

Entwicklung neuer multitargeting Kinaseinhibitoren zur Bekämpfung der Alzheimerschen Erkrankung

Dissertation

zur Erlangung des
Doktorgrades der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

der
Naturwissenschaftlichen Fakultät I -Biowissenschaften-

der Martin-Luther-Universität
Halle-Wittenberg,

vorgelegt

von
Herrn Nico Schade
geb. am 30.03.1987 in Kyritz

verteidigt am 3. November 2020

Gutachter I: Prof. Dr. Andreas Hilgeroth

Gutachter II: PD Dr. Max Holzer

Gutachter III: Prof. Dr. Wolfgang Sippl

„Die Seele hat die Farbe deiner Gedanken.“
Mark Aurel, Römischer Kaiser

INHALTSVERZEICHNIS

Abbildungsverzeichnis	V
Tabellenverzeichnis	IX
Abkürzungsverzeichnis.....	XI
I Theoretischer Teil.....	
1 Einleitung.....	1
2 Grundlagen	3
2.1 Alzheimersche Erkrankung.....	3
2.2 Amyloidhypothese.....	5
2.3 Tauhypothese	8
2.4 Proteinkinasen.....	13
2.4.1 AD-relevante Proteinkinasen.....	15
2.4.1.1 Cyclin-abhängige Kinasen - CDK.....	16
2.4.1.2 Glykogensynthase-Kinase 3 – GSK 3.....	19
2.4.1.3 Mitogen-aktivierte Kinasen - MAPK	22
2.4.1.4 Tyrosinkinase Fyn.....	24
2.4.2 Proteinkinaseinhibitoren.....	26
2.4.3 Inhibitoren AD-assoziiierter Proteinkinasen mit Azoxafluoren-Grundstruktur.....	33
3 Zielstellung der Arbeit	36
4 Ergebnisse und Diskussion.....	38
4.1 Teilabschnitt I: Synthese und Analytik von 1-Aza-9-oxafluoren- sowie 10-Aza-11-oxabenzofluoren-Derivaten des Carbamidtyps.....	38
4.1.1 Synthese kommerziell nicht zugänglicher Ausgangsstoffe	39
4.1.2 Synthese der Nicotinamide	39
4.1.3 Darstellung und Charakterisierung der <i>N</i> -Acetyl-1,4-dihydropyridin-Derivate des 3-Carbamidtyps	41

4.1.4	Darstellung und Charakterisierung der 1-Aza-9-oxafluoren- sowie der 10-Aza-11-oxabenz[<i>a</i>]fluoren-Derivate des Carbamidtyps	49
4.1.4.1	Strukturaufklärung mittels NMR-Analytik.....	55
4.2	Teilabschnitt II: Synthese und Analytik von 1-Aza-9-oxafluoren- sowie der 10-Aza-11-oxabenz[<i>a</i>]fluoren-Derivate des Oximethertyps.....	62
4.2.1	Synthese der <i>O</i> -Alkyl- und <i>O</i> -Benzyloximether	64
4.2.1.1	Synthese von Nicotinaldehyd- <i>O</i> -alkyloximen sowie – <i>O</i> -benzyloximen: Alkylierung und Benzylierung.....	65
4.2.1.2	Synthese von Nicotinaldehyd- <i>O</i> -benzyloximen: Kondensationsreaktion von Nicotinaldehyd mit <i>O</i> -Benzyhydroxylaminderivaten.....	71
4.2.2	Synthese der <i>N</i> -Acetyl-1,4-dihydropyridin-Derivate des 3-Oximethertyps.....	78
4.2.3	Darstellung und Charakterisierung der 1-Aza-9-oxafluoren- beziehungsweise der 10-Aza-11-oxabenz[<i>a</i>]fluoren-Derivate des Oximethertyps.....	78
4.2.3.1	Darstellung der 1-Aza-9-oxafluoren- beziehungsweise der 10-Aza-11-oxabenz[<i>a</i>]fluoren-Derivate des Oximethertyps nach Syntheseweg B.....	81
4.2.3.2	Festlegung der <i>E/Z</i> -Isomerie und Isomereninversion	86
4.3	Proteinkinasehemmung.....	91
4.3.1	Interpretation der Testergebnisse von der PROQINASE GmbH.....	93
4.3.2	Interpretation der Testergebnisse von P.KOCH	95
4.3.3	Interpretation der Testergebnisse von V.KRYSTOF	98
4.4	<i>Docking</i> -Untersuchungen.....	101
5	Zusammenfassung und Ausblick	105
II	Experimenteller Teil	
6	Chemikalien, Geräte und Methoden.....	113
6.1	Chemikalien	113
6.2	Geräte und Methoden zur Synthese und Analytik	115
6.2.1	Allgemeine Methoden zur Synthese	115
6.2.2	Chromatographie.....	116
6.2.2.1	Schwerkraftsäulenchromatographie	116
6.2.2.2	Dünnschichtchromatographie (DC).....	116
6.2.2.3	<i>Middle Pressure Liquid Chromatography</i> (MPLC)	117

6.2.2.4 High Pressure Liquid Chromatography (HPLC).....	118
6.2.3 Infrarotspektroskopie (IR)	119
6.2.4 Massenspektrometrie (MS).....	119
6.2.5 Nuclear Magnetic Resonance Spektroskopie (NMR).....	120
6.2.6 Schmelzbereichbestimmung (Schmb).....	120
6.2.7 Mikrowellenunterstützte Synthese	120
6.2.8 Sonstiges.....	121
6.2.9 <i>In silico</i> Untersuchungen.....	122
7 Synthese der Verbindungen.....	124
7.1 Allgemeine Arbeitsvorschriften (AAV)	124
7.2 Verbindungsmonographien.....	127
7.2.1 Kommerziell nicht verfügbare Syntheseedukte.....	127
7.2.2 Syntheseriehe der 1-Aza-9-oxafluoren- sowie 10-Aza-11-oxabenz[<i>a</i>]fluoren- Derivate des Carbamidtyps.....	130
7.2.2.1 Nicotinsäureamide und -anilide	130
7.2.2.2 <i>N</i> -Acetyl-1,4-dihydropyridine des Amid- und des Ethylestertyps.....	136
7.2.2.3 1-Aza-9-oxafluoren- sowie 10-Aza-11-oxabenz[<i>a</i>]fluoren-Derivate des Carbamid- und des Ethylestertyps.....	144
7.2.3 Syntheseriehe der 1-Aza-9-oxafluoren- sowie 10-Aza-11-oxabenz[<i>a</i>]fluoren- Derivate des Oximether- und Carbaldehydtyps	176
7.2.3.1 2-(Benzyloxy)isoindolin-1,3-dion-Derivate	176
7.2.3.2 <i>O</i> -Benzylhydroxylaminhydrochlorid-Derivate.....	181
7.2.3.3 Nicotinaldehyd- <i>O</i> -alkyloxime und - <i>O</i> -benzyloxime	184
7.2.3.4 <i>N</i> -Acetyl-1,4-dihydropyridine des Oximethertyps.....	188
7.2.3.5 1-Aza-9-oxafluoren- sowie 10-Aza-11-oxabenz[<i>a</i>]fluoren-Derivate des Oxim- ether- und des Carbaldehydtyps	192
7.2.4 Sonstige	215
8 Biochemische und physikochemische Untersuchungen.....	220
8.1 ³³ PanQinase® -Assay der ProQinase GmbH	220
8.2 ADP-Glo™: ADP monitoring Assay	221
8.3 ELISA zum Nachweis der JNK3-Inhibition.....	223

8.4 Inhibitionsbestimmung an CDK1/CycB, CDK2/CycE und Fyn wt.....	224
8.5 Bestimmung des Verteilungskoeffizienten Log P von ausgewählten Verbindungen.....	226
Literaturverzeichnis	229
Eidesstattliche Erklärung	243
Danksagung.....	245
Lebenslauf.....	247
Bisherige Veröffentlichungen	249
Anlagen	

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Ursachen und Prävalenz für Demenzen.....	2
Abbildung 2: A β ₄₂ -Bildung über den Amyloidweg aus APP.....	5
Abbildung 3: Glymphatisches System (nach Vorlage von NEDERGAARD <i>et al.</i>).....	7
Abbildung 4: Graphische Darstellung der NFT-Bildung.....	11
Abbildung 5: Schematischer Aufbau der ATP-Bindetasche.....	14
Abbildung 6: Wiedereintritt in den Zellzyklus.....	17
Abbildung 7: Darstellung des PI3K-AKT-mTOR-Signalweges.....	18
Abbildung 8: Regulierung der GSK3 β -Aktivität.....	19
Abbildung 9: AMPA-Endozytose durch GSK3 β -Aktivierung.....	21
Abbildung 10: Schema der wichtigsten Mitogen-aktivierten Kinasekaskaden. ^[132]	22
Abbildung 11: Pathologische Aktivierung des NMDAR im Dendrit (adaptiert nach ITTNER <i>et al.</i>). ^[196]	26
Abbildung 12: Ausgewählte CDK-Inhibitoren.....	28
Abbildung 13: Ausgewählte GSK3-Inhibitoren.....	29
Abbildung 14: Ausgewählte JNK- und ERK-Inhibitoren.....	31
Abbildung 15: Fyn-Inhibitoren.....	32
Abbildung 16: Chemische Struktur der 1-Aza-9-oxafluorene.....	33
Abbildung 17: Ausrichtung I: <i>Docking</i> -Ergebnisse der 1-Aza-9-oxafluorene Ic , Id , If und Ih in der aktiven Konformation der GSK3 β	34
Abbildung 18: Ausrichtung II: <i>Docking</i> -Ergebnisse Ig in der aktiven Konformation der CDK1.....	35
Abbildung 19: Synthese von 6-Hydroxy-1,4-4a,9a-tetrahydro-1-aza-9-oxafluorenen nach HILGEROTH <i>et al.</i> ^[243]	36
Abbildung 20: Synthese der 6-Hydroxy-1-aza-9-oxafluorene im Eintopfverfahren nach VOIGT. ^[241]	36
Abbildung 21: Allgemeine Strukturformeln der Zielverbindungen mit Carbamidpartialstruktur des Teilabschnitts I.....	37
Abbildung 22: Allgemeine Strukturformel der Zielverbindungen mit Oximetherpartialstruktur des Teilabschnitts II.....	37
Abbildung 23: Drei-Stufen-Synthese zur Darstellung der 6-Hydroxy-4-phenyl-1-aza-9-oxafluorene beziehungsweise der 5-Hydroxy-7-phenyl-10-aza-11-oxabenz[<i>a</i>]fluorene des Carbamidtyps über zwei Reaktionswege.....	38
Abbildung 24: Umsatz von 5-Hydroxy-1,4-naphthochinon zu 5-Methoxy-1,4-naphthochinon.....	39
Abbildung 25: Darstellung von Carbonsäureaniliden/ -amiden mittels Carbonsäurechlorid bei Raumtemperatur (RT).....	40
Abbildung 26: Verteilung der positiven Partialladung im Pyridiniumsalz.....	41

