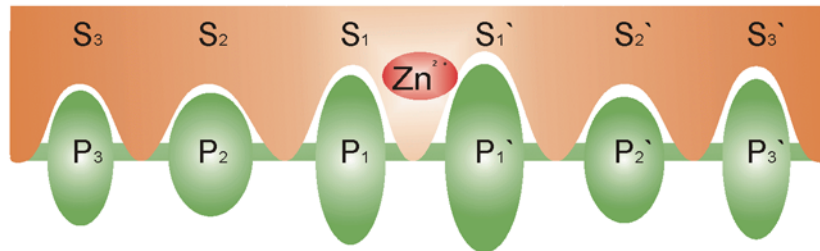
Die Inhibierung erfolgt durch die N-terminale Domäne der TIMPs, in der sich 4 Cysteinreste befinden, welche sich in den katalytischen Spalt der MMPs einlagern. Die Chelatisierung des Zink-Ions erfolgt über die Carbonyl- sowie die α -Aminogruppe des Cys1-Restes. Durch die Ausbildung zahlreicher Wasserstoffbrückenbindungen können die Moleküle auf einer Fläche von 1300 \AA^2 höchst effektiv miteinander interagieren.

2.3 Synthetische Inhibitoren

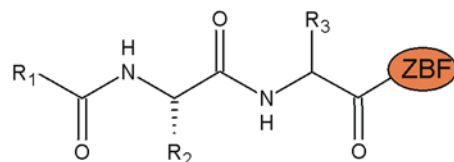
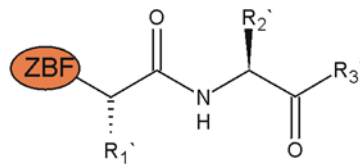
Die Beteiligung der MMPs an vielen pathologischen Prozessen rückte sie als therapeutische Zielproteine früh in den Mittelpunkt der pharmazeutischen Forschung wie auch zahlreicher wissenschaftlicher Forschergruppen. In Ermangelung struktureller Daten der MMPs griff man in der Anfangsphase der Entwicklung von synthetischen Inhibitoren auf die Kenntnis der natürlichen Substrate zurück. Dieser substrat-basierte Ansatz machte sich die Kenntnisse der Aminosäuresequenz von humanem tripelhelikalen Kollagen und um dessen Spaltstelle bei Proteolyse mit MMP-1 zu nutze. Dabei konnten einige grundsätzliche Erkenntnisse über den Aufbau synthetischer Inhibitoren gewonnen werden. Um inhibitorisches Potential zu erlangen, muß ein Molekül über eine funktionelle Gruppierung verfügen, welche das im katalytischen Zentrum befindliche Zink-Ion chelatisiert bzw. bindet und eine oder mehrere Seitenketten, um van der Waals Interaktionen mit den Enzym-„subsites“ eingehen zu können. Dies führt zu drei Klassen von Inhibitoren. Die C-terminalen Inhibitoren interagieren mit den „S'-subsites“ des Enzyms, d.h. das Inhibitorgerüst wechselwirkt C-terminal zur Spaltstelle mit dem „backbone“ des Enzyms, während sich der zinkbindende Ligand am N-Terminus des Inhibitors befindet. Einen entsprechenden Aufbau mit C-terminaler Zinkbindungsgruppe zeigen die N-terminalen Inhibitoren. Bereits 1986 wurde durch Vergleich entsprechender Inhibitoren festgestellt, daß C-terminale Inhibitoren ein wesentlich höheres inhibitorisches Potential aufweisen als die entsprechenden N-terminalen Inhibitoren^{64,65}. Schließlich führte die Verknüpfung dieser beiden Klassen zur Entwicklung kombinierter Inhibitoren. Bei diesen befindet sich die zinkbindende Funktion in zentraler Position am C_α des P₁-Liganden wodurch die C- bzw. N-terminalen Substituenten mit den „subsites“ zu beiden Seiten der Spaltstelle wechselwirken können. Inhibitoren dieses Aufbauprinzips zeigen teilweise hervorragende Hemmwirkung bei gleichzeitig sehr guter Selektivität⁶⁶⁻⁶⁹.



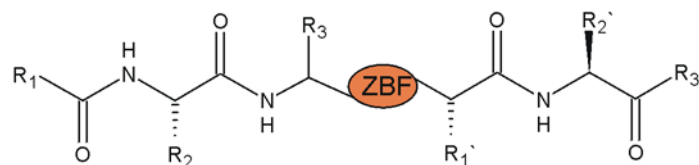
Pro-Gln-Gly	:	Ile-Ala-Gly	Human α 1
Pro-Gln-Gly	:	Ile-Ala-Gly	Human α 1
Pro-Gln-Gly	:	Leu-Leu-Ala	Human α 2



C-terminaler Inhibitor



N-terminaler Inhibitor



Kombinierter Inhibitor

Abb. 2.6 Schematische Darstellung der Bindung verschiedener Inhibitoren an ein Matrixin

Nach der Nomenklatur von Schechter und Berger werden ausgehend von der Spaltstelle die Aminosäurereste des Substrats in N-terminaler Richtung mit P_x , in C-terminaler Richtung mit P_x' bezeichnet. Die entsprechenden Bindungsstellen des Enzyms (*subsites*) werden mit S_x bzw. S_x' benannt⁷⁰.

Eine zentrale Bedeutung kommt der ZBF zu. Abbildung 2.7 zeigt verschiedene funktionelle Gruppen, welche bezüglich ihrer chelatisierenden Funktion auf das Zink-Ion untersucht wurden.

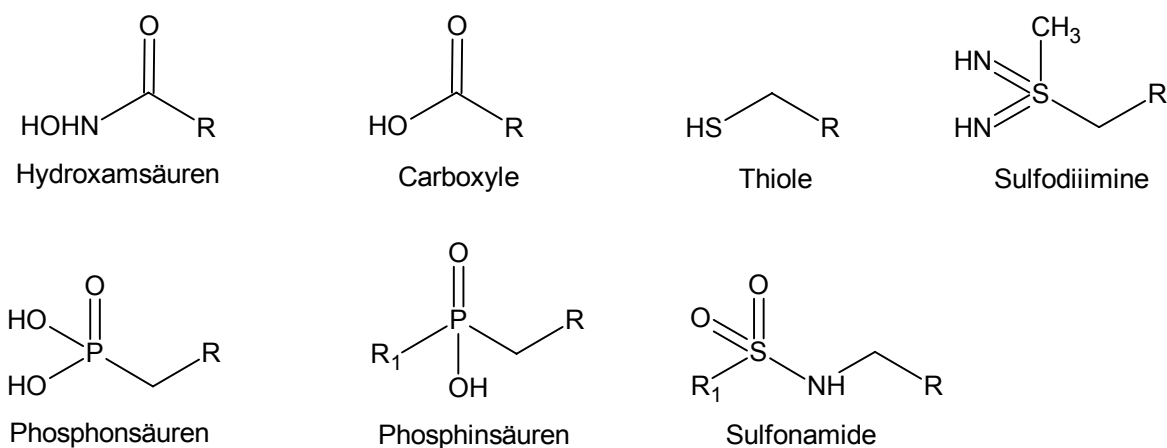
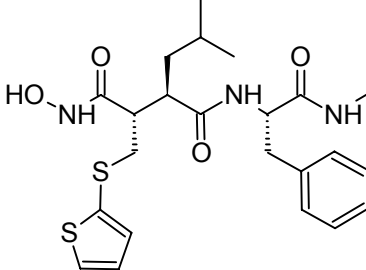
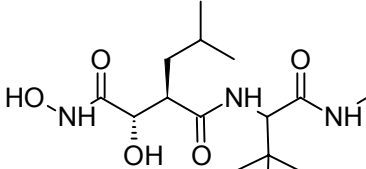


Abb. 2.7 Schematische Darstellung unterschiedlicher funktioneller Gruppen mit zink-bindender Funktion (ZBF), die bei der Entwicklung synthetischer Inhibitoren verwendet wurden

Die funktionelle Gruppe stabilisiert den während der Proteolyse auftretenden tetrahedralen Übergangszustand, welchen das Zink-Ion durch Koordination des Carbonylsauerstoff-Atoms der zu spaltenden Bindung eingeht. Dabei stellte sich schnell heraus, dass Inhibitoren mit einer Hydroxamat-Gruppe als ZBF das höchste inhibitorische Potential aufweisen⁷¹. Durch Röntgenstrukturanalysen konnte gezeigt werden, dass diese Gruppierung als zweizähliger Ligand agiert, dessen zwei Sauerstoffatome sich im optimalen Abstand (1.9-2.3 Å) zum aktiven Zink-Ion befinden und dessen protonierter Stickstoff eine Wasserstoffbrückenbindung zu einem Sauerstoffatom des Enzym-„backbones“ eingehen kann. Die Thiol-Gruppe zeigt ein im Vergleich zu Hydroxamaten 20-50fach erniedrigtes Potential, Carboxylate eine Erniedrigung um den Faktor 100-2000⁷². Phosphonsäuren sind bezüglich ihrer Hemmwirkung mit den Carboxylaten vergleichbar, gefolgt von Phosphinsäurederivaten und Sulfodiimininen. In jüngerer Vergangenheit traten Sulfonamide in den Vordergrund^{68,69}. Weitere Gruppierungen wurden in die Entwicklung synthetischer Inhibitoren einbezogen, zeigten jedoch nicht die gewünschten Erfolge.

Mit Hilfe der kombinatorischen Chemie konnte gezeigt werden, dass neben der ZBF auch die Wechselwirkung mit der „S₁'-subsite“ für die Inhibierung der MMPs von großer Bedeutung ist. Erst mit Hilfe der Röntgenstrukturanalyse der MMPs konnte schließlich eine Einteilung dieser Enzyme in zwei große strukturelle Klassen vorgenommen werden. Dabei ist die Größe, Form und Tiefe der S₁'-Tasche des Enzyms von entscheidender Bedeutung. Der größte Teil der MMPs (z.B. MMP-2, MMP-9, MMP-3, MMP-8) besitzt eine recht große S₁'-Seitentasche, während bei einigen MMPs (z.B. MMP-1, MMP-7, MMP-11) diese Tasche teilweise oder ganz von den Seitenketten der sie formenden Aminosäuren ausgefüllt wird. Mit Hilfe dieser Erkenntnis konnte eine Selektivität der Inhibitoren herbeigeführt werden. Durch Verwendung großer Seitenketten (z.B. Biphenyl) in der P₁'-Position wurde eine Diskriminierung der MMPs mit kleinen S₁'-Seitentaschen erreicht. Kleinere Reste führten erwartungsgemäß zu Breitbandinhibitoren.

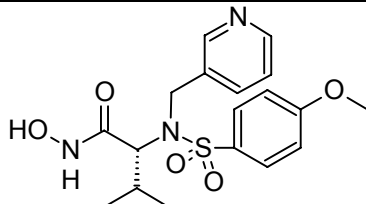
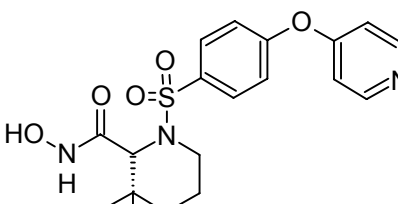
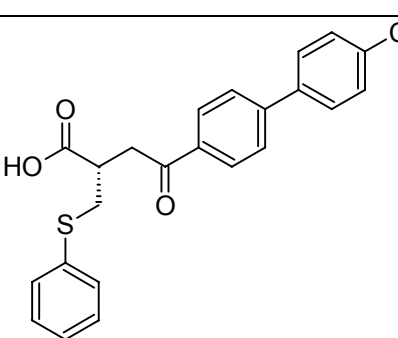
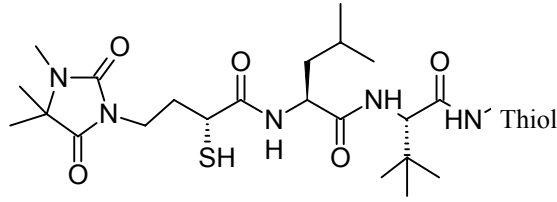
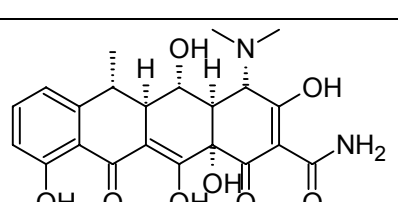
Alle Erkenntnisse führten zur Entwicklung von Pseudopeptidinhibitoren, deren strukturelle Entwicklung sich zwar an der Aminosäuresequenz des Kollagens orientierte, jedoch als Grundgerüst Succinyl-Hydroxamat aufweisen. Prominenteste Vertreter dieser Klasse sind die beiden Breitband-Inhibitoren Batimastat und Marimastat. Batimastat weist *in vitro* hohes inhibitorisches Potential mit K_i-Werten im nanomolaren Bereich auf, weshalb dieser Inhibitor auch heute noch Verwendung in *in vitro* Experimenten findet. Auch bei Versuchen in verschiedenen Tumormodellen konnte eine hohe Effektivität nachgewiesen werden, so dass Batimastat in klinischen Studien auf sein pharmakologisches Potential untersucht wurde. Dabei zeigten sich jedoch schnell Probleme im Löslichkeitsverhalten und der damit verbundenen fehlenden oralen Bioverfügbarkeit. Darüber hinaus deuteten einige Ergebnisse darauf hin, dass Batimastat die Metastasierung bei Patienten mit Leberkrebs unterstützt⁷³.

Name	Struktur	ZBF	IC ₅₀ -Wert
Batimastat (BB-94)		Hydroxamat	MMP-1 10 nM MMP-2 4 nM MMP-3 20 nM MMP-8 10 nM MMP-9 1 nM
Marimastat (BB-2516)		Hydroxamat	MMP-1 5 nM MMP-2 6 nM MMP-3 200 nM MMP-7 20 nM MMP-9 3 nM

Tab. 2.2 "first generation" Inhibitoren

Diese Probleme führten zur Entwicklung von Marimastat, welches anstatt einer Thienylthiomethylen-Gruppe in α -Position eine Hydroxyl-Gruppe besitzt mit entsprechender Verbesserung des Löslichkeitsverhalten. Trotz der Möglichkeit der oralen Applikation wurden auch die klinischen Studien mit Marimastat eingestellt. Neben fehlender Effektivität bei Patienten mit fortgeschrittenem Krebsleiden wurden erhebliche Nebenwirkungen in Form von Gelenkschmerzen oder Versteifungen der Gelenke festgestellt.

Neben dem fehlenden Nachweis pharmakologischer Effizienz zeigen diese „first generation“ Inhibitoren auch kinetische Probleme wie z.B. metabolische Instabilität. Diese Probleme sollten mit Hilfe der „second generation“ Inhibitoren vermieden werden bei gleichzeitiger Erhöhung der Selektivität. Dabei handelt es sich um Substanzen, deren Struktur keinen peptidischen Charakter aufweist. Vier Gruppen dieser Inhibitoren wurden in klinischen Studien getestet, wobei das Zinkbindungsmotiv für die Unterteilung verantwortlich zeichnet.

Name	Struktur	ZBF	IC ₅₀ -Wert
CGS 27023A		Hydroxamat	MMP-1 33 nM MMP-2 20 nM MMP-3 43 nM MMP-9 8 nM
Prinomasta (AG 3340)		Hydroxamat	MMP-1 8.2 nM MMP-2 0.083 nM MMP-3 0.27 nM MMP-7 54 nM MMP-13 0.038 nM
Tanomastat (BAY12-9566)		Carboxylat	MMP-1 >5000 nM MMP-2 11 nM MMP-3 143 nM MMP-9 301 nM MMP-13 1470 nM
Rebimasta (BMS 275291)		Thiol	MMP-1 25 nM MMP-2 41 nM MMP-3 157 nM MMP-9 25 nM MMP-13 4 nM
Peristat		Doxycyclin	

Tab. 2.3 Verschiedene Klassen synthetischer Inhibitoren, welche in klinischen Studien auf ihre Wirksamkeit in Tumormodellen getestet wurden

Tabelle 2.3 zeigt die verschiedenen Klassen, deren Leitstruktur überwiegend durch „screening“ großer Molekülbibliotheken gefunden wurden. Anschließende Struktur-optimierungen vervollständigten die Entwicklung. Als einer der ersten Vertreter der Sulfamid Hydroxamate gilt CGS27023A, welcher 1990 vorgestellt wurde⁷⁴ und einen selektiven Inhibitor für MMP-1, MMP-2, MMP-3 und MMP-9 darstellt, mit IC₅₀-Wert-

en im nanomolaren Bereich. Da ein großer Nachteil der Hydroxamate die Möglichkeit der Hydrolyse zur freien Säure oder der Reduktion zum Amid, sowie die Bildung von Hydroxylamin darstellt, wurde versucht, durch die Einführung der Isopropylgruppe eine Verlangsamung dieser metabolischen Reaktionen herbeizuführen. Durch NMR Analysen konnte der Bindungsmodus mit MMP-3 aufgeklärt werden^{75,76}. Während der p-Methoxyphenyl-Substituent die S₁'-Tasche besetzt, wechselwirken der Pyridylmethyl- und der Isopropyl-Rest mit den S₂'- bzw. S₁-subsites des Enzyms. Durch Ersetzen der Isopropyl-Gruppe durch einen Sechsring sowie die Vergrößerung des P₁'-Restes erhält man den Inhibitor AG3340 mit IC₅₀-Werten im picomolaren Bereich für MMP-2, MMP-3 und MMP-13⁷⁷. Dieser Inhibitor erreichte klinische Studien der Phase III u.a. wegen seines guten pharmakokinetischen Potentials, welches eine 18% Bioverfügbarkeit in Ratten aufweist. In Laufe der klinischen Studien zeigten diese Substanzen jedoch keine Wirksamkeit in Modellen bei fortgeschrittenem Krebsleiden sowie gleichfalls die von den „first generation“ Inhibitoren bekannten Nebenwirkungen. Dies führte zur Einstellung sämtlicher klinischer Studien. Bayer entwickelte aus dem Entzündungshemmer Fenbufen eine Serie von Inhibitoren, welche als Zinkbindungsmotiv eine Carbonylgruppe aufwiesen. Dabei sollte der Verlust an inhibitorischem Potential durch die verbesserte Pharmakokinetik ausgeglichen werden⁷⁸. Mit der Substanz BAY-12-9566 entwickelte man einen MMP-2 Inhibitor mit IC₅₀-Werten im nanomolaren Bereich. Da BAY-12-9566 MMP-1 nur sehr schwach hemmt, jedoch in klinischen Studien ähnliche Nebenwirkungen wie die Hydroxamate zeigte, wurde widerlegt, dass die Hemmung von MMP-1 mit dem MSS (Muskuloskeletales Syndrom) einhergeht. Darüber hinaus waren die klinischen Ergebnisse für Bayer besonders enttäuschend, da BAY12-9566 die Sterberate bei Patienten mit Pankreas- und kleinzelligem Lungenkrebs erhöhte, was zur sofortigen Einstellung der Studien führte. Auch Studien des Inhibitors BMS275291, einem Vertreter von Inhibitoren mit einer Thiol-Gruppe als zinkbindendem Motiv, wurden wegen fehlender Effektivität eingestellt.

Derzeit ist Perostat, ein Vertreter der Doxycycline, der einzig zugelassene MMP-Inhibitor. Perostat inhibiert die Kollagenaseaktivität und wird zur Behandlung von Parodontitis bei Erwachsenen eingesetzt, einer Erkrankung, an welcher ein Drittel der Amerikaner über 35 Jahren leidet⁷⁹. Perostat wurde aus dem natürlichen Chlortetra-

cyclin, welches aus dem Bakterium *streptomyces aureofaciens* isoliert wurde, entwickelt. Auf Grund der fehlenden antibakteriellen Eigenschaften, welche das ursprüngliche Ziel der Entwicklungsarbeit waren, wurde Perostat für weitere Untersuchungen bezüglich der Hemmwirkung gegenüber MMPs verwendet. Grund hierfür waren die 1990 veröffentlichten Untersuchungen, die zeigten, dass Gingivalgewebe, welches während einer Operation entfernt wurde, deutlich weniger Kollagenase enthält, wenn die Patienten niedrige Dosen von Doxycyclin über einen zweiwöchigen Zeitraum vor der Operation erhalten hatten. Trotz der Zulassung durch die FDA zeigt auch Perostat Nebenwirkungen wie Herzschmerzen, Diarrhoe oder Gelenkschmerzen. Darüber hinaus konnte in klinischen Studien gezeigt werden, dass nur 15% der potentiellen Patienten erfolgreich mit Perostat behandelt werden können.

3 Ergebnisse und Diskussion

3.1 Leitstruktur und deren Modifizierung

Die Entwicklung von MMP-Inhibitoren wurde in unserer Arbeitsgruppe bereits seit Jahren mit großem Erfolg vorangetrieben. Neben der Synthese hochwirksamer peptidischer Inhibitoren mit Hemmkonstanten gegen MMPs im subnanomolaren Bereich^{66,67} konnten Thiadiazine als eine neue Klasse von Inhibitoren mit heterozyklischem Kern gefunden werden, welche neben dem fehlenden peptidischen Charakter und der damit günstigeren Pharmakokinetik zur Hemmung der Proteinasen keine Hydroxamatgruppierung als zinkchelatisierendes Element enthielten^{68,69}. Damit eröffnete sich ein neues Forschungsgebiet, da Hemmkonstanten im nanomolaren Bereich erreicht werden konnten. Die Substanzen wiesen unter physiologischen Bedingungen jedoch eine metabolische Labilität auf. Diese war möglicherweise auf den heterozyklischen Kern zurückzuführen, der zu einer Umlagerung im wässrigen Milieu unter Verlust der Hemmaktivität neigte. Die Optimierung dieses zentralen Strukturmerkmals mit einer verbesserten metabolischen Stabilität und damit günstigerem pharmakologischen Profil führte zur Verwendung von 1,2,4-Triazinen als Ausgangssubstanz zur Synthese einer neuen Klasse von MMP-Inhibitoren.

3.1.1 1,2,4-Triazine

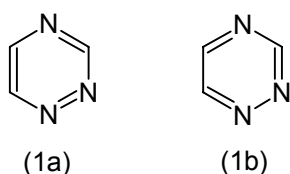


Abb. 3.1 Kekulé-Strukturen des 1,2,4-Triazins

Das oben gezeigte 1,2,4-Triazin, welches auch unter den Bezeichnungen *as*-Triazin, *a*-Triazin oder Isotriazin in der Literatur zu finden ist, wurde erstmals 1966 von Paudler und Barton⁸⁰ synthetisiert. Von den beiden gezeigten Kekulé Strukturen bildet (1b) mit

einer N1-N2-Einfachbindung den tatsächlichen Grundzustand des Moleküls ab, wie sowohl durch theoretische Berechnungen als auch durch Röntgenstrukturanalysen gezeigt werden konnte. In den letzten Jahren erlangten die *as*-Triazine eine immer höhere Bedeutung, da viele Naturstoffe dieses Strukturmerkmal enthalten und einige Substanzen biologische Aktivität aufweisen. Interessante Derivate des 1,2,4-Triazins sind z.B. die Pyrimido[5,4-*e*][1,2,4]triazine^{81,82}, deren Strukturmerkmal in natürlichen Antibiotika gefunden werden kann oder 4-Amino-3-methyl-6-phenyl-1,2,4-triazin-5(4*H*)-one^{83,84}, welches als Herbizid verwendet wird.

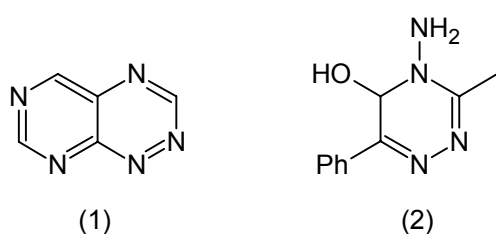


Abb. 3.2 Pyrimido[5,4-*e*][1,2,4]triazin (1); 4-Amino-3-methyl-6-phenyl-1,2,4-triazin-5(4*H*)-one (2)

Intensive Studien zu Verwendung von Derivaten des 1,2,4-Triazins zur Behandlung von HIV⁸⁵⁻⁸⁹, als Ligand des Thyroid Hormon Rezeptors⁹⁰, sowie als Hemmer der Interleukin-5-Produktion^{91,92} und Herbizid⁹³ sind in den letzten Jahren durchgeführt worden, wobei die beiden letztgenannten Anwendung in zahlreichen Schriften patentrechtlich geschützt sind. Darüber hinaus sind einige Triazine von hohem wirtschaftlichen Nutzen, da sie bei der Bekämpfung von Kokzidiosen eingesetzt werden⁹⁴. Diese Krankheit wird vor allem bei Geflügel beobachtet und äußert sich in Teilnahmslosigkeit und Schwäche der befallenen Tiere.

In Anlehnung an die in unserer Arbeitsgruppe entwickelten MMP-Inhibitoren mit einem Thiadiazin-Grundkörper wurde in einem ersten Schritt die Verwendung von 1,2,4-Triazinen als Ausgangssubstanz für die Inhibitor-Synthese gewählt. Dabei kristallisierte sich das 3-Amino-5,6-dimethyl-1,2,4-triazin als am besten geeignet heraus. Ausschlaggebend waren die chemischen Eigenschaften dieses Stoffes, welcher eine Derivatisierung sowohl an der Amino-Gruppe in Position 3 als auch an der 5-Methyl-Gruppierung zuließ. Kopplungen mit Aminosäurederivaten nach klassischen Verfahren sind wegen

der elektronenziehenden Eigenschaften des Triazin-Ringes bei diesen Substanzen nicht möglich, eine Addition der Isocyanat-Gruppe kann aber erreicht werden.

In einer zweiten Entwicklungsstufe wurde der 1,2,4-Triazin-Heterozyklus durch einen 1,2,4-Triazin-3,5-dion-Grundkörper ersetzt. Diese Substanz ist auch unter der Bezeichnung Azaurazil bekannt. Bei der Verwendung dieser Substanzklasse war der Einfluß der Carbonyl-Gruppen auf die Inhibierung der MMPs von besonderem Interesse, da von den strukturell verwandten Pyrimidin-Dionen ein hohes Chelatisierungspotential gegenüber Zn(II)-Ionen bekannt ist. In Abbildung 3.3 sind Vertreter dieser drei Substanzklassen dargestellt.

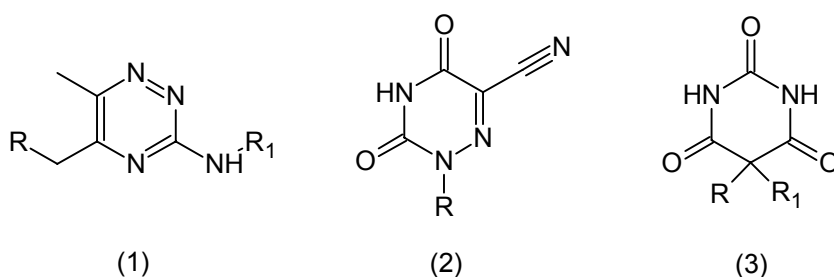
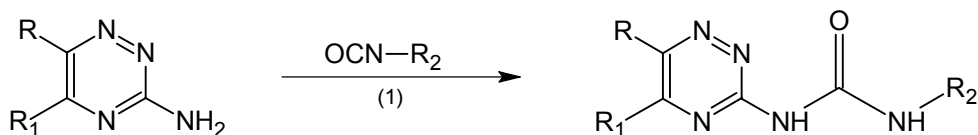


Abb. 3.3 1,2,4-Triazin (1), 6-Azaurazil (2), Pyrimidin-2,4,6-trion (3)

3.2 Inhibitoren vom 1,2,4 - TRIAZIN-Typ

3.2.1 Modifizierung der Amino-Gruppe



Schema 3.1: Modifikationen der Aminofunktion

Reaktionsbedingungen: (1) CHCl_3 , Reflux

Die Derivatisierung der Amino-Gruppe gelingt nicht mit allen Elektrophilen, sondern ist maßgeblich von der Stärke des elektrophilen Charakters abhängig. So reagiert 3-Amino-1,2,4-triazin mit Benzoylchlorid in Anwesenheit einer Base zum di-Benzoyl-Produkt, wird jedoch von Sulfonylchloriden nicht angegriffen. Der Grund für dieses Verhalten ist in dem stark elektronenziehenden Effekt des Heterozyklus zu finden, dessen Resultat eine Deaktivierung der 3-Amino-Gruppe hinsichtlich eines elektrophilen Angriffes ist. Alternativ gelingt jedoch eine Addition einer Isocyanat-Gruppierung in Abwesenheit einer Base unter Rückflußbedingungen ohne Probleme in Ausbeuten von 50% – 70%. Hierbei ist bemerkenswert, dass die Verwendung einer Base, welche normalerweise bei der Reaktion von Aminen mit Isocyanaten katalytisch wirkt, eine Herabsetzung der Ausbeute zu Folge hat. Wahrscheinlicher Grund ist die vermehrte Bildung von Nebenprodukten durch die Abstraktion eines Methylprotons (s.u.). Als Lösungsmittel wurde ausschließlich Chloroform verwendet. Da die synthetisierten Substanzen als Zwischenprodukte für die Darstellung von weiteren MMP-Inhibitoren dienen sollten, wurde als Edukt 3-Amino-5,6-dimethyl-1,2,4-triazin verwendet, da hier eine weitere Derivatisierung an Position 5 möglich war. Tabelle 3.1 zeigt die dargestellten Substanzen sowie die durch Hemmtests ermittelten K_i -Werte.