Abbildung 27: Darstellung der 3-substituierten <i>N</i> -Acetyl-4-phenyl-1,4-dihydropyridin-Derivate 11 bis 21 nach COMINS, adaptiert von VOIGT. ^[241, 254]	42
Abbildung 28: <i>N</i> -Acetyl-4-phenyl-1,4-dihydropyridin-3-carbonitril.	44
Abbildung 29: Geplante Darstellung von 1-Acetyl- <i>N</i> -(4-nitrophenyl)-4-phenyl-1,4-dihydropyridin-3-carboxamid	45
Abbildung 30: Energieminimierte Darstellung von 12	46
Abbildung 31: oben: partieller Doppelbindungscharakter der ringintegrierten Carbonsäureamidfunktion und Ausbildung der <i>Z</i> - und <i>E</i> -Rotamere, beispielhaft an 12 ; unten: Einfluss des Anisotropiekegels auf räumlich nahe Protonen.	47
Abbildung 32: ¹ H-NMR von 12	47
Abbildung 33: Möglich denkbarer Reaktionsmechanismus zur Bildung von 1,4-Dihydropyridinen.	49
Abbildung 34: Postulierter Reaktionsweg Schritt 1 zur Gewinnung der 1,4,4a,9a-Tetrahydro-1-aza-9-oxafluorene, exemplarisch mit 1,4-Benzochinon. ^[241] 50	
Abbildung 35: Bruttogleichung der Scandium-katalysierten Reaktion nach FUKUZUMI <i>et al.</i> unter Bildung von 1-Benzyl-6-hydroxy-4-isopropyl- 1,4,4a,9a-tetrahydrobenzofuro[2,3- <i>b</i>]pyridin-3-carboxamid. ^[267]	51
Abbildung 36: Postulierter, konzertierter Reaktionsmechanismus mit anschließender Umlagerung zum stabileren 2,3-Dihydrobenzofuran-Derivat nach ENGLER <i>et al.</i> . ^[268]	51
Abbildung 37: Postulierter Reaktionsweg Schritt 2 zur Gewinnung der 1-Aza-9-oxafluorene, exemplarisch mit 1,4-Benzochinon.....	52
Abbildung 38: Isolierte Nebenprodukte: <i>N</i> -(2-Chlorobenzyl)-5-(2,5-dihydroxyphenyl)-4-phenylnicotinamid (NP31) und <i>N</i> -(4-Methoxybenzyl)-5-(2,5-dihydroxyphenyl)-4-phenylnicotinamid (NP32).	53
Abbildung 39: Darstellung von 29 , 30 und 33 durch Aminolyse von 22	55
Abbildung 40: oben: ¹ H-NMR-Spektrum von 23 ; unten: vergrößerte Bereiche zur Charakterisierung von H-5, H-7 und H-8.....	55
Abbildung 41: links: Energieminimierte Darstellung von 23 mit einem 109 Grad Torsionswinkel des 4-Phenylringes zum <i>regiden</i> System; rechts: Ringstrommodell zur Erklärung der Anisotropie des 4-Phenylringes und die Einflussnahme auf das Protonen H-5.	56
Abbildung 42: ¹ H-NMR von 36 , oben rechts: Hervorhebung des Bereiches von 8,40 bis 7,60.	57
Abbildung 43: Gesamt-HMBC-Spektrum von 36 , mit Ausschnitt des Bereiches, der die vicinale Kopplung von H-4 und C5 anzeigt.	58
Abbildung 44: ¹ H-NMR-Spektren von 47 (rotbraun, oben) und 47 Iso (blau, unten).	59
Abbildung 45: Mesomere Grenzstrukturen der Naphtholpartialstruktur von 47 Iso	60
Abbildung 46: HMBC von 47 zur Differenzierung der Strukturisomere.	61
Abbildung 47: Synthesepfad der 6-Hydroxy-4-phenyl-1-aza-9-oxafluorene beziehungsweise der 5-Hydroxy-7-phenyl-10-aza-11-oxabenz[<i>a</i>]fluorene des Oximethertyps über zwei Reaktionswege.	63

Abbildung 48: Darstellung von Nicotinaldehydoxim (65) über eine instabile Halbaminalbildung.	64
Abbildung 49: Darstellung von (<i>E/Z</i>)-Nicotinaldehyd- <i>O</i> -alkyloximether und - <i>O</i> -benzyloximether nach AAV 6a.	67
Abbildung 50: Möglicher Reaktionsmechanismus bei der Umsetzung von 65 mit einem Diazoniumsalz.	70
Abbildung 51: Synthese der 2-(Benzyloxy)isoindolin-1,3-dion-Derivate mit Ausbeuten durch Benzylierung. ^[284]	71
Abbildung 52: Postulierter Reaktionsmechanismus nach MITSONUBU.	72
Abbildung 53: Möglicher Reaktionsmechanismus der <i>O</i> -Arylierung von NHPI.	74
Abbildung 54: Hydrazinolyse der 2-(Benzyloxy)isoindolin-1,3-dion-Derivate mit Ausbeuten der <i>O</i> -Benzyloxyhydroxylaminhydrochloride.	75
Abbildung 55: Kondensationsreaktion von Nicotinaldehyd mit <i>O</i> -Benzyloxyhydroxylamin.	76
Abbildung 56: <i>O</i> -Debenzylierung von 80 durch klassische Hydrogenolyse unter Bildung von 77 .	80
Abbildung 57: ¹ H-NMR von 80 (oben, rot); ¹ H-NMR von 77 (unten, blau).	81
Abbildung 58: Mikrowellengestützte Hydrolyse am Beispiel von 79 unter Bildung von 76 .	83
Abbildung 59: ¹ H-NMR von 79 (oben, rot); ¹ H-NMR von 76 (unten, blau).	83
Abbildung 60: Energieminimierte Konformationen des <i>O</i> -(4-Fluorbenzyl)-Derivats 92 E (links) und 92 Z (rechts). ^[261]	85
Abbildung 61: ¹ H-NMR von 92 E (oben, rot); ¹ H-NMR von 92 Z (unten, blau).	87
Abbildung 62: Isomerisierung der <i>E</i> -Form von 80 zum <i>Z</i> -Isomer anhand von HPLC- und ¹ H-NMR-Analytik.	89
Abbildung 63: Möglicher Bindungsmodus von 23 (orange, links) und 28 (gelb, rechts) nach Ausrichtung I.	102
Abbildung 64: Wahrscheinlicher Bindungsmodus von 23 (orange, links) und 28 (gelb, rechts) nach Ausrichtung II.	102
Abbildung 65: Wahrscheinlicher Bindungsmodus von 77 (grün, links) und 88 (cyan, rechts) nach Ausrichtung II.	103
Abbildung 66: Wechselwirkung der Liganden mit Fyn wt.	104
Abbildung 67: Überblick über potentielle Derivatisierungen der Leitstruktur.	109
Abbildung 68: Darstellung der Detektion durch ADP-Glo™ (adaptiert nach der PROMEGA Internetseite). ^[345]	222
Abbildung 69: Schematische Darstellung des JNK3-assoziierten ELISAs.	223
Abbildung 70: Kalibriergerade zur Bestimmung der gesuchten Log P-Werte.	227

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: Gewonnene Nicotinanilide (links) und –amide (rechts) mit Ausbeuten.....	40
Tabelle 2: Dargestellte Verbindungen des <i>N</i> -Acetyl-4-phenyl-1,4-dihydropyridin-3-carboxylats (11) sowie der <i>N</i> -Acetyl-4-phenyl-1,4-dihydropyridin-3-carbamide (12-21) mit Ausbeuten.....	44
Tabelle 3: Chemische Verschiebung [ppm] der ringständigen Wasserstoffatome und der Acetylgruppe in Abhängigkeit des Rotamers von 11 und 12 (Z = Rotationsisomer der Z-Form, E = Rotationsisomer der E-Form).	48
Tabelle 4: Dargestellte Verbindungen der 1-Aza-9-oxafluoren- (22-28, 31, 32, 34, 35) beziehungsweise der 10-Aza-11-oxabenz[<i>a</i>]fluoren-Derivate (36-50) mit Ausbeuten... 52	52
Tabelle 5: Experimente zur Darstellung von (<i>E/Z</i>)-Nicotinaldehyd- <i>O</i> -benzyloxim-Derivaten.	68
Tabelle 6: Isolierte Verbindungen 68 bis 70 und ihre Ausbeuten.....	77
Tabelle 7: Gewonnene <i>N</i> -Acetyl-1,4-dihydropyridin-Derivate des 3-Oximethertyps (71 bis 75).	78
Tabelle 8: Dargestellte Verbindungen der 6-Hydroxy-1-aza-9-oxafluoren- (78 bis 80, 82) sowie der 5-Hydroxy-10-aza-11-oxabenz[<i>a</i>]fluoren-Derivate (89 bis 91, 93) mit Ausbeuten. .79	79
Tabelle 9: Dargestellte Verbindungen der 6-Hydroxy-1-aza-9-oxafluoren- (81, 83 bis 86) sowie der 5-Hydroxy-10-aza-11-oxabenz[<i>a</i>]fluoren-Derivate (92 E/Z, 94 bis 96 E/Z) mit Ausbeuten.....	84
Tabelle 10: Strukturübersicht der im ersten Teil getesteten Verbindungen mit Amid-Partialstruktur.	92
Tabelle 11: Strukturübersicht der im zweiten Teil getesteten Verbindungen mit Amid-Partialstruktur.....	92
Tabelle 12: Strukturübersicht der im zweiten Teil getesteten Verbindungen mit Oxim- und Oximether-Partialstruktur.....	93
Tabelle 13: Experimentell bestimmte Verteilungskoeffizienten ausgewählter Verbindungen.	110
Tabelle 14: Relative Laufmittelgemische Teil 1 (V/V).	116
Tabelle 15: Relative Laufmittelgemische Teil 2 (V/V).....	116
Tabelle 16: MPLC-Methoden.	117
Tabelle 17: Isokratische relative Laufmittelzusammensetzung (V/V) am HPLC-Gerät 2.....	118
Tabelle 18: Genutzte Handels-, Präzisions-, Feinwaagen ^[325-327]	121
Tabelle 19: Magnetrührplatten zur Synthese	121
Tabelle 20: Testergebnisse Teil I von der PROQINASE GmbH.....	221
Tabelle 21: Testergebnisse Teil II an der GSK3 β	222
Tabelle 22: Testergebnisse Teil II an der JNK3.....	224
Tabelle 23: Testergebnisse Teil II an der CDK1/CycB, CDK2/CycE und Fyn wt.	225
Tabelle 24: IC ₅₀ -Werte der Testergebnisse Teil II an der CDK1/CycB, CDK2/CycE und Fyn wt.	225
Tabelle 25: Verwendete Referenzsubstanzen und ihre Messdaten.....	227
Tabelle 26: Ermittelte Log P-Werte der Azoxafluorene.....	227

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

δ	Chemische Verschiebung
abs.	absolut
ACh	Acetylcholin
ACh-E	Acetylcholinesterase
AD	<i>Alzheimer Disease</i> = Alzheimer Erkrankung
ADAS cog	<i>Alzheimer's disease assessment scale cognition</i> = Alzheimer-Bewertungsskala für Kognition
ADCS ADL	<i>Alzheimer's disease cooperative study group- active daily living</i> = Kooperationsarbeitsgruppe für Alzheimererkrankung zur Einschätzung des aktiven täglichen Lebens
ADI	ALZHEIMER'S DISEASE INTERNATIONAL
APCI	<i>Atmospheric Pressure Chemical Ionization</i> = Chemische Ionisierung bei Atmosphärendruck
APP	<i>Amyloid Precursor Protein</i> = Amyloid Vorläuferprotein
AKT	Proteinkinase B
AMPA	α -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolpropionsäure-Rezeptor
AS	Aminosäure
Asp, D	Asparaginsäure
ATP	Adenosintriphosphat
AU	<i>Absorbance Units</i> = Absorptionseinheiten
<i>Brine</i>	gesättigte Natriumchloridlösung
cCT	Kraniale Computertomographie
CDK	<i>Cyclin dependent Kinase</i> = Cyclin-abhängige Kinase
cMRT	Kraniale Magnetresonanztomographie
CSF	Zerebrospinalflüssigkeit
Cyc	Cycline
Cys, C	Cystein
DC	Dünnschichtchromatographie
DCM	Dichlormethan
DMF	Dimethylformamid
Dem Tect	Demenz Detektionstest
dest.	destilliert
DIAD	Diisopropylazodicarboxylat
DIBAL	Diisobutylaluminiumhydrid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTGS	deutertes Triglycinsulfat
ELISA	<i>Enzyme-linked Immunosorbant Assay</i>

Abkürzungsverzeichnis

ERK	<i>Extracellular signal-regulated kinases</i> = Extrazellulär signalregulierte Kinase
ESI	Elektronen Spray Ionisation
EtOH	Ethanol
EtOAc	Ethylacetat
Et ₂ O	Diethylether
¹⁸ F-FDG-PET	¹⁸ F-Fluordesoxyglukose-Positronen-Emissions-Tomographie
FAD	Familiär bedingte Alzheimersche Erkrankung
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FEP	Fluorpolymere
Gln, Q	Glutamin
Glu, E	Glutaminsäure
Gly, G	Glycin
GSK 3	Glykogensynthase-Kinase 3
HMBC	<i>Heteronuclear Multiple Bond Correlation</i> = Heteronukleare Mehrfachbindungs-Korrelation
HOMO	<i>Highest Occupied Molecular Orbital</i> = Höchstes besetztes Molekülorbital
HPLC	<i>High Pressure Liquid Chromatography</i> = Hochdruckflüssigchromatographie
HR-MS	<i>High Resolution Mass Spectrometry</i> = Hochauflösende Massenspektrometrie
HSQC	<i>Heteronuclear Single Quantum Coherence</i> = Heteronukleare Einzelquanten-kohärenz
ICD-10	<i>International Statistical Classification of Diseases and Related Health Conditions</i> = Internationale Klassifikation der Krankheiten u. verwandten Gesundheitszustände
Ile, I	Isoleucin
<i>i</i> -PrOH	Isopropanol
<i>J</i>	Kopplungskonstante
JNK	c-Jun N-terminale Kinase
Leu, L	Leucin
LM	Laufmittel
LTP	<i>Long Term Potential</i> = Langandauernde Verstärkung synaptischer Übertragungen
LTD	<i>Long Term Depression</i> = Langandauernde Abschwächung synaptischer Übertragungen
LUMO	<i>Lowest Unoccupied Molecular Orbital</i> = Niedrigstes nichtbesetztes Molekülorbital
MAP	Mikrotubulus-assoziiertes Protein
MBD	<i>Microtubulus-binding domäne</i>
MeOH	Methanol
MPLC	<i>Middle Pressure Liquid Chromatography</i> = Mitteldruckflüssigchromatographie
MMST	Mini Mental Status Test
mTORC1	<i>mammalian target of rapamycin complex 1</i> = Säugetierziel-von-Rapamycin-Komplex 1

NaOEt	Natriumethanolat
NHPI	<i>N</i> -Hydroxyphthalimid
NMDA	<i>N</i> -Methyl-D-Aspartat
NMDAR	<i>N</i> -Methyl-D-Aspartat Rezeptor
PDB	Proteindatenbank
PEEK	Polyetheretherketon
PET	Positronen-Emissions-Tomographie
PI3K	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat 3-kinase
PP	Proteinphosphatase, Polypropylen
PPh ₃	Triphenylphosphin
ppm	<i>parts per million</i> = Teile pro Million
Pro, P	Prolin
PSD-95	postsynaptisches Dichteprotein 95
ROS	Reaktive Sauerstoff Spezies
RT	Raumtemperatur
SAPK	<i>Stress-activated proteine kinase</i> = Stress-aktivierte Proteinkinase
SD	Standardabweichung (<i>standard deviation</i>)
Ser, S	Serin
Src	Familie der Tyrosin-Kinasen
TBAB	Tetrabutylammoniumbromid
TEA	Triethylamin
<i>tert</i> -BuOK	Kalium <i>tert</i> -Butoxid
Thr, T	Threonin
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin
Trp, W	Tryptophan
Tyr, Y	Tyrosin
V/V	Volumen-Volumen-Verhältnis
Val, V	Valin
WHO	WORLD HEALTH ORGANIZATION
wt	<i>wild type</i> = Wildtyp
ZNS	Zentralnervensystem

I Theoretischer Teil

1 EINLEITUNG

„Liebe Landsleute, vor kurzem habe ich erfahren, dass ich einer der Millionen Amerikaner bin, die an Alzheimer erkrankt sind.[...] Ich beginne nun die Reise, die mich zum Sonnenuntergang meines Lebens führt.“^[1, 2] Mit diesen Worten verabschiedete sich der an Alzheimer erkrankte Ronald Reagan, am 05.11.1994, von der Amerikanischen Gesellschaft. Der facettenreiche Schauspieler und 40. US-Präsident überlebte den Kampf gegen die progressive, neurodegenerative Krankheit nicht.

Wie ihm erging es, laut ALZHEIMER'S DISEASE INTERNATIONAL (ADI), im Jahr 2015 über 47 Millionen Menschen weltweit, die mit einer Demenzerkrankung zu kämpfen hatten - darunter waren 9,9 Millionen Neuerkrankungen. Das bedeutet, dass alle 3,2 Sekunden ein neuer Demenzfall diagnostiziert wird. Das ADI schätzt, dass die Zahl bis 2050 auf 132 Millionen ansteigen wird.^[3] In Deutschland leben bis zu 1,2 Millionen Demenzerkrankte.^[4]

Demenz stellt ein Syndrom mit einem großen Symptompool dar. Mit schleichendem Beginn, geprägt vom Rückgang kognitiver Fähigkeiten, erleben die Betroffenen, anfangs bei vollem Bewusstsein, einen Persönlichkeitsverlust. Derartige Störungen höherer kortikaler Funktionen sind vorrangig Beeinträchtigungen des Gedächtnisses, der Aufmerksamkeit sowie des Denk- und Urteilsvermögens.^[4] Während des progredienten Krankheitsverlaufes sind die Betroffenen nicht mehr in der Lage einfache Alltagshandlungen ohne Unterstützung zu bewältigen.^[5] Gepaart mit Ängsten und Depressionen, entwickeln sich im fortgeschrittenen Stadium vegetative Funktionsstörungen, wie Inkontinenz, das Unvermögen des Kauens, Schluckens und des Atmens. Der so geschwächte Körper bietet viel Angriffsfläche für weitere Komorbiditäten. Nicht selten versterben die Leidtragenden an nicht mehr therapierbaren Infektionen, wie Pneumonien oder Sepsen. Durch soziale Interaktionen können die Betroffenen die ersten Symptome geschickt verschleiern. Treten diese aber in den Vordergrund sind der Zerfall bestimmter Hirnareale und der langsame Rückgang von Nervenzellen schon so weit fortgeschritten, dass das menschliche Gehirn die Fehlfunktion einzelner Abschnitte nicht mehr ausgleichen kann. Ursächlich hierfür sind zum einen neurodegenerative Krankheitsbilder. Hierzu zählen die am häufigsten diagnostizierte Form, die Alzheimer-Demenz (60 bis 70 %), die Lewy-Körperchen-Demenz (15 %) und die Frontotemporale Demenz (5 %). Zum anderen können kleine, kumulierte Infarkte und Läsionen im Gehirn eine Vaskuläre Demenz (10 %) hervorrufen. Fast die Hälfte der Erkrankungen treten als Mischformen auf (Abbildung 1, links, Seite 2).^[5] Ihre Differentialdiagnose und Abgrenzung zu anderen neurologischen Erkrankungen ist langwierig und vielschichtig. Für die Diagnosestellung muss die Symptomatik, laut Internationaler statistischer Klassifikation von Krankheiten (ICD-10), mindestens sechs Monate anhalten. Sie reicht von sozialer, Eigen-, Fremd-, sowie Familienanamnese, über kognitive Tests, wie den Mini Mental Status Test (MMST), den Demenz Detektion Test (DemTect) beziehungsweise den *Alzheimer's disease assessment scale cognition*-Test (ADAS cog) bis hin zu bildgebenden Verfahren, wie die kraniale Computertomographie (cCT), die kraniale Magnetresonanztomographie (cMRT),

Einleitung

die Positronen-Emissions-Tomographie (PET) und die Elektroenzephalographie (EEG). Weiterhin können serologische und biochemische Untersuchungen des Blutes sowie die Überprüfung der genetischen Veranlagung hilfreich sein.^[4] Eine abschließende Diagnose kann erst *post mortem* durch eine Gehirnautopsie und histopathologischer Untersuchung erfolgen.

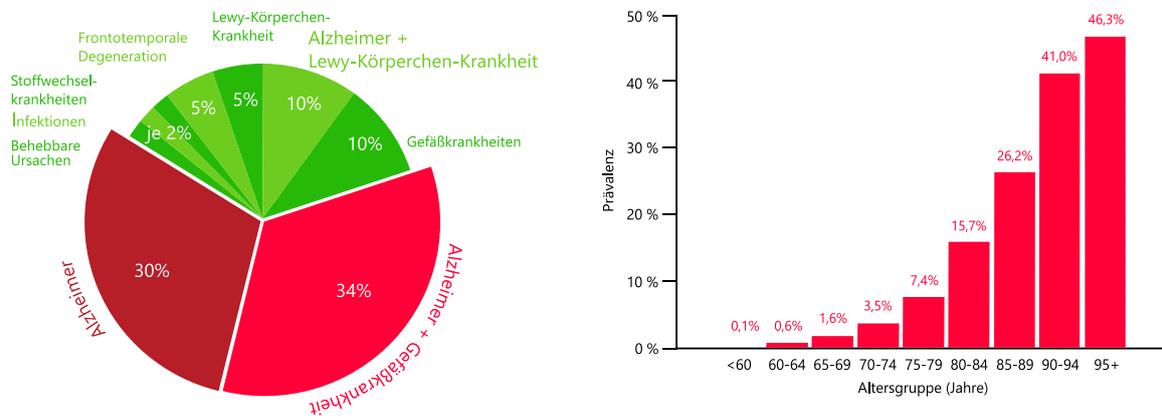


Abbildung 1: Ursachen und Prävalenz für Demenzen. Ursachen für Demenzen nach Häufigkeit (links)^[6], Prävalenz für Demenz in Europa nach Altersgruppen, 2013 (rechts)^[5].

Demenz ist in der westlichen Welt die vierthäufigste Todesursache nach Herz-Kreislauf-Erkrankungen, Gewebsneubildungen und zerebrovaskulären Erkrankungen. Dabei ist das Alter der größte Risikofaktor. Die 75- bis 79-Jährigen erkranken viereinhalb Mal häufiger an einer Demenz als ihre zehn Jahre jüngeren Mitmenschen. Die Prävalenzrate steigt von unter einem Prozent, für die 60- bis 65-Jährigen, auf 41 Prozent, für die 90- bis 94-Jährigen (Abbildung 1, rechts).^[5] Weiterhin korrelieren Bluthochdruck, Diabetes mellitus, Depressionen im mittleren Alter, soziale Isolation, ein niedriger Bildungsstand sowie ein geringes Einkommen mit dem Risiko an Demenz zu erkranken.^[5, 7]

Das ADI schätzte die globalen Kosten zur Behandlung und Pflege von Demenzpatienten für das Jahr 2015 auf 818 Milliarden US-Dollar – das entspricht 1,09 Prozent des weltweiten Bruttosozialproduktes - und erwartet einen Anstieg auf bis zu 2000 Milliarden US-Dollar für das Jahr 2030.^[3] Alarmierende Zahlen, die die WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO) veranlasst haben mit ihrem GLOBAL ACTION PLAN, von 2017 bis 2025, die Behandlung und die Prävention der Demenz, sowie die soziale Unterstützung und die Menschenrechte der Patienten international zu harmonisieren und außerdem die Forschungskosten um das Zweifache zu erhöhen.^[8]

Im Folgenden wird speziell auf die Alzheimersche Erkrankung Bezug genommen.