		K _i -Werte für MMP [μ M]						
	R; R ₁ ; R ₂	2	7	8	9	12	13	14
1	CH ₃ ; CH ₃ ; 4-Methylbenzylsulfonyl	30.8	>50.0	>50.0	>50.0	40.8	10.3	12.5
2	H; H; 4-Methylbenzylsulfonyl	23.7	>50.0	>50.0	>50.0	48.0	0.3	17.8
3	CH ₃ ; CH ₃ ; Phenyl	27.8	48.9	>50.0	37.9	>50.0	9.8	22.8
4	CH ₃ ; CH ₃ ; 4-Methylphenyl	32.3	37.8	>50.0	45.0	>50.0	11.2	13.7
5	CH ₃ ; CH ₃ ; 4-Nitrophenyl	25.9	>50.0	45.2	36.2	>50.0	17.8	32.8

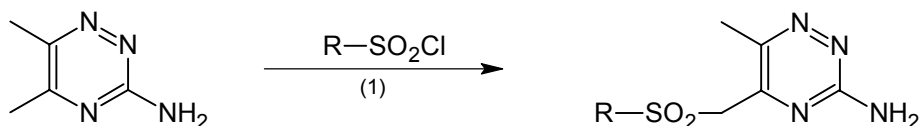
Tab. 3.1 K_i-Werte für Inhibitoren des 1,2,4-Triazin-Typs mit modifizierter Amino-Gruppe

Das inhibitorische Potential gegenüber MMPs ist bei diesen Substanzen recht schwach ausgeprägt, wobei bereits in diesem Entwicklungsstadium eine leicht erhöhte Hemmwirkung gegenüber MMP-13 erkennbar wird. So zeigt Substanz **2** einen K_i-Wert im nanomolaren Bereich und somit eine um zwei Zehnerpotenzen erhöhte Hemmwirkung gegenüber MMP-13 im Vergleich zu den Gelatinasen A und B. Eine weitere Optimier-

ung dieser Substanz war im Rahmen dieser Arbeit jedoch nicht möglich, da es sich hier um einen nicht weiter umsetzbaren Heterozyklus handelt.

3.2.2 Modifizierung der 5-Methyl-Gruppe

In einer zweiten Versuchsreihe wurde die Reaktivität der Methylgruppe in Position 5 des 3-Amino-5,6-dimethyl-1,2,4-triazins ausgenutzt. Wie oben bereits erwähnt, führte der elektronenziehende Charakter des Triazin-Kerns zu einer Deaktivierung der Amino-Funktion, gleichzeitig wurde jedoch der saure Charakter der 5-Methyl-Gruppe erhöht. Durch Einwirkung einer Base erhielt man daher das entsprechende Carbanion, welches durch aromatische Sulfonylchloride elektrophil angegriffen werden konnte und in guten Ausbeuten zum gewünschten Produkt führte. Durch den hohen Raumbedarf dieser Gruppierung war ein weiterer elektrophiler Angriff sterisch nicht mehr möglich. Als am besten geeignet hatte sich Triethylamin als Base herausgestellt, als Lösungsmittel wurde Chloroform verwendet. Bei allen Synthesen wurden die Reaktionslösungen 20 Stunden refluxiert, wobei trotz dieser drastischen Reaktionsbedingungen die gewünschten Produkte in guter Reinheit erhalten wurden.



Schema 3.2: Modifizierung der 5-Methylgruppe

Reaktionsbedingungen: (1) Chloroform, Triethylamin, Reflux

In Tabelle 3.2 sind die K_i -Werte der entsprechenden Substanzen aufgeführt.

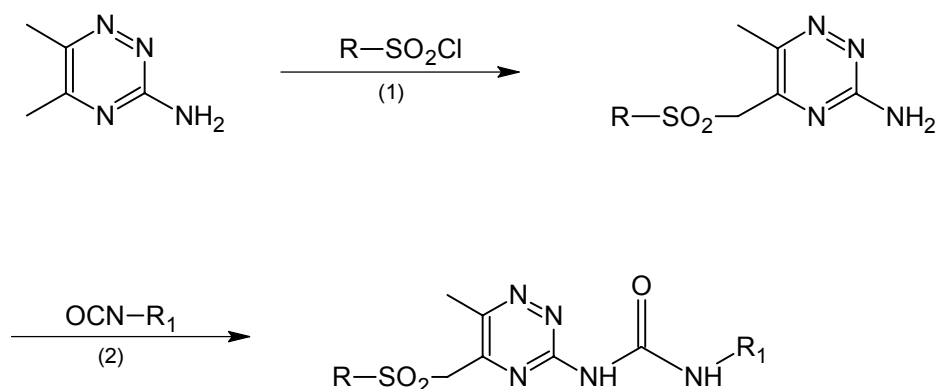
	R	K_i -Werte für MMP [μ M]						
		2	7	8	9	12	13	14
6	Phenyl	25.8	15.1	>50.0	>50.0	>50.0	3.30	0.71
7	4-Methylphenyl	35.7	13.2	>50.0	>50.0	>50.0	1.78	0.21
8	Benzyl	19.6	0.8	12.8	9.7	>50.0	0.22	0.07
9	4-Methoxyphenyl	20.3	3.5	>50.0	11.8	>50.0	0.23	2.21
10	4-Chlorphenyl	18.9	7.8	>50.0	17.2	>50.0	2.80	3.25
11	1,1'-Biphenyl	22.7	>50.0	>50.0	0.3	>50.0	2.58	0.65

Tab. 3.2 K_i -Werte für Inhibitoren des 1,2,4-Triazin-Typs mit modifizierter 5-Methyl-Gruppe

Im direkten Vergleich mit den Harnstoffderivaten zeigten die hier vorgestellten Substanzen ein erhöhtes inhibitorisches Potential bei gleichzeitiger Diskriminierung von MMP-2, MMP-8, MMP-9 und MMP-12. Teilweise konnten K_i -Werte im niedrigen nanomolaren Bereich erreicht werden. Verantwortlich für die Erhöhung der Hemmwirkung könnte im vorliegenden Fall die freie Aminogruppierung sein. In Arbeiten von Schröder^{68,69} konnte am Beispiel von Thiadiazinen gezeigt werden, dass die Chelatisierung des aktiven Zink(II)-Ion über ein exozyklisches Stickstoff-Atom einer Aminogruppierung bewerkstelligt wird und damit für die gute Hemmwirkung gegenüber MMPs verantwortlich war.

3.2.3 Inhibitoren mit 1,2,4-Triazin-Kern

Unter der Annahme, dass der Heterozyklus bzw. der exozyklische Stickstoff für die Chelatisierung des katalytischen Zink-Ions verantwortlich zeichnete, wurde eine Kombination der beiden oben angesprochenen Reaktionen durchgeführt. Die bereits beschriebenen Eigenschaften des verwendeten Eduktes machten eine strikte Einhaltung der Reaktionsfolge unausweichlich. Es war darauf zu achten, dass im ersten Schritt die Sulfonylierung erfolgt und anschließend die Addition der Isocyanate.



Schema 3.3: Darstellung der kombinierten Inhibitoren

Reaktionsbedingungen: (1) Chloroform, Reflux; (2) Chloroform, Triethylamin, Reflux

Eine veränderte Reaktionsfolge führt durch den Verlust des nukleophilen Charakters der Aminogruppe und dem damit verbundenen Verlust des sauren Charakters der Methylgruppe nicht zum gewünschten Ergebnis. Die oben angegebenen Reaktionsbedingungen wurden übernommen und führten glatt zu den gewünschten Produkten.

K_i-Werte für MMP [μ M]

R; R ₁	2	7	8	9	12	13	14
12 Phenyl; 4-Methylphenyl	>50.0	2.06	2.0	>50.0	n.b. ^a	0.16	2.06
13 1,1'-Biphenyl; 4-Methylphenyl	28.3	1.78	27.8	7.8	n.b.	0.03	0.52
14 4-Methylphenyl; Phenyl	40.4	0.98	20.6	>50.0	>50.0	0.05	2.07
15 Phenyl; Phenyl	32.8	1.21	15.9	>50.0	n.b.	0.18	1.21
16 Benzyl; Phenyl	22.7	5.38	22.6	>50.0	n.b.	0.40	14.00
17 Phenyl; 4-Chlorphenyl	4.8	0.01	8.2	>50.0	>50.0	0.05	>50.00
18 1,1'-Biphenyl; 4-Chlorphenyl	13.2	0.13	6.2	17.2	>50.0	0.04	42.80
19 1,1'-Biphenyl; Phenyl	10.8	0.71	1.8	8.9	24.8	0.02	0.12
20 4-Methoxyphenyl; Phenyl	35.0	0.27	22.6	>50.0	>50.0	0.19	2.20

a: nicht bestimmt

Tab. 3.3 K_i-Werte für kombinierte Inhibitoren des 1,2,4-Triazin-Typs

Die kombinierten Inhibitoren zeigten zum Teil hervorragende inhibitorische Eigenschaften mit K_i-Werten im niedrigen nanomolaren Bereich. Gleichzeitig konnte eine Diskriminierung einzelner MMPs beobachtet werden. So wurden für Substanz **17** K_i-

Werte von 12 nM für MMP-7 sowie 50 nM für MMP-13 ermittelt. Bei allen anderen für diesen Inhibitor bestimmten Hemmkonstanten wurden Werte im mikromolaren Bereich festgestellt. Eine noch bessere Spezifität erreichte Substanz **13**, bei welcher nur gegen MMP-13 eine Hemmkonstante im nanomolaren Bereich (28nM) gemessen wurde. Bemerkenswert für diese neue Klasse von MMP-Inhibitoren war die Tatsache, dass die Verwendung von Substituenten unterschiedlicher räumlicher Ausdehnung keinen bzw. nur wenig Einfluss auf die Aktivität gegenüber den verschiedenen MMPs hatte. Wie bereits beschrieben, sollten kleine Substituenten eher zu Breitbandinhibitoren führen. Diese Beobachtung konnte jedoch in den vorliegenden Fällen nicht bestätigt werden. Selbst die Verwendung einer Biphenyl-Gruppierung führt nicht zum Verlust des inhibitorischen Potentials gegenüber MMP-7, einer Proteinase mit eher kleiner S_1' -Seitentasche. Daher konnte davon ausgegangen werden, dass die S_1' -Tasche der MMPs im Falle der kombinierten Inhibitoren vom 1,2,4-Triazin-Typ nicht für die Spezifität der Inhibitoren verantwortlich war. In künftigen Arbeiten sollte daher dem Bindungsmodus erhöhte Aufmerksamkeit geschenkt werden, um eine weitere Optimierung der Strukturen zu erreichen. Dies könnte beispielsweise durch Kristallisation von MMP mit Inhibitor und anschließender Röntgenstrukturanalyse erfolgen. Weiter Hinweise könnten durch Bindungsstudien mittels „Molecular Modeling“ gesammelt werden.

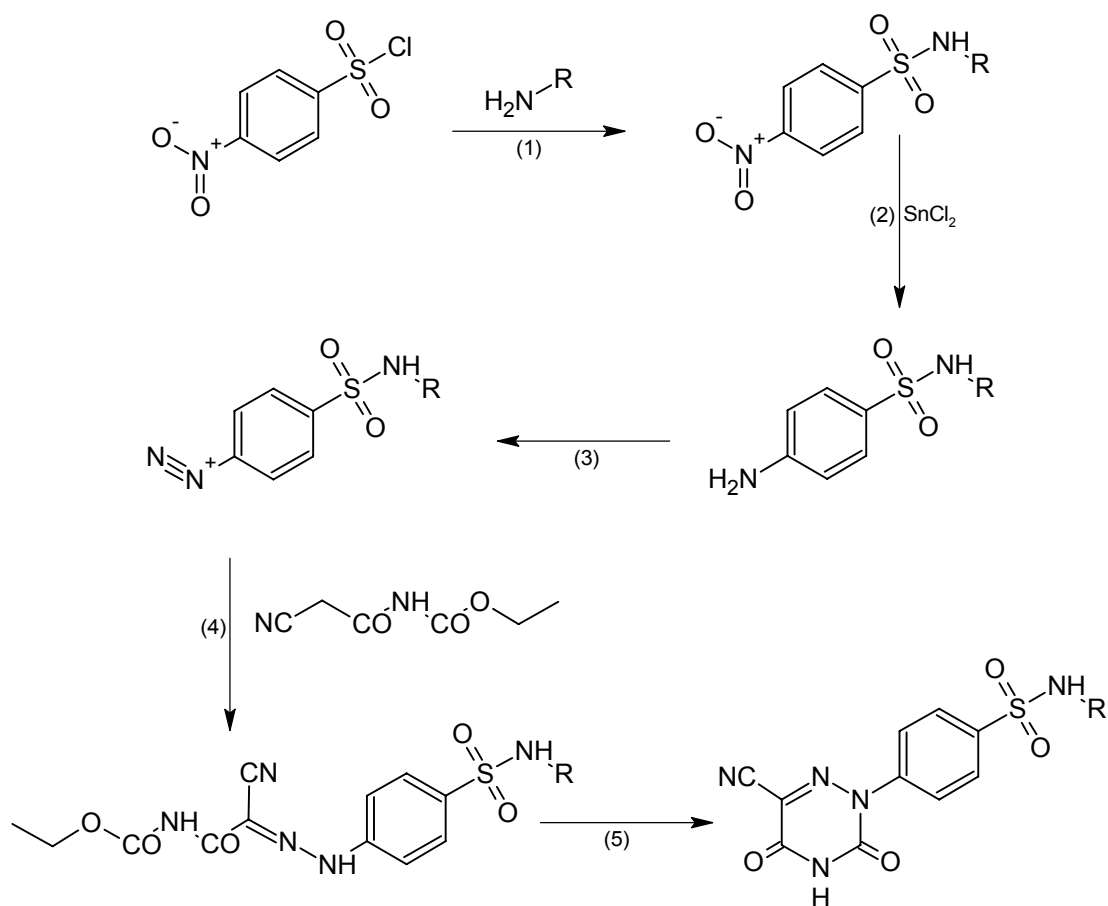
3.3 Inhibitoren vom AZAURACIL-Typ

Die Darstellung der Derivate der Inhibitoren mit einem 1,2,4-Triazin-3,5-dion-Grundkörper, auch unter der Bezeichnung Azaurazil bekannt, wurde ausgehend von den verwendeten Edukten auf zwei alternativen Wegen erreicht. Beide führten über die Bildung eines Anilin-Derivates zum gewünschten heterozyklischen Produkt.

3.3.1 Syntheseweg 1

Ausgangssubstanzen für die Synthese dieser Inhibitoren waren heterozyklische 4-Nitrophenylsulfonyl-Derivate. Die Reduktion zum entsprechenden Anilin verlief glatt in nahezu quantitativer Ausbeute unter Verwendung von SnCl_2 in HCl. Die anschließende Diazotierung und Umsetzung mit N-Cyanoacetylurethan führte zur Isolierung des er-

warteten Carbamates, welches thermisch mit Hilfe einer zugesetzten Base in wässriger Umgebung zyklisiert wurde. Hier stellte sich die Verwendung von Na_2CO_3 als optimal heraus, alternativ konnte auch Pyridin verwendet werden.



Schema 3.4: Darstellung der Inhibitoren vom Azauracil-Typ

Reaktionsbedingungen: (1) Diethylether, Reflux, HCl ; (2) SnCl_2 ; HCl , Reflux, NaOH ;

(3) HCl , NaNO_2 , $0-5^\circ\text{C}$; (4) Pyridin, H_2O , RT; (5) Na_2CO_3 , H_2O ,

Reflux, Eisessig

Die auf diesem Weg hergestellten Inhibitoren sind in Tabelle 3.4 mit den dazugehörigen K_i -Werten aufgeführt.

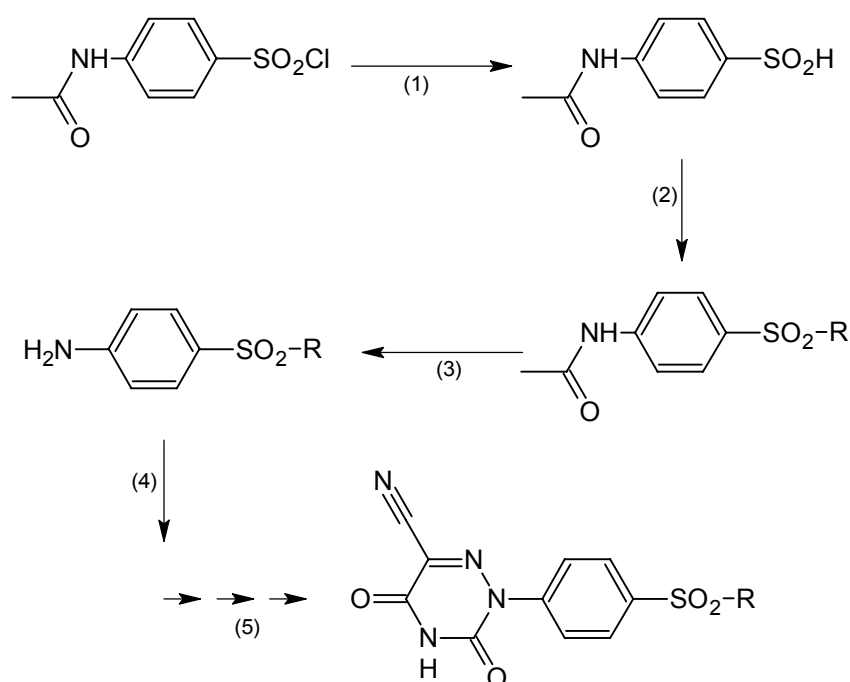
R	K_i -Werte für MMP [μ M]							
	2	7	8	9	12	13	14	
21d Morpholine	29.8	0.23	11.3	>50.0	>50.0	0.006	10.0	
22d Pyrrolidin	14.7	0.71	0.2	>50.0	n.b.	0.091	0.2	
23d Piperidin	4.4	0.06	7.3	>50.0	n.b.	0.208	3.9	
24d n-allyl	1.3	2.17	42.8	0.4	n.b.	2.380	0.3	
25b 2,6-Dimethoxyimidin-4-yl	17.6	0.02	9.0	9.1	21.0	0.082	4.3	

Tab. 3.4 K_i -Werte für Inhibitoren vom Azauracil-Typ

Diese Klasse von Inhibitoren ähnelte in ihrer Spezifität den Hemmstoffen des 1,2,4-Triazin-Typs, jedoch mit nochmals verbessertem inhibitorischen Potential. So konnte für **21d** ein K_i -Wert von 6 nM gegenüber MMP-13 ermittelt werden. Dies bedeutet einen Unterschied von vier Zehnerpotenzen zwischen MMP-9 und MMP-13.

3.3.2 Syntheseweg 2

Die Synthese der zweiten Gruppe von MMP-Inhibitoren mit einem Azauracil-Grundgerüst startete mit der Darstellung von 4-(Acetylamino)benzolsulfinsäure durch Reduktion von 4-(Acetylamino)benzolsulfonylchlorid mit Na_2SO_3 im wässrigem Milieu unter basischen Bedingungen. Die Sulfinsäure konnte in quantitativer Ausbeute erhalten und direkt für die nachfolgende Umsetzung eingesetzt werden. Auch die anschließende Umsetzung mit Alkylhalogeniden, es wurden ausschließlich die Bromide verwendet, führte in guter Reinheit und Ausbeute zu den gewünschten Produkten. Die abschliessende Hydrolyse der 4-(Alkylsulfonyl)acetanilide in halbkonzentrierter HCl unter Rückflußbedingungen lieferte die gewünschten Anilin-Derivate. Diese wurden analog des oben beschriebenen Syntheseweg 1 über die Diazotierung, Bildung des Carbamates und anschließende Zyklisierung zum 6-Azauracil umgesetzt. Reaktionsschema 3.5 zeigt den Syntheseweg, die ermittelten K_i -Werte für diese Inhibitoren sind in Tabelle 3.5 dargestellt.



Schema 3.5 zweiter Syntheseweg der Inhibitoren vom 6-Azauracil-Typ

Reaktionsbedingungen: (1) Na_2SO_3 , H_2O , 45-50 °C, pH 8.5-9.0; (2) Ethanol, Reflux, pH 6.0-8.0; (3) HCl, Reflux; (4); (5) siehe Schema 3.4

		K_i -Werte für MMP [μM]						
R		2	7	8	9	12	13	14
26d	Ethyl	37.8	0.10	24.7	16.3	22.5	17.00	1.12
27d	Propyl	32.1	0.32	15.7	13.5	13.7	11.40	1.73
28d	Butyl	28.0	0.05	4.0	10.8	14.9	2.50	0.22
29d	Pentyl	3.5	0.05	3.8	15.2	22.3	0.06	0.01
30d	Hexyl	11.5	0.03	11.0	22.8	17.2	0.98	0.08
31d	Heptyl	17.3	0.06	9.8	23.1	25.8	0.82	0.28
32d	Octyl	25.0	0.11	17.2	19.2	31.3	1.78	0.85

Tab. 3.5 K_i -Werte für Inhibitoren des 6-Azauracil-Typs

Auch diese Inhibitoren zeigten eine sehr gute Hemmwirkung gegenüber MMP-7, MMP-13 und MMP-14 mit K_i -Werten im niedrigen nanomolaren Bereich.

Um einen Hinweis auf einen möglichen Bindungsmodus dieser Inhibitoren zu erhalten, wurden in einem weiteren Schritt die Substituenten in Position 6 des Heterozyklus modifiziert. Abbildung 3.4 zeigt die zugehörige Struktur, in Tabelle 3.6 findet man die Hemmkonstanten dieser Derivate für MMP-9.

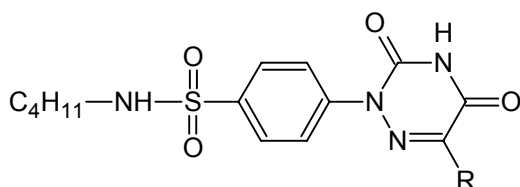


Abb. 3.4 Derivate mit modifiziertem Substituenten in Position 6

K_i -Werte für MMP-9 [μM]

	R	
28f	H	>50.0
28d	CN	10.8
28e	COOH	11.2

Tab. 3.6 K_i -Werte von Inhibitoren mit unterschiedlichen Substituenten in Position 6

Ausschlag gebend für diese Überlegungen waren die Kenntnisse des Bindungsmodus von Pyrimidin-2,4,6-trionen (Barbiturate) an MMP-9. Abbildung 3.5 zeigt die Bindung eines Vertreters dieser Substanzklasse an MMP-9¹¹⁷.

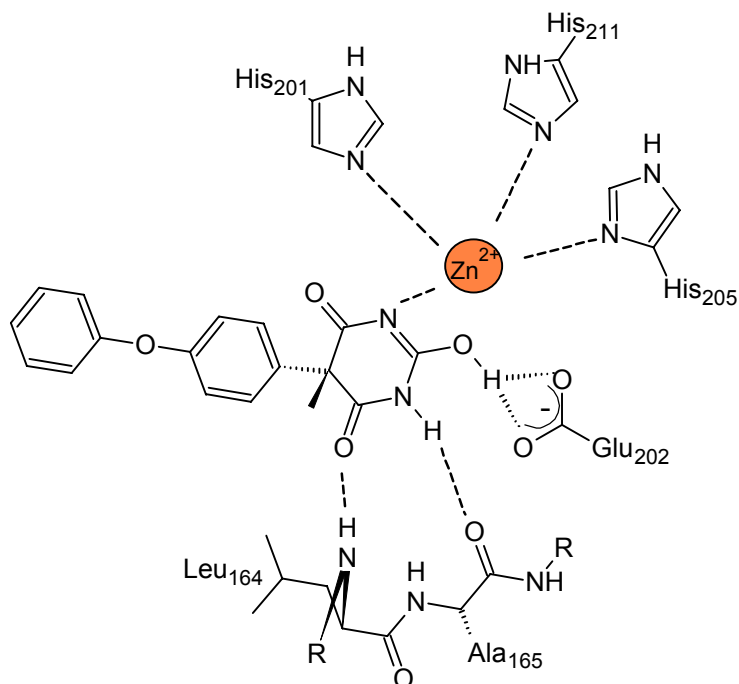


Abb. 3.5 Bindung eines Pyrimidin-2,4,6-trions an MMP-9

Gut zu erkennen ist die Chelatisierung des aktiven Zink(II)-Ions über das Stickstoffatom in Position 3, sowie die Wasserstoffbrückenbindung des protonierten Stickstoffs in Position 1 mit dem Enzymgerüst.

Durch Substitution der voluminösen Cyano-Gruppe in **28d** über eine Carbonsäure **28e** hin zum Wasserstoffatom in **28f** sollte die Auswirkung der veränderten sterischen Bedingungen untersucht werden. Da jedoch keine Erhöhung des inhibitorischen Potentials, sondern im Gegenteil ein vollständiger Verlust der Hemmwirkung gegenüber MMP-9 festgestellt wurde, konnte hieraus ein erster Hinweis auf einen andersartigen Bindungsmodus unserer Inhibitoren gewonnen werden. Eine weitere Bestätigung lieferte die Auswertung der Röntgenstruktur (s.u.), mit welcher gezeigt werden konnte, dass Substanz **28d** in der di-Ketoform im Kristall vorliegt und damit eine Chelatisierung des Zink(II)-Ions im aktiven Zentrum der MMPs über das entsprechende Stickstoffatom in Position 4 des Heterozyklus nicht möglich ist. Auch im Falle dieser Klasse von Inhibitoren sollte zukünftig verstärkt an der Aufklärung des Bindungsmodus gearbeitet werden.

3.4 Röntgenstrukturanalyse

Zur abschließenden Klärung der Struktur als auch zum Verständnis des Bindungsmodus von **28d** wurde eine Röntgenstruktur angefertigt. Die benötigten Kristalle konnten in hervorragender Qualität durch langsame Kristallisation aus einem Hexan/Ethanol Gemisch (1:1 v/v) erhalten werden. Die Ergebnisse der Analyse bestätigten die durch NMR-Analyse sowie Massenspektrometrie erwartete Molekülstruktur. Abbildung 3.6 zeigt die ORTEP-Projektion der Atome durch Schwingungsellipsoide mit 50% Wahrscheinlichkeit und die entsprechenden Nummerierungen. Die Wasserstoffatome wurden anisotrop berechnet.

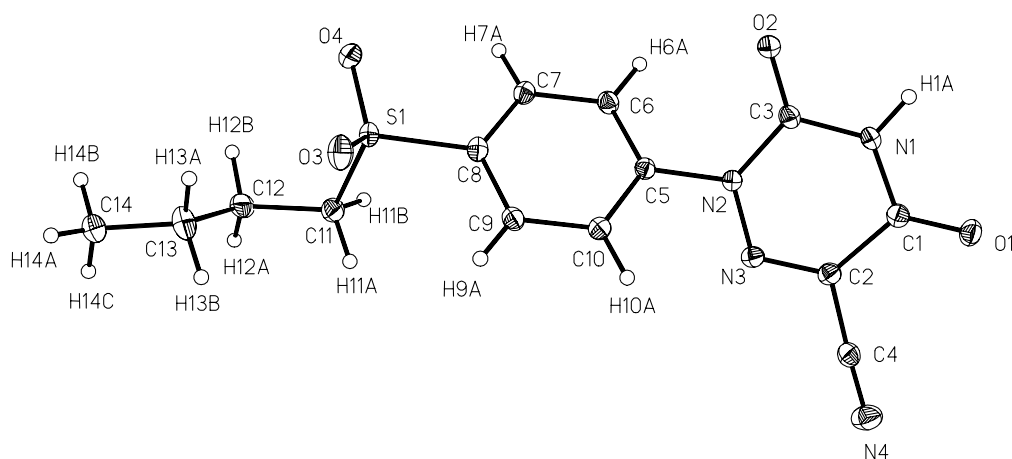


Abb. 3.6 ORTEP-Projektion von **28d**. Die Atome sind durch Schwingungsellipsoide mit 50% Wahrscheinlichkeit dargestellt.