2 GRUNDLAGEN

2.1 Alzheimersche Erkrankung

Das Auftreten einer Alzheimerschen Erkrankung (AD) wurde im Jahr 1901 erstmals dokumentiert. Der deutsche Psychiater, ALOIS ALZHEIMER, diagnostizierte bei der damals 51-jährigen AUGUSTE DETER die „Krankheit des Vergessens“, die später seinen Namen tragen sollte.^[9] Sie wäre, wie vier bis acht Prozent aller AD-Fälle, in das Krankheitsbild mit frühem Beginn (vor dem 65. Lebensjahr) einzugruppieren. Diese familiär bedingte AD (FAD) grenzt sich von der sporadischen AD ab, welche mit 90 % die häufigste Form darstellt und mit der Krankheit mit spätem Beginn (nach dem 65. Lebensjahr) korreliert.^[10, 11] Allen gemein ist das nach routinemäßiger Autopsie, stark atrophierte Gehirn. Besonders betroffen sind Zonen, die für das Denken, Lernen und Sprechen essentiell sind, wie die des paritemporalen Bereichs oder des medialen Temporallappens, in denen der Hippocampus und der entorhinale Kortex lokalisiert sind. Histopathologisch lassen sich in den Gewebeproben beachtliche Ansammlungen von extrazellulären A β -Amyloidplaques und vorrangig intrazellulären, neurofibrillären Bündeln (*Neurofibrillary tangles*; NFT's) erkennen, die für die Diagnosestellung obligat sind.

Mittlerweile geht man davon aus, dass die Neurodegeneration bei AD schon 20 bis 30 Jahre vor dem ersten Auftreten klinischer Symptome beginnt und nach weiteren zehn Jahren mit dem Tod in völlig hilflosem Zustand endet.^[12, 13] Die Pathogenese von AD ist bis heute noch nicht zweifelsfrei geklärt. Neben der A β -Amyloid- sowie der Tauhypothese werden weitere Faktoren, wie eine gestörte *Clearance*, inklusive ApoE-Dysregulation oder eine genetische Prädisposition als Ursache diskutiert. Des Weiteren könnten oxidativer Stress, gepaart mit mitochondrialer Fehlfunktion und chronisch bedingten Entzündungen oder eine starke Exposition mit neurotoxischen Metallen, wie Kupfer und Aluminium, eine AD bewirken.^[14-17] Diese multifaktorielle Kausalität führt zum Absterben von Neuronen und zum Funktionsverlust ganzer Hirnareale. Folglich sind Kognitionsausfälle unterschiedlichster Ausprägung zu beobachten. AD wird anhand einer bestimmten Punktzahl in die Stadien leicht (26 bis 20 Punkte), mittelschwer (19 bis 10 Punkte) und schwer (unter 10 Punkte) eingestuft.^[4] Die Zuordnung erfolgt nach Auswertung eines MMST. In der Frühphase ist vorrangig das Kurzzeitgedächtnis beeinflusst und die Betroffenen können Alltagsaufgaben noch eingeschränkt bewältigen. Während der mittelschweren Phase ist der geistige Verfall so weit fortgeschritten, dass eine eigenständige Lebensführung schwer vorstellbar ist. Im dritten Stadium ist selbst die Fähigkeit des Sprechens auf wenige Worte begrenzt oder nicht mehr existent. Additive, vegetative Funktionsstörungen lassen den Patienten zum ganztäglichen Pflegefall werden.^[18] AD gilt weiterhin als unheilbar, sodass sich die Therapiestrategie auf den progredienten Verlauf und die Symptomlinderung fokussiert. Dabei beeinflussen alle bisher zugelassenen Arzneistoffe das cholinerge und glutaminerge System.

Cholinerge Hypothese

Eine cholinerge Dysfunktion wurde frühzeitig mit AD-assozierten Anzeichen in Verbindung gebracht. Sie korreliert wohl auch mit der Zunahme von A β -Plaques und NFT's.^[17] Besonders beeinträchtigt sind Neuronen des Nukleus basalis Meynert. Dieser gehört zu den wichtigsten Acetylcholin (ACh) produzierenden Kernen im ZNS und sendet Efferenzen in große Bereiche des limbischen Systems und des zerebralen Kortex. Diese Einschränkung geht mit einer verringerten Aktivität der Acetylcholin-Transferase beziehungsweise der Wiederaufnahme von Cholin und Essigsäure in den präsynaptischen Teil der Nervenzelle einher. Folglich sind die ACh-Spiegel im synaptischen Spalt erniedrigt und mit einer reduzierten Signaltransduktion verknüpft.^[19, 20] Unbehandelt kommt es zur neuronalen Apoptose.

Die in Deutschland zugelassenen Arzneistoffe Donepezil, Galantamin und Rivastigmin nehmen vorrangig Einfluss auf die Acetylcholin-Esterase (ACh-E). Durch Inhibition der ACh-E erhöht sich die Konzentration an ACh im synaptischen Spalt wieder. Daraus resultiert eine verbesserte Signalübertragung, was zur kognitiven Leistungssteigerung führt. Alle drei Arzneistoffe haben eine Zulassung für eine leichte bis moderat-schwere AD. Nach Stand 2018 sind bei der Behandlung von leichter bis mittelgradiger AD mit fünf bis zehn Milligramm Donepezil laut der COCHRANE COLLABORATION nur marginale Verbesserungen in Hinblick auf Kognition, Lebensqualität und klinischen Zustand der Patienten zu erkennen.^[21] Nach S3-Leitlinie für Demenzen gibt es keine klinisch relevanten Unterschiede in der Wirksamkeit aller drei Arzneistoffe.^[4]

Glutaminerge Hypothese

Mit Memantin befindet sich ein weiterer Arzneistoff gegen AD auf dem deutschen Markt. Mit einer Zulassung für mittel- bis schwergradige AD nimmt er als nichtkompetitiver N-Methyl-D-Aspartat (NMDA)-Rezeptorantagonist Einfluss auf das glutaminerge System. Wie bei vielen Krankheitsbildern des Zentralnervensystems, so unter anderem bei Parkinson, Amyotropher Lateralsklerose und HIV-assoziierter Demenz, tritt auch bei AD eine Überstimulation von Glutamaterezeptoren auf.^[22] Eine normale NMDA-Rezeptor-Aktivität ist allerdings für die Induktion von Langzeitpotenzierungen und den damit verbundenen Prozessen des Lernens und Erinnerns wichtig.^[16] Mechanistisch zeichnet sich die Hyperaktivität durch einen vermehrten Calciumeinstrom in die Nervenzelle aus. Daraus resultieren eine Dauerdepolarisation im Zellinneren und eine Störung der Signaltransduktion. Diese Exzitotoxizität mündet schließlich in die Apoptose von Neuronen. Memantin normalisiert die exzitatorische Erregungsweiterleitung wieder, indem es nur an bereits geöffnete Kanalporen bindet (Offen-Kanal-Blocker). Somit werden nur vorab aktivierte NMDA-Rezeptoren blockiert und der pathologisch bedingten Überstimulation wird entgegengewirkt.^[23, 24]

A β_{1-42} -Ablagerungen stehen in Verdacht die glutaminerge Hyperaktivität zu provozieren.^[16, 25] Eine kontrollierte Beeinflussung der A β -Plaquetbildung könnte daher zielführender sein.

2.2 Amyloidhypothese

Die Amyloidablagerungen und die damit verbundenen Neuronenuntergänge stellen eine der zentralen Hypothesen in der AD-Pathogenese dar. Jene senilen Plaques resultieren mit hoher Wahrscheinlichkeit aus dem Ungleichgewicht zwischen Produktion und *Clearance* der A β -Peptide.^[10] Ihre physiologische Bedeutung ist nicht vollends geklärt. Vermutlich dienen sie der Regulierung von neuronalen und synaptischen Aktivitäten im Gehirn.^[13] Amyloidpeptide werden aus dem membranständigen Amyloid-Precursor-Protein (APP) gebildet. Über den Nicht-Amyloidweg bildet die α -Sekretase aus APP lösliches sAPP α -Peptid, dem eine wachstumsfördernde und neuroprotektive Funktion zugeschrieben wird. Bei dem mit AD-assoziierten Amyloidweg hingegen spaltet die β -Sekretase APP in ein lösliches, nichttoxisches sAPP β - und in ein membranverankertes C99-Peptid. Letzteres wird, durch Interaktion mit der γ -Sekretase, zu Peptiden mit einer Länge von 38 bis 42 Aminosäuren (AS) abgebaut. Dabei entstehen überwiegend A β ₁₋₄₀-Monomere, die eine hohe Affinität zu Blutgefäßen aufweisen und mit der Zerebralen Amyloidangiopathie (CAA) in Verbindung gebracht werden.^[26, 27] Die um zwei AS längeren A β ₁₋₄₂-Monomere werden in geringerem Maße gebildet und neigen, aufgrund ihrer höheren Lipophilie, stärker zur Aggregation.^[10, 27] Sie bilden in der Summe den Kern der A β -Ablagerungen und somit einen der charakteristischen Marker in den Gehirnen von AD-Patienten (Abbildung 2).

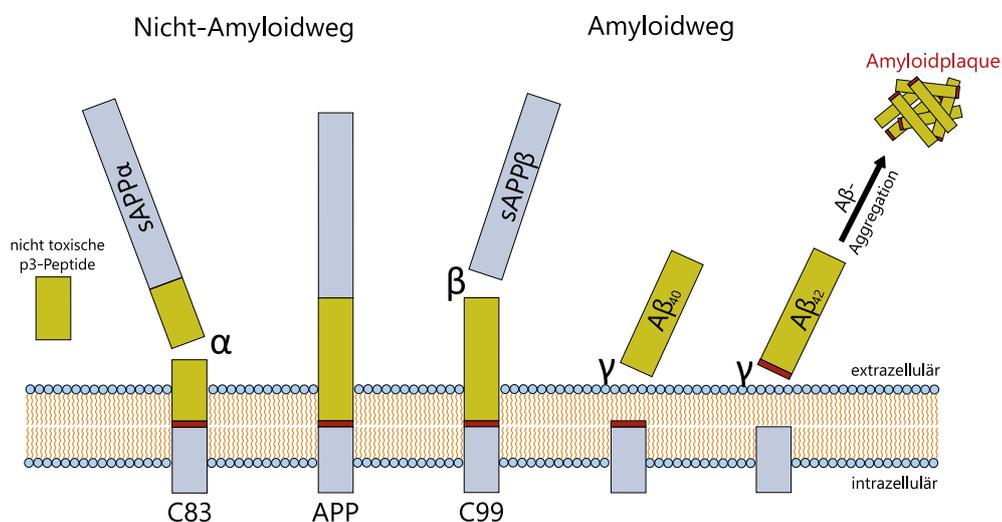


Abbildung 2: A β ₄₂-Bildung über den Amyloidweg aus APP.

Nicht-Amyloidweg (linke Seite): APP wird durch die α -Sekretase in sAPP α und C83 (α -CTF) gespalten. C83 wird durch Vermittlung der γ -Sekretase zu nichttoxischen Tripeptid-Einheiten abgebaut. Amyloidweg (rechte Seite): Die β -Sekretase spaltet APP in nichttoxische sAPP β -Peptide sowie membranverankerte C99-Produkte. C99 wird wiederum durch γ -Sekretase katalysiert zu Monomeren von A β ₁₋₄₀ und A β ₁₋₄₂ abgebaut. A β ₁₋₄₂ aggregieren schließlich zu A β -Plaques.

Zu Beginn der Plaquebildung lagern sich drei bis acht A β ₁₋₄₂-Monomere zu Oligomeren zusammen. Diese nehmen vorrangig eine β -Faltblattstruktur an, die zur leichteren Aggregation verhilft. Erreichen die Oligomere eine bestimmte Konzentration, vereinigen sie sich zu löslichen Protofibril-

len, die sich wiederum zu $A\beta_{1-42}$ -Aggregaten zusammenballen und als senile Plaques sichtbar werden.^[17] All diese Formen von $A\beta_{1-42}$ stehen miteinander in einem dynamischen Gleichgewicht.^[20] Mittlerweile geht man davon aus, dass weder die Monomere noch die senilen Plaques neurotoxisch wirken. Vielmehr vermutet man, dass vorrangig die oligomerisierte Form hoch toxisch auf Neuronen wirkt und zu deren Untergang führt. Dies konnte in unabhängigen Zellversuchsreihen und Tierversuchen gezeigt werden.^[28-32]

Genetische Aspekte und Sekretase-gerichtete Therapiemöglichkeiten

Wie eingangs erwähnt ist bei der autosomal dominant vererbten FAD die genetische Prädisposition entscheidend, bei der Mutationen der Chromosomen 1, 14 und 21 auftreten können. Auf dem 21. Chromosomenpaar befindet sich das APP-exprimierende Gen. Durch Duplikation des Gens oder durch dreifaches Auftreten des Chromosoms, wie beim Krankheitsbild der Trisomie 21, werden vermehrt APP und folglich $A\beta$ -Peptide gebildet.^[33] Daher entwickelt jeder Down Syndrom-Patient im Laufe seines Lebens eine AD.^[34] Weiterhin sind Genveränderungen auf den Chromosomen 1 und 14 möglich. Hier befinden sich die Genloci, aus denen die Proteine Presenilin 1 und 2 hervorgehen, welche die katalytischen Untereinheiten der γ -Sekretase bilden.^[33] Eine Überexpression führt zu gesteigerten Spiegeln der γ -Sekretase und zu damit verbundenen erhöhten $A\beta$ -Peptid-Konzentrationen. Somit stellt die γ -Sekretase ein interessantes zu hemmendes *Target* dar. Sie spaltet neben C99 noch eine Reihe weiterer Substrate, so unter anderem Notch 1.^[20] Der Notch-Signalweg ist essentiell für die Entwicklung von Nervengewebe. Daher ist die Inhibition der γ -Sekretase nur sinnvoll, wenn sie selektiv erfolgt und die Notch-Signalkaskade wenig beeinflusst. Mit Semagacestat (ELI LILLY) und Avagacestat (BRISTOL-MYERS) waren vielversprechende, hochselektive Inhibitoren in der *Pipeline*. Weder Semagacestat in Phase III (2013) noch Avagacestat in Phase II (2015) führten jedoch zu einer signifikanten Verbesserung der Kognition im Vergleich zur Placebokontrollgruppe.^[35, 36]

Ein weiterer Ansatz zur Reduktion von $A\beta_{1-42}$ beschäftigt sich mit der Inhibition des β -Sekretase-enzym (BACE 1). Viele potentielle Arzneistoffe kamen über die Phase I-Stufe nicht hinaus. Mit Lanabecestat (ASTRA ZENECA, ELI LILLY) und Verubecestat (MERCK SHARP & DOHME, MSD) rückten zwei BACE 1-Inhibitoren in den Fokus, die bei leicht- bis mittelgradiger AD eingesetzt werden sollten. Die jeweiligen Phase II-Studien wurden positiv bewertet, doch die primären Endpunkte der Phase III konnten in beiden Fällen nicht erreicht werden.^[37, 38] Somit wurden die Forschungsarbeiten 2018 eingestellt. Im gleichen Jahr erlangte eine amerikanisch-japanische Partnerschaft, zwischen BIOGEN und EISAI, mit ihrem BACE 1-Inhibitor Elenbecestat eine positive Bewertung in ihrer Phase II-Studie.^[39] Im September 2019 wurde die Phase III-Studie nach ungünstiger Risiko-Nutzen-Bewertung abgebrochen.^[40] Somit mündet die β -Sekretase-Forschung wahrscheinlich in eine Sackgasse.

Gestörte Clearance

Die $A\beta_{1-42}$ -Akkumulation korreliert auch mit einer gestörten *Clearance* im Gehirn. Die Klärung erfolgt größtenteils durch das Ausschleusen von Abbauprodukten über die Bluthirnschranke oder über das Glymphatische System.^[27] Bei dem von NEDERGAARD *et al.* entdeckten Glymphatischen System gelangt die Zerebrospinalflüssigkeit (CSF, Liquor) in den Arterien-assoziierten, perivaskulären Raum. Dieser wird durch die Endothelschicht der Blutgefäße sowie durch ein Geflecht aus Zellfortsätzen der Astrozyten gebildet. Durch die Vasokonstriktion der Arterien wird der Liquor wellenartig fortbewegt und Abfallstoffe abtransportiert. Die CSF wird über Aquaporin 4 in Astrocyten aufgenommen und anschließend in das Interstitium abgegeben. In diesem Zellzwischenraum findet ein partieller $A\beta_{1-42}$ -Peptid-Abbau durch Proteine, wie Neprilysin, Insulysin, Plasmin oder Angiotensin Converting Enzym, statt. Vorangig werden $A\beta_{1-42}$ -Peptide und andere Abfallstoffe aber über den Liquorstrom in den venös gerichteten, perivaskulären Raum transportiert und verlassen, über die Venen, das Gehirn (Abbildung 3).^[41] Final werden sie in Leber und Nieren metabolisiert.

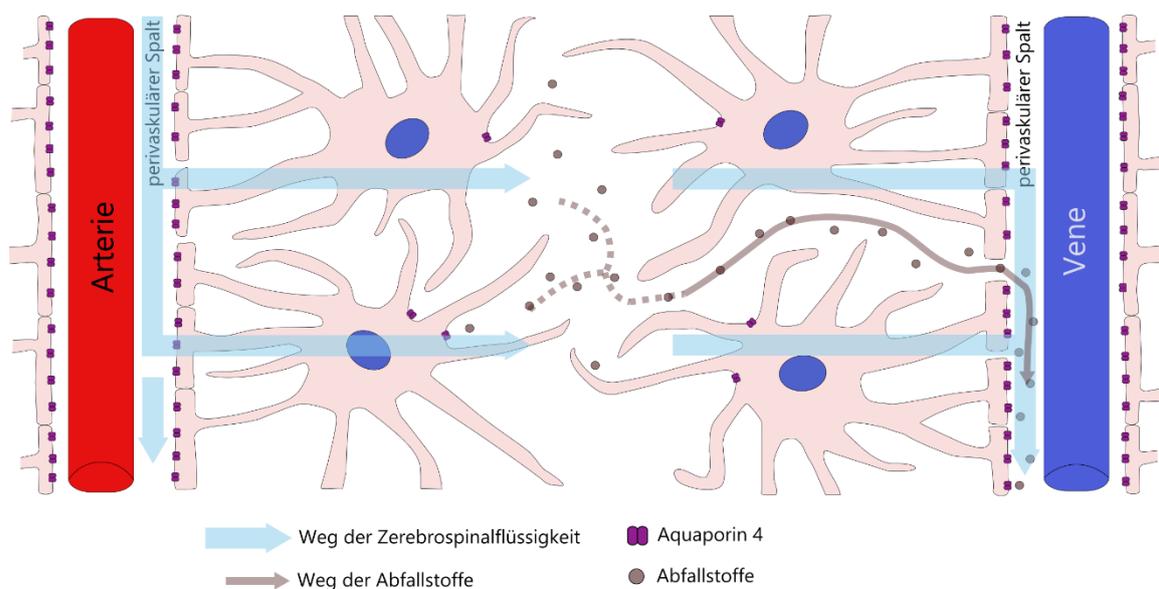


Abbildung 3: Glymphatisches System (nach Vorlage von NEDERGAARD *et al.*).

Ein kleiner Teil der CSF wird durch Kontraktion der Arterien wellenförmig in den Arterien-assoziierten, perivaskulären Raum geleitet und von dort aus Aquaporin 4-vermittelt von Astrocyten aufgenommen. Diese schleusen den Liquor in das Interstitium. Im Zellzwischenraum werden Abfallstoffe über den Liquorstrom in Richtung des perivaskulären Raumes der Venen abtransportiert. Die Abfallstoffe verlassen venös das Gehirn und werden in Leber und Nieren abgebaut.^[41]

In den Bereichen des Hippocampus und des Temporallappens konnte bei AD-Patienten eine verringerte Neprilysin-Aktivität festgestellt werden.^[27] Zudem wurde in Aquaporin 4-*Knockout*-Mäusen eine um 55 % verringerte *Clearance* von $A\beta$ -Peptiden nachgewiesen.^[41] Das in diesem Fall provozierte Aquaporin 4-Defizit könnte auch ursächlich für einen gestörten Abtransport von $A\beta_{1-42}$ bei AD-Patienten sein. Ein Hochregulieren der Aquaporin-4-Expression und die damit verbundene Beeinflussung des Glymphatischen Systems stellen daher neue Anreize für zukünftige Therapiestrategien dar.

Immuntherapie

Mit dem Einsatz passiver und aktiver Immunisierung sollte die AD-Therapie revolutioniert werden. Durch die Gabe von hirngängigen A β -Antikörpern oder A β -Epitopen sollte die A β ₁₋₄₂-Clearance stimuliert werden. Mit den A β -Antikörpern Bapineuzumab (PFIZER), Solanezumab (ELI LILLY), Crenezumab (ROCHE), Gantenerumab (ROCHE) und Aducanumab (BIOGEN) erhofften sich die Firmen Milliarden Gewinne. Die präklinischen Ergebnisse stimmten die Beteiligten erwartungsfroh, aber die der Phase III-Studien enttäuschten. Bapineuzumab und Solanezumab konnten zwar die β -Amyloid-Akkumulationen bei leichter bis mittelgradiger AD reduzieren, aber zu keinerlei Verbesserungen des kognitiven Status beitragen.^[42-44] Folglich zog sich PFIZER 2018 aus der Alzheimerforschung zurück.^[45] Bei ROCHE stellte man schon nach den Zwischenanalysen der Phase III-Studien mit Gantenerumab und Crenezumab fest, dass die gesetzten Endpunkte nicht erreicht werden können.^[46, 47] Dennoch plante das Unternehmen 2017 eine weitere Phase III-Studie zur Wirksamkeitstestung von Gantenerumab. Das Ergebnis dieser Studie soll erst 2022 folgen.^[46, 48] In der Phase III-Studie EMERGE unter Anwendung von Aducanumab konnten die primären und sekundären Endpunkte tatsächlich erreicht werden. Somit möchte BIOGEN als erstes Unternehmen 2020 die Zulassung für Aducanumab bei der FDA beantragen.^[49]

NOVARTIS setzt mit CAD-106 auf eine aktive Immunisierung. CAD-106 löst dabei als A β ₁₋₆-Epitop eine körpereigene Immunantwort aus. Die Phase II/III-Studie sollte erst 2024 Resultate liefern, allerdings stellte NOVARTIS schon im September 2019 die Forschungen ergebnislos ein.^[50, 51] Weitere A β -Impfstoffe befinden sich in der Phase I oder II.

Trotz der milliardenschweren Anstrengungen die Amyloidtherapie voranzutreiben, ist es bisher nicht gelungen, ein A β -gerichtetes Medikament auf den Markt zu bringen. Zwar konnte in zahlreichen präklinischen und klinischen Studien die A β -Last gesenkt, aber die damit korrelierenden kognitiven Einschränkungen nur marginal bis gar nicht verbessert werden. Ein Umdenken in der AD-Pathogenese, wie sie auch der Ulmer Neuroanatom BRAAK fordert, ist daher in Betracht zu ziehen.