Bindung	Länge [Å]	Bindung	Länge [Å]
O(1)-C(1)	1.2148 (16)	N(2)-N(3)	1.3401 (15)
O(2)-C(3)	1.2149 (16)	N(2)-C(3)	1.4005 (16)
N(1)-C(1)	1.3739 (17)	N(3)-C(2)	1.2972 (17)
N(1)-C(3)	1.3743 (16)	C(1)-C(2)	1.4717 (18)

Tab. 3.7 Interessante Bindungslängen für **28d**

Bindungen	Winkel [°]	Bindungen	Winkel [°]
C(1)-N(1)-C(3)	125.86 (11)	N(1)-C(1)-C(2)	112.15 (11)
N(3)-N(2)-C(3)	124.15 (11)	N(3)-C(2)-C(4)	117.36 (12)
N(3)-N(2)-C(5)	114.28 (10)	N(3)-C(2)-C(1)	124.46 (12)
C(3)-N(2)-C(5)	121.32 (10)	C(4)-C(2)-C(1)	118.18 (11)
C(2)-N(3)-N(2)	118.53 (11)	O(2)-C(3)-N(1)	122.78 (12)
O(1)-C(1)-N(1)	123.71 (12)	O(2)-C(3)-N(2)	122.55 (12)
O(1)-C(1)-C(2)	124.14 (12)	N(1)-C(3)-N(2)	114.67 (11)

Tab. 3.8 Interessante Bindungswinkel für **28d**

Von besonderem Interesse war bei dieser Klasse von Verbindungen die Möglichkeit der Keto-Enol-Tautomerie des Heterozyklus über die Carbonyl-Gruppierungen sowie den Stickstoff in Position 5. Die Möglichkeit eines Bindungsmodus in Analogie zu den bereits oben angesprochenen Barbituraten besteht nur, wenn das Stickstoffatom in nicht protonierter Form vorliegt. Die Bindungslängen der beiden Carbonyl-Gruppen waren mit 1.2148 (16) Å für O(1)-C(1) sowie 1.2149 (16) Å für O(2)-C(3) praktisch gleich, so dass von davon ausgegangen werden konnte, dass die di-Ketoform des Moleküls den tatsächlichen Zustand beschrieb. Dafür sprachen weiterhin die sehr ähnlichen Längen der Bindungen N(1)-C(1) von 1.3739 (17) Å und 1.3743 (16) Å für N(1)-C(3). Neben diesen Hinweisen aus dem Vergleich der Bindungslängen konnten auch die Bindungswinkel im Heterozyklus über den Protonierungsgrad des N(5)-Atoms Aufschluss liefern. Wie gut zu erkennen war, war der Bindungswinkel C(1)-N(1)-C(3) mit 125.86 (11)° deutlich größer als der vergleichbare Winkel C(2)-N(3)-N(2) mit 118.53 (11)°. Dies korreliert hervorragend mit der von Singh et al.⁹⁵ gemachten Beobachtung, nach der ein protoniertes Ring-Stickstoff-Atom einen deutlich erhöhten Bindungswinkel aufweist. Somit konnte für die hier vorgestellte Verbindung von einer im Kristall vorliegenden di-Ketoform ausgegangen werden. Mit diesen Ergebnissen sollte der Bindungsmodus der synthetisierten Inhibitoren vom Azaurazil-Typ Unterschiede im Vergleich zu den Barbituraten aufweisen. Bei diesen Verbindungen kann die Hemmung der katalytischen Aktivität durch Chelatisierung des aktiven Zink(II)-Ions über ein nicht protoniertes Stickstoff-Atom des Heterozyklus erreicht werden. Dabei besetzt dieses Atom die freie Koordinationsstelle am Zink(II)-Ion und verdrängt dabei das für die Katalyse essentielle Wassermolekül. Diese Möglichkeit besteht für die Azaurazile wahrscheinlich

nicht, da hier ein protoniertes Stickstoffatom in Position 4 vorliegt. Allerdings ist zu beachten, dass dieser Zustand nur für die Kristallform bewiesen wurde.

3.5 Wirksamkeit im orthotopen Pankreaskarzinom-Modell

In Zusammenarbeit mit der Abteilung Molekulare Onkologie der Universität Kiel wurde die Substanz **28d** hinsichtlich ihrer Wirksamkeit gegen das Tumorstadium im orthotopischen Pankreaskrebs-Zellmodell *in vivo* und *in vitro* untersucht. Dieses Modell wurde im Universitätsklinikum gut etabliert, wobei dem Pankreaskarzinom-Modell besonderes Interesse zukommt, da diese Tumorform neben der negativen Prognose nicht bzw. ungenügend auf die derzeit verfügbare cytotoxische Chemotherapie anspricht.

3.6 *In vitro* Messungen

Um die Verträglichkeit und das inhibitorische Potential von **28d** abschätzen zu können, wurde im Vorfeld der *in vivo* Messungen verschiedene *in vitro* Tests durchgeführt. Hierbei konnte festgestellt werden, dass die Proliferation sowohl der Fibroblasten (KiF-5) als auch der Pankreastumorzellen (PancTu-1) im EZ4U-Test bis zu einer Konzentration von 300 μ M nicht beeinflusst wird. Die gleichen Ergebnisse wurden bei einer Ko-Kultivierung der KiF-5 Zellen mit den PancTu-1 Zellen erhalten. Erst bei einer Konzentration von 3 mM **28d** zeigte sich eine Inhibierung der Proliferation.

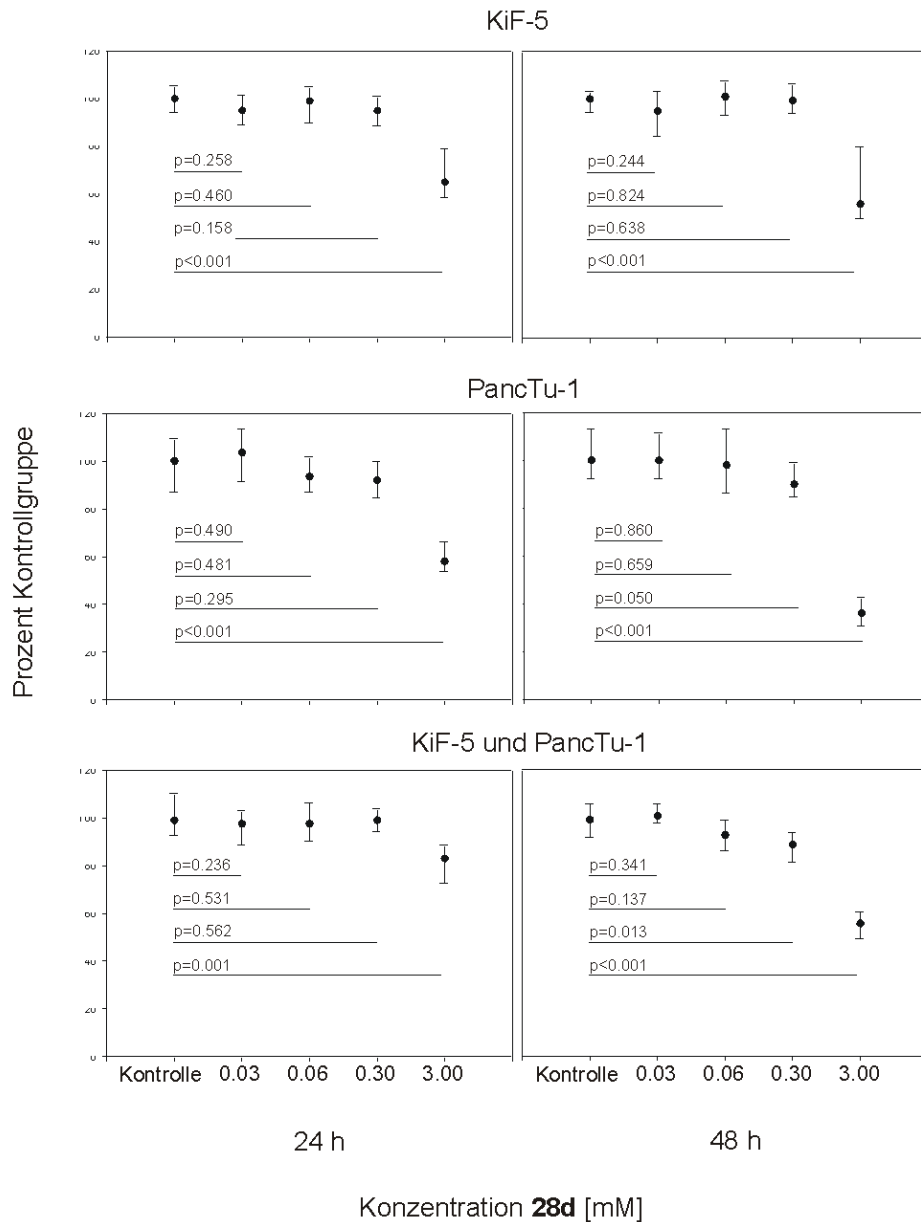


Abb. 3.7 EZ4U Test, Zellproliferation mit unterschiedlichen Konzentrationen **28d**. RPMI-Medium (10% FCS), je drei Messungen, Signifikanz bei $p < 0.05$

Die Kontrolle der Beeinflussung der Invasivität der PancTu-1 Zellen durch eine Fibroblasten-, „monolayer“ zeigte eine signifikante Inhibierung bis zu einer Konzentration von 30 μM im Vergleich zu einer Kontrollgruppe, welche ohne Inhibitor kultiviert worden war. In diesem Modellsystem wurden KiF-5 Zellen konfluent über einen Zeitraum von 24 bis 72 Stunden in RPMI-1640 Medium aufgezogen. Die Konfluenz wurde mikroskopisch kontrolliert. Anschließend wurde mit DMSO bei Raumtemperatur permeabilisiert

und sorgfältig mit PBS und RPMI-1640 Medium gewaschen. Die Resuspension von Einzelzellen Suspensionen der PancTu-1 Zellen erfolgte in RPMI-1640 Medium mit nachfolgender Zugabe zu den Fibroblasten „monolayern“. Nach 24 Stunden wurde das Medium entfernt und gegen frisches Medium mit verschiedenen Konzentration an **28d** (0-3 mM) ausgetauscht. 48 bzw. 72 Stunden nach Zugabe des Inhibitors wurde vorsichtig mit PBS gewaschen und mit einer Trympanblau Lösung angefärbt. Eine blaue Färbung zeigten im Gegensatz zu den lebenden Pankreaskarzinom Zellen nur die permeabilisierten Fibroblasten Zellen. Die Proteolyse der Fibroblasten „monolayer“ führte zu einer nicht eingefärbten Fläche, welche mit der proteolytischen Aktivität der PancTu-1 Zellen korreliert. Nachfolgend wurden die Platten fotografiert und nachfolgender Aufarbeitung mit Hilfe des Programms Scion Image.

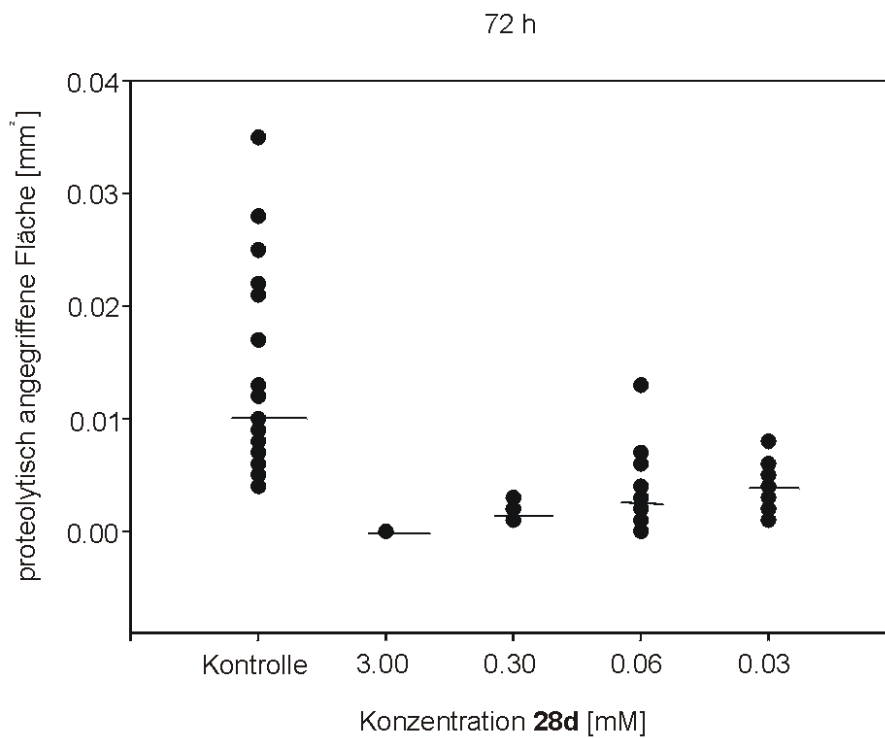
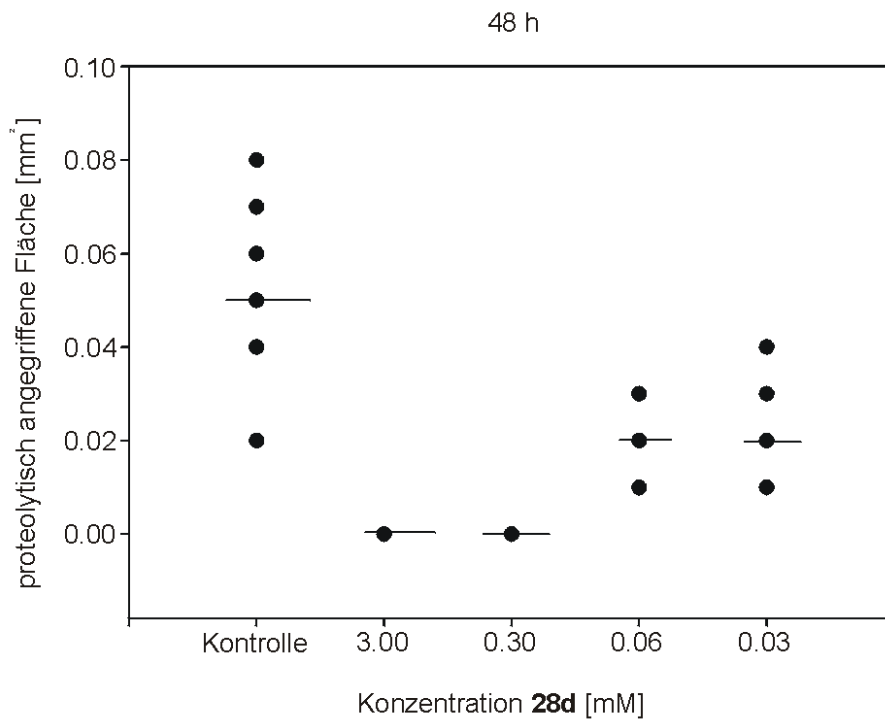


Abb. 3.8 Größe der proteolytisch angegriffenen Fläche des Fibroblasten Monolayers während des Invasionsassays

Abbildung 3.8 zeigt die Größe der proteolytisch angegriffenen Fläche der Fibroblasten. Gut zu erkennen ist die Reduktion dieser Fläche bis zu einer Konzentration von 30 μM **28d**. Da die Größe dieser Fläche mit der proteolytischen Aktivität der PancTu-1 Zellen korreliert, zeigt sich bereits in diesem Test das inhibitorische Potential von **28d**.

3.7 *In vivo* Messungen

Um die Wirksamkeit von **28d** *in vivo* untersuchen zu können, wurde ein entsprechendes Tiermodell entwickelt. Hierzu wurden PancTu-1 Zellen bis zu einer Dichte von 1.000.000 Zellen/20 μl kultiviert. Anschließend wurden den Versuchstieren unter Narkoseeinfluß diese Zellen in den Pankreas eingesetzt. Sieben Tage nach der Operation wurde die Therapie gestartet. **28d** wurde in einer Tagesdosis von 120 mg/kg Körpergewicht über einen Zeitraum von 15 Tagen verabreicht. Die Verabreichung des Inhibitor erfolgte in DMSO. Entsprechend wurde die Kontrollgruppe während der Versuchreihe mit DMSO behandelt. Anschließend wurde der Tumor reseziert und das Gewicht bestimmt. Alle Versuche wurden unter Einhaltung der „Richtlinien für Sorgfalt bei der Durchführung von Tierexperimenten der Universität Kiel“ durchgeführt und permanent vom lokalen Veterinäramt überwacht.

Abbildung 3.9 zeigt das Tumorgewicht von Kontrollgruppe sowie der Versuchstiergruppe nach der Resektion des Tumors. Beide Gruppen enthielten sechs Versuchstiere. Zu erkennen ist die signifikante Verringerung des Tumorgewicht um etwa 40% nach der Behandlung mit **28d**.

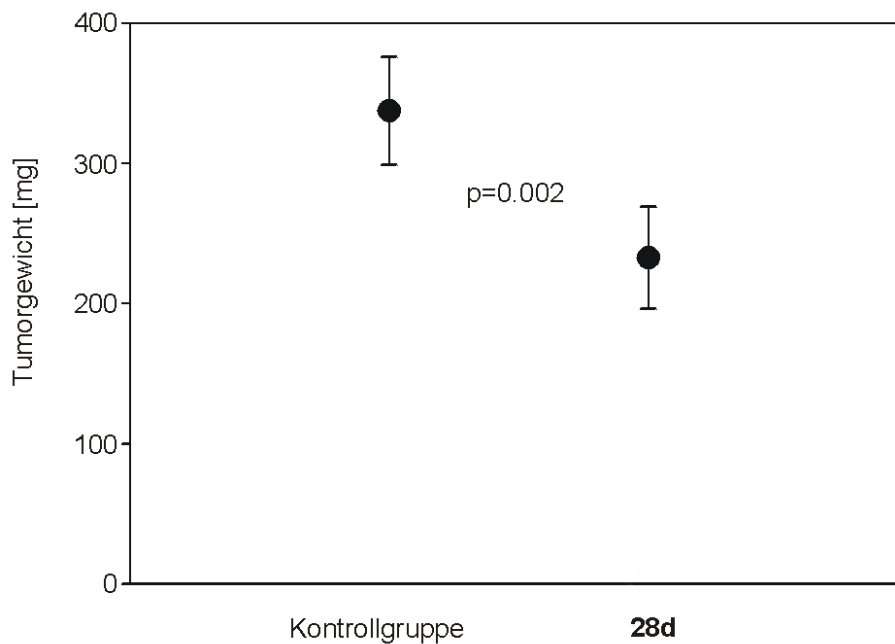


Abb. 3.9 Pankreastumorgewicht nach 15 Tagen Behandlung mit **28d**.

In dieser Versuchsreihe wurde einer Gruppe von Mäusen (n=6) die humane Pankreas-krebszelllinie PancTu-1 orthotop in den Pankreas eingepflanzt. Sieben Tage nach erfolgter Operation wurde die Therapie über einen Zeitraum von 15 Tagen gestartet. Dabei erhielt die Kontrollgruppe einmal täglich 10 µl DMSO, den Versuchstieren wurde eine tägliche Dosis **28d** (120mg / kg Körpergewicht) in 10 µl DMSO appliziert. Nach Beendigung der Therapie wurden die Tumore reseziert und deren Gewicht bestimmt. Wie in der Abbildung 3.9 gut zu erkennen ist, konnte durch die Behandlung mit **28d** eine Verringerung des Tumorgewicht von 344 mg auf 212 mg, dies entspricht einer Abnahme von ca. 40%, erreicht werden. Darüber hinaus war festzustellen, dass sowohl die Kontrollgruppe als auch die Gruppe der Versuchstiere während der Versuchsreihe keine Auffälligkeiten zeigten, welche zum Abbruch des Versuchs geführt hätten. Dies ließ auf eine gute Verträglichkeit des Inhibitors schließen.

3.8 Metabolische Stabilität

Schon im möglichst frühen Stadium der Entwicklung potentieller Medikamente ist die Abschätzung von Unverträglichkeiten bzw. unerwünschter Nebenwirkungen essentieller Bestandteil. Durch Untersuchungen in diesem Stadium soll mit nachfolgender Optimierung der Substanzen das toxikologische Potential eliminiert werden, da 35% aller klinischen Entwicklungsprojekte wegen Unverträglichkeiten abgebrochen werden müssen. Im Mittelpunkt des Interesses steht heute die Cytochrom P-450 (CYP)-Superfamilie. Diese Gruppe von Enzymen spielt bei der Metabolisierung von Arzneimitteln die wohl bedeutendste Rolle. Diese Enzymfamilie metabolisiert verschiedenste endogene Substrate, beispielsweise durch Oxidation oder Reduktion. Zu diesen Substraten zählen u.a. gesättigte und ungesättigte Fettsäuren, Steroide oder Vitamine. Darüber hinaus werden zahlreiche exogene Stoffe, wie Medikamente, Pflanzenstoffe, aber auch Umweltgifte verstoffwechselt.

Die Untersuchungen zur metabolischen Stabilität erfolgen mit Hilfe von humanen Lebermikrosomen-Präparationen, welche eine bekannte Konzentration an CYP450 enthalten. Die zu untersuchende Substanz wurde zusammen mit den Mikrosomen sowie einem Ko-Faktor in einem Natriumphosphat-Puffer bei pH 7.4 über verschiedene Zeiträume bei 37 °C inkubiert. Dieser Ko-Faktor ist für die Aktivität der CYP450-Enzyme essentiell und enthält Glucose-6-Phosphat, MgCl₂, NADP sowie Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase. Die Metabolisierung wurde durch Zugabe von eiskaltem Methanol gestoppt, die Reaktionsmischungen über Nacht eingefroren und anschließend zentrifugiert. Der Überstand wurde mit Hilfe der HPLC-Analytik qualitativ auf einen möglicherweise erfolgten Abbau bzw. Veränderungen untersucht. Die bereits bei den *in vivo* Messungen verwendete Substanz **28d** wurde für diese Stabilitätsuntersuchungen ausgewählt. Um die Aktivität der verwendeten Mikrosomen zu dokumentieren, diente Testosteron als Standardreagens. Dieses Hormon wird innerhalb von 2 Stunden vollständig unter den gewählten Reaktionsbedingungen abgebaut. Abbildung 3.10 zeigt schematisch den Verlauf der Abbaureaktionen über den genannten Zeitraum. Gut zu erkennen ist die vollständige Metabolisierung des Standards. Eine vergleichbare

Reaktion ist bei der Testsubstanz nicht zu erkennen. Die Auswertung der Absorptionsmessung zeigt über das Fehlen von Metaboliten hinaus keine Intensitätsabnahme, so dass davon ausgegangen werden kann, dass die Testbedingungen für ein derartiges System optimal gewählt wurden und die Substanz **28d** unter diesen Bedingungen stabil gegen die verwendeten Leberenzyme (Mikrosomen-Enzyme) war.

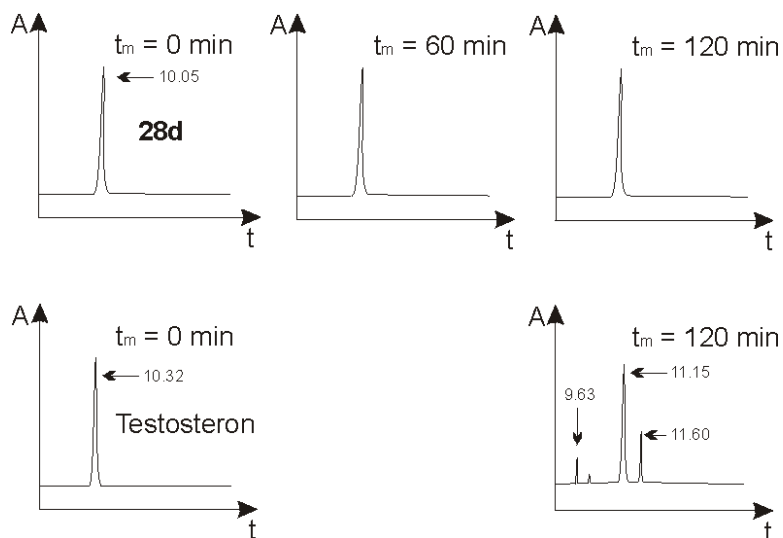


Abb. 3.10 Kontrolle der metabolischen Stabilität von **28d**. Zum Aktivitätsnachweis der Mikrosomen diente Testosteron. Gewählte Bedingungen: Natriumphosphatpuffer, pH 7.4, 37 °C, Inkubationsdauer 60, 120 min, analytische Säule Aquapore OD-300 C₁₈, Porenweite 7µm, Temperatur der Säule 30 °C, $\lambda = 221$ nm.

3.9 Einordnung der Ergebnisse in den medizinischen Kontext

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die in dieser Arbeit entwickelten Inhibitoren gute bis sehr gute Hemmwirkungen gegen MMP-7, MMP-13 und MMP-14 aufweisen. In einigen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass die Expression von MMP-7 positiv mit der Fernmetastasierung und invers mit der Überlebensrate bei früh metastasierendem Kolonkarzinom⁹⁶ assoziiert ist. Dabei wird diese Proteinase vorwiegend im Bereich der Invasionsfront des Tumor detektiert und könnte damit durch Tumor-Host-Interaktion induziert sein und bei der Tumorprogression eine entscheidende Rolle

spielen⁹⁷. Durch die breite Substratspezifität⁹⁸ des Enzyms könnte die Verstärkung von Invasion und Metastasierung auf einen direkten Effekt von MMP-7 zurückzuführen sein, da viele Bestandteile der Basalmembran direkt degradiert werden. Durch die Fähigkeit von MMP-7, andere Enzyme wie MMP-2 und MMP-9 zu aktivieren^{99,100}, wäre jedoch auch ein indirekter Effekt denkbar. Darüber hinaus konnte eine Korrelation von MMP-7 mit der Fernmetastasierung im fortgeschrittenen Kolonkarzinom sowie der lokalen Lymphknotenmetastasierung¹⁰¹ und im Zusammenhang mit Magenkarzinomen¹⁰² gezeigt werden. Eine erhöhte Expression von MMP-7 ist weiterhin in verschiedensten Tumorformen wie beispielsweise im Brust-, Prostata-, Lungen-, Darm- und Hautkarzinom zu beobachten¹⁰³. MMP-7 spielt durch Dehydratation von Vitronektin und uPA bei der Blutkoagulation eine entscheidende Rolle¹⁰⁴.

Im Gegensatz zu MMP-7, welche direkt in das Tumorgeschehen involviert sein kann, kommt der MMP-14 (MT1-MMP) besondere Bedeutung zu, da die Expression dieser membranständigen Proteinase direkt mit der Aktivierung von MMP-2 korreliert¹⁰⁵⁻¹⁰⁷, die für den Abbau des Typ-IV Kollagens der Basalmembran verantwortlich gemacht wird. Dieser Zusammenhang zwischen Expressionslevel von MMP-14 und Aktivierungsrate von MMP-2 wurde in verschiedenen Arbeiten gezeigt^{108 105,109}. Somit könnte die Hemmung von MMP-14 über den Zusammenhang mit der Aktivierung von MMP-2 entscheidenden Einfluss auf Wachstum, Invasivität und Metastasierung im Tumorgeschehen haben.

4 Zusammenfassung und Ausblick

Matrix Metalloproteinasen (MMPs) gehören zur Superfamilie der Metzinkine, einer Enzymklasse, welche sich durch ein im aktiven Zentrum lokalisiertes Zink-Ion auszeichnet. An vielen physiologischen Prozessen, welche ein fein reguliertes Gleichgewicht von Auf- und Abbaureaktionen von Bestandteilen der Zellmembran oder des sie umgebenden Matrixgewebes beinhalten, haben MMPs entscheidenden Anteil. Dieses Gleichgewicht wird durch endogene, teils hochspezifische Inhibitoren, wie den TIMPs, aufrecht erhalten. Eine Störung dieser Regulierung führt häufig zu pathologischen Prozessen, wie z.B. der Metastasierung oder dem Tumorwachstum.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollten hochspezifische Inhibitoren der MMPs gefunden werden. Neben guten Hemmeigenschaften wurde einem möglichst guten pharmakologischen Profil wie auch günstigen Pharmakokinetik besondere Aufmerksamkeit beigemessen. Der Verzicht auf eine Hydroxamat-Gruppe als Zink-chelatisierendes Element resultierte in einer neuen Klasse von MMP-Inhibitoren, den 1,2,4-Triazinen. Dieses zentrale Strukturelement führte durch Modifizierungen sowohl am Heterozyklus als auch durch Änderung des Substitutionsmusters zu hochwirksamen Inhibitoren und zur Synthese vollkommen neuer Wirkstoffe. Nach unserem derzeitigen Kenntnisstand wurden erstmals Vertreter dieser Stoffklasse zur Hemmung der Aktivität von MMPs eingesetzt.