2.3 Tauhypothese

BRAAK ist einer der vehementesten Verfechter der Tauhypothese, in der missgefaltete Tauproteine als Ursache von AD angesehen werden. Die fehlgefalteten und hyperphosphorylierten Tauproteine ballen sich aufgrund von dysbalancierten Aktivitäten der Proteinkinasen sowie Phosphatasen zu *Neurofibrillary Tangles* (NFTs) zusammen. Jene Aggregate treten bei vielen neurodegenerativen Erkrankungen auf, die allgemein auch als Tauopathien bekannt sind. Dennoch sind Dichte und Lokalisation der NFTs wichtige Parameter in der AD-Diagnostik.^[33] Ihre Ausbreitung korreliert, im Gegensatz zu der der A β -Plaques, mit der Schwere der Erkrankung und der Ausbildung von Symptomen.^[26, 33] Den Untergang von NFT-beladenen Neuronen beschreiben BOBINSKI und MORSCH als sehr langsamen Prozess.^[52, 53] MORSCH vermutet sogar, dass eine Nervenzelle mehrere Jahre bis

Jahrzehnte die NFT-Ablagerungen, trotz eingeschränkter Zellfunktion, tolerieren kann.^[52] Jener Fakt korreliert auch mit den Aussagen BRAAKS, dass die Entwicklung erster fibrillärer Ablagerungen schon in der Kinderheit beziehungsweise im frühen Erwachsenenleben beginnen kann, die maximale Symptomausprägung der AD aber erst in höherem Alter erreicht wird.^[54]

Tauprotein

Die physiologische Bedeutung des Tauproteins ist eng mit dem Mikrotubulusapparat verbunden. Daher stammt auch der Name *Tubulin associated unit*.^[55] Die Mikrotubuli sind als bewegliches System mitverantwortlich für Zellteilung, Zellmorphologie, intrazellulären sowie axonalen Vesikel- und Organellentransport, axonale Stabilität und Neuritenwachstum.^[56-58] Sie bestehen aus polymerisierten Heterodimeren von α - und β -Tubulin-Proteinen, die einen stetigen Auf- und Abbau erfahren. Diese dynamische Modulierung wird von Mikrotubulus-assoziierten Proteinen (MAP) gesteuert. Das Tauprotein bildet dabei mit 80 Prozent den größten Anteil der MAPs.^[59] Es wird vorrangig in Neuronen exprimiert und ist zellulär vor allem im Axonteil lokalisiert, kann aber auch in den dendritischen Ausstülpungen oder pathologisch im Soma vorhanden sein.^[57] Unter physiologischen Bedingungen sind mehr als 80 Prozent der Taupeptide am Mikrotubulus gebunden.^[60] In Gehirnen von AD-Patienten konnte, im Vergleich zur Nicht-AD-Kontrollgruppe, eine vier- bis achtfach höhere Konzentration an Tau nachgewiesen werden.^[61] Seine Überexpression korrelierte *in vitro* mit Vesikelaggregationen und Blockaden des axonalen Transports. Dieser Zusammenhang verdeutlicht, dass abnormale Taukonzentrationen einen enormen Einfluss auf die Physiologie der Nervenzelle haben.^[57]

Tau ist im nativen Zustand eines der längsten Proteine. Es liegt vorrangig ungefaltet vor und weist kaum Sekundärstrukturen auf.^[62, 63] Es enthält einen sehr hohen Anteil an Glycin (Gly, G), Prolin (Pro, P), Serin (Ser, S), Threonin (Thr, T) sowie Lysin (Lys, K) und ist durch lange, geladene Abschnitte charakterisiert.^[61, 64] Daher ist Tau ein gut lösliches Protein, das nur schwer aggregiert. Infolge posttranslationaler Modifikationen, wie Phosphorylierungen, Glykosylierungen, Acetylierungen und Verkürzungen des Proteins, kommt es zu Anpassungen in Konformation sowie Aktivität.^[64] Die Phosphorylierung von AS wird dabei als wichtigste Strukturveränderung angesehen. Im längsten Tausomer konnten bis zu 85 phosphorylierbare AS (53 % Serin, 41 % Threonin, 6 % Tyrosin) identifiziert werden.^[58] Für die optimale Tauaktivität scheinen zwei bis drei Mol gebundenes Phosphat je Mol Protein notwendig zu sein. Bei hyperphosphorylierten Tau hingegen wird acht bis neun Mol an gebundenem Phosphat beschrieben. Dadurch werden seine gut löslichen und Tubulus affinen Eigenschaften vermindert.^[61]

Tau wird durch ein einzelnes Gen codiert, das sich auf dem 17. Chromosomenpaar befindet.^[58] Durch alternatives Spleißen von Exon zwei, drei und zehn aus der prä-mRNA und nachgeschalteter Translation resultieren sechs Isoformen.^[58] In der embryonalen sowie fetalen Phase wird nur die kleinste Isoform exprimiert. Während dieses Entwicklungszeitraumes ist die Phosphorylierung von Tau stark stimuliert. Nach der Geburt nimmt die Phosphorylierungsrate deutlich ab, während sich

die Anzahl der Isoformen auf sechs erhöht.^[10, 65, 66] Charakterisiert sind die differenzierten Tauproteine, die Proteingewichte von 60 bis 74 Kilodalton ergeben, durch 352 bis 441 AS.^[56] Dabei bilden im N-terminalen Ende konzentriert auftretende, saure AS die „*Inserts*“-Regionen.^[10] Sie werden durch die Exons zwei und drei codiert und können während der m-RNA-Prozessierung herausgeschnitten werden.^[58] In Nachbarschaft zu den *Inserts* liegt die prolinreiche Region. Am C-terminalen Ende ist die stark konservierte Mikrotubulus bindende Domäne (MBD) lokalisiert, die durch drei bis vier sich wiederholende Regionen (R1 bis R4) gekennzeichnet ist.^[10] Diese repetitiven Elemente bestehen aus 31 bis 32 AS, die durch PGGP-Motive voneinander abgetrennt sind.^[56, 59] Das Entfernen von Exon zehn in der prä-mRNA führt zum Verlust der Wiederholungsregion R2 im Protein.^[10] Tauproteine mit vier Wiederholungsregionen (4R-Tau) binden deutlich stärker an die Mikrotubuli als jene mit drei repetitiven Segmenten (3R-Tau).^[65] In der MBD ist eine hohe Dichte an Serin, Threonin und Lysin erkennbar. Sie sind für die Bindungsaffinität an den Tubulindimeren essentiell. Lysin ist in der gesamten MBD-Region so reich vertreten, dass sie auch als basische Region bezeichnet werden kann.^[59, 67] Weiterhin sind Lysin- und Serinreste Teil des im MBD lokalisierten KXGS-Motivs, das sich im gleichen Abstand in jeder Wiederholungsregion wiederfinden lässt.^[59] Das KXGS-Muster wird als notwendig für eine stabile Tau-Tubulus-Wechselwirkung erachtet. Eine Phosphorylierung der KXGS-Motive führt zu einem erheblichen Affinitätsverlust des Tauproteins zum Mikrotubulusapparat.^[57, 58] Kommt es zu weiteren Phosphorylierungen der MBD-Domäne, diffundiert Tau vom Mikrotubulus ab. Auch die prolinreiche Region beeinflusst die Tau-Tubulin-Interaktion.^[58] Bei Phosphorylierungen von Serin- oder Threoninresten, auf die Prolin folgt - so zum Beispiel Thr231 - kann an dieser Stelle die Peptidyl-Prolyl-Isomerase Prolin isomerisieren und folglich eine Konformationsänderung im Tauprotein initiieren. Eine Bindungssteigerung von Tau zu den Tubulindimeren kann die Folge sein.^[68] Die N-terminalen *Inserts* sind für die Mikrotubulusbindung nicht von Relevanz.^[67] Vielmehr verhelfen sie dem nativen Tauprotein durch ihre hohe Zahl an sauren AS-Resten zur gestreckten Konstitution, die sich aus den Abstoßungskräften zu benachbarten, negativ geladenen Strukturen ergibt.^[56, 67] Ihre Bedeutung bei der Aggregationsneigung von hyperphosphoryliertem Tau scheint aber zweitrangig zu sein.

NFT-Bildung und Ausbreitung

Beim Erreichen einer bestimmten Grenzkonzentration an hyperphosphorylierten und von Mikrotubulus-abdiffundierten Tau-Monomeren wird in der Nervenzelle die NFT-Bildung initiiert.^[58] Anfangs erfahren diese Tauproteine eine Konformationsänderung und Neutralisierung der positiv geladenen MBD-Oberfläche. Somit verringern sich die Abstoßungskräfte innerhalb der MBD, was zur leichteren Zusammenlagerung der Tau-Monomere führt (Abbildung 4, Seite 11).^[61] Bei Annäherung einzelner Proteine lagern sie sich zu Dimeren zusammen und stabilisieren sich durch die Ausbildung von Disulfidbrücken und β -Faltblattstrukturen.^[62] Dabei begünstigen die zwei Hexapeptide ²⁷⁵VQIINK²⁸⁰ und ³⁰⁶VQIVYK³¹¹ die Konformationen der MBD-Abschnitte R2 sowie R3. Somit können leichter die Wasserstoffbrücken-assoziierten β -Faltblattstrukturen aufgebaut werden.^[69] Liegen vier

bis sieben Dimere konzentriert vor, aggregieren sie zu einem Nukleus, der durch weitere Dimeren-anlagerung in lösliche Oligomere übergeht.^[62] Diese Oligomere fügen sich zu Protofilamenten (*pretangles*) zusammen, die wiederum, energetisch bedingt, zu gepaarten Filamenten mit helikaler Struktur (*paired helical filaments*, PHFs) agglomerieren. Zahlreiche PHFs verdichten sich schließlich zu vollständigen NFTs. Bei zu stark geschädigter Zellstruktur, lassen sich apoptotisch bedingt extraneuronale NFTs erkennen. Sie werden auch *ghosts tangles* genannt.^[70] Die löslichen *Pretangles* sowie Oligomere, die in Tiermodellen zu kognitiven Einschränkungen führten, werden mittlerweile als hochtoxisch für das Neuron erachtet.^[17, 71-73]

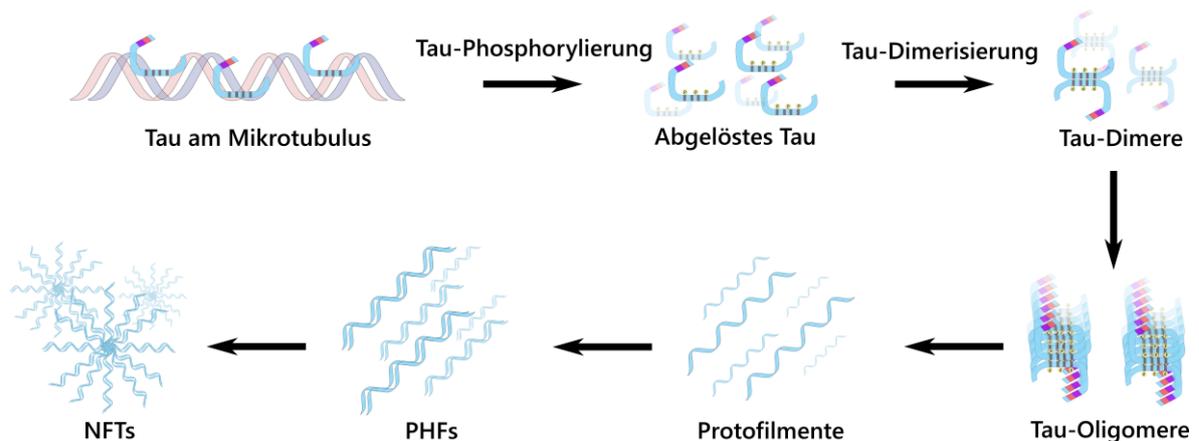


Abbildung 4: Graphische Darstellung der NFT-Bildung.

Durch die Phosphorylierung von Tau diffundiert es vom Mikrotubulus ab. In ihrem hyperphosphorylierten Zustand dimerisieren die Tau-Monomere, die sich wiederum zu löslichen Tau-Oligomeren zusammenlagern. Diese erweitern sich zu Protofilamenten, die sich paaren (PHF) und zu NFTs zusammenballen.