Eines der herausragenden Merkmale der neu entwickelten Inhibitoren ist die gute bis sehr gute Diskriminierung zwischen einzelnen MMPs. Teilweise konnten Hemmkonstanten im niedrigen nanomolaren Bereich ermittelt werden. Dabei wurde vor allem die Aktivität von MMP-7, MMP-13 und MMP-14 (MT1-MMP) herabgesetzt. Dies gilt sowohl für die in einem ersten Schritt synthetisierten Inhibitoren mit 6-Methyl-1,2,4-Triazin-Kern als auch für die Inhibitoren mit 6-Azurazil-Kern. Die Änderung des Substitutionsmusters führte ausgehend von 3-Amino-5,6-dimethyl-1,2,4-triazin zu einer Änderung des inhibitorischen Potentials, jedoch nicht zu einer Änderung im Diskriminierungsverhalten gegenüber

einzelnen MMPs. So konnten für *N*-(4-Chlorphenyl)-*N'*-{6-methyl-5-[(phenylsulfonyl)methyl]-1,2,4-triazin-3-yl}harnstoff (**17**) K_i -Werte von 10 nM gegen MMP-7 und 50 nM gegen MMP-13 ermittelt werden, *N*-(4-Chlorphenyl)-*N'*-{6-methyl-5-[(1,1'-biphenyl-4-ylsulfonyl)methyl]-1,2,4-triazin-3-yl}harnstoff (**18**) erwies mit 130 nM gegen MMP-7 und 40 nM gegen MMP-13 ein ähnliches Hemmverhalten bei gleichzeitig veränderten sterischen Verhältnissen. Beide Substanzen zeigten deutliche Präferenzen für die Hemmung von MMP-7 und MMP-13. Aus früheren Arbeiten von Schröder war bekannt, dass Thiadiazine eine Hemmung der MMPs über die Chelatisierung des aktiven Zink-Ions mittels exozyklischem Stickstoffatom bewerkstelligten. Die 1,2,4-Triazine weisen offensichtlich einen andersartigen Bindungsmodus auf, da die Diskriminierung der MMPs nicht über die $S_{1'}$ -Seitentasche erfolgt, wie die gute Hemmkonstante von *N*-(4-Chlorphenyl)-*N'*-{6-methyl-5-[(1,1'-biphenyl-4-ylsulfonyl)methyl]-1,2,4-triazin-3-yl}harnstoff (**18**) gegen MMP-7 trotz der großen Biphenylliganden zeigte. Folglich sollte der Heterozyklus selbst eine tragende Rolle spielen. Diese Überlegung führte zur Synthese von Inhibitoren mit 1,2,4-Triazin-3,5-dion-Grundkörper (6-Azaurazil). Auch diese Inhibitoren wiesen hervorragende K_i -Werte im niedrigen nanomolaren Bereich auf. Für 3,5-Dioxo-2-[4-(piperidin-1-ylsulfonyl)phenyl]-2,3,4,5-tetrahydro-1,2,4-triazin-6-carbonitril (**23d**) konnte ein Wert von 60 nM gegen MMP-7 ermittelt werden, die Hemmkonstante von 2-[4-(Morpholin-4-ylsulfonyl)phenyl]-3,5-dioxo-2,3,4,5-tetrahydro-1,2,4-triazin-6-carbonitril (**21d**) gegen MMP-13 betrug 6 nM. Mittels Röntgenstrukturanalyse von 2-[4-(Butylsulfonyl)-phenyl]-3,5-dioxo-2,3,4,5-tetrahydro-1,2,4-triazin-6-carbonitril (**28d**) konnte im Hinblick auf das Tautomerieverhalten der tatsächliche Zustand dieser Moleküle im Kristall ermittelt werden. Dabei wurde festgestellt, dass diese 6-Azaurazile in der di-Ketoform mit protoniertem Stickstoff an Position 4 vorliegen und folglich eine Chelatisierung des aktiven Zink-Ions über diese Position nicht möglich ist. Damit zeigten die 6-Azaurazile einen im Vergleich zu den strukturell verwandten Pyrimidin-2,4,6-trionen (Barbiturate) veränderten Bindungsmodus. Diese Substanzen wiesen gute Hemmeigenschaften gegenüber den Gelatinasen auf und besetzten über das Stickstoffatom an Position drei die vierte Koordinationsstelle des aktiven Zink-Ions in den Gelatinasen.

Im Zuge der Zusammenarbeit mit der onkologischen Abteilung der Universität Kiel konnte erstmals gezeigt werden, dass die Klasse der 6-Azaaurazile nicht cytotoxisch wirkt und im Tiermodell *in vivo* eine gute Verträglichkeit aufweist. Die signifikante Reduzierung des Tumorgewichts um 40% im orthotopen Pankreaskarzinom-Modell in Mäusen durch Therapie mit 2-[4-(Butylsulfonyl)phenyl]-3,5-dioxo-2,3,4,5-tetrahydro-1,2,4-triazin-6-carbonitril (**28d**) wurde nachgewiesen.

Die metabolische Stabilität von 2-[4-(Butylsulfonyl)phenyl]-3,5-dioxo-2,3,4,5-tetrahydro-1,2,4-triazin-6-carbonitril (**28d**) konnte durch Behandlung mit humanen Lebermikrosomen ermittelt werden. Ein metabolischer Abbau des Azaaurazil-Inhibitors über die Dauer von zwei Stunden war nicht zu beobachten, was auf eine vorteilhafte Pharmakokinetik dieser Inhibitorenklasse hinweist.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass im Rahmen dieser Arbeit eine neue Klasse von MMP-Inhibitoren gefunden werden konnte. Diese weist neben sehr hohem inhibitorischem Potential *in vitro* auch im Tiermodell eine hohe *in vivo* Aktivität auf. Diese interessanten Charakteristika geben dieser Substanzklasse daher ein sehr gutes therapeutisches Entwicklungspotential.

Zukünftige Arbeiten sollten sich in einem ersten Schritt der Aufklärung des Bindungsmodus der Inhibitoren mit den MMPs widmen. Hierzu könnten Kristallisationsstudien von MMPs mit Inhibitor durchgeführt werden, um mit anschließender Röntgenstrukturanalyse zunächst den molekularen Bindungsmodus aufzuklären. Die bereits durch die Kristallisation von **28d** gewonnenen Daten könnten durch „Molecular Modeling“ in „Docking“-Versuchen hierbei Verwendung finden. Ausgehend von diesen Ergebnissen sollte eine weitere Optimierung der Inhibitoren möglich sein, vor allem im Hinblick auf ihr Diskriminierungspotential.

5 Experimenteller Teil

5.1 Allgemeine Methoden, verwendete Geräte

Alle Reaktionen wurden in Lösungsmitteln der Qualitätsstufe p.A. ausgeführt, welche ohne weitere Aufreinigung eingesetzt wurden. Je nach Verfügbarkeit wurden diese Lösungsmittel von den Firmen Merck, Darmstadt; Riedel-de Haen, Seelze; Carl Roth GmbH, Karlsruhe; Sigma Aldrich, Steinheim; Fisher Chemicals, Loughborough, UK sowie J.T.Baker, Deventer, Niederlande verwendet. Die Charakterisierung mittels HPLC erfolgte mit Reinstwasser, aufbereitet mit einer Milli-Q Anlage der Firma Millipore, Billerica, USA, sowie Acetonitril der Qualitätsstufe Gradient Grade LiChroSolv, Merck, Darmstadt verwendet.

Der überwiegende Teil der eingesetzten Edukte wurde über die Firmen Sigma Aldrich, Steinheim; Fluka Chemie GmbH, Buchs; Merck, Darmstadt und Acros Organics, Geel, Belgien bezogen.

5.2 Chromatographie

5.2.1 Dünnschichtchromatographie

DC-Alufolien Alugram Sil G/UV₂₅₄ der Firma Macherey-Nagel, Düren, wurden für analytische Dünnschichtchromatographien verwendet. Die Identifizierung der Substanzen erfolgte durch Beleuchtung mit UV-Licht der Wellenlänge 254 nm. Anschließend wurde durch Besprühen mit einer 0,3%igen ethanolschen Ninhydrin-Lösung und gleichmäßigem, vorsichtigen Erhitzen angefärbt.

5.2.2 HPLC

Zur Charakterisierung und Prüfung der Reinheit sowie der metabolischen Stabilität der dargestellten Substanzen diente ein System der Firma Applied Bioscience. Ein 130 A Separation System sowie ein 920 A Data Analysis Modul wurden durch ein PE Nelson

900 Series Interface der Firma Perkin Elmer, Überlingen verbunden. Als stationäre Phase diente eine analytische Säule Aquapore OD-300 C₁₈, Porenweite 7µm, 220 x 2,1 mm der Firma Perkin Elmer, Überlingen. Als Standardbedingung wurde eine Temperatur der Säule von 30 °C gewählt. Die Detektion der Substanzen erfolgte durch Absorptionsmessung bei einer Wellenlänge von 221 nm.

Als mobile Phase wurde ein binäres Puffersystem benutzt: Eluent A: Wasser, 0,1% TFA; Eluent B: 80% Acetonitril (LiChroSolv, Merck, Darmstadt), 20% Wasser, 0,09% TFA. Die Charakterisierung erfolgte ausschließlich mit folgendem Gradientenprogramm: Flußrate = 250 µl / min , t = 5 min (0 %B), t = 10 min (55% B), t = 20 min (100% B), t = 25 min (100% B), t = 30 min (0% B).

5.3 Spektroskopie

NMR-Spektren wurden mit einem FT-Multikernspektrometer DRX-500 der Firma Bruker, Karlsruhe gemessen. Die Meßfrequenzen betragen 500,1 MHz für ¹H-Spektren und 250,8 MHz für ¹³C-Spektren, als externer Standard fungierte TMS, die Meßtemperatur betrug 300 K. Die chemischen Verschiebungen wurden in ppm (parts per million) als δ-Werte relativ zum Standard angegeben.

5.4 Massenspektrometrie

Massenspektren wurden mit Hilfe der Elektro-Spray-Methode in positiver und negativer Ionisation auf einem Autospec VG der Firma Fisons, Manchester, Großbritannien aufgenommen. Angegeben sind jeweils die Signale höchster Intensität.

5.5 Elementaranalysen

Elementaranalysen wurden mit Hilfe eines Leco CHNS-932 Elementar Analyser, mikroanalytisches Labor Universität Bielefeld, angefertigt.

5.6 Röntgenstrukturanalyse

Die Röntgenstruktur von **28d** wurde mit einem Diafraktometer der Firma bei einer Temperatur von 100 K aufgenommen.

Die Bestimmung der Schmelzpunkte erfolgte in einer Apparatur der Firma Büchi, Büchi 510.

5.7 Hemmtest

Zur Bestimmung der Hemmeigenschaften der synthetisierten Substanzen wurden Aktivitätsmessungen mit verschiedenen MMPs durchgeführt. Die Aktivitätsmessungen erfolgten in einem wässrigen MRB - Meßpuffer der Zusammensetzung 50 mM HEPES/NaOH, 10 mM CaCl₂, 0,02% PEG 8000, pH 7,4 bei einer Temperatur von 25 °C . Während der Messung bei einer Wellenlänge von 393 nm ($\lambda_{\text{ex}} = 328$ nm) wurde über einen Zeitraum von 120 s der Anstieg der Fluoreszenzintensität durch Umsetzung eines entsprechenden Substrates verfolgt. Es wurde ausschließlich Mca-Pro-Leu-Gly-Leu-Dpa-Ala-Arg-NH₂ (Mca: (7-Methoxycumarin-4-yl)-acetyl; Dpa: N-3-(2,3-Dinitrophenyl)-L-2,3-Diaminopropionyl) der Firma Calbiochem verwendet. Durch proteolytische Spaltung der Gly(P1)-Leu(P1')-Bindung erhält man ein fluoreszierendes Produkt, dessen Bildung grafisch verfolgt und mittels implementierter Software ausgewertet wurde.

Die Messungen wurden in Makro-Quarzküvetten der Firma Helma, bei einem Gesamtvolumen von 2 ml durchgeführt. Die Meßlösung enthielt jeweils konstante Konzentra-

tionen an Enzym (ein bis 10 nM), Substrat (ca. 5 mM), max. 1% DMSO sowie verschiedene Inhibitorkonzentrationen. Diese Konzentrationen richteten sich nach der Wirksamkeit des Inhibitors, wobei ausgehend von einer 30 mM Stammlösung entsprechende Verdünnungsreihen angefertigt wurden.

Zur Messung wurden Enzym und Inhibitor 30 Minuten bei 25 °C inkubiert, anschließend das Substrat zugegeben und der Fluoreszenzanstieg gemessen. Die Auswertung erfolgte relativ zu einem ohne Inhibitor verwendeten Standard. Alle Messungen wurden dreifach ausgeführt.

Die Messung erfolgte mit Hilfe eines Lumineszenz-Spektrometers LS 50 B, Perkin Elmer, Überlingen mit Thermostat MGW Lauda RL-3, Lauda, Königshofen. Die erhaltenen Daten wurden über einen angeschlossenen PC mit der Software FL-Winlab, Version 4.00.02, Perkin Elmer 2001, ausgewertet.

5.7.1 Bestimmung der K_i -Werte

Die Bestimmung der K_i -Werte erfolgte nach einer von Copeland et. al sowie Horovitz & Levitzki entwickelten Methode, welche unter Annahme einer Michaelis-Menton ähnlichen Kinetik folgende Gleichung herleiteten:

$$K_i = IC_{50} / (1 + [S]/K_m)$$

Die IC_{50} -Werte der Inhibitoren konnten mit Hilfe eines vier Parameter Algorithmus des Programms GraFit, Version 3.0, Erithacus Software Limited ermittelt werden. Für jede zur Verfügung MMP wurden Aktivitätsmessungen bei verschiedenen Konzentrationen von Mca-Substrat in Abwesenheit von Inhibitor durchgeführt. Aus diesen Werten konnte mit Hilfe von GraFit für cdMMP-2, MMP-7, cdMMP-8, MMP-9, cdMMP-12, cdMMP-13 und cdMMP-14 K_m -Werte von 9.1, 1.9, 5.9, 1.8, 27.3, 7.5 and 6.8 μ M ermittelt werden.

5.7.2 MMPs

Alle in den Hemmtests verwendeten Enzyme, ausgenommen die MMP-7, wurden in unserer Arbeitsgruppe hergestellt. Die MMP-9 konnte in ihrer vollständigen Form verwendet werden, von allen weiteren Enzymen stand die katalytische Domäne zur Verfügung. Bei einigen Enzymen erfolgte die Expression als latente Pro-Form, welche vor der Messung aktiviert werden mußte.

Die rekombinante, katalytische Domäne der MMP-2 wurde in einem *E.Coli* Expressionssystem als pro-Form dargestellt¹¹¹. Vor der Messung erfolgte die Aktivierung bei 37 °C mit 0.5 mM APMA.

Die rekombinante erzeugte, humane MMP-7 wurde von der Firma Calbiochem, San Diego bezogen.

Die rekombinant erzeugte, katalytische Domäne der MMP-8 wurde in aktiver Form mit Hilfe eines *E.Coli* Expressionssystems erhalten¹¹².

Als einziges Enzym konnte die MMP-9 in Ihrer vollständigen Form erhalten werden. Die latente MMP-9 wurde nach Tschesche et. al dargestellt¹¹³. Die Aktivierung erfolgte durch Inkubation mit Trypsin bei 37 °C für 10 min. Zur Inaktivierung des Trypsins wurde Aprotinin verwendet.

Die Expression der katalytische Domäne von MMP-12 erfolgte in einem *E.Coli* System. Das Protein wurde nach Renaturierung über Affinitätschromatografie mit einem Hydroxamat-Inhibitor aufgereinigt¹¹⁴.

Die katalytische Domäne der humanen MMP-13 wurde in einem *E.Coli* Expressionssystem als pro-Form erhalten¹¹⁵. Die Aktivierung des Enzyms erfolgte durch Inkubation mit 5 mM HgCl₂ für 2h bei 37 °C.

Die katalytische Domäne der MMP-14 erhielt man durch Expression in einem *E. Coli* System¹¹⁶. Die Aktivierung erfolgte autokatalytisch.

5.8 *In vitro* und *in vivo* Messungen

In Zusammenarbeit mit der Abteilung molekulare Onkologie der Universität Kiel wurden Messungen der Wirksamkeit der Substanz **28d** in einem orthotopen Pankreas-krebs-Modell in Mäusen durchgeführt, welches an diesem Institut entwickelt wurde.

5.8.1 Zellen

Pankreastumor Zelllinien PancTu-1 sowie humane „Foreskin“ Fibroblasten KiF-5 wurden in RPMI-1640 Medium (Invitrogen, Deutschland), welches 10% fötales Kälberserum, 2 mM Glutamine, 1 mM Natriumpyruvat (PAA, Österreich) enthielt, kultiviert.

5.8.2 *In vitro* Zellwachstumsassay

Das Zellwachstum wurde mit Hilfe des EZ4U-Kit (Biomol, Deutschland) verfolgt. Die Zellen (10.000 oder 20.000 Zellen/well) wurde in RPMI-1640 Medium, welches 10% FCS enthielt, aufgenommen und in einer 96 well Platte (Nunc, Deutschland) über Nacht kultiviert. Anschließend wurde **28d** in verschiedenen Konzentrationen zugegeben und für 24 oder 48 Stunden inkubiert. Im Falle der Inkubation über 48 Stunden wurde das Medium wie auch der Inhibitor nach 24 Stunden ausgewechselt. Danach wurde EZ4U Detektionslösung (10µl) zugegeben und für 3 Stunden bei 37°C inkubiert. Die Absorption bei 450nm wurde mit Hilfe eines Immunoreaders (AnthosII, Anthos Labtec, Deutschland). Die Ergebnisse wurde als Ergebnisse relativ zur Kontrollgruppe berechnet.

5.8.3 Invasions Assay

Ein Modellsystem, um die Invasion von PancTu-1 Pankreaskarzinom-Zellen durch eine Einzelschicht von Fibroblasten Zellen zu quantifizieren, wurde durch Modifizierung eines Protokolls von Casey entwickelt. KiF-5 Zellen (10.000 Zellen/well) wurden zwischen 48 bis 72 Stunden in 24 well Kulturschalen (Nunc, Deutschland) konfluent in RPMI-1640 Medium aufgezogen. Die Kontrolle der Konfluenz erfolgte durch Mikroskopie. Die Fibroblasten „monolayer“ wurde zweimal mit je 1 ml PBS gespült, permeabilisiert mit 250 µl DMSO für 50 Minuten bei Raumtemperatur und anschließend je zweimal mit PBS und RPMI-1640 Medium gespült. Die Kontrolle der Konfluenz während der Permeabilisierung erfolgte mittels Mikroskopie.

Einzelzellen Suspensionen von PancTu-1 Zellen (15.000 Zellen/well) wurden in RPMI-1640 Medium resuspendiert und zu den Fibroblasten „monolayern“ zugegeben. Nach je 24 Stunden wurde das Medium entfernt und gegen frisches Medium mit verschiedenen Konzentration an **28d** (0-3 mM) ausgetauscht. Nach 48 bzw. 72 Stunden wurde vorsichtig zweimal mit je 1 ml PBS gewaschen. Anschließend färbte man mit je 500 µl 0.2% Trypanblau Lösung (Sigma) über 9 Minuten an und spülte vorsichtig mit 1 ml PBS. Die permeabilisierten Fibroblasten Zellen wurden dabei im Gegensatz zu den lebenden Pankreaskarzinom-Zellen blau angefärbt, wodurch eine einfache Unterscheidung möglich war. Die Proteolyse der Fibroblasten „monolayer“ führte zu einer nicht eingefärbten Fläche, welche mit der proteolytischen Aktivität der PancTU-1 Zellen korreliert. Die Platten wurden fotografiert (Axio-Vision, Zeiss, Deutschland) und die nicht gefärbten Flächen um die PancTu-1 Zellen mit Hilfe des Programms Scion Image (Scion Corporation, Maryland, USA) ausgewertet.

5.8.4 Versuchstiere

Sechs Wochen alte weibliche *scid* Mäuse wurden von Harland und Winkleman, Borcheln, Deutschland, bezogen. Die Tiere wurden bei freiem Futter und Wasser unter laminar „airflow“ Bedingungen mit 12 Stunden Tag / Nacht Rhythmus bei 22-25 °C gehalten.

5.8.5 Orthotopes Mäuse Pankreaskrebs-Modell

PancTu-1 Zellen wurden bis zu einer Konfluenz von 70-80% in 175 cm³-Kulturflaschen kultiviert. Anschließend wurden sie enzymatisch, zweimal mit PBS gewaschen und resuspendiert auf Eis in Matrigel (BD, Deutschland). Die Tiere wurden narkotisiert (Midazolam, Fentanyl, Medetomidin), der Pankreas freigelegt und 1.000.000 Zellen sorgfältig inokkuliert. Die Wunden wurden sorgfältig mit Isopropanol (70%) gereinigt und die Bauchdecke geschlossen. Sieben Tage nach der Operation wurde die Therapie gestartet. **28d** wurde in DMSO gelöst und Tagesdosen von 120 mg/kg Körpergewicht appliziert. Die Kontrollgruppe erhielt entsprechende Dosen an DMSO. Die Therapie umfasste drei fünf-Tage-Rhythmen. Anschließend wurden die Tiere mit Kohlenstoffmonoxid behandelt, die Tumore reseziert und gewogen.

Die gesamte Studie wurde unter Beachtung der „Richtlinien für Sorgfalt bei der Durchführung von Tierexperimenten der Universität Kiel“ durchgeführt und permanent vom lokalen Veterinäramt überwacht.

5.9 Messung der metabolischen Stabilität gegenüber Lebermikrosomen

5.9.1 Materialien, Lösungen

Die verwendeten Chemikalien wurden von den Firmen Fluka Chemie GmbH, Buchs (Testosteron, Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase); Gerbu Biotechnik GmbH, Gaiberg (NADP) sowie Serva Feinbiochemica, Heidelberg (Glucose-6-Phosphat) bezogen.

Leber-Mikrosomen-Präparationen mit bekanntem P450-Gehalt der Firma Tebu-Bio GmbH, Offenbach, wurden erwendet.

5.9.2 Stabilitätsmessung

Die Inkubationen wurden im 96-Lochplattenformat mit 1.2 ml Fassungsvermögen pro Vertiefung bzw. Röhrchen ausgeführt. Jeder Substanz-Ansatz "+" wurde in Zweifachwerten mit Mikrosomen und Kofaktor-Mix, incl. 0-Minutenwert, durchgeführt.

Ansätze ohne Mikrosomen, d.h. "OM"-Ansätze zur Abschätzung der chemischen Stabilität in Puffer, und ohne Kofaktor-Mix, d.h. "OC" -Ansätze zur Erfassung von nicht-Cytochrom P450-vermitteltem Abbau, wurden in Einfachwerten bestimmt. Die folgende Tabelle 4.1 veranschaulicht das Pipettierschema.

µL	+	OC	OM
Puffer	170	220	195
Substanz	5	5	5
Mikrosomen	25	25	-
Kofaktor	50	-	50

Tab. 4.1 Pipettierschema der Inkubationskomponenten

Alle verwendeten Lösungen und Materialien wurden auf 0 °C gekühlt. Nach Vorlegen von Puffer und Substanz in die entsprechenden Wells/Röhrchen erfolgte das Auftauen der Mikrosomen im 37°C Wasserbad für 60-90 Sekunden mit anschließender Verdünnung mit Phosphat-Puffer auf eine Konzentration von 2 µM CYP450. Die Substanzen wurden ausgehend von einer Stammlösung der Konzentration von 10 mM in DMSO derart verdünnt, dass eine Endkonzentration von 10 µM Prüfsubstanz bei max. 1% DMSO erreicht wurde. Zu den 0h-Werten wurden 250 µl eiskaltem Methanol zugegeben, danach über Nacht -20°C eingefroren, am nächsten Tag 15 min bei 3000 Upm zentrifugiert und anschließend der Überstand in Probengefäße übergeführt. In alle

weiteren Wells/Röhrchen wurden die Mikrosomen sowie der Kofaktor zugegeben. Diese Kofaktor-Lösung setzte sich aus 2 ml einer wässrigen Natriumphosphat-Pufferlösung, pH 7,4 mit 160 mM Glucose-6-Phosphat und 80 mM MgCl₂, 15.6 mg NADP und 0.4 ml einer Lösung mit 100 IU/ml Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase zusammen. Vor der Verwendung wurde diese Lösung 1:3.33 verdünnt. Nach der Kofaktor-Zugabe wurden die Proben bei 37 °C für 0.5h, 1h sowie 2h auf einem Schüttler inkubiert. Anschließend wurde analog zum 0h-Wert verfahren. Zur Kontrolle der Enzymaktivität wurde Testosteron mit einer Endkonzentration von 100 µM verwendet. Mit Hilfe von HPLC konnte der Abbau der Substanzen verfolgt werden.

Die Inkubation erfolgte in einem Incubator-Shaker G25KC der Firma New Brunswick Scientific Co., Inc., Edison, USA. Als Zentrifuge wurde eine Biofuge Pico, Heraeus Instruments, Osterode eingesetzt.

5.10 Darstellung *N*-{[(1,2,4-triazin-3-yl)amino]carbonyl}-benzenesulfonamide

Zu einer Lösung von 10 mmol 1,2,4-Triazin-Derivat in 150 ml Chloroform wurde eine Lösung von 10 mmol Arylisocyanat in 10 ml Chloroform langsam zugetropft. Die Reaktionsmischung wurde 6 Stunden refluxiert und anschließend das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der erhaltene Feststoff wurde mit eiskaltem Hexan gewaschen und aus Ethanol umkristallisiert.

N-{[(5,6-dimethyl-1,2,4-triazin-3-yl)amino]carbonyl}-4-methylbenzenesulfonamide (1)

Ausbeute: 2 g (6 mmol), farbloser Feststoff, Smp.: 169 °C; ¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆): δ 2.25 (s, 3H, CH₃), 2.48 (s, 3H, CH₃), 2.53 (s, 3H, CH₃), 7.52 (dd, 4H, ³J = 8.1 Hz, arom. H), 10.24 (s, 1H, NH), 11.04 (s, 1H, NH). ¹³C: δ 18.1 (p, CH₃), 20.9 (p, CH₃), 21.2 (p, CH₃), 125.6 (t, arom. C), 129.3 (t, arom. C), 141.4 (q), 141.9 (q), 147.2 (q), 159.1 (q), 162.2 (q, C=O). ESI MS: 322.1 [M+H]⁺. Elementaranalyse: berechnet für C₁₃H₁₅N₅O₃S: C, 48.59 % H, 4.70 % N, 21.79 %. gefunden: C, 48.80 % H, 4.70 % N, 21.43 %.

4-Methyl-*N*-[(1,2,4-triazin-3-ylamino)carbonyl]benzenesulfonamid (2)

Ausbeute: 1.7 g (5.8 mmol), farbloser Feststoff, Smp.: 206 °C; ¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆): δ 2.36 (s, 3H, CH₃), 7.57 (dd, 4H, ³J = 8.1 Hz, arom. H), 8.19 (d, 1H, heterozykl. H), 8.52 (d, 1H, heterozykl. H), 10.32 (s, 1H, NH), 11.09 (s, 1H, NH). ¹³C: δ 20.9 (p, CH₃), 125.6 (t, arom. C), 129.3 (t, arom. C), 140.7 (t, heterozykl. C), 141.4 (q), 141.9 (q), 149.9 (t, heterozykl. C), 163.4 (q, C=O). ESI MS: 316.0 [M+Na]⁺. Elementaranalyse: berechnet für C₁₁H₁₁N₅O₃S: C, 45.04 % H, 3.78 % N, 23.88 %. gefunden: C, 44.67 % H, 3.77 % N, 23.88 %.

N-(5,6-Dimethyl-1,2,4-triazin-3-yl)-N'-phenylharnstoff (3)

Ausbeute: 1,8 g (7,3 mmol), farbloser Feststoff, Smp.: 196 °C; ¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆): δ 2.48 (s, 3H, CH₃), 2.53 (s, 3H, CH₃), 7.06 (t, 1H, ³J = 7.5 Hz, arom. H), 7.33 (t, 2H, ³J = 7.7 Hz, arom. H), 7.43 (d, 2H, ³J = 7.9 Hz, arom. H), 10.29 (s, 1H, NH), 11.12 (s, 1H, NH). ¹³C: δ 18.5 (p, CH₃), 21.7 (p, CH₃), 119.4 (t, arom. C), 123.2 (t, arom. C), 126.6 (t, arom C), 129.0 (t, arom. C), 138.4 (q), 151.1 (q), 152.3 (q), 157.3 (q), 161.4 (q, C=O). ESI MS: 265.9 [M+Na]⁺.

N-(5,6-Dimethyl-1,2,4-triazin-3-yl)-N'-(4'-methylphenyl)harnstoff (4)

Ausbeute: 1.7 g (6.3 mmol), farbloser Feststoff, Smp.: 204 °C; ¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆): δ 2.26 (s, 3H, CH₃), 2.48 (s, 3H, CH₃), 2.53 (s, 3H, CH₃), 7.25 (dd, 4H, ³J = 8.8 Hz, arom. H), 10.24 (s, 1H, NH), 11.04 (s, 1H, NH). ¹³C: δ 18.5 (p, CH₃), 20.4 (p, CH₃), 21.7 (p, CH₃), 119.4 (t, arom. C), 129.4 (t, arom. C), 132.2 (q), 135.9 (q), 151.1 (q), 152.3 (q), 157.2 (q), 161.4 (q, C=O). ESI MS: 279.3 [M+Na]⁺.

N-(5,6-Dimethyl-1,2,4-triazin-3-yl)-N'-(4'-nitrophenyl)harnstoff (5)

Ausbeute: 1.4 g (4.9 mmol), farbloser Feststoff, Smp.: 257 °C; ¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆): δ 2.26 (s, 3H, CH₃), 2.35 (s, 3H, CH₃), 7.96 (dd, 4H, ³J = 9.2 Hz, arom. H), 10.57 (s, 1H, NH), 11.54 (s, 1H, NH). ¹³C: δ 18.1 (p, CH₃), 21.2 (p, CH₃), 118.0 (t, arom. C), 125.1 (t, arom. C), 126.4 (q), 141.5 (q), 145.7 (q), 147.2 (q), 159.0 (q), 162.2 (q, C=O). ESI MS: 289.1 [M+H]⁺.

5.11 Darstellung 6-methyl-5-(phenylsulfonyl)-1,2,4-triazin-3-amine

Eine Lösung von 10 mmol Arylsulfonylchlorid in 20 ml Chloroform wurde langsam zu einer Lösung von 10 mmol 3-Amino-5,6-dimethyl-1,2,4-triazin und 10 mmol Triethylamin in 150 ml Chloroform getropft. Die Reaktionsmischung wurde 20 Stunden refluxiert und der Feststoff abfiltriert. Vom Filtrat wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt, der erhaltene Feststoff mit Hexan und Wasser gewaschen und anschließend die vereinigten Feststoffe aus Ethanol umkristallisiert.

6-Methyl-5-[(phenylsulfonyl)methyl]-1,2,4-triazin-3-amin (6)

Ausbeute: 0.97 g (3.7 mmol), gelber Feststoff, Smp: 208 °C; $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, DMSO- d_6): δ 2.35 (s, 3H, CH₃), 4.69 (s, 2H, CH₂), 6.95 (s, 2H, NH₂), 7.44 – 7.80 (m, 5H, arom. H). ^{13}C : δ 17.8 (p, CH₃), 60.2 (s, CH₂), 128.0 (t, arom. C), 129.4 (t, arom. C), 134.3 (t, arom. C), 138.8 (q), 147.9 (q), 149.7 (q), 162.0 (q). ESI MS: 264.3 [M]⁺. Elementaranalyse: berechnet für C₁₁H₁₂N₄O₂S: C, 49.99 % H, 4.58 % N, 21.20 %. gefunden: C, 49.87 % H, 4.72 % N, 21.08 %.

6-Methyl-5-[(4-methylphenyl)sulfonyl]methyl-1,2,4-triazin-3-amin (7)

Ausbeute: 1,1 g (4 mmol), grüne Nadeln, Smp: 229 °C, $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, DMSO- d_6): δ 2.33 (s, 3H, CH₃), 2.40 (s, 2H, CH₂), 4.64 (s, 2H, CH₂), 6.98 (s, 2H, NH₂), 7.54 (dd, 5H, $^3\text{J}=8.1$ Hz, arom. H). $^{13}\text{C-NMR}$ (125.8 MHz, DMSO- d_6): δ 17.8 (CH₃), 21.2 (CH₂), 60.4 (CH₂), 97.6, 128.1, 129.9 (C_{arom}), 136.0, 145.0, 147.9, 149.9 (C_q). ESI MS: 278.9 [M+H]⁺. Elementaranalyse: berechnet für C₁₂H₁₄N₄O₂S: C, 51.78 % H, 5.07 % N, 20.13 %. gefunden: C, 51.56 % H, 5.13 % N, 19.98 %.

5-[(Benzylsulfonyl)methyl]-6-methyl-1,2,4-triazin-3-amin (8)

Ausbeute: 1,05 g (3.8 mmol), grüne Nadeln, Smp: 230 °C; ¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆): δ 2.33 (s, 3H, CH₃), 2.40 (s, 2H CH₂), 4.64 (s, 2H, CH₂), 6.98 (s, 2H, NH₂), 7.54 (dd, 4H, ³J = 8.9 Hz, arom. H)
¹³C: δ 17.8 (p, CH₃), 21.2 (s, CH₂), 60.4 (s, CH₂), 128.1 (t, arom. C), 128.5 (t, arom. C), 129.9 (t, arom. C), 145.0 (q), 147.9 (q), 149.9 (q), 162.1 (q). ESI MS: 278.9 [M+H]⁺.
Elementaranalyse: berechnet für C₁₂H₁₄N₄O₂S: C, 51.78 % H, 5.07 % N, 20.13 %.
gefunden: C, 52.02 % H, 4.94 % N, 19.66 %.

5-[(4-Methoxyphenyl)sulfonyl)methyl]-6-methyl-1,2,4-triazin-3-amin (9)

Ausbeute: 0.8 g (2.7 mmol), grüner Feststoff, Smp: 200 °C; ¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆): δ 2.34 (s, 3H, CH₃), 3.84 (s, 3H, CH₃), 4.62 (s, 2H, CH₂), 6.97 (s, 2H, NH₂), 7.41 (dd, 4H, ³J = 8.9 Hz, arom. H)
¹³C: δ 17.9 (p, CH₃), 55.7 (p, CH₃), 60.6 (s, CH₂), 114.6 (t, arom. C), 129.9 (q), 130.4 (t, arom. C), 147.9 (q), 150.0 (q), 162.1 (q), 163.7 (q). ESI MS: 317.1 [M+Na]⁺.
Elementaranalyse: berechnet für C₁₂H₁₄N₄O₃S: C, 48.97 % H, 4.79 % N, 19.04 %.
gefunden: C, 48.89 % H, 4.83 % N, 18.83 %.

5-[(4-Chlorophenyl)sulfonyl)methyl]-6-methyl-1,2,4-triazin-3-amin (10)

Ausbeute: 1,43 g (4.8 mmol), grüne Nadeln, Smp: 232 °C, ¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆): δ 2.40 (s, 3H, CH₃), 4.76 (s, 2H, CH₂), 6.97 (s, 2H, NH₂), 7.75 (dd, 4H, ³J = 8.4 Hz, arom. H). ¹³C: δ 18.1 (p, CH₃), 60.0 (s, CH₂), 129.6 (t, arom. C), 130.2 (t, arom. C), 137.5 (q), 142.8 (q), 147.9 (q), 150.4 (q), 162.0 (q). ESI MS: 297.8 [M-H]⁺.
Elementaranalyse: berechnet für C₁₁H₁₁ClN₄O₂S: C, 44.22 % H, 3.71 % N, 18.75 %.
gefunden: C, 44.05 % H, 3.83 % N, 18.47 %.

5-[(1,1'-Biphenyl-4-ylsulfonyl)methyl]-6-methyl-1,2,4-triazin-3-amin (11)

Ausbeute: 1,25 g (3.7 mmol), farbloser Feststoff, Smp: 225 °C; ¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆): δ 2.42 (s, 3H, CH₃), 4.75 (s, 2H, CH₂), 7.00 (s, 2H, NH₂), 7.39-7.93 (m, 9H, arom. H). ¹³C: δ 17.9 (p, CH₃), 60.3 (s, CH₂), 126.3 – 129.2 (t, arom. C), 137.5 (q), 139.1 (q), 145.7 (q), 148.0 (q), 149.9 (q), 162.1 (q, C=O). ESI MS: 340.8 [M+H]⁺. Elementaranalyse: berechnet für C₁₇H₁₆N₄O₂S: C, 59.98 % H, 4.74 % N, 16.46 % gefunden: C, 59.53 % H, 4.90 % N, 16.08 %.

5.12 Darstellung der Inhibitoren mit 1,2,4-Triazin-Kern

Die Darstellung der kombinierten Inhibitoren erfolgte in Analogie zu den oben beschriebenen Reaktionsvorschriften. Im ersten Schritt wurde das 3-Amino-5,6-dimethyl-1,2,4-triazin mit dem Arylsulfonylderivat umgesetzt. Nach entsprechender Aufarbeitung wurde das gewünschte Produkt durch Reaktion mit dem Arylisocyanat-Derivat erhalten. Eingesetzt wurden jeweils 10 mmol Edukt.

***N*-(4-Methylphenyl)-*N'*-{6-methyl-5-[(phenylsulfonyl)methyl]-1,2,4-triazin-3-yl}harnstoff (12)**

Ausbeute: 1,0 g (2.5 mmol), farbloser Feststoff, Smp: 224 °C; ¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆): δ 2.23 (s, 3H, CH₃), 2.47 (s, 3H, CH₃), 5.10 (s, 2H, CH₂), 7.10-7.92 (m, 9H, arom. H), 10.28 (s, 1H, NH), 10.57 (s, 1H, NH). ¹³C-NMR (125.8 MHz, DMSO-d₆): δ 18.1 (CH₃), 20.4 (CH₃), 59.4 (CH₂), 100.9, 120.0, 128.1, 128.8, 129.5 (C_{arom}), 135.7, 138.2, 146.6, 149.7, 150.7, 152.7, 156.9 (C_q with one C=O). ESI MS: 398.0 [M+H]⁺. Elementaranalyse: berechnet für C₁₉H₁₉N₅O₃S: C, 57.42 % H, 4.82 % N, 17.62 % gefunden: C, 57.21 % H, 4.90 % N, 17.21 %.

***N*-(4-Methylphenyl)-*N'*-{6-methyl-5-[(1,1'-biphenyl-4-ylsulfonyl)methyl]-1,2,4-triazin-3-yl}harnstoff (13)**

Ausbeute: 1,5 g (3.2 mmol), farbloser Feststoff, Smp: 232 °C; ¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆): δ 2.25 (s, 3H, CH₃), 5.17 (s, 2H, CH₂), 7.08-8.00 (m, 13H, arom. H), 10.16 (s, 1H, NH), 10.57 (s, 1H, NH). ¹³C-NMR (125.8 MHz, DMSO-d₆): δ 18.3 (CH₃), 20.4 (CH₃), 59.5 (CH₂), 101.0, 119.9-156.8 (C, with 14 C_{arom} and 8 C_q). ESI MS: 474.2 [M+H]⁺. Elementaranalyse: berechnet für C₁₂H₁₄N₄O₃S: C, 48.97 % H, 4.79 % N, 19.04 %. gefunden: C, 48.89 % H, 4.83 % N, 18.83 %.

***N*-(6-Methyl-5-[(4-methylphenyl)sulfonyl]methyl)-1,2,4-triazin-3-yl)-*N'*-phenylharnstoff (14)**

Ausbeute: 1,4 g (3.5 mmol), grüne Nadeln, Smp: 222 °C; ¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆): δ 2.21 (s, 3H, CH₃), 2.51 (s, 3H, CH₃), 5.07 (s, 2H, CH₂), 7.06-7.81 (m, 9H, arom. H), 10.22 (s, 1H, NH), 10.63 (s, 1H, NH). ¹³C-NMR (125.8 MHz, DMSO-d₆): δ 18.2 (CH₃), 22.0 (CH₃), 59.6 (CH₂), 119.9, 126.3, 128.1, 130.0 (C_{arom}), 135.2, 138.2, 145.3, 149.6, 150.7, 152.8, 156.8 (C_q with one C=O). ESI MS: 398.1 [M+H]⁺. Elementaranalyse: berechnet für C₁₉H₁₉N₅O₃S: C, 57.42 % H, 4.82 % N, 17.62 %. gefunden: C, 57.02 % H, 4.75 % N, 17.25 %.

***N*-(6-Methyl-5-[(phenylsulfonyl)methyl]-1,2,4-triazin-3-yl)-*N'*-phenylharnstoff (15)**

Ausbeute: 1,2 g (3.1 mmol), farbloser Feststoff, Smp: 216 °C, ¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆): δ 2.47 (s, 3H, CH₃), 5.12 (s, 2H, CH₂), 7.06-7.93 (m, 10H, arom. H), 10.36 (s, 1H, NH), 10, 63 (s, 1H, NH). ¹³C-NMR (125.8 MHz, DMSO-d₆): δ 18.5 (CH₃), 59.4 (CH₂), 120.1, 120.6, 126.3, 128.2, 128.6, 129.2 (C_{arom}), 138.2, 144.9, 146.6, 150.8, 152.7, 156.9 (C_q, with one C=O). ESI MS: 384.2 [M+H]⁺. Elementaranalyse: berechnet

für C₁₈H₁₇N₅O₃S: C, 56.38 % H, 4.47 % N, 18.27 %. gefunden: C, 56.80 % H, 4.27 % N, 17.98 %.

***N*-{5-[(Benzylsulfonyl)methyl]-6-methyl-1,2,4-triazin-3-yl}-*N'*-phenylharnstoff (16)**

Ausbeute: 1,3 g (3.3 mmol), farbloser Feststoff, Smp: 219 °C, ¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆): δ 2.22 (s, 2H, CH₂), 2.52 (s, 3H, CH₃), 5.08 (s, 2H, CH₂), 7.06-7.81 (m, 9H, arom. H), 10.22 (s, 1H, NH), 10.63 (s, 1H, NH). ¹³C-NMR (125.8 MHz, DMSO-d₆): δ 18.2 (CH₃), 21.0 (CH₂), 59.6 (CH₂), 101.5, 119.9, 120.3, 123.3, 126.3, 128.1, 128.7, 129.20, 130.0 (C_{arom}), 135.2, 145.3, 149.6, 150.7, 152.8, 156.8 (C_q with one C=O). ESI MS: 398.5 [M+H]⁺. Elementaranalyse: berechnet für C₁₉H₁₉N₅O₃S: C, 57.42 % H, 4.82 % N, 17.62 %. gefunden: C, 56.80 % H, 4.27 % N, 17.98 %.

***N*-(4-Chlorophenyl)-*N'*-{6-methyl-5-[(phenylsulfonyl)methyl]-1,2,4-triazin-3-yl}harnstoff (17)**

Ausbeute: 1,5 g (3.8 mmol), farbloses Pulver, Smp: 230 °C, ¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆): δ 2.48 (s, 3H, CH₃), 5.13 (s, 2H, CH₂), 7.36-7.92 (m, 9H, arom. H), 10.40 (s, 1H, NH), 10, 71 (s, 1H, NH). ¹³C-NMR (125.8 MHz, DMSO-d₆): δ 18.1 (CH₃), 59.3 (CH₂), 100.9, 121.5, 121.9, 126.1, 126.9, 128.6, 128.9, 129.6, 134.5 (C_{arom}), 128.1, 136.9, 137.2, 138.2, 150.8, 152.9, 156.8 (C_q, with one C=O). ESI MS: 418.0 [M+H]⁺. Elementaranalyse: berechnet für C₁₈H₁₆ClN₅O₃S: C, 51.74 % H, 3.86 % N, 16.76 %. gefunden: C, 51.38 % H, 3.91 % N, 16.31 %.

***N*-(4-Chlorophenyl)-*N'*-{6-methyl-5-[(1,1'-biphenyl-4-ylsulfonyl)methyl]-1,2,4-triazin-3-yl}harnstoff (18)**

Ausbeute: 1,6 g (3.2 mmol), farbloser Feststoff, Smp: 245 °C, ¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆): δ 2.60 (s, 3H, CH₃), 5.20 (s, 2H, CH₂), 7.31-8.00 (m, 13H, arom. H), 10.25 (s, 1H, NH), 10.72 (s, 1H, NH). ¹³C-NMR (125.8 MHz, DMSO-d₆): δ 18.3 (CH₃), 59.5 (CH₂), 101.1, 121.3-156.7 (C, with 13 C_{arom} and 9 C_q). ESI MS: 494.1 [M+H]⁺.

Elementaranalyse: berechnet für $C_{24}H_{20}ClN_5O_3S$: C, 58.36 % H, 4.08 % N, 14.18 %.
gefunden: C, 58.59 % H, 4.23 % N, 14.33 %.

***N*-(5-[(1,1'-biphenyl-4-ylsulfonyl)methyl]-6-methyl-1,2,4-triazin-3-yl)-*N'*-phenylharnstoff (19)**

Ausbeute: 1,9 g (4.2 mmol), farblose Nadeln, Smp: 237 °C, 1H -NMR (500 MHz, DMSO- d_6): δ 2.59 (s, 3H, CH₃), 5.18 (s, 2H, CH₂), 7.05-8.01 (m, 14H, arom. H), 10.24 (s, 1H, NH), 10.71 (s, 1H, NH). ^{13}C -NMR (125.8 MHz, DMSO- d_6): δ 18.6 (CH₃), 59.4 (CH₂), 119.7-156.8 (C, with 14 C_{arom} and 8 C_q). ESI MS: 460.1 [M+H]⁺.

Elementaranalyse: berechnet für $C_{24}H_{21}N_5O_3S$: C, 62.73 % H, 4.61 % N, 15.24 %.
Found: C, 62.40 % H, 4.70 % N, 14.75 %.

***N*-(5-[(4-methoxyphenyl)sulfonyl]methyl)-6-methyl-1,2,4-triazin-3-yl)-*N'*-phenylharnstoff (20)**

Ausbeute: 1,4 g (3.4 mmol), farbloser Feststoff, Smp.: 207 °C, 1H -NMR (500 MHz, DMSO- d_6): δ 2.52 (s, 3H, CH₃), 3.67 (s, 3H, CH₃), 5.04 (s, 2H, CH₂), 7.01-7.86 (m, 9H, arom. H), 10.29 (s, 1H, NH), 10.62 (s, 1H, NH). ^{13}C -NMR (125.8 MHz, DMSO- d_6): δ 18.2 (CH₃), 55.6 (CH₃), 59.8 (CH₂), 102.2, 119.0, 119.9, 120.4, 123.2, 128.4, 128.7, 130.5 (C_{arom}), 129.6, 138.2, 149.8, 150.7, 152.8, 156.9, 163.7 (C_q mit einem C=O). ESI MS: 414.0 [M+H]⁺. Elementaranalyse: berechnet für: $C_{19}H_{19}N_5O_4S$: C, 55.19 % H, 4.63 % N, 16.94 %. gefunden: C, 55.03 % H, 4.80 % N, 16.70 %.

5.13 Darstellung der Inhibitoren vom 6-Azaurazil-Typ

1. Darstellung der Heterozyklen

Zu einer Lösung von 26 mmol 4-Nitrobenzolsulfonylchlorid in 150 ml abs. Diethylether tropft man eine Lösung von 17 mmol Morpholin in 50 ml abs. Diethylether innerhalb

von 20 Minuten. Anschließend läßt man 1 Stunde refluxieren und kühlt ab. Der ausgefallene Feststoff wird abgesaugt und mit 6 N HCl gewaschen.

4-[(4-Nitrophenyl)sulfonyl]morpholin (21a)

Ausbeute: 5,9 g (21,7 mmol), farbloser Feststoff, Smp.: 174 °C, ¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆): δ 2.94 (t, 4H, ²J = 4.7 Hz, CH₂), 3.62 (t, 4H, ²J = 4.7 Hz, CH₂), 8.22 (dd, 4H, ³J = 8.8 Hz, arom. H); ¹³C-NMR (125.8 MHz, DMSO-d₆): δ 45.8 (CH₂), 65.3 (CH₂), 124.7, 129.2 (C_{arom}), 140.2, 150.2 (C_q).

1-[(4-Nitrophenyl)sulfonyl]pyrrolidin (22a)

Ausbeute: 4,13 g (16,1 mmol), farblose Nadeln, Smp.: 250 °C, ¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆): δ 2.66 (q, 4H, ²J = 3.4 Hz, CH₂), 3.18 (m, 4H, CH₂), 8.24 (dd, 4H, ³J = 8.9 Hz, arom. H); ¹³C-NMR (125.8 MHz, DMSO-d₆): δ 24.8 (CH₂), 47.9 (CH₂), 124.6, 128.9 (C_{arom}), 141.8, 149.9 (C_q).

1-[(4-Nitrophenyl)sulfonyl]piperidin (23a)

Ausbeute: 5,13 g (19,0 mmol), farbloser Feststoff, Smp.: 171 °C, ¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆): δ 1.36 (q, 2H, ³J = 5.8 Hz, CH₂), 1.53 (q, 4H, ²J = 5.7 Hz, CH₂), 2.95 (t, 4H, ³J = 5.4 Hz, CH₂), 8.21 (dd, 4H, ³J = 8.8 Hz, arom. H); ¹³C-NMR (125.8 MHz, DMSO-d₆): δ 22.7 (CH₂), 24.6 (CH₂), 46.3 (CH₂), 124.6, 128.9 (C_{arom}), 141.3, 149.9 (C_q).

N-Allyl-4-nitrobenzensulfonamid (24a)

Zu einer Lösung von 25 mmol 4-Nitrobenzolsulfochlorid in 25 ml Aceton wird eine Lösung von 25 mmol Allylamin in 2,3 ml Pyridin langsam zugetropft. Anschließend läßt man 1 Stunde refluxieren, rührt in 25 ml 1 N HCl ein, filtriert den ausgefallenen Feststoff ab und kristallisiert aus Methanol um.

Ausbeute: 3,4 g (15 mmol), farbloser Feststoff, Smp.: 197 °C, $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, DMSO- d_6): δ 3.49 (t, 2H, $^3\text{J} = 1.3$ Hz, CH_2), 5.00 – 5.14 (m, 2H, CH_2), 5.62 – 5.68 (m, 1H, CH), 8.20 (t, 1H, $^3\text{J} = 5.9$ Hz, NH), 8.22 (dd, 4H, $^3\text{J} = 8.8$ Hz, arom. H); $^{13}\text{C-NMR}$ (125.8 MHz, DMSO- d_6): δ 45.0 (CH_2), 116.8 (CH_2), 124.6, 128.1 ($\text{C}_{\text{arom.}}$), 133.8 (CH), 146.3, 149.5 (C_q)

2. Reduktion der Nitroverbindungen

Eine Lösung von 40 mmol $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ in 18 ml konz. HCl werden in eine Aufschlemmung von 10 mmol 4-[(4-Nitrophenyl)sulfonyl]morpholin in 10 ml H_2O getropft. Anschließend läßt man 75 Minuten refluxieren, gießt die Lösung in 100 ml H_2O und läßt weiter 3 Stunden rühren. Der ausgefallene Feststoff wird abfiltriert, die Lösung mit 30%iger wässriger NaOH neutralisiert und die Feststoffe vereinigt. Der Feststoff wird aus einem EtOH-Wasser-Gemisch umkristallisiert.

4-(Morpholin-4-ylsulfonyl)anilin (21b)

Ausbeute: 2,3 g (8,3 mmol), farbloser Feststoff, Smp.: 216 °C, $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, DMSO- d_6): δ 2.74 (t, 4H, $^2\text{J} = 4.6$ Hz, CH_2), 3.60 (t, 4H, $^2\text{J} = 4.7$ Hz, CH_2), 6.10 (s, 2H, NH), 6.99 (dd, 4H, $^3\text{J} = 8.8$ Hz, arom. H); $^{13}\text{C-NMR}$ (125.8 MHz, DMSO- d_6): δ 45.9 (CH_2), 65.3 (CH_2), 112.7, 129.7 ($\text{C}_{\text{arom.}}$), 118.6, 153.4 (C_q).

4-(Pyrrolidin-1-ylsulfonyl)anilin (22b)

Ausbeute: 2,2 g (9,7 mmol), farbloser Feststoff, Smp.: 168 °C, $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, DMSO- d_6): δ 1.59 (q, 4H, $^2\text{J} = 3.2$ Hz, CH_2), 3.14 (m, 4H, CH_2), 6.04 (s, 2H, NH), 7.01 (dd, 4H, $^3\text{J} = 8.6$ Hz, arom. H); $^{13}\text{C-NMR}$ (125.8 MHz, DMSO- d_6): δ 24.5 (CH_2), 47.6 (CH_2), 112.7, 129.3 ($\text{C}_{\text{arom.}}$), 120.8, 153.0 (C_q).

4-(Piperidin-1-ylsulfonyl)anilin (23b)

Ausbeute: 1,85 g (7,7 mmol), farbloser Feststoff, Smp.: 167 °C, ¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆): δ 1.32 (d, 2H, ³J = 5.4 Hz, CH₂), 1.50 (q, 4H, ²J = 5.6 Hz, CH₂), 2.76 (t, 4H, ³J = 5.3 Hz, CH₂), 6.02 (s, 2H, NH), 6.97 (dd, 4H, ³J = 8.7 Hz, arom. H); ¹³C-NMR (125.8 MHz, DMSO-d₆): δ 23.0 (CH₂), 24.7 (CH₂), 46.6 (CH₂), 112.6, 129.4 (C_{arom}), 119.9, 153.0 (C_q).

N-Allyl-4-aminobenzenesulfonamid (24b)

Ausbeute: 1,93 g (9.1 mmol), farbloser Feststoff, Smp.: 167 °C, ¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆): δ 3.30 (d, 2H, ³J = 5.6 Hz, CH₂), 5.00-5.14 (m, 2H, CH₂), 5.61-5.68 (m, 1H, CH), 5.92 (s, 2H, NH₂), 7.0 (dd, 4H, ³J = 8.7 Hz, arom. H), 7.28 (s br, 1H, NH); ¹³C-NMR (125.8 MHz, DMSO-d₆): δ 45.1 (CH₂), 116.2 (s, CH₂), 112.6, 128.5 (C_{arom}), 134.5 (CH), 125.5, 152.5 (C_q)

3. Diazotierung und Darstellung der Carbamate

Eine Lösung von 5,0 mmol 4-(Morpholin-4-ylsulfonyl)anilin und 28 ml 6 N HCl werden 10 Minuten auf 60 °C erwärmt und anschließend auf 0-5°C abgekühlt. Innerhalb von 10 Minuten tropft man 6,2 mmol NaNO₂ in 4 ml H₂O zu dieser Lösung.

Diese Diazoniumsalzlösung wird innerhalb von 10 Minuten zu einer Lösung von 5,25 mmol Cyanoacetylurethan, 4 ml Pyridin und 81 ml H₂O wird bei Raumtemperatur zugetropft. Man läßt über Nacht stehen, filtert den ausgefallenen Feststoff ab, wäscht mit H₂O und kristallisiert aus EtOH um.

Ethyl(2Z)-2-cyano-2-{{4-(morpholin-4-ylsulfonyl)phenyl}hydrazono}ethanoyl-carbamat (21c)

Ausbeute: 1,5 g (3,7 mmol), farbloser Feststoff, Smp.: >290 °C, ¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆): δ 1.26 (t, 3H, 3J = 7.1 Hz, CH₃), 2.85 (t, 4H, ²J = 4.4 Hz, CH₂), 3.62 (t, 4H, ²J = 4.5 Hz, CH₂), 4.19 (q, 2H, ³J = 7.1 Hz, CH₂), 7.84 (dd, 4H, ³J = 8.8 Hz, arom. H), 10.81 (s, 1H, NH); ¹³C-NMR (125.8 MHz, DMSO-d₆): δ 14.8 (CH₃), 45.9 (CH₂), 61.5 (CH₂), 65.3 (CH₂), 116.9, 129.0 (C_{arom}), 109.8, 110.5, 129.4, 145.6, 150.8, 159.7 (C_q mit zwei C=O).

Ethyl(2Z)-2-cyano-2-{{4-(pyrrolidin-1-ylsulfonyl)phenyl}hydrazono}ethanoyl-carbamat (22c)

Ausbeute: 1,7 g (4,3 mmol), farbloser Feststoff, Smp.: 181 °C, ¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆): δ 1.26 (t, 3H, 3J = 7.1 Hz, CH₃), 1.62 (q, 4H, ²J = 6.6 Hz, CH₂), 3.12 (m, 4H, CH₂), 4.19 (q, 2H, ³J = 7.1 Hz, CH₂), 7.86 (dd, 4H, ³J = 8.8 Hz, arom. H), 10.81 (s, 1H, NH); ¹³C-NMR (125.8 MHz, DMSO-d₆): δ 14.2 (CH₃), 24.7 (CH₂), 47.8 (CH₂), 61.5 (CH₂), 116.9, 128.7 (C_{arom}), 109.6, 110.5, 131.3, 145.3, 150.9, 159.7 (C_q mit zwei C=O).

Ethyl(2Z)-2-cyano-2-{{4-(piperidin-1-ylsulfonyl)phenyl}hydrazono}ethanoyl-carbamat (23c)

Ausbeute: 1,8 g (4,4 mmol), farbloser Feststoff, Smp.: 194 °C, ¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆): δ 1.26 (t, 3H, ³J = 7.1 Hz, CH₃), 1.34 (d, 2H, ³J = 4.0 Hz, CH₂), 1.52 (q, 4H, ²J = 7.2 Hz, CH₂), 2.85 (t, 4H, ³J = 5.1 Hz, CH₂), 4.19 (q, 2H, ³J = 7.1 Hz, CH₂), 7.82 (dd, 4H, ³J = 8.8 Hz, arom. H), 10.80 (s, 1H, NH); ¹³C-NMR (125.8 MHz, DMSO-d₆): δ

14.2 (CH₃), 22.9 (CH₂), 24.7 (CH₂), 46.6 (CH₂), 61.5 (CH₂), 116.9, 128.8 (C_{arom}), 109.6, 110.5, 130.6, 145.3, 150.8, 159.7 (C_q mit zwei C=O).

Ethyl(2Z)-2-({4-[(allylamino)sulfonyl]phenyl}hydrazono)-2-cyanoethanoyl-carbamat (24c)

Ausbeute: 1,36 g (3,6 mmol), farbloser Feststoff, Smp.: 201 °C, ¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆): δ 1.26 (t, 3H, ³J = 7.1 Hz, CH₃), 3.41 (t, 2H, ³J = 5.1 Hz, CH₂), 4.19 (q, 2H, ³J = 7.1 Hz, CH₂), 5.12 (dd, 2H, ³J = 1.4 Hz, CH₂), 5.65 (m, 1H, CH), 7.83 (dd, 4H, ³J = 8.8 Hz, arom. H), 10.79 (s, 1H, NH); ¹³C-NMR (125.8 MHz, DMSO-d₆): δ 14.2 (CH₃), 45.0 (CH₂), 61.5 (CH₂), 116.5 (CH₂), 116.8, 127.8 (C_{arom}), 135.9 (CH), 109.4, 110.6, 134.1, 144.8, 150.9, 159.8 (C_q mit zwei C=O).