Diese *Pretangles* konnten laut BRAAK und DEL TREDICI als erstes im subkortikalen *Locus Caeruleus* – ein Areal im dorsalen Bereich des Hinterhirns - beobachtet werden. Sie stellen den Beginn der fibrillären Ausbreitung dar (subkortikales *pretangle*-Stadium).^[74] Die Fibrillenausdehnung weitet sich auf den transentorhinalen Kortex und den oberen Teil des Hippocampus aus. In diesem transentorhinalen Stadium (Braak I und II) sind die ersten NFTs erkennbar.^[75] Diese Phase repräsentiert wahrscheinlich die klinisch stille Periode einer AD. Im nachgeschalteten limbischen Stadium (Braak III und IV) sind NFTs vorrangig im entorhinalen Kortex, in der Amygdala und in weiteren Arealen des Hippocampus lokalisiert. Außerdem sind beginnende NFT-Ansammlungen in Isokortexbereichen zu erkennen. Während dieser Stufe zeigen sich die ersten klinischen Symptome einer AD.^[75] Im finalen Isokortex-Stadium (Braak V und VI) ist zusätzlich die gesamte Großhirnrinde betroffen und die AD-Symptomatik vollständig ausgeprägt.^[75] BRAAK vermutet, dass aggregiertes Tau von einer Zelle auf die andere übertragen werden kann.^[76] FROST *et al.* konnten *in vitro* ähnliche Erkenntnisse gewinnen, bei denen vorab aggregierte Tau-elemente von Zellenkulturen aufgenommen wurden und intrazellulär Tauaggregationen initiierten.^[77] Im Tiermodell konnten IBA und LEE diese Hypothese bekräftigen. Sie injizierten transgenen PS19-Mäusen, die noch keine Tauopathien ausgebildet hatten, vorsynthetisierte Tauaggregate und beobachteten die Bildung neuer NFTs sowie deren Ausbreitung, ausgehend von den Injektionsstellen, in weite Teile des Tiergehirns.^[78]

Beeinflussung der Tauaggregation und Therapieansätze

In NFTs sind neben normalen Tausoformen verkürzte Strukturen dieser Proteine identifiziert worden. Sie entstehen durch Enzyme, wie Caspase 6, Thrombin und Chymotrypsin. Verkürzte Tauproteine aggregieren *in vitro* deutlich schneller als die normallangen Formen, sodass diese Modifikation als mitbestimmend für die Filamentbildung erachtet wird.^[26, 57, 61, 64] Weiterhin konnten in Neurofibrillenablagerungen sulfatierte Glykosaminoglykane, wie Heparansulfat, nachgewiesen werden. Sie setzen die Abstoßungskräfte der Tau-Monomere herab und verstärken so ebenfalls deren Aggregation.^[79] Vergleichbare Beobachtungen lassen sich *in vitro* auch bei Polyanionen, wie RNA und DNA, sowie bei Arachidonsäure erkennen. Hingegen zeigen Methylenblau-Abkömmlinge, wie Leucomethylthioniniumbis(hydromethansulfonat) (LMTX®), in präklinischen Studien einen vermindernden Effekt auf die Tau-Tau-Interaktion. In der 2016 veröffentlichte Phase III-Studie TRX-005 konnten keine signifikanten Unterschiede in den primären Endpunkten festgestellt werden.^[80] Die anschließende Phase III-Studie TRX-015 legte 2018 allerdings offen, dass nach neun Monaten bei Patienten mit leichter AD ein signifikanter Rückgang der Hirnatrophie sowie der reduzierten Glukoseaufnahme im Temporallappen beobachtet werden konnte. Des Weiteren dokumentierte man signifikante kognitive (ADAS-cog) und funktionelle Verbesserungen (ADCS-ADL).^[81] Diese kontroversen Ergebnisse sollen mit der Studie LUCIDITY (2019) geklärt werden.^[82]

Trotz der enttäuschenden Bilanzen in der Anti-Amyloid-Immuntherapie erweiterte man das Feld der immunologischen Behandlung auf die toxischen Tauaggregate. In verschiedenen Tiermodellen konnte durch Immunisierung die Clearance toxischer Tauformen verbessert werden.^[83] AADvac-1, ein Tauepitop mit den AS-Resten 294 bis 305, wurde in der Phase I als sicher und verträglich eingestuft.^[83, 84] Eine weiterführende Phase II-Studie veröffentlichte 2019 allerdings, dass es keine signifikanten Unterschiede in den Tau-Serumspiegeln zwischen Kontroll- und Placebogruppe gab.^[85] Ebenso zeigte der monoklonale Antikörper BMS-986168 in seiner Phase II-Studie keine signifikante Wirksamkeit. Die Phase II-Studie zum Antikörper ABBV-8E12 lässt hingegen erste Ergebnisse im Jahr 2022 erwarten.^[83] Eine passive Immuntherapie wird mit dem Einsatz von intravenösem Immunglobulin (IVIg) angestrebt. In einer Phase II-Studie sollten bei Patienten mit leichter kognitiver Störung Veränderungen hinsichtlich des Lernvermögens und der Hirnatrophie sowie die Reduktion von Amyloid- und Taubelastungen erreicht werden. Leider waren die Ergebnisse nicht sehr überzeugend.^[86]

Eine elementare Strategie zur Beeinflussung der Tauaggregation ist es, der Hyperphosphorylierung entgegenzuwirken. Sie geht aus einer verstärkten Proteinkinase- und einer verminderten Phosphataseaktivität hervor. In den betroffenen Bereichen des AD-Gehirns konnten eine 20 bis 30 prozentige Beeinträchtigung der Aktivität der Phosphatasen PP1 und PP2A beobachtet werden, die über 90 % aller Serin- und Threoninreste im Tau dephosphorylieren.^[57, 87] PP2A gilt weiterhin als Aktivator bestimmter Proteinkinasen.^[61] Eine reduzierte Methylierung im aktiven Zentrum von PP2A führt *in vitro* zu einer Hyperphosphorylierung von Tau sowie zur Steigerung der Amyloidproduktion.^[88, 89] Analoge Erfahrungen wurden im Tiermodell unter Einsatz des PP2A-Inhibitors

Okadainsäure gemacht.^[61] Eine Stimulierung der PP2A-Aktivität wäre daher ein sinnvoller Therapieansatz. Natriumselenit wurde als PP2A-Agonist in der Phase II als verträglich und sicher erachtet.^[90] Dennoch bleibt es abzuwarten, ob es potent wirksam gegen AD ist. Ein weitaus größerer Fokus im Bereich Tau basierter Therapien liegt allerdings in der Entwicklung AD relevanter Proteinkinase-Inhibitoren (siehe 2.4 Proteinkinasen).

2.4 Proteinkinasen

Proteinkinasen gehören neben den Lipid-, Nukleotid-, metabolischen und Guanidokinasen zur übergeordneten Familie der Phosphotransferasen – auch allgemein als Kinasen bekannt.^[91] Im menschlichen Genom wurden 518 mutmaßliche Proteinkinasegene identifiziert, die 1,7 Prozent aller Gene ausmachen. Somit stellt die Proteinkinasefamilie die größte Gruppe aller im humanen Genom verankerten Proteine dar.^[92] Proteinkinasen werden in Abhängigkeit von ihrer Substratspezifität in fünf verschiedene Gruppen untergliedert. Dabei können Proteinkinasen mit alkoholischen (Serin- und Threoninkinasen), mit phenolischen (Tyrosinkinasen) sowie mit basischen Akzeptorgruppen interagieren oder auch Sulfhydryl- (Cysteinkinasen) und Acylgruppen (Aspartyl- und Glutamylokinasen) im Substrat derivatisieren.^[91]

Proteinkinasen übertragen den γ -Phosphorylrest vom Phosphatdonator auf einen nukleophilen Aminosäurerest im Zielprotein. Als phosphatgebendes Molekül hat sich evolutionär Adenosin-5'-triphosphat (ATP), seltener Guanidin-5'-triphosphat (GTP), herausgebildet. Zur Phosphorylierung müssen sowohl ATP als auch das Zielsubstrat in der katalytischen Bindetasche des Proteins binden. Diese ist in allen Kinasen hochkonserviert und wird durch 250 bis 300 AS gebildet. Sie besteht aus einer einzelnen Polypeptidkette, die in eine N- sowie C-terminale Domäne untergliedert ist.^[58, 91, 93] Die N-terminale Einheit weist fünf antiparallele β -Faltblattstrukturen auf, während das C-terminale Element vorwiegend durch α -Helix-förmige Sekundärstrukturen geprägt ist.^[94, 95] Beide Domänen sind über die Scharnierregion (*hinge region*) miteinander verbunden (Abbildung 5, Seite 14). Sie interagiert mit dem Adeningrundkörper des ATP-Moleküls über mindestens zwei Wasserstoffbrücken (H-Brücken). Die Ausbildung einer dritten schwächeren H-Brücke wird ebenfalls diskutiert. Sie könnte sich zwischen dem CH-aciden Wasserstoffatom an Position zwei des Adeningrundkörpers und einer in der *Hinge*-Schleife befindlichen Carbonylgruppe bilden.^[91, 96] Die ATP-Bindetasche ist weiterhin durch zwei polare, hochkonservierte Regionen charakterisiert. Zum einen die zuckerbindende Region, die durch polare AS mit der Ribosegruppe des ATPs interagiert. Zum anderen die in Nachbarschaft befindliche phosphatbindende Einheit.^[91] Sie besteht aus einer konformationell sehr flexiblen, glycinreichen Schleife und einer α -Helix. Polare Gruppen jener Sekundärstruktur sind mitverantwortlich für die Koordination eines der beiden Magnesiumionen und damit für die korrekte Orientierung der γ -Phosphatgruppe des ATPs zur Substratbindetasche. Von weiterer Relevanz für die exakte Ausrichtung der ATP-Phosphatgruppen ist das DFG-Motiv. Dieses sehr flexible Element zeichnet sich durch eine hochkonservierte Abfolge der AS Asparaginsäure (Asp, D),

Phenylalanin (Phe, F) und Glycin (Gly, G) aus. Asp aus der DFG-Schleife koordiniert ebenfalls über das Magnesium an die Phosphatgruppen des ATPs.^[91, 95] Die Adeninbinderegion wird von zwei hydrophoben Taschen flankiert. Beide Regionen werden durch ATP nicht besetzt und sind durch höhere Sequenzdiversität geprägt. Daher sind vorrangig jene Strukturen Angriffspunkte, um das Selektivitätsprofil von Kinaseinhibitoren zu beeinflussen. Die hintere hydrophobe Tasche wird durch das DFG-Motiv und eine vorgelagerte AS, auch Türsteherrest (*gatekeeper residue*) genannt, begrenzt. Bei *Gatekeeper*-AS mit sperrigen Resten, wie Phenylalanin, Leucin oder Methionin, ist jene hydrophobe Tasche abgeschottet und für Kinaseinhibitoren nicht zugänglich. Anders verhält es sich bei weniger raumgreifenden AS, wie Threonin.^[91, 94, 95] Die vordere hydrophobe Tasche ist zur Proteinoberfläche hin gerichtete und stellt die Lösungsmittel exponierte Region dar.

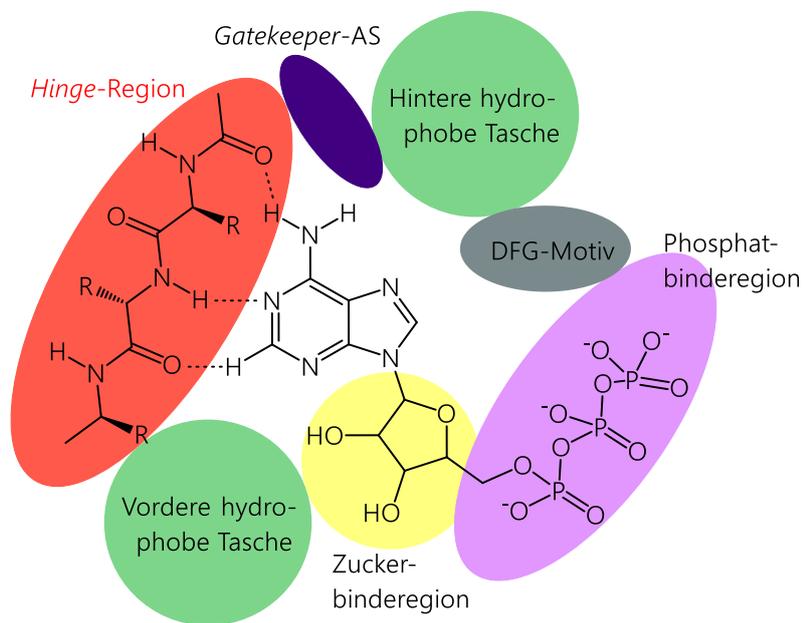


Abbildung 5: Schematischer Aufbau der ATP-Bindetasche.