Ethyl(2Z)-2-cyano-2-[(4-[(2,6-dimethoxypyrimidin-4-yl)amino]sulfonyl]phenyl)hydrazono]ethanoylcarbamat (25a)

Ausbeute: 1,36 g (3,6 mmol), farbloser Feststoff, Smp.: 207 °C, ¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆): δ 1.26 (t, 3H, ³J = 7.2 Hz, CH₃), 3.75 (s, 3H, CH₃), 3.78 (s, 3H, CH₃), 4.18 (q, 2H, ³J = 7.1 Hz, CH₂), 5.38 (s, 1H, CH), 7.90 (dd, 4H, ³J = 9.7 Hz, arom. H), 10.79 (s, 1H, NH); ¹³C-NMR (125.8 MHz, DMSO-d₆): δ 14.2 (CH₃), 53.9 (CH₃), 54.4 (CH₃), 61.5 (CH₂), 84.6, 116.8, 127.8 (C_{arom}), 109.8, 110.5, 134.8, 145.5, 150.9, 159.7, 159.9, 171.7 (C_q mit zwei C=O).

4. Zyklisierung der Carbamate

2,5 mmol Ethyl (2Z)-2-cyano-2-{{4-(pyrrolidin-1-ylsulfonyl)phenyl}hydrazono}-ethanoylcarbamate werden mit 250 mmol Na₂CO₃ in 21 ml H₂O 10 Minuten refluxiert. Anschließend wird heiß filtriert, mit Eisessig angesäuert und abgekühlt. Der abgetrennte Feststoff wird mit H₂O gewaschen und aus einem EtOH – Wasser – Gemisch umkristallisiert.

2-[4-(Morpholin-4-ylsulfonyl)phenyl]-3,5-dioxo-2,3,4,5-tetrahydro-1,2,4-triazin-6-carbonitril (21d)

Ausbeute: 0,65 g (1,8 mmol), farbloser Feststoff, Smp.: 198 °C, ¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆): δ 2.79 (t, 4H, ²J = 4.5 Hz, CH₂), 3.68 (t, 4H, ²J = 4.9 Hz, CH₂), 7.93 (dd, 4H, ³J = 8.9 Hz, arom. H), 10.82 (s, 1H, NH); ¹³C-NMR (125.8 MHz, DMSO-d₆): δ 45.9 (CH₂), 65.2 (CH₂), 126.3, 129.2 (C_{arom}), 111.7, 121.6, 137.4, 143.1, 147.5, 152.2 (C_q mit zwei C=O). ESI MS: 364.4 [M+H]⁺. Elementaranalyse: berechnet für C₁₄H₁₃N₅O₅S: C, 46.28 % H, 3.61 % N, 19.27 %. gefunden: C, 46.15 % H, 3.72 % N, 19.05 %.

3,5-Dioxo-2-[4-(pyrrolidin-1-ylsulfonyl)phenyl]-2,3,4,5-tetrahydro-1,2,4-triazin-6-carbonitril (22d)

Ausbeute: 0,76 g (2,2 mmol), farbloser Feststoff, Smp.: 204 °C, ¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆): δ 1.66 (q, 4H, ²J = 3.4 Hz, CH₂), 3.17 (t, 4H, ³J = 6.7 Hz, CH₂), 7.86 (dd, 4H, ³J = 8.7 Hz, arom. H), 10.80 (s, 1H, NH); ¹³C-NMR (125.8 MHz, DMSO-d₆): δ 24.8 (CH₂), 47.8 (CH₂), 126.2, 128.2 (C_{arom}), 110.6, 123.2, 136.2, 142.4, 147.0, 150.8 (C_q mit zwei C=O). ESI MS: 346.1 [M-H]⁺. Elementaranalyse: berechnet für C₁₄H₁₃N₅O₄S: C, 48.41 % H, 3.77 % N, 20.16 %. gefunden: C, 48.99 % H, 3.81 % N, 19.95 %.

3,5-Dioxo-2-[4-(piperidin-1-ylsulfonyl)phenyl]-2,3,4,5-tetrahydro-1,2,4-triazin-6-carbonitril (23d)

Ausbeute: 0,61 g (1,7 mmol), farbloser Feststoff, Smp.: 235 °C, ¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆): δ 1.37 (d, 2H, ³J = 4.1 Hz, CH₂), 1.54 (q, 4H, ²J = 5.5 Hz, CH₂), 2.91 (t, 4H, ³J = 5.2 Hz, CH₂), 7.82 (dd, 4H, ³J = 8.6 Hz, arom. H); ¹³C-NMR (125.8 MHz, DMSO-

d_6): δ 22.7 (CH₂), 24.7 (CH₂), 46.6 (CH₂), 126.2, 128.3 (C_{arom}), 112.4, 123.2, 135.5, 142.6, 147.2, 154.9 (C_q mit zwei C=O). ESI MS: 360.1 [M-H]⁺.

Elementaranalyse: berechnet für C₁₅H₁₅N₅O₄S: C, 49.85 % H, 4.18 % N, 19.38 %.
gefunden: C, 49.75 % H, 4.23 % N, 19.24 %.

***N*-Allyl-4-(6-cyano-3,5-dioxo-4,5-dihydro-1,2,4-triazin-2(3*H*)-yl)benzenesulfonamid (24d)**

Ausbeute: 0,43 g (1,3 mmol), farbloser Feststoff, Smp.: 233 °C, ¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ 3.46 (t, 2H, ³J = 5.7 Hz, CH₂), 5.09 (m, 2H, CH₂), 5.67 (m, 1H, CH), 7.82 (dd, 4H, ³J = 8.7 Hz, arom. H); ¹³C-NMR (125.8 MHz, DMSO-*d*₆): δ 45.0 (CH₂), 116.7 (CH₂), 126.1, 127.4 (C_{arom}), 134.0 (CH), 112.6, 123.1, 140.5, 142.2, 147.5, 155.3 (C_q mit zwei C=O). ESI MS: 332.2 [M-H]⁺. Elementaranalyse: berechnet für C₁₃H₁₁N₅O₄S: C, 46.84 % H, 3.33 % N, 21.01 %. gefunden: C, 46.89 % H, 3.44 % N, 21.14 %.

4-(6-cyano-3,5-dioxo-4,5-dihydro-1,2,4-triazin-2(3*H*)-yl)-*N*-(2,6-dimethoxy-pyrimidin-4-yl)benzenesulfonamid (25b)

Ausbeute: 0,91 g (2,1 mmol), farbloser Feststoff, Smp.: 238 °C, ¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ 3.73 (s, 3H, OCH₃), 3.79 (s, 3H, OCH₃), 5.96 (s, 1H, NH), 7.91 (dd, 4H, ³J = 8.7 Hz, arom. H); ¹³C-NMR (125.8 MHz, DMSO-*d*₆): δ 53.9, 54.6 (OCH₃), 84.8 (CH), 126.1, 128.1 (C_{arom}), 112.4, 123.2, 140.0, 142.6, 147.1, 154.8, 159.7, 164.1, 171.7 (C_q mit zwei C=O). ESI MS: 433.4 [M+H]⁺. Elementaranalyse: berechnet für C₁₆H₁₃N₇O₆S: C, 44.55 % H, 3.04 % N, 22.73 %. gefunden: C, 44.53 % H, 2.87 % N, 22.48 %.

5.14 Darstellung der Inhibitoren vom 6-Azaurazil-Typ über Sulfonsäurederivate

5.14.1 Darstellung von 4-(Acetylamino)benzolsulfinsäure

Zu einem Gemisch von 145 g Na_2SO_3 und 350 ml Wasser werden innerhalb von 45 Min. portionsweise 233.5g (1 mol) 4-(Acetylamino)-benzolsulfonylchlorid gegeben, wobei die Temperatur durch Kühlung bei 45-50 °C und der pH-Wert durch Zudosierung von 30%iger NaOH bei 8.5-9.0 gehalten werden. Die nach 120 Min. erhaltene Lösung wurde direkt für die weiteren Reaktionen. Durch Ansäuern der Lösung auf pH 1.0, abtrennen des ausgefallenen Feststoffes und anschließendem Umkristallisieren aus Essigsäureethylester / EtOH (4:3) erhält man eine Analysenprobe.

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, DMSO-d_6): δ 2.01 (s, 3H, CH_3), 7.47 (dd, 4H, $^3\text{J} = 8.4$ Hz, arom. H), 10.18 (s, 1H, NH); $^{13}\text{C-NMR}$ (125.8 MHz, DMSO-d_6): δ 24.1 (CH_3), 118.3, 124.7 (C_{arom}), 139.2, 153.8, 168.5 (C_q mit einem C=O).

1. Umsetzung von 4-(Acetylamino)benzolsulfinsäure mit Alkylhalogeniden

0.115 mol eines entsprechenden Alkylbromids in 50 ml EtOH werden mit 1/10 des Volumens der wässrigen Lösung von 4-(Acetylamino)benzolsulfinsäure versetzt. Nach Rühren während 24 Stunden bei schwachem Rückfluß und pH 6.0-8.0 wurde auf 300 ml eisgekühltes Wasser gegossen und 120 Minuten bei 0-5 °C gerührt, das ausgefallene Produkt abgesaugt und aus einem Wasser/EtOH-Gemisch umkristallisiert.

***N*-[4-(Ethylsulfonyl)phenyl]acetamide (26a)**

Ausbeute: 4.5 g (20 mmol), farbloser Feststoff, Smp.: 117 °C, ¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆): δ 0.94 (t, 3H, ³J = 7.2 Hz, CH₃), 2.09 (s, 3H, CH₃), 3.18-3.21 (m, 2H, CH₂), 7.82 (dd, 4H, ³J = 8.9 Hz, arom. H), 10.38 (s, 1H, NH). ¹³C-NMR (125.8 MHz, DMSO-d₆): δ 13.6 (p, CH₃), 17.4 (p, CH₃), 56.5 (s, CH₂), 118.5, 128.9 (C_{arom.}), 132.5 (q), 143.9 (q), 169.2 (q, C=O)

***N*-[4-(Propylsulfonyl)phenyl]acetamide (27a)**

Ausbeute: 12.1 g (50 mmol), farbloser Feststoff, Smp.: 126 °C, ¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆): δ 0.88 (t, 3H, ³J = 7.4 Hz, CH₃), 1.49-1.54 (m, 2H, CH₂), 2.09 (s, 3H, CH₃), 3.17-3.20 (m, 2H, CH₂), 7.80 (dd, 4H, ³J = 8.9 Hz, arom. H), 10.40 (s, 1H, NH). ¹³C-NMR (125.8 MHz, DMSO-d₆): δ 12.5 (p, CH₃), 16.3 (p, CH₃), 24.2 (s, CH₂), 56.5 (s, CH₂), 118.7 (t, arom. C), 128.9 (t, arom. C), 132.5 (q), 143.9 (q), 169.2 (q, C=O)

***N*-[4-(Butylsulfonyl)phenyl]acetamide (28a)**

Ausbeute: 12.8 g (50 mmol), farbloser Feststoff, Smp.: 98 °C, ¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆): δ 0.80 (t, 3H, ³J = 7.4 Hz, CH₃), 1.27-1.31 (m, 2H, CH₂), 1.45-1.48 (m, 2H, CH₂), 2.09 (s, 3H, CH₃), 3.40 (t, 2H, ³J = 7.9 Hz, CH₂), 7.80 (dd, 4H, ³J = 8.9 Hz, arom. H), 10.41 (s, 1H, NH). ¹³C-NMR (125.8 MHz, DMSO-d₆): δ 13.5 (p, CH₃), 20.7 (p, CH₃), 24.2 (s, CH₂), 24.5 (s, CH₂), 54.6 (s, CH₂), 118.6 (t, arom. C), 128.9 (t, arom. C), 132.5 (q), 143.9 (q), 169.2 (q, C=O)

***N*-[4-(Pentylsulfonyl)phenyl]acetamide (29a)**

Ausbeute: 15.1 g (56 mmol), farbloser Feststoff, Smp.: 90 °C, ¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆): δ 0.78 (t, 3H, ³J = 7.1 Hz, CH₃), 1.19-1.25 (m, 4H, CH₂), 1.47-1.48 (m, 2H, CH₂), 2.08 (s, 3H, CH₃), 3.19 (t, 2H, ³J = 7.9 Hz, CH₂), 7.80 (dd, 4H, ³J = 9.0 Hz, arom. H), 10.41 (s, 1H, NH). ¹³C-NMR (125.8 MHz, DMSO-d₆): δ 13.6 (p, CH₃),

21.5 (p, CH₃), 22.1 (s, CH₂), 24.2 (s, CH₂), 29.5 (s, CH₂) 54.8 (s, CH₂), 118.6 (t, arom. C), 128.9 (t, arom. C), 132.5 (q), 143.9 (q), 169.2 (q, C=O)

***N*-[4-(Hexylsulfonyl)phenyl]acetamide (30a)**

Ausbeute: 17.0 g (60 mmol), farbloser Feststoff, Smp.: 94 °C, ¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆): δ 0.79 (t, 3H, ³J = 7.4 Hz, CH₃), 1.16-1.19 (m, 6H, CH₂), 1.25-1.28 (m, 2H, CH₂), 1.47-1.50 (m, 2H, CH₂), 2.09 (s, 3H, CH₃), 3.19 (t, 2H, ³J = 7.8 Hz, CH₂), 7.80 (dd, 4H, ³J = 8.9 Hz, arom. H), 10.40 (s, 1H, NH). ¹³C-NMR (125.8 MHz, DMSO-d₆): δ 13.7 (p, CH₃), 21.7 (p, CH₃), 22.4 (s, CH₂), 24.1 (s, CH₂), 27.0 (s, CH₂), 30.6 (s, CH₂), 54.8 (s, CH₂), 118.6 (t, arom. C), 128.9 (t, arom. C), 132.5 (q), 143.9 (q), 169.1 (q, C=O)

***N*-[4-(Heptylsulfonyl)phenyl]acetamide (31a)**

Ausbeute: 17.5 g (59 mmol), farbloser Feststoff, Smp.: 83 °C, ¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆): δ 0.80 (t, 3H, ³J = 7.1 Hz, CH₃), 1.13-1.26 (m, 8H, CH₂), 1.47-1.48 (m, 2H, CH₂), 2.09 (s, 3H, CH₃), 3.19 (t, 2H, ³J = 7.8 Hz, CH₂), 7.80 (dd, 4H, ³J = 9.0 Hz, arom. H), 10.40 (s, 1H, NH). ¹³C-NMR (125.8 MHz, DMSO-d₆): δ 13.8 (p, CH₃), 21.9 (p, CH₃), 22.4 (s, CH₂), 24.1 (s, CH₂), 27.3 (s, CH₂), 28.0 (s, CH₂), 30.9 (s, CH₂), 54.8 (s, CH₂), 118.6 (t, arom. C), 128.9 (t, arom. C), 132.5 (q), 143.9 (q), 169.1 (q, C=O)

***N*-[4-(Octylsulfonyl)phenyl]acetamide (32a)**

Ausbeute: 18.4 g (59 mmol), farbloser Feststoff, Smp.: 85 °C, ¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆): δ 0.81 (t, 3H, ³J = 7.1 Hz, CH₃), 1.15-1.26 (m, 10H, CH₂), 1.47-1.48 (m, 2H, CH₂), 2.08 (s, 3H, CH₃), 3.19 (t, 2H, ³J = 7.8 Hz, CH₂), 7.80 (dd, 4H, ³J = 9.0 Hz, arom. H), 10.42 (s, 1H, NH). ¹³C-NMR (125.8 MHz, DMSO-d₆): δ 13.9 (p, CH₃), 22.0 (p, CH₃), 22.4 (s, CH₂), 24.1 (s, CH₂), 27.3 (s, CH₂), 28.3 (s, CH₂), 31.0 (s, CH₂), 39.8 (s, CH₂), 54.8 (s, CH₂), 118.6 (t, arom. C), 128.9 (t, arom. C), 132.5 (q), 143.9 (q), 169.1 (q, C=O)

2. Hydrolyse der 4-(Alkylsulfonyl)acetanilide

Ein Gemisch aus 50 mmol 4-(Alkylsulfonyl)acetanilide, 18 ml konz. HCl und 20 ml Wasser wurde 4 Stunden unter Rückfluß gerührt und anschließend bei 80 °C durch Zutropfen von 30 %iger NaOH auf pH 5.5 – 6.0 eingestellt. Nach Kühlen auf 5 °C wurde das ausgefallene Produkt abgetrennt und aus Wasser umkristallisiert.

4-(Ethylsulfonyl)anilin (26b)

Ausbeute: 6.7 g (37 mmol), farbloser Feststoff, Smp.: 88 °C, ¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆): d 0.87 (t, 3H, ³J = 7. Hz, CH₃), 3.12 (t, 2H, ³J = 7.7 Hz, CH₂), 6.21 (s, 2H, NH₂), 7.13 (dd, 4H, ³J = 8.7 Hz, arom. H). ¹³C: d 13.7 (p, CH₃), 56.5 (s, CH₂), 115.2 (t, arom. C), 123.4 (q), 128.8 (t, arom. C), 153.4 (q)

4-(Propylsulfonyl)anilin (27b)

Ausbeute: 7.0 g (35 mmol), farbloser Feststoff, Smp.: 96 °C, ¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆): d 0.79 (t, 3H, ³J = 7. Hz, CH₃), 1.43-1.45 (m, 2H, CH₂), 3.09 (t, 2H, ³J = 7.8 Hz, CH₂), 6.09 (s, 2H, NH₂), 7.24 (dd, 4H, ³J = 8.9 Hz, arom. H). ¹³C: d 14.2 (p, CH₃), 23.5 (s, CH₂), 55.7 (s, CH₂), 113.2 (t, arom. C), 124.2 (q), 129.3 (t, arom. C), 153.1 (q)

4-(Butylsulfonyl)anilin (28b)

Ausbeute: 8.5 g (40 mmol), farbloser Feststoff, Smp.: 107 °C, ¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆): d 0.78 (t, 3H, ³J = 7. Hz, CH₃), 1.25-1.29 (m, 2H, CH₂), 1.41-1.46 (m, 2H, CH₂), 3.09 (t, 2H, ³J = 7.9 Hz, CH₂), 6.16 (s, 2H, NH₂), 7.04 (dd, 4H, ³J = 8.7 Hz, arom. H). ¹³C: d 13.5 (p, CH₃), 20.9 (s, CH₂), 24.8 (s, CH₂), 55.3 (s, CH₂), 112.8 (t, arom. C), 123.6 (q), 129.5 (t, arom. C), 153.6 (q)

4-(Pentylsulfonyl)anilin (29b)

Ausbeute: 9.5 g (42 mmol), farbloser Feststoff, Smp.: 121 °C, $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, DMSO- d_6): δ 0.79 (t, 3H, $^3\text{J} = 7.1$ Hz, CH_3), 1.20-1.24 (m, 4H, CH_2), 1.46-1.48 (m, 2H, CH_2), 3.22 (t, 2H, $^3\text{J} = 7.8$ Hz, CH_2), 6.14 (s, 2H, NH_2), 7.83 (dd, 4H, $^3\text{J} = 8.9$ Hz, arom. H). $^{13}\text{C-NMR}$ (125.8 MHz, DMSO- d_6): δ 13.6 (p, CH_3), 22.5 (s, CH_2), 23.6 (s, CH_2), 29.4 (s, CH_2) 54.9 (s, CH_2), 119.1 (t, arom. C), 128.5 (t, arom. C), 123.4, 154.0 (q)

4-(Hexylsulfonyl)anilin (30b)

Ausbeute: 7.9 g (33 mmol), farbloser Feststoff, Smp.: 96 °C, $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, DMSO- d_6): δ 0.78 (t, 3H, $^3\text{J} = 7.4$ Hz, CH_3), 1.16-1.18 (m, 4H, CH_2), 1.25-1.26 (m, 2H, CH_2), 1.48-1.50 (m, 2H, CH_2), 3.19 (t, 2H, $^3\text{J} = 7.8$ Hz, CH_2), 6.16 (s, 2H, NH_2), 7.83 (dd, 4H, $^3\text{J} = 8.9$ Hz, arom. H). $^{13}\text{C-NMR}$ (125.8 MHz, DMSO- d_6): δ 13.8 (p, CH_3), 22.3 (s, CH_2), 24.0 (s, CH_2), 27.1 (s, CH_2), 30.6 (s, CH_2), 54.6 (s, CH_2), 118.6 (t, arom. C), 128.9 (t, arom. C), 123.2, 154.1 (q)

4-(Heptylsulfonyl)anilin (31b)

Ausbeute: 10.5 g (41 mmol), farbloser Feststoff, Smp.: 105 °C, $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, DMSO- d_6): δ 0.82 (t, 3H, $^3\text{J} = 7.2$ Hz, CH_3), 1.15-1.27 (m, 8H, CH_2), 1.47-1.48 (m, 2H, CH_2), 3.19 (t, 2H, $^3\text{J} = 7.6$ Hz, CH_2), 6.14 (s, 2H, NH_2), 7.78 (dd, 4H, $^3\text{J} = 9.2$ Hz, arom. H). $^{13}\text{C-NMR}$ (125.8 MHz, DMSO- d_6): δ 13.6 (p, CH_3), 22.3 (s, CH_2), 23.7 (s, CH_2), 28.0 (s, CH_2), 28.5 (s, CH_2), 30.3 (s, CH_2), 54.4 (s, CH_2), 118.6 (t, arom. C), 128.9 (t, arom. C), 123.6, 153.8 (q)

4-(Octylsulfonyl)anilin (32b)

Ausbeute: 7.3 g (27 mmol), farbloser Feststoff, Smp.: 115 °C, ¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆): δ 0.80 (t, 3H, ³J = 7.3 Hz, CH₃), 1.15-1.26 (m, 10H, CH₂), 1.47-1.48 (m, 2H, CH₂), 3.21 (t, 2H, ³J = 7.7 Hz, CH₂), 6.17 (s, 2H, NH₂), 7.83 (dd, 4H, ³J = 8.7 Hz, arom. H). ¹³C-NMR (125.8 MHz, DMSO-d₆): δ 13.9 (p, CH₃), 22.2 (s, CH₂), 24.5 (s, CH₂), 27.1 (s, CH₂), 27.9 (s, CH₂), 31.3 (s, CH₂), 40.0 (s, CH₂), 55.1 (s, CH₂), 118.6 (t, arom. C), 128.9 (t, arom. C), 123.5, 153.9 (q)

3. Darstellung der Carbamate

Die Synthese der Carbamate erfolgt analog der Reaktionsvorschrift 5.13.3.

Eingesetzt wurden jeweils 10 mmol des Amins und die entsprechende Menge an Reagenzien.

Ethyl(2Z)-2-cyano-2- {[4-(ethylsulfonyl)phenyl]hydrazono}ethanoylcarbammat (26c)

Ausbeute: 1.8 g (5.1 mmol), gelber Feststoff, Smp.: 215 °C, ¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆): δ 0.88 (t, 3H, ³J = 7.3 Hz, CH₃), 1.27 (t, 3H, ³J = 7.1 Hz, CH₃), 3.24 (m, 2H, CH₂), 4.19 (q, 2H, ³J=7.2 Hz, CH₂), 7.87 (dd, 4H, ³J = 8.7 Hz, arom. H), 10.81 (s, 1H, NH), 10.97 (s, 1H, NH); ¹³C-NMR (125.8 MHz, DMSO-d₆): δ 13.4, 14.2 (CH₃), 56.5, 61.5 (CH₂), 116.7, 128.7 (C_{arom}), 109.9, 110.5, 134.1, 145.9, 150.9, 159.7 (C_q mit zwei C=O).

Ethyl(2Z)-2-cyano-2- {[4-(propylsulfonyl)phenyl]hydrazono}ethanoylcarbammat (27c)

Ausbeute: 1.7 g (4.7 mmol), gelber Feststoff, Smp.: 203 C, ¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆): δ 0.89 (t, 3H, ³J = 7.4 Hz, CH₃), 1.26 (t, 3H, ³J = 7.0 Hz, CH₃), 1.54 (m, 2H, CH₂), 3.24 (m, 2H, CH₂), 4.19 (q, 2H, ³J=7.1 Hz, CH₂), 7.90 (dd, 4H, ³J = 8.9 Hz, arom. H), 10.82 (s, 1H, NH), 10.99 (s, 1H, NH);

^{13}C -NMR (125.8 MHz, DMSO- d_6): δ 13.4, 14.2 (CH_3), 27.8, 56.5, 61.5 (CH_2), 116.8, 129.0 (C_{arom}), 109.9, 110.5, 134.1, 145.9, 150.9, 159.7 (C_q mit zwei $\text{C}=\text{O}$).

Ethyl(2Z)-2-cyano-2- {[4-(butylsulfonyl)phenyl]hydrazono}ethanoylcarbammat (28c)

Ausbeute: 2.0 g (5.3 mmol), gelber Feststoff, Smp.: 221 °C, ^1H -NMR (500 MHz, DMSO- d_6): δ 0.79 (t, 3H, $^3\text{J} = 7.1$ Hz, CH_3), 1.22 (m, 2H, CH_2), 1.26 (t, 3H, $^3\text{J} = 7.1$ Hz, CH_3), 1.50 (m, 2H, CH_2), 3.25 (t, 2H, $^3\text{J} = 7.8$ Hz, CH_2), 4.19 (q, 2H, $^3\text{J} = 7.1$ Hz, CH_2), 7.90 (dd, 4H, $^3\text{J} = 9.0$ Hz, arom. H), 10.82 (s, 1H, NH); ^{13}C -NMR (125.8 MHz, DMSO- d_6): δ 13.6, 14.2 (CH_3), 22.1, 29.5, 54.7, 61.5 (CH_2), 116.9, 129.2 (C_{arom}), 109.9, 110.5, 134.0, 145.9, 150.9, 159.7 (C_q mit zwei $\text{C}=\text{O}$).

Ethyl(2Z)-2-cyano-2- {[4-(pentylsulfonyl)phenyl]hydrazono}ethanoylcarbammat (29c)

Ausbeute: 2.4 g (6.2 mmol), gelber Feststoff, Smp.: 225 °C, ^1H -NMR (500 MHz, DMSO- d_6): δ 0.78 (t, 3H, $^3\text{J} = 7.0$ Hz, CH_3), 1.19-1.21 (m, 4H, CH_2), 1.26 (t, 3H, $^3\text{J} = 7.1$ Hz, CH_3), 1.51 (m, 2H, CH_2), 3.21 (t, 2H, $^3\text{J} = 7.7$ Hz, CH_2), 4.20 (q, 2H, $^3\text{J} = 7.0$ Hz, CH_2), 7.92 (dd, 4H, $^3\text{J} = 8.8$ Hz, arom. H), 10.83 (s, 1H, NH); ^{13}C -NMR (125.8 MHz, DMSO- d_6): δ 13.8, 14.5 (CH_3), 22.0, 23.9, 28.9, 55.1, 61.4 (CH_2), 116.7, 129.0 (C_{arom}), 110.1, 110.9, 134.3, 145.5, 151.2, 159.6 (C_q mit zwei $\text{C}=\text{O}$).

Ethyl(2Z)-2-cyano-2- {[4-(hexylsulfonyl)phenyl]hydrazono}ethanoylcarbammat (30c)

Ausbeute: 2.3 g (5.7 mmol), gelber Feststoff, Smp.: 231 °C, ^1H -NMR (500 MHz, DMSO- d_6): δ 0.81 (t, 3H, $^3\text{J} = 7.2$ Hz, CH_3), 1.19-1.21 (m, 6H, CH_2), 1.26 (t, 3H, $^3\text{J} = 7.0$ Hz, CH_3), 1.52 (m, 2H, CH_2), 3.19 (t, 2H, $^3\text{J} = 7.8$ Hz, CH_2), 4.21 (q, 2H, $^3\text{J} = 7.1$ Hz, CH_2), 7.88 (dd, 4H, $^3\text{J} = 8.9$ Hz, arom. H), 10.81 (s, 1H, NH); ^{13}C -NMR (125.8 MHz, DMSO- d_6): δ 13.8, 14.5 (CH_3), 22.1, 23.5, 28.1, 28.7, 55.4, 61.2 (CH_2), 116.8, 129.3 (C_{arom}), 110.0, 111.2, 134.1, 145.2, 151.0, 159.3 (C_q mit zwei $\text{C}=\text{O}$).

Ethyl(2Z)-2-cyano-2- {[4-(heptylsulfonyl)phenyl]hydrazono}ethanoylcarbamat (31c)

Ausbeute: 1.8 g (4.2 mmol), hellroter Feststoff, Smp.: 218 °C, ¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆): δ 0.79 (t, 3H, ³J = 7.1 Hz, CH₃), 1.18-1.21 (m, 8H, CH₂), 1.27 (t, 3H, ³J = 7.1 Hz, CH₃), 1.51 (m, 2H, CH₂), 3.20 (t, 2H, ³J = 7.8 Hz, CH₂), 4.21 (q, 2H, ³J=7.2 Hz, CH₂), 7.91 (dd, 4H, ³J = 9.0 Hz, arom. H), 10.79 (s, 1H, NH); ¹³C-NMR (125.8 MHz, DMSO-d₆): δ 13.9, 14.5 (CH₃), 21.9, 23.3, 28.1, 29.1, 32.4, 55.3, 61.7 (CH₂), 116.9, 129.2 (C_{arom}), 110.0, 111.2, 134.1, 145.0, 150.9, 159.1 (C_q mit zwei C=O).

Ethyl(2Z)-2-cyano-2- {[4-(octylsulfonyl)phenyl]hydrazono}ethanoylcarbamat (32c)

Ausbeute: 1.6 g (4.2 mmol), roter Feststoff, Smp.: 218 °C, ¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆): δ 0.78 (t, 3H, ³J = 7.2 Hz, CH₃), 1.18-1.21 (m, 10H, CH₂), 1.26 (t, 3H, ³J = 7.0 Hz, CH₃), 1.51 (m, 2H, CH₂), 3.18 (t, 2H, ³J = 7.7 Hz, CH₂), 4.23 (q, 2H, ³J = 7.2 Hz, CH₂), 7.89 (dd, 4H, ³J = 8.8 Hz, arom. H), 10.81 (s, 1H, NH); ¹³C-NMR (125.8 MHz, DMSO-d₆): δ 13.7, 14.4 (CH₃), 21.9, 22.7, 24.0, 27.8, 29.3, 32.1, 56.1, 62.0 (CH₂), 116.8, 128.7 (C_{arom}), 110.2, 111.4, 135.3, 144.5, 151.6, 160.1 (C_q mit zwei C=O).

4. Zyklisierung der Carbamate

Die Reaktion erfolgte analog zu 5.13.4. Eingesetzt wurden jeweils 5 mmol des Carbamates.

2-[4-(Ethylsulfonyl)phenyl]-3,5-dioxo-2,3,4,5-tetrahydro-1,2,4-triazin-6-carbonitril (26d)

Ausbeute: 0.5 g (1.6 mmol), gelber Feststoff, Smp.: 222 °C, ¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆): δ 0.80 (t, 3H, ³J=7.4 Hz, CH₃), 3.27 (m, 2H, CH₂), 7.90 (dd, 4H, ³J=8.9 Hz, arom. H). ¹³C-NMR (125.8 MHz, DMSO-d₆): δ 13.7 (CH₃), 61.4 (CH₂), 126.7, 128.7 (C_{arom}), 112.3, 123.5 (C_q), 138.7 (C_q), 142.51 (C=O), 147.4 (C_q), 153.9 (C=O).

ESI MS: 305.5 [M-H]⁻. Elementaranalyse: berechnet für C₁₂H₁₀N₄O₄S: C, 47.05 % H, 3.29 % N, 18.29 %. gefunden: C, 46.90 % H, 3.18 % N, 18.67 %.

2-[4-(Propylsulfonyl)phenyl]-3,5-dioxo-2,3,4,5-tetrahydro-1,2,4-triazin-6-carbonitril (27d)

Ausbeute: 0.7 g (2.2 mmol), gelber Feststoff, Smp.: 219 °C, ¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆): δ 0.88 (t, 3H, ³J = 7.4 Hz, CH₃), 1.55 (m, 2H, CH₂), 3.24 (m, 2H, CH₂), 7.95 (dd, 4H, ³J = 8.8 Hz, arom. H). ¹³C-NMR (125.8 MHz, DMSO-d₆): δ 13.4, (CH₃), 27.8, 61.5 (CH₂), 126.8, 129.0 (C_{arom}), 112.7, 125.5, 137.5, 141.8, 148.4, 154.7 (C_q mit zwei C=O). ESI MS: 343.1 [M+Na]⁺. Elementaranalyse: berechnet für C₁₃H₁₂N₄O₄S: C, 48.74 % H, 3.78 % N, 17.49 %. gefunden: C, 48.90 % H, 3.76 % N, 17.38 %.

2-[4-(Butylsulfonyl)phenyl]-3,5-dioxo-2,3,4,5-tetrahydro-1,2,4-triazin-6-carbonitril (28d)

Ausbeute: 0.6 g (1.8 mmol), oranger Feststoff, Smp.: 230 °C, ¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆): δ 0.82 (t, 3H, ³J=7.4 Hz, CH₃), 1.31-1.35 (m, 2H, CH₂), 1.50-1.53 (m, 2H, CH₂), 3.34-3.37 (m, 2H, CH₂), 7.91 (dd, 4H, ³J=8.7 Hz, arom. H). ¹³C-NMR (125.8 MHz, DMSO-d₆): δ 13.4 (CH₃), 20.8 (CH₂), 24.3 (CH₂), 54.3 (CH₂), 112.3 (C_q), 123.2 (C_q), 126.3 (C_{arom}), 128.7 (C_{arom}), 140.0 (C_q), 143.1 (C=O), 147.0 (C_q), 154.6 (C=O). ESI MS: 333.1 [M-H]⁻. Elementaranalyse: berechnet für C₁₄H₁₄N₄O₄S: C, 50.29 % H, 4.22 % N, 16.76 %. gefunden: C, 50.40 % H, 4.22 % N, 16.67 %.

2-[4-(Butylsulfonyl)phenyl]-3,5-dioxo-2,3,4,5-tetrahydro-1,2,4-triazin-6-carbonsäure (28e)

Ausbeute: 0.3 g (0.9 mmol), hellgelber Feststoff, Smp.: 253 °C, H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆): δ 0.82 (t, 3H, ³J = 7.3 Hz, CH₃), 1.33 (m, 2H, CH₂), 1.51 (m, 2H, CH₂), 3.33 (m, 2H, CH₂), 7.91 (dd, 4H, ³J = 8.6 Hz, arom. H); ¹³C-NMR (125.8 MHz, DMSO-

d₆): δ 13.5 (CH₃), 20.8, 24.4, 54.4 (CH₂), 126.2, 128.5 (C_{arom}), 136.7, 138.2, 147.7, 157.4, 161.7 (C_q mit drei C=O).

2-[4-(Butylsulfonyl)phenyl]-1,2,4-triazin-3,5(2*H*,4*H*)-dion (28f)

Ausbeute: 0.4 g (1.1 mmol), farbloser Feststoff, Smp.: 215 °C, ¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆): δ 0.80 (t, 3H, ³J = 7.1 Hz, CH₃), 1.35 (m, 2H, CH₂), 1.49 (m, 2H, CH₂), 3.33 (m, 2H, CH₂), 7.71 (s, 1H, CH), 7.90 (dd, 4H, ³J = 8.6 Hz, arom. H); ¹³C-NMR (125.8 MHz, DMSO-d₆): δ 13.4 (CH₃), 20.8, 23.8, 54.3 (CH₂), 125.6, 128.4 (C_{arom}), 137.6 (CH), 137.1, 144.1, 147.7, 157.0 (C_q mit zwei C=O).

2-[4-(Pentylsulfonyl)phenyl]-3,5-dioxo-2,3,4,5-tetrahydro-1,2,4-triazin-6-carbonitril (29d)

Ausbeute: 0.7 g (2.0 mmol), gelber Feststoff, Smp.: 241 °C, ¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆): δ 0.81 (t, 3H, ³J = 7.0 Hz, CH₃), 1.18-1.20 (m, 4H, CH₂), 1.51 (m, 2H, CH₂), 3.22 (t, 2H, ³J = 7.7 Hz, CH₂), 7.94 (dd, 4H, ³J = 8.8 Hz, arom. H), 10.78 (s, 1H, NH); ¹³C-NMR (125.8 MHz, DMSO-d₆): δ 13.8, (CH₃), 22.0, 23.9, 28.9, 61.4 (CH₂), 126.3, 129.8 (C_{arom}), 113.1, 124.2, 140.4, 145.5, 148.7, 154.6 (C_q mit zwei C=O). ESI MS: 349.4 [M+H]⁺. Elementaranalyse: berechnet für C₁₅H₁₆N₄O₄S: C, 51.71 % H, 4.63 % N, 16.08 %. gefunden: C, 51.40 % H, 4.62 % N, 16.21 %.

2-[4-(Hexylsulfonyl)phenyl]-3,5-dioxo-2,3,4,5-tetrahydro-1,2,4-triazin-6-carbonitril (30d)

Ausbeute: 0.8 g (2.2 mmol), roter Feststoff, Smp.: 231 °C, ¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆): δ 0.80 (t, 3H, ³J = 7.2 Hz, CH₃), 1.20-1.21 (m, 6H, CH₂), 1.54 (m, 2H, CH₂), 3.19 (t, 2H, ³J = 7.7 Hz, CH₂), 7.91 (dd, 4H, ³J = 8.9 Hz, arom. H), 10.81 (s, 1H, NH); ¹³C-NMR (125.8 MHz, DMSO-d₆): δ 13.8, (CH₃), 22.1, 23.5, 28.1, 28.7, 61.2 (CH₂), 126.5, 129.4 (C_{arom}), 113.0, 125.2, 140.1, 145.2, 147.3, 153.3 (C_q mit zwei C=O).

ESI MS: 385.0 $[M+Na]^+$. Elementaranalyse: berechnet für $C_{16}H_{18}N_4O_4S$: C, 53.03 % H, 5.01 % N, 15.46 %. gefunden: C, 53.15 % H, 5.11 % N, 15.10 %.

2-[4-(Heptylsulfonyl)phenyl]-3,5-dioxo-2,3,4,5-tetrahydro-1,2,4-triazin-6-carbonitril (31d)

Ausbeute: 0.7 g (1.9 mmol), roter Feststoff, Smp.: 218 °C, 1H -NMR (500 MHz, DMSO- d_6): δ 0.78 (t, 3H, $^3J = 7.0$ Hz, CH_3), 1.18-1.21 (m, 8H, CH_2), 1.51 (m, 2H, CH_2), 3.20 (t, 2H, $^3J = 7.8$ Hz, CH_2), 7.92 (dd, 4H, $^3J = 8.9$ Hz, arom. H), 10.82 (s, 1H, NH); ^{13}C -NMR (125.8 MHz, DMSO- d_6): δ 14.1 (CH_3), 21.6, 23.5, 28.3, 29.0, 33.0, 61.5 (CH_2), 126.2, 129.8 (C_{arom}), 112.7, 124.2, 141.0, 145.3, 148.1, 154.1 (C_q mit zwei C=O). ESI MS: 375.2 $[M-H]^-$. Elementaranalyse: berechnet für $C_{17}H_{20}N_4O_4S$: C, 54.24 % H, 5.36 % N, 14.88 %. gefunden: C, 54.25 % H, 5.31 % N, 15.02 %.

2-[4-(Octylsulfonyl)phenyl]-3,5-dioxo-2,3,4,5-tetrahydro-1,2,4-triazin-6-carbonitril (32d)

Ausbeute: 0.9 g (2.4 mmol), roter Feststoff, Smp.: 226 °C, 1H -NMR (500 MHz, DMSO- d_6): δ 0.79 (t, 3H, $^3J = 7.1$ Hz, CH_3), 1.18-1.21 (m, 10H, CH_2), 1.52 (m, 2H, CH_2), 3.21 (t, 2H, $^3J = 7.9$ Hz, CH_2), 7.91 (dd, 4H, $^3J = 9.0$ Hz, arom. H), 10.80 (s, 1H, NH); ^{13}C -NMR (125.8 MHz, DMSO- d_6): δ 14.4 (CH_3), 21.8, 22.8, 24.1, 29.2, 29.8, 32.5, 61.5 (CH_2), 126.5, 129.9 (C_{arom}), 113.9, 124.8, 141.5, 144.7, 148.0, 154.9 (C_q mit zwei C=O). MS: 375.2 $[M-H]^-$. Elementaranalyse: berechnet für $C_{17}H_{20}N_4O_4S$: C, 54.24 % H, 5.36 % N, 14.88 %. gefunden: C, 54.25 % H, 5.31 % N, 15.02 %.

6 Literaturliste

1. Ruoslahti,E. Brain extracellular matrix. *Glycobiology* **6**, 489-492 (1996).
2. Scott,J.E. Extracellular matrix, supramolecular organisation and shape. *J. Anat.* **187**, 259-269 (1995).
3. Oldberg,A., Antonsson,P., Hedbom,E. & Heinegard,D. Structure and function of extracellular matrix proteoglycans. *Biochem. Soc. Trans.* **18**, 789-792 (1990).
4. Birkedal-Hansen,H. *et al.* Matrix metalloproteinases: a review. *Crit Rev. Oral Biol. Med.* **4**, 197-250 (1993).
5. Vaes,G., Delaisse,J.M. & Eeckhout,Y. Relative roles of collagenase and lysosomal cysteine-proteinases in bone resorption. *Matrix Suppl* **1:383-8.**, 383-388 (1992).
6. Jiang,W. & Bond,J.S. Families of metalloendopeptidases and their relationships. *FEBS Lett.* **312**, 110-114 (1992).
7. Rawlings,N.D. & Barrett,A.J. Evolutionary families of peptidases. *Biochem. J.* **290**, 205-218 (1993).
8. Stöcker,W., Gomis-Rüth,F.X., Bode,W. & Zwillig,R. Implications of the three-dimensional structure of astacin for the structure and function of the astacin family of zinc-endopeptidases. *Eur. J. Biochem.* **214**, 215-231 (1993).
9. Vallee,B.L. & Auld,D.S. Cocatalytic zinc motifs in enzyme catalysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **90**, 2715-2718 (1993).
10. Bode,W., Gomis-Ruth,F.X. & Stockler,W. Astacins, serralysins, snake venom and matrix metalloproteinases exhibit identical zinc-binding environments (HEXXHXXGXXH and Met-turn) and topologies and should be grouped into a common family, the 'metzincins'. *FEBS Lett.* **331**, 134-140 (1993).

11. Bode,W. *et al.* The metzincin-superfamily of zinc-peptidases. *Adv. Exp. Med. Biol.* **389:1-11.**, 1-11 (1996).
12. GROSS,J. & LAPIERE,C.M. Collagenolytic activity in amphibian tissues: a tissue culture assay. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **48:1014-22.**, 1014-1022 (1962).
13. Bode,W. *et al.* Structural properties of matrix metalloproteinases. *Cell Mol. Life Sci.* **55**, 639-652 (1999).
14. Egeblad,M. & Werb,Z. New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nat. Rev. Cancer* **2**, 161-174 (2002).
15. Van Doren,S.R. *et al.* Solution structure of the catalytic domain of human stromelysin complexed with a hydrophobic inhibitor. *Protein Sci.* **4**, 2487-2498 (1995).
16. Bode,W. *et al.* The X-ray crystal structure of the catalytic domain of human neutrophil collagenase inhibited by a substrate analogue reveals the essentials for catalysis and specificity. *EMBO J.* **13**, 1263-1269 (1994).
17. Reinemer,P. *et al.* Structural implications for the role of the N terminus in the 'superactivation' of collagenases. A crystallographic study. *FEBS Lett.* **338**, 227-233 (1994).
18. Lovejoy,B., Hassell,A.M., Luther,M.A., Weigl,D. & Jordan,S.R. Crystal structures of recombinant 19-kDa human fibroblast collagenase complexed to itself. *Biochemistry* **33**, 8207-8217 (1994).
19. Li,J. *et al.* Structure of full-length porcine synovial collagenase reveals a C-terminal domain containing a calcium-linked, four-bladed beta-propeller. *Structure.* **3**, 541-549 (1995).
20. Fernandez-Catalan,C. *et al.* Crystal structure of the complex formed by the membrane type 1-matrix metalloproteinase with the tissue inhibitor of

-
- metalloproteinases-2, the soluble progelatinase A receptor. *EMBO J.* **17**, 5238-5248 (1998).
21. Kiyama,R. *et al.* Homology modeling of gelatinase catalytic domains and docking simulations of novel sulfonamide inhibitors. *J. Med. Chem.* **42**, 1723-1738 (1999).
 22. Morgunova,E. *et al.* Structure of human pro-matrix metalloproteinase-2: activation mechanism revealed. *Science* **284**, 1667-1670 (1999).
 23. Moy,F.J. *et al.* High-resolution solution structure of the catalytic fragment of human collagenase-3 (MMP-13) complexed with a hydroxamic acid inhibitor. *J. Mol. Biol.* **302**, 671-689 (2000).
 24. Gall,A.L. *et al.* Crystal structure of the stromelysin-3 (MMP-11) catalytic domain complexed with a phosphinic inhibitor mimicking the transition-state. *J. Mol. Biol.* **307**, 577-586 (2001).
 25. Lang,R. *et al.* Substrate specificity determinants of human macrophage elastase (MMP-12) based on the 1.1 Å crystal structure. *J. Mol. Biol.* **312**, 731-742 (2001).
 26. Van Wart,H.E. & Birkedal-Hansen,H. The cysteine switch: a principle of regulation of metalloproteinase activity with potential applicability to the entire matrix metalloproteinase gene family. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **87**, 5578-5582 (1990).
 27. Pei,D. & Weiss,S.J. Furin-dependent intracellular activation of the human stromelysin-3 zymogen. *Nature* **375**, 244-247 (1995).
 28. Overall,C.M. Matrix metalloproteinase substrate binding domains, modules and exosites. Overview and experimental strategies. *Methods Mol. Biol.* **151:79-120**, 79-120 (2001).

29. Knäuper,V., Kramer,S., Reinke,H. & Tschesche,H. Partial amino-acid sequence of human PMN leukocyte procollagenase. *Biol. Chem. Hoppe Seyler* **371**, 733 (1990).
30. Wetmore,D.R. & Hardman,K.D. Roles of the propeptide and metal ions in the folding and stability of the catalytic domain of stromelysin (matrix metalloproteinase 3). *Biochemistry* **35**, 6549-6558 (1996).
31. Housley,T.J. *et al.* Recombinant Chinese hamster ovary cell matrix metalloprotease-3 (MMP-3, stromelysin-1). Role of calcium in promatrix metalloprotease-3 (pro-MMP-3, prostromelysin-1) activation and thermostability of the low mass catalytic domain of MMP-3. *J. Biol. Chem.* **268**, 4481-4487 (1993).
32. Lovejoy,B. *et al.* Structure of the catalytic domain of fibroblast collagenase complexed with an inhibitor. *Science* **263**, 375-377 (1994).
33. Spurlino,J.C. *et al.* 1.56 Å structure of mature truncated human fibroblast collagenase. *Proteins* **19**, 98-109 (1994).
34. Gomis-Rüth,F.X. *et al.* The helping hand of collagenase-3 (MMP-13): 2.7 Å crystal structure of its C-terminal hemopexin-like domain. *J. Mol. Biol.* **264**, 556-566 (1996).
35. Murphy,G. & Knauper,V. Relating matrix metalloproteinase structure to function: why the "hemopexin" domain? *Matrix Biol.* **15**, 511-518 (1997).
36. Sanchez-Lopez,R., Alexander,C.M., Behrendtsen,O., Breathnach,R. & Werb,Z. Role of zinc-binding- and hemopexin domain-encoded sequences in the substrate specificity of collagenase and stromelysin-2 as revealed by chimeric proteins. *J. Biol. Chem.* **268**, 7238-7247 (1993).
37. Gomis-Rüth,F.X. *et al.* Mechanism of inhibition of the human matrix metalloproteinase stromelysin-1 by TIMP-1. *Nature* **389**, 77-81 (1997).

-
38. Sato,H. *et al.* A matrix metalloproteinase expressed on the surface of invasive tumour cells. *Nature* **370**, 61-65 (1994).
 39. Pei,D., Kang,T. & Qi,H. Cysteine array matrix metalloproteinase (CA-MMP)/MMP-23 is a type II transmembrane matrix metalloproteinase regulated by a single cleavage for both secretion and activation. *J. Biol. Chem.* **275**, 33988-33997 (2000).
 40. Kojima,S., Itoh,Y., Matsumoto,S., Masuho,Y. & Seiki,M. Membrane-type 6 matrix metalloproteinase (MT6-MMP, MMP-25) is the second glycosyl-phosphatidyl inositol (GPI)-anchored MMP. *FEBS Lett.* **480**, 142-146 (2000).
 41. Sato,H., Kinoshita,T., Takino,T., Nakayama,K. & Seiki,M. Activation of a recombinant membrane type 1-matrix metalloproteinase (MT1-MMP) by furin and its interaction with tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP)-2. *FEBS Lett.* **393**, 101-104 (1996).
 42. Nagase,H. Activation mechanisms of matrix metalloproteinases. *Biol. Chem.* **378**, 151-160 (1997).
 43. Desrochers,P.E., Jeffrey,J.J. & Weiss,S.J. Interstitial collagenase (matrix metalloproteinase-1) expresses serpinase activity. *J. Clin. Invest* **87**, 2258-2265 (1991).
 44. Pei,D., Majmudar,G. & Weiss,S.J. Hydrolytic inactivation of a breast carcinoma cell-derived serpin by human stromelysin-3. *J. Biol. Chem.* **269**, 25849-25855 (1994).
 45. Gronski,T.J., Jr. *et al.* Hydrolysis of a broad spectrum of extracellular matrix proteins by human macrophage elastase. *J. Biol. Chem.* **272**, 12189-12194 (1997).
 46. Ohuchi,E. *et al.* Membrane type 1 matrix metalloproteinase digests interstitial collagens and other extracellular matrix macromolecules. *J. Biol. Chem.* **272**, 2446-2451 (1997).

-
47. Tsafriri,A. Ovulation as a tissue remodelling process. Proteolysis and cumulus expansion. *Adv. Exp. Med. Biol.* **377:121-40.**, 121-140 (1995).
 48. Salomonsen,L.A. & Woolley,D.E. Matric metalloproteinases in normal menstruation. *Hum. Reprod.* **11**, 124-133 (1996).
 49. Shi,Y.B. & Ishizuya-Oka,A. Biphasic intestinal development in amphibians: embryogenesis and remodeling during metamorphosis. *Curr. Top. Dev. Biol.* **32:205-35.**, 205-235 (1996).
 50. Smith,C.E. Cellular and chemical events during enamel maturation. *Crit Rev. Oral Biol. Med.* **9**, 128-161 (1998).
 51. Pilcher,B.K., Sudbeck,B.D., Dumin,J.A., Welgus,H.G. & Parks,W.C. Collagenase-1 and collagen in epidermal repair. *Arch. Dermatol. Res.* **290 Suppl:S37-46.**, S37-S46 (1998).
 52. Tschesche,H. *et al.* Prospects in Diagn. and Treatm. of Breast Cancer. Schmitt,M., graeff,H. & Kindermann,C. (eds.), pp. 77-88 (Exerpta Medica, Amsterdam,1994).
 53. Basset,P. *et al.* Matrix metalloproteinases as stromal effectors of human carcinoma progression: therapeutic implications. *Matrix Biol.* **15**, 535-541 (1997).
 54. Stetler-Stevenson,W.G., Hewitt,R. & Corcoran,M. Matrix metalloproteinases and tumor invasion: from correlation and causality to the clinic. *Semin. Cancer Biol.* **7**, 147-154 (1996).
 55. Cockett,M.I. *et al.* Matrix metalloproteinases and metastatic cancer. *Biochem. Soc. Symp.* **63**, 295-313 (1998).
 56. Thompson,R.W. & Parks,W.C. Role of matrix metalloproteinases in abdominal aortic aneurysms. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **800:157-74.**, 157-174 (1996).

-
57. Janicki,J.S., Brower,G.L., Henegar,J.R. & Wang,L. Ventricular remodeling in heart failure: the role of myocardial collagen. *Adv. Exp. Med. Biol.* **382:239-45.**, 239-245 (1995).
 58. Arthur,M.J. Matrix degradation in liver: a role in injury and repair. *Hepatology* **26**, 1069-1071 (1997).
 59. Chandler,S. *et al.* Matrix metalloproteinases, tumor necrosis factor and multiple sclerosis: an overview. *J. Neuroimmunol.* **72**, 155-161 (1997).
 60. Docherty,A.J. *et al.* Sequence of human tissue inhibitor of metalloproteinases and its identity to erythroid-potentiating activity. *Nature* **318**, 66-69 (1985).
 61. Stetler-Stevenson,W.G., Kruttsch,H.C. & Liotta,L.A. Tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP-2). A new member of the metalloproteinase inhibitor family. *J. Biol. Chem.* **264**, 17374-17378 (1989).
 62. Apte,S.S., Mattei,M.G. & Olsen,B.R. Cloning of the cDNA encoding human tissue inhibitor of metalloproteinases-3 (TIMP-3) and mapping of the TIMP3 gene to chromosome 22. *Genomics* **19**, 86-90 (1994).
 63. Greene,J. *et al.* Molecular cloning and characterization of human tissue inhibitor of metalloproteinase 4. *J. Biol. Chem.* **271**, 30375-30380 (1996).
 64. Moore,W.M. & Spilburg,C.A. Purification of human collagenases with a hydroxamic acid affinity column. *Biochemistry* **25**, 5189-5195 (1986).
 65. Moore,W.M. & Spilburg,C.A. Peptide hydroxamic acids inhibit skin collagenase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **136**, 390-395 (1986).
 66. Krumme,D. & Tschesche,H. Oxal hydroxamic acid derivatives with inhibitory activity against matrix metalloproteinases. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **12**, 933-936 (2002).

67. Krumme,D., Wenzel,H. & Tschesche,H. Hydroxamate derivatives of substrate-analogous peptides containing aminomalonic acid are potent inhibitors of matrix metalloproteinases. *FEBS Lett.* **436**, 209-212 (1998).
68. Schröder,J. *et al.* Structure-based design and synthesis of potent matrix metalloproteinase inhibitors derived from a 6H-1,3,4-thiadiazine scaffold. *J. Med. Chem.* **44**, 3231-3243 (2001).
69. Schröder,J. *et al.* Novel heterocyclic inhibitors of matrix metalloproteinases: three 6H-1,3,4-thiadiazines. *Acta Crystallogr. C.* **57**, 593-596 (2001).
70. Schechter,I. & Berger,A. On the size of the active site in proteases. I. Papain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **20;27**, 157-162 (1967).
71. Babine,R.E. & Bender,S.L. Molecular Recognition of Proteinminus signLigand Complexes: Applications to Drug Design. *Chem. Rev.* **97**, 1359-1472 (1997).
72. Castelhana,A.L. *et al.* Novel indolactam-based inhibitors of matrix metalloproteinases. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **5**, 1415-1420 (1995).
73. Krüger,A. *et al.* Hydroxamate-type matrix metalloproteinase inhibitor batimastat promotes liver metastasis. *Cancer Res.* **61**, 1272-1275 (2001).
74. MacPherson,L.J. *et al.* Discovery of CGS 27023A, a non-peptidic, potent, and orally active stromelysin inhibitor that blocks cartilage degradation in rabbits. *J. Med. Chem.* **40**, 2525-2532 (1997).
75. Gonnella,N.C. *et al.* Bioactive conformation of stromelysin inhibitors determined by transferred nuclear Overhauser effects. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **92**, 462-466 (1995).
76. Gonnella,N.C., Li,Y.C., Zhang,X. & Paris,C.G. Bioactive conformation of a potent stromelysin inhibitor determined by X-nucleus filtered and multidimensional NMR spectroscopy. *Bioorg. Med. Chem.* **5**, 2193-2201 (1997).

-
77. Santos,O., McDermott,C.D., Daniels,R.G. & Appelt,K. Rodent pharmacokinetic and anti-tumor efficacy studies with a series of synthetic inhibitors of matrix metalloproteinases. *Clin. Exp. Metastasis* **15**, 499-508 (1997).
 78. Tamura,Y. *et al.* Highly selective and orally active inhibitors of type IV collagenase (MMP-9 and MMP-2): N-sulfonylamino acid derivatives. *J. Med. Chem.* **41**, 640-649 (1998).
 79. Peterson,J.T. Matrix metalloproteinase inhibitor development and the remodeling of drug discovery. *Heart Fail. Rev.* **9**, 63-79 (2004).
 80. Paudler,W.W. & Barton,J.M. The Synthesis of 1,2,4-Triazine. *J. Org. Chem.* **31**, 1720-1722 (1966).
 81. Jäckel,H. & Stamm,H. Molecular complexes, 9. Arene complexes of fervenulin, an antibiotic structurally related to caffeine. Formation constants and complex topologies determined by the refined ¹H-NMR shift method. *Arch. Pharm. (Weinheim)* **321**, 213-219 (1988).
 82. Taylor,E.C. & Sowinski,F. Synthesis of the pyrimido [5,4-e]-as-triazine antibiotics fervenulin and 2-methylfevenulone. *J. Org. Chem.* **40**, 2321-2329 (1975).
 83. Debnath,S.C. *et al.* Toxicokinetics, recovery, and metabolism of metamitron in goat. *J. Agric. Food Chem.* **51**, 5977-5984 (2003).
 84. Hooghe,R.J., Devos,S. & Hooghe-Peters,E.L. Effects of selected herbicides on cytokine production in vitro. *Life Sci.* **66**, 2519-2525 (2000).
 85. el Gendy,Z., Morsy,J.M., Allimony,H.A., Ali,W.R. & Abdel-Rahman,R.M. Synthesis of heterobicyclic nitrogen systems bearing the 1,2,4-triazine moiety as anti-HIV and anticancer drugs, part III. *Pharmazie* **56**, 376-383 (2001).

86. Abdel-Rahman, R.M. Chemistry of uncondensed 1,2,4-triazines, Part IV. Synthesis and chemistry of bioactive 3-amino-1,2,4-triazines and related compounds--an overview. *Pharmazie* **56**, 275-286 (2001).
87. Abdel-Rahman, R.M. Role of uncondensed 1,2,4-triazine derivatives as biocidal plant protection agents--a review. *Pharmazie* **56**, 195-204 (2001).
88. Abdel-Rahman, R.M. Role of uncondensed 1,2,4-triazine compounds and related heterobicyclic systems as therapeutic agents--a review. *Pharmazie* **56**, 18-22 (2001).
89. Abdel-Rahman, R.M., Morsy, J.M., el Edfawy, S. & Amine, H.A. Synthesis of some new heterobicyclic nitrogen systems bearing the 1,2,4-triazine moiety as anti-HIV and anti-cancer drugs, Part II. *Pharmazie* **54**, 667-671 (1999).
90. Dow, R.L. *et al.* Discovery of a novel series of 6-azauracil-based thyroid hormone receptor ligands: potent, TR beta subtype-selective thyromimetics. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **13**, 379-382 (2003).
91. Freyne. 6-Azauracil derivatives as IL-5 Inhibitors. (US 6,746,792 B2). 1-6-2004.
92. Freyne, J. 6-Azauracil derivatives as IL-5 Inhibitors. (US 2003/0220331 A1). 27-11-2003.
93. Kelly, M.J., Evans, K., Gallagher, J.J. & Mulvihill, M.J. Substituted 4,5-Dihydro-1,2,4-triazin-6-ones and their use as fungicides and insecticides. (WO 02/067675 A2). 6-9-2002.
94. Miller, M.W. *et al.* Anticoccidial derivatives of 6-azauracil. 3. Synthesis, high activity, and short plasma half-life of 1-phenyl-6-azauracils containing sulfonamide substituents. *J. Med. Chem.* **23**, 1083-1087 (1980).
95. Singh, C. The structure of the pyrimidines and purines. 8. The crystal structure of alloxan, C₄H₄N₂O₅. *Acta Crystallogr.* **19**, 759-767 (1965).

-
96. Masaki,T. *et al.* Matrilysin (MMP-7) as a significant determinant of malignant potential of early invasive colorectal carcinomas. *Br. J. Cancer* **84** , 1317-1321 (2001).
 97. Yamamoto,H. *et al.* Expression of matrilysin mRNA in colorectal adenomas and its induction by truncated fibronectin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **201**, 657-664 (1994).
 98. Wilson,C.L. & Matrisian,L.M. Matrilysin: an epithelial matrix metalloproteinase with potentially novel functions. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **28**, 123-136 (1996).
 99. Crabbe,T., Smith,B., O'Connell,J. & Docherty,A. Human progelatinase A can be activated by matrilysin. *FEBS Lett.* **345**, 14-16 (1994).
 100. Imai,K. *et al.* Matrix metalloproteinase 7 (matrilysin) from human rectal carcinoma cells. Activation of the precursor, interaction with other matrix metalloproteinases and enzymic properties. *J. Biol. Chem.* **270**, 6691-6697 (1995).
 101. Adachi,Y. *et al.* Contribution of matrilysin (MMP-7) to the metastatic pathway of human colorectal cancers. *Gut* **45**, 252-258 (1999).
 102. Huachuan,Z. *et al.* Expression of matrix metalloproteinase-7 involving in growth, invasion, metastasis and angiogenesis of gastric cancer. *Chin Med. Sci. J.* **18**, 80-86 (2003).
 103. Shiomi,T. & Okada,Y. MT1-MMP and MMP-7 in invasion and metastasis of human cancers. *Cancer Metastasis Rev.* **22**, 145-152 (2003).
 104. Imai,K., Shikata,H. & Okada,Y. Degradation of vitronectin by matrix metalloproteinases-1, -2, -3, -7 and -9. *FEBS Lett.* **369**, 249-251 (1995).
 105. Nakada,M. *et al.* Expression and tissue localization of membrane-type 1, 2, and 3 matrix metalloproteinases in human astrocytic tumors. *Am. J. Pathol.* **154**, 417-428 (1999).

106. Lampert,K. *et al.* Expression of matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors in human brain tumors. *Am. J. Pathol.* **153**, 429-437 (1998).
107. Yamamoto,M. *et al.* Differential expression of membrane-type matrix metalloproteinase and its correlation with gelatinase A activation in human malignant brain tumors in vivo and in vitro. *Cancer Res.* **56**, 384-392 (1996).
108. Ueno,H. *et al.* Expression and tissue localization of membrane-types 1, 2, and 3 matrix metalloproteinases in human invasive breast carcinomas. *Cancer Res.* **57**, 2055-2060 (1997).
109. Shimada,T. *et al.* Enhanced production and activation of progelatinase A mediated by membrane-type 1 matrix metalloproteinase in human oral squamous cell carcinomas: implications for lymph node metastasis. *Clin. Exp. Metastasis* **18**, 179-188 (2000).
110. Malhotra,S. *et al.* Increased membrane type 1 matrix metalloproteinase expression from adenoma to colon cancer: a possible mechanism of neoplastic progression. *Dis. Colon Rectum* **45**, 537-543 (2002).
111. Kroger,M. & Tschesche,H. Cloning, expression and activation of a truncated 92-kDa gelatinase minienzyme. *Gene* **196**, 175-180 (1997).
112. Kleine,T. *et al.* Preparation of active recombinant TIMP-1 from Escherichia coli inclusion bodies and complex formation with the recombinant catalytic domain of PMNL-collagenase. *Biochemistry* **32**, 14125-14131 (1993).
113. Tschesche,H. *et al.* Latent collagenase and gelatinase from human neutrophils and their activation. *Matrix Suppl* **1:245-55.**, 245-255 (1992).
114. Pieper,M. *et al.* Expression, purification, characterization, and X-ray analysis of selenomethionine 215 variant of leukocyte collagenase. *J. Protein Chem.* **16**, 637-650 (1997).

115. Hiller,O., Lichte,A., Oberpichler,A., Kocourek,A. & Tschesche,H. Matrix metalloproteinases collagenase-2, macrophage elastase, collagenase-3, and membrane type 1-matrix metalloproteinase impair clotting by degradation of fibrinogen and factor XII. *J. Biol. Chem.* **20;275**, 33008-33013 (2000).
116. Lichte,A., Kolkenbrock,H. & Tschesche,H. The recombinant catalytic domain of membrane-type matrix metalloproteinase-1 (MT1-MMP) induces activation of progelatinase A and progelatinase A complexed with TIMP-2. *FEBS Lett.* **397**, 277-282 (1996).
117. Foley,L.H., Palermo,R., Dunten,P., Wang,P. Novel 5,5-disubstituted pyrimidine-2,4,6-triones as selective MMP inhibitors. *Bioorg.Med.Chem.Lett.* **11; 8**, 969-972 (2001).

7 Anhang

Table 1. Crystal data and structure refinement for tifi01.

Identification code	tifi01
Measurement device	Nonius KappaCCD
Empirical formula	C14 H14 N4 O4 S
Formula weight	334.35
Temperature	100(2) K
Wavelength	0.71073 Å
Crystal system, space group	Monoclinic P 21
Unit cell dimensions	a = 9.07300(10) Å alpha = 90 deg. b = 14.5590(2) Å beta = 91.1800(8) deg. c = 11.57400(10) Å gamma = 90 deg.
Volume	1528.53(3) Å ³
Z, Calculated density	4, 1.453 Mg/m ³
Absorption coefficient	0.238 mm ⁻¹
F(000)	696
Crystal size, colour and habit	0.30 x 0.28 x 0.20 mm ³ , Colourless plate
Theta range for data collection	3.15 to 30.00 deg.
Index ranges	-12 ≤ h ≤ 12, -20 ≤ k ≤ 20, -16 ≤ l ≤ 16
Reflections collected / unique	42289 / 8883 [R(int) = 0.030]
Completeness to theta = 30.00	99.7%
Absorption correction	multi-scan
Max. and min. transmission	0.9539 and 0.9320
Refinement method	Full-matrix least-squares on F ²
Data / restraints / parameters	8883 / 1 / 528
Goodness-of-fit on F ²	1.036
Final R indices [I > 2σ(I)]	R1 = 0.0286, wR2 = 0.0715 [8430]
R indices (all data)	R1 = 0.0314, wR2 = 0.0731
Absolute structure parameter	0.45(3)
Largest diff. peak and hole	0.328 and -0.357 e.Å ⁻³
remarks	Racemic twin. Hydrogens were refined isotropically.

Table 2. Atomic coordinates ($\times 10^4$) and equivalent isotropic displacement parameters ($\text{\AA}^2 \times 10^3$) for tifi01. U(eq) is defined as one third of the trace of the orthogonalized U_{ij} tensor.

	x	y	z	U(eq)
S(1)	7088(1)	5936(1)	5716(1)	13(1)
S(2)	8375(1)	1618(1)	9046(1)	13(1)
O(1)	11613(1)	2908(1)	12607(1)	19(1)
O(2)	7564(1)	4302(1)	11010(1)	19(1)
O(3)	6531(1)	5168(1)	5043(1)	21(1)
O(4)	6060(1)	6643(1)	6035(1)	18(1)
O(5)	3745(1)	4744(1)	2279(1)	18(1)
O(6)	7728(1)	3172(1)	3712(1)	21(1)
O(7)	9109(1)	2373(1)	9635(1)	20(1)
O(8)	9269(1)	845(1)	8711(1)	17(1)
N(1)	9599(1)	3651(1)	11848(1)	15(1)
N(2)	9698(1)	4252(1)	9980(1)	12(1)
N(3)	11094(1)	3972(1)	9864(1)	13(1)
N(4)	14425(1)	3000(1)	10489(1)	24(1)
N(5)	5714(1)	3907(1)	2952(1)	15(1)
N(6)	5648(1)	3274(1)	4807(1)	13(1)
N(7)	4277(1)	3581(1)	4957(1)	13(1)
N(8)	964(1)	4588(1)	4457(1)	22(1)
C(1)	11019(2)	3326(1)	11817(1)	14(1)
C(2)	11732(2)	3544(1)	10720(1)	14(1)
C(3)	8853(1)	4082(1)	10956(1)	14(1)
C(4)	13235(2)	3252(1)	10573(1)	17(1)
C(5)	9061(1)	4674(1)	8959(1)	13(1)
C(6)	8213(1)	5465(1)	9058(1)	14(1)
C(7)	7622(1)	5867(1)	8052(1)	14(1)
C(8)	7910(1)	5470(1)	6989(1)	14(1)
C(9)	8789(2)	4687(1)	6894(1)	15(1)
C(10)	9374(1)	4288(1)	7894(1)	14(1)
C(11)	8603(2)	6444(1)	4996(1)	17(1)
C(12)	8141(2)	6957(1)	3889(1)	21(1)
C(13)	7462(2)	6366(1)	2935(1)	28(1)
C(14)	7234(2)	6913(1)	1823(1)	33(1)
C(15)	4328(1)	4277(1)	3033(1)	14(1)
C(16)	3636(1)	4042(1)	4130(1)	13(1)
C(17)	6464(1)	3433(1)	3811(1)	14(1)
C(18)	2145(2)	4338(1)	4325(1)	16(1)
C(19)	6301(1)	2846(1)	5816(1)	13(1)
C(20)	7180(2)	2069(1)	5724(1)	16(1)
C(21)	7780(2)	1677(1)	6725(1)	16(1)
C(22)	7495(1)	2072(1)	7790(1)	13(1)
C(23)	6594(2)	2841(1)	7887(1)	16(1)
C(24)	5986(1)	3230(1)	6888(1)	15(1)
C(25)	6919(2)	1240(1)	9929(1)	16(1)
C(26)	7527(1)	994(1)	11129(1)	17(1)
C(27)	6321(2)	690(1)	11937(1)	29(1)

Table 3. Bond lengths [\AA] and angles [deg] for tifi01.

S(1)-O(4)	1.4419(10)
S(1)-O(3)	1.4481(10)
S(1)-C(8)	1.7734(13)
S(1)-C(11)	1.7820(13)
S(2)-O(8)	1.4452(10)
S(2)-O(7)	1.4479(10)
S(2)-C(22)	1.7714(12)
S(2)-C(25)	1.7738(13)
O(1)-C(1)	1.2148(16)
O(2)-C(3)	1.2149(16)
O(5)-C(15)	1.2171(16)
O(6)-C(17)	1.2156(16)
N(1)-C(1)	1.3739(17)
N(1)-C(3)	1.3743(16)
N(1)-H(1A)	0.903(19)
N(2)-N(3)	1.3401(15)
N(2)-C(3)	1.4005(16)
N(2)-C(5)	1.4416(15)
N(3)-C(2)	1.2972(17)
N(4)-C(4)	1.1471(19)
N(5)-C(15)	1.3737(17)
N(5)-C(17)	1.3784(16)
N(5)-H(5A)	0.81(2)
N(6)-N(7)	1.3364(15)
N(6)-C(17)	1.4019(16)
N(6)-C(19)	1.4408(16)
N(7)-C(16)	1.2962(16)
N(8)-C(18)	1.1446(19)
C(1)-C(2)	1.4717(18)
C(2)-C(4)	1.4412(19)
C(5)-C(10)	1.3901(17)
C(5)-C(6)	1.3908(17)
C(6)-C(7)	1.4000(17)
C(6)-H(6A)	0.973(19)
C(7)-C(8)	1.3889(18)
C(7)-H(7A)	0.972(18)
C(8)-C(9)	1.3959(17)
C(9)-C(10)	1.3911(18)
C(9)-H(9A)	0.905(17)
C(10)-H(10A)	0.98(2)
C(11)-C(12)	1.5337(18)
C(11)-H(11A)	0.961(19)
C(11)-H(11B)	0.956(18)
C(12)-C(13)	1.521(2)
C(12)-H(12A)	0.94(2)
C(12)-H(12B)	1.005(17)
C(13)-C(14)	1.524(2)
C(13)-H(13A)	0.96(2)
C(13)-H(13B)	0.99(2)
C(14)-H(14A)	1.03(2)
C(14)-H(14B)	0.99(2)

C(14)-H(14C)	0.90(2)
C(15)-C(16)	1.4695(17)
C(16)-C(18)	1.4421(18)
C(19)-C(20)	1.3895(18)
C(19)-C(24)	1.3955(17)
C(20)-C(21)	1.3919(17)
C(20)-H(20A)	0.916(17)
C(21)-C(22)	1.3895(18)
C(21)-H(21A)	1.009(19)
C(22)-C(23)	1.3921(17)
C(23)-C(24)	1.3921(17)
C(23)-H(23A)	0.995(18)
C(24)-H(24A)	1.006(19)
C(25)-C(26)	1.5264(18)
C(25)-H(25A)	0.94(2)
C(25)-H(25B)	0.91(2)
C(26)-C(27)	1.520(2)
C(26)-H(26A)	0.99(2)
C(26)-H(26B)	1.003(19)
C(27)-C(28)	1.519(2)
C(27)-H(27A)	0.93(3)
C(27)-H(27B)	1.04(3)
C(28)-H(28A)	0.95(2)
C(28)-H(28B)	0.99(3)
C(28)-H(28C)	0.96(3)
O(4)-S(1)-O(3)	117.89(6)
O(4)-S(1)-C(8)	108.88(6)
O(3)-S(1)-C(8)	106.69(6)
O(4)-S(1)-C(11)	109.48(6)
O(3)-S(1)-C(11)	109.47(6)
C(8)-S(1)-C(11)	103.42(6)
O(8)-S(2)-O(7)	117.52(6)
O(8)-S(2)-C(22)	108.40(6)
O(7)-S(2)-C(22)	107.35(6)
O(8)-S(2)-C(25)	109.95(6)
O(7)-S(2)-C(25)	107.80(6)
C(22)-S(2)-C(25)	105.09(6)
C(1)-N(1)-C(3)	125.86(11)
C(1)-N(1)-H(1A)	119.3(12)
C(3)-N(1)-H(1A)	114.7(12)
N(3)-N(2)-C(3)	124.15(11)
N(3)-N(2)-C(5)	114.28(10)
C(3)-N(2)-C(5)	121.32(10)
C(2)-N(3)-N(2)	118.53(11)
C(15)-N(5)-C(17)	125.95(11)
C(15)-N(5)-H(5A)	116.6(15)
C(17)-N(5)-H(5A)	117.1(15)
N(7)-N(6)-C(17)	124.08(10)
N(7)-N(6)-C(19)	114.07(10)
C(17)-N(6)-C(19)	121.50(11)
C(16)-N(7)-N(6)	118.83(10)
O(1)-C(1)-N(1)	123.71(12)
O(1)-C(1)-C(2)	124.14(12)

N(1)-C(1)-C(2)	112.15(11)
N(3)-C(2)-C(4)	117.36(12)
N(3)-C(2)-C(1)	124.46(12)
C(4)-C(2)-C(1)	118.18(11)
O(2)-C(3)-N(1)	122.78(12)
O(2)-C(3)-N(2)	122.55(12)
N(1)-C(3)-N(2)	114.67(11)
N(4)-C(4)-C(2)	177.58(16)
C(10)-C(5)-C(6)	122.11(11)
C(10)-C(5)-N(2)	117.95(11)
C(6)-C(5)-N(2)	119.89(11)
C(5)-C(6)-C(7)	118.69(11)
C(5)-C(6)-H(6A)	121.3(11)
C(7)-C(6)-H(6A)	120.0(11)
C(8)-C(7)-C(6)	119.17(12)
C(8)-C(7)-H(7A)	120.6(10)
C(6)-C(7)-H(7A)	120.0(10)
C(7)-C(8)-C(9)	121.85(12)
C(7)-C(8)-S(1)	119.55(10)
C(9)-C(8)-S(1)	118.56(10)
C(10)-C(9)-C(8)	118.96(12)
C(10)-C(9)-H(9A)	120.6(10)
C(8)-C(9)-H(9A)	120.4(10)
C(5)-C(10)-C(9)	119.18(12)
C(5)-C(10)-H(10A)	121.4(11)
C(9)-C(10)-H(10A)	119.4(11)
C(12)-C(11)-S(1)	113.10(10)
C(12)-C(11)-H(11A)	112.5(10)
S(1)-C(11)-H(11A)	107.1(11)
C(12)-C(11)-H(11B)	113.9(10)
S(1)-C(11)-H(11B)	102.5(11)
H(11A)-C(11)-H(11B)	106.9(15)
C(13)-C(12)-C(11)	115.49(12)
C(13)-C(12)-H(12A)	112.5(12)
C(11)-C(12)-H(12A)	105.5(12)
C(13)-C(12)-H(12B)	110.8(10)
C(11)-C(12)-H(12B)	106.4(9)
H(12A)-C(12)-H(12B)	105.5(15)
C(12)-C(13)-C(14)	111.30(14)
C(12)-C(13)-H(13A)	107.7(13)
C(14)-C(13)-H(13A)	109.6(13)
C(12)-C(13)-H(13B)	107.2(12)
C(14)-C(13)-H(13B)	109.5(13)
H(13A)-C(13)-H(13B)	111.6(18)
C(13)-C(14)-H(14A)	109.3(13)
C(13)-C(14)-H(14B)	110.5(11)
H(14A)-C(14)-H(14B)	110.5(17)
C(13)-C(14)-H(14C)	111.2(13)
H(14A)-C(14)-H(14C)	108.1(18)
H(14B)-C(14)-H(14C)	107.1(18)
O(5)-C(15)-N(5)	123.74(12)
O(5)-C(15)-C(16)	124.23(12)
N(5)-C(15)-C(16)	112.02(11)
N(7)-C(16)-C(18)	116.64(11)

N(7)-C(16)-C(15)	124.44(12)
C(18)-C(16)-C(15)	118.93(11)
O(6)-C(17)-N(5)	122.75(12)
O(6)-C(17)-N(6)	122.79(12)
N(5)-C(17)-N(6)	114.46(11)
N(8)-C(18)-C(16)	178.37(15)
C(20)-C(19)-C(24)	121.56(12)
C(20)-C(19)-N(6)	121.11(11)
C(24)-C(19)-N(6)	117.31(11)
C(19)-C(20)-C(21)	119.01(12)
C(19)-C(20)-H(20A)	121.9(11)
C(21)-C(20)-H(20A)	119.1(11)
C(22)-C(21)-C(20)	119.49(12)
C(22)-C(21)-H(21A)	122.0(10)
C(20)-C(21)-H(21A)	118.5(10)
C(21)-C(22)-C(23)	121.62(11)
C(21)-C(22)-S(2)	119.04(10)
C(23)-C(22)-S(2)	119.26(10)
C(24)-C(23)-C(22)	118.96(12)
C(24)-C(23)-H(23A)	119.4(11)
C(22)-C(23)-H(23A)	121.6(11)
C(23)-C(24)-C(19)	119.32(12)
C(23)-C(24)-H(24A)	121.7(10)
C(19)-C(24)-H(24A)	118.8(10)
C(26)-C(25)-S(2)	109.71(9)
C(26)-C(25)-H(25A)	114.4(14)
S(2)-C(25)-H(25A)	104.9(14)
C(26)-C(25)-H(25B)	112.6(13)
S(2)-C(25)-H(25B)	104.0(13)
H(25A)-C(25)-H(25B)	110.3(18)
C(27)-C(26)-C(25)	112.15(11)
C(27)-C(26)-H(26A)	111.5(13)
C(25)-C(26)-H(26A)	108.1(13)
C(27)-C(26)-H(26B)	109.1(11)
C(25)-C(26)-H(26B)	109.1(11)
H(26A)-C(26)-H(26B)	106.6(16)
C(28)-C(27)-C(26)	111.90(13)
C(28)-C(27)-H(27A)	111.7(17)
C(26)-C(27)-H(27A)	113.4(18)
C(28)-C(27)-H(27B)	107.9(16)
C(26)-C(27)-H(27B)	110.4(17)
H(27A)-C(27)-H(27B)	101(2)
C(27)-C(28)-H(28A)	114.6(14)
C(27)-C(28)-H(28B)	109.7(14)
H(28A)-C(28)-H(28B)	110(2)
C(27)-C(28)-H(28C)	111.3(17)
H(28A)-C(28)-H(28C)	106(2)
H(28B)-C(28)-H(28C)	105(2)

Symmetry transformations used to generate equivalent atoms:

**Table 4. Anisotropic displacement parameters ($\text{\AA}^2 \times 10^3$) for tifi01.
The anisotropic displacement factor exponent takes the form:
 $-2 \pi^2 [h^2 a^{*2} U_{11} + \dots + 2 h k a^* b^* U_{12}]$**

	U11	U22	U33	U23	U13	U12
S(1)	15(1)	14(1)	12(1)	2(1)	-2(1)	-1(1)
S(2)	13(1)	13(1)	12(1)	2(1)	-1(1)	0(1)
O(1)	22(1)	19(1)	15(1)	2(1)	-2(1)	4(1)
O(2)	14(1)	26(1)	16(1)	5(1)	2(1)	3(1)
O(3)	26(1)	18(1)	18(1)	1(1)	-6(1)	-5(1)
O(4)	17(1)	19(1)	18(1)	3(1)	0(1)	4(1)
O(5)	22(1)	20(1)	14(1)	3(1)	-1(1)	4(1)
O(6)	16(1)	28(1)	17(1)	7(1)	4(1)	5(1)
O(7)	24(1)	17(1)	18(1)	1(1)	-5(1)	-4(1)
O(8)	16(1)	17(1)	17(1)	2(1)	1(1)	4(1)
N(1)	15(1)	18(1)	11(1)	2(1)	2(1)	1(1)
N(2)	12(1)	13(1)	12(1)	1(1)	0(1)	1(1)
N(3)	13(1)	14(1)	14(1)	-2(1)	-1(1)	0(1)
N(4)	21(1)	30(1)	23(1)	-7(1)	-3(1)	6(1)
N(5)	16(1)	18(1)	10(1)	2(1)	1(1)	1(1)
N(6)	13(1)	15(1)	10(1)	1(1)	1(1)	-1(1)
N(7)	12(1)	13(1)	14(1)	-1(1)	0(1)	-1(1)
N(8)	21(1)	26(1)	20(1)	1(1)	2(1)	3(1)
C(1)	17(1)	13(1)	12(1)	-2(1)	-1(1)	0(1)
C(2)	15(1)	15(1)	14(1)	-3(1)	-1(1)	1(1)
C(3)	16(1)	15(1)	11(1)	-1(1)	1(1)	0(1)
C(4)	20(1)	19(1)	12(1)	-2(1)	-1(1)	2(1)
C(5)	11(1)	14(1)	13(1)	2(1)	0(1)	-2(1)
C(6)	16(1)	14(1)	12(1)	-1(1)	0(1)	0(1)
C(7)	14(1)	14(1)	15(1)	2(1)	-1(1)	0(1)
C(8)	14(1)	14(1)	13(1)	2(1)	-2(1)	-2(1)
C(9)	17(1)	16(1)	12(1)	0(1)	1(1)	1(1)
C(10)	15(1)	14(1)	14(1)	0(1)	0(1)	1(1)
C(11)	16(1)	18(1)	17(1)	3(1)	1(1)	0(1)
C(12)	24(1)	20(1)	19(1)	7(1)	6(1)	5(1)
C(13)	34(1)	34(1)	15(1)	4(1)	-1(1)	2(1)
C(14)	31(1)	51(1)	17(1)	10(1)	4(1)	14(1)
C(15)	15(1)	15(1)	12(1)	-2(1)	0(1)	0(1)
C(16)	15(1)	13(1)	11(1)	-1(1)	2(1)	0(1)
C(17)	14(1)	16(1)	12(1)	2(1)	0(1)	-1(1)
C(18)	17(1)	17(1)	13(1)	0(1)	-1(1)	1(1)
C(19)	14(1)	13(1)	12(1)	1(1)	-1(1)	-1(1)
C(20)	22(1)	16(1)	12(1)	-1(1)	2(1)	2(1)
C(21)	20(1)	14(1)	15(1)	0(1)	0(1)	2(1)
C(22)	14(1)	14(1)	12(1)	3(1)	0(1)	0(1)
C(23)	17(1)	17(1)	14(1)	0(1)	1(1)	1(1)
C(24)	16(1)	14(1)	14(1)	1(1)	0(1)	2(1)
C(25)	14(1)	20(1)	14(1)	3(1)	1(1)	0(1)
C(26)	18(1)	20(1)	13(1)	2(1)	1(1)	1(1)
C(27)	19(1)	48(1)	21(1)	13(1)	5(1)	2(1)
C(28)	28(1)	33(1)	17(1)	6(1)	4(1)	3(1)

Table 5. Hydrogen coordinates ($\times 10^4$) and isotropic displacement parameters ($\text{\AA}^2 \times 10^3$) for tifi01.

	x	y	z	U(eq)
H(1A)	9060(2)	3551(13)	12482(16)	20(4)
H(5A)	6160(2)	4021(15)	2371(19)	33(5)
H(6A)	8010(2)	5730(13)	9810(17)	25(5)
H(7A)	7076(19)	6439(13)	8097(15)	20(4)
H(9A)	8990(18)	4452(11)	6191(14)	10(4)
H(10A)	9960(2)	3728(14)	7836(16)	27(5)
H(11A)	9301(19)	5962(14)	4855(15)	19(4)
H(11B)	9029(19)	6830(12)	5581(15)	18(4)
H(12A)	8990(2)	7268(14)	3652(16)	26(5)
H(12B)	7436(19)	7451(12)	4129(14)	16(4)
H(13A)	6530(2)	6149(14)	3196(18)	36(6)
H(13B)	8150(2)	5855(16)	2798(18)	40(6)
H(14A)	6680(2)	6513(16)	1220(2)	42(6)
H(14B)	6680(2)	7482(14)	1974(16)	27(5)
H(14C)	8110(2)	7082(15)	1522(17)	30(5)
H(20A)	7367(19)	1803(12)	5025(15)	15(4)
H(21A)	8400(2)	1107(13)	6652(16)	24(5)
H(23A)	6400(2)	3127(13)	8649(16)	22(4)
H(24A)	5380(2)	3809(13)	6912(15)	21(4)
H(25A)	6490(2)	745(17)	9523(19)	43(6)
H(25B)	6290(2)	1728(16)	9939(17)	33(5)
H(26A)	8070(2)	1536(16)	11440(19)	40(6)
H(26B)	8270(2)	487(13)	11058(16)	23(4)
H(27A)	5660(3)	270(2)	11600(2)	69(8)
H(27B)	5620(4)	1230(2)	12110(3)	76(9)
H(28A)	6240(3)	257(17)	13670(2)	47(6)
H(28B)	7480(3)	-247(18)	12950(2)	50(7)
H(28C)	7680(3)	750(2)	13400(2)	66(8)