Zu erkennen ist die Wechselwirkung von ATP mit der *Hinge*-Region (rot) über mindestens zwei H-Brücken. Diese Region wird flankiert von zwei hydrophoben Taschen (grün), wobei die hintere durch die *Gatekeeper*-AS (dunkelblau) und dem DFG-Motiv (grau) räumlich abgegrenzt ist. Des Weiteren sind die Interaktionsdomänen der Zucker- und Phosphatgruppe erkennbar (gelb und violett).^[91, 95]

Proteinkinasen können durch posttranslationale Modifikationen reguliert werden. So können sie durch Fremd- sowie Eigenphosphorylierung oder durch Komplexierung mit weiteren Proteinen in aktive oder inaktive Zustände überführt werden.^[58] Diese Zustandsänderungen gehen mit Konformationsumlagerungen sowie differenzierten elektrostatischen Eigenschaften einher.^[95] Derartige Modifizierungen haben wiederum Einfluss auf die Aktivität weiterer Kinasen und ziehen die Regulation ganzer Signalkaskaden nach sich. Auf diesem Wege werden zelluläre Prozesse, einschließlich Metabolismus, Transkription, Zellteilung und –differenzierung sowie Apoptose, dirigiert.^[92] Treten pathologisch bedingte Unregelmäßigkeiten, im Hinblick auf mutagene Sequenzveränderung oder erhöhter Kinaseaktivität, auf, können zahlreiche Krankheitsbilder, wie Krebs, Diabetes, entzündliche und neurodegenerative Erkrankungen, die Folge sein.^[92]

2.4.1 AD-relevante Proteinkinasen

Schon frühzeitig wurden Proteinkinasen mit der bei AD auftretenden Hyperphosphorylierung von Tau-Proteinen und der damit verbundenen NFT-Bildung in Zusammenhang gebracht. Histopathologisches Hirnmaterial von an AD Verstorbenen offenbarte die Kollokalisierung dieser intraneuronalen AD-Markern mit Proteinkinasen. Weitere wissenschaftliche Arbeiten vertieften die Hypothese, dass Überexpression und Hyperaktivität bestimmter Proteinkinasen mit der NFT-Ausbreitung und dem Fortschreiten der AD-Symptomatik korrelieren könnten.^[75, 76, 97-100]

AD-relevante Proteinkinasen phosphorylieren zwischen 17 und 40 Tau-Aminosäurereste. Als kritische und fibrillenfördernde Phosphorylierungen werden die der AS Ser198, 199, 202, 208, 214, 262, 356, 396, 404, 416 und 422 sowie Thr205, 212 und 231 angesehen.^[61, 101-103] Gewisse Phosphorylierungsstellen können weitere Phosphorylierungen verstärken. So scheint insbesondere die Tauphosphorylierung an Ser262 den meisten Tauphosphorylierungsereignissen vorgelagert zu sein.^[104] Weiterhin können unterschiedliche Kinasen die gleiche AS-Position auf Tau forcieren beziehungsweise ein Enzym mehrere AS phosphorylieren. Mittlerweile ist bekannt, dass Kinasen innerhalb einzelner Krankheitsstadien unterschiedlich starke Aktivitäten aufweisen.

AD-relevante Proteinkinasen sind vorrangig in den Kinasefamilien der Serin-Threonin-Kinasen und der Nichtrezeptor-Tyrosinkinasen vertreten. In ersterer Gruppe werden Prolin-gerichtete und Nicht-Prolin-dirigierende Kinasen differenziert betrachtet. Die Prolin-gerichteten Kinasen phosphorylieren Proteine, in denen die Serin- und Threoninreste von Prolin flankiert sind (PXXP-Motiv). Zu dieser Unterklasse gehören die Cyclin-abhängigen Kinasen (*Cycline dependent kinases*, **CDK**), die Glykogen Synthase Kinase 3 (**GSK3**) sowie die Mitogen-aktivierten Proteinkinasen (*mitogen-activated protein kinases*, **MAPK**).^[58] Zu den wichtigsten Nicht-Prolin-gerichteten Vertretern zählen die Casein-Kinasen (CK) und Proteinkinase A (PKA), die innerhalb dieser Arbeit keine Berücksichtigung finden sollen.^[58] Bei den Nichtrezeptor-Tyrosinkinasen sind die Fyn-Kinase sowie die c-Abl-Kinase zu nennen, wobei nur die Erstgenannte näher beschrieben wird.^[60]

Im Folgenden werden ausschließlich die Proteinkinasefamilien näher vorgestellt, die im Rahmen der biologischen Testung von Relevanz waren.

2.4.1.1 Cyclin-abhängige Kinasen - CDK

Als Cyclin-abhängige Kinasen (CDKs) wird eine Familie von 20 Phosphotransferasen bezeichnet, die aus 250 bis 1500 AS aufgebaut sind. Deren Aktivitäten hängen von regulatorischen Untereinheiten, den Cyclinen (Cyc), ab. Sie können aber auch durch zusätzliche Phosphorylierungen verändert werden. Die Cyclinfamilie setzt sich aus ungefähr 30 Proteine zusammen, die über ihre α -Helix-förmigen Cyclinboxen mit den N-terminalen Strukturen der CDKs wechselwirken. Erst diese Interaktion führt zur Freilegung der katalytischen Domäne und damit zur Aktivierung der CDKs. In der Folge werden vorrangig Funktionen des Zellzyklus (CDK1 bis 6 und 14 bis 18) oder der Transkription (CDK7 bis 13 sowie 19, 20) beeinflusst. Unkontrollierte Zellproliferation und entartete Gewebe werden mit einer Hyperaktivität und Überexpression von CDKs assoziiert. Somit sind sie primäre Zielstrukturen in der Krebstherapie. In der Vergangenheit ging man davon aus, dass CDKs ausschließlich in sich noch teilenden Zellen vorzufinden sind und in G_0 -arretierten Zellen, wie Neuronen, keinerlei Bedeutung haben.^[105, 106]

Mit der Entdeckung der neuronal lokalisierten CDK5 durch HELLMICH *et al.* rückte man von diesem Paradigma ab. Diese Kinase wird in hohem Maße im Gehirn exprimiert.^[61] Ihre Sequenzhomologie bezüglich CDK1 und CDK2 liegt bei 58 sowie 61 Prozent.^[107] Die CDK5 wird durch Interaktion mit den Regulationsproteinen p35 und p39 aktiviert. Deren Abbau durch Calcium-abhängige Calpaine führt zur Bildung von p25 und p29.^[61] Diese proteolytischen Metabolite interagieren deutlich stärker mit CDK5 und fördern somit die Enzymaktivität. Des Weiteren wird die Aktivität von CDK5 durch die Phosphorylierung in Stellung Tyr15 verstärkt sowie an den Positionen Thr14 und Ser159 inhibiert.^[58]

CDK5 ist in zahlreiche Funktionen des Nervensystems involviert, einschließlich in dem Neuritenwachstum, der Neuronenmigration und der Steuerung von Transportvorgängen.^[108] BAUMANN und MANDELKOW beschrieben 1993 erstmals die abnormale Phosphorylierung von Tau durch aus Schweinehirn isoliertes CDK5-Konzentrat in einem Tau-Antikörper-Enzym-Assay.^[107] Die Überexpression des CDK5/p25-Komplex führte im Tiermodell zur vermehrten Phosphorylierung von Tau, was mit NFT-Bildung und Neurodegeneration einherging.^[109, 110] In Hirngewebeproben von AD-Patienten sowie in Zellstudien konnten erhöhte CDK5/p25-Aktivitäten in unmittelbarer Nähe zu NFTs erfasst werden.^[111, 112] Außerdem führte ein Stilllegen des CDK5-Gens im AD-Mausmodell zur Reduzierung von NFTs und zur kognitiven Verbesserung der Tiere.^[113] CDK5 kann vermutlich bis zu 11 AD-relevante Stellen im Tauprotein phosphorylieren, so mitunter die Positionen Ser202, 208, 396/404 und Thr205, 181, 231.^[58, 109, 112]

Zudem scheint eine vermehrte A β -Exposition die signifikante Erhöhung der CDK5-Aktivität zu vermitteln. CDK5 könnte dabei zur verstärkten Aktivierung von CDK4/CycD1 führen und so den neuronalen Zelltod einleiten.^[114, 115]

Neben CDK5 beobachtete man mit dem Einsetzen der Neurodegeneration eine vermehrte Expression von CDK1, CDK2, CDK4 sowie von Cyclin B1, Cyclin D und Cyclin E.^[108, 114, 116, 117] Jene

Proteine spielen eine wesentliche Rolle im Zellzyklus und beim neuronalen Zelltod.^[108] Daher vermutete man, dass die AD-assoziierte Neurodegeneration mit einer gestörten Zellzyklusreaktivierung von G₀ arretierten Neuronen einhergeht.^[116, 118] Folglich wären nach dem durch CDK4-vermittelten Wiedereintritt der Neuronen in den Zellzyklus DNA-Replikationen sowie mitotische Prozesse zu erwarten. In der Tat beobachtete man in einigen neuronalen Zellen einen pathologisch bedingten, te-traploiden Chromosomensatz, allerdings keine weitere Zellteilung.^[119] Somit geht man mittlerweile davon aus, dass eine Dysregulation von Zellzyklus bezogenen Proteinen in allen Stadien der AD dem neuronalen Tod voraus geht.^[120, 121]

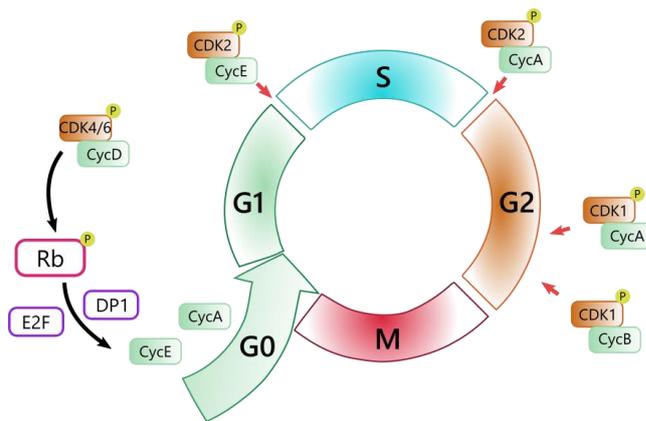


Abbildung 6: Wiedereintritt in den Zellzyklus. Der Wiedereintritt der Zelle in die G₁-Phase des Zellzyklus beginnt mit der Aktivierung von Cyclin D-assoziierten CDK4 und CDK6. Diese Komplexe inaktivieren das Retinoblastom-Protein (pRb) durch Phosphorylierung, sodass die Transkriptionsfaktoren E2F und DP1 aktiviert bleiben. Die folglich translatierten Cycline A und E komplexieren mit CDK2 und fördern das Durchschreiten der S-Phase, in der die DNA repliziert wird. Der Übergang von der sich anschließenden G₂-Phase in die M-Phase ist CDK1/B gesteuert. In der M-Phase findet die Zellteilung statt.^[106]

Weiterhin scheint die Hyperphosphorylierung von Tau zu Mikrotubuli-assoziierten Zellzyklusveränderungen zu führen, die für die Neuroplastizität und den Lernprozess von enormer Bedeutung sind.^[118] Dabei rücken vor allem die Zellzyklus-regulierenden Proteine CDK1 und CDK2 in den Fokus (Abbildung 6). Während CDK1 mit Cyclin B1 (CDK1/CycB1) ein Heterodimer bildet, wird CDK2 durch Cyclin A oder E aktiviert (CDK2/CycA, CDK2/CycE).^[122-124] Erstere Kinase wird durch zusätzliche Phosphorylierung an Position Thr161 stimuliert und durch Dephosphorylierung an den AS-Resten Tyr15 und Thr14 inaktiviert.^[122]

tiviert.^[122]

Unter pathologischen Gesichtspunkten beschrieben VINCENT *et al.* als erstes die abnormale Akkumulation von CDK1 in NFT tragenden Neuronen.^[117] *In vitro*-Experimente bestätigten, dass das Tauprotein von CDK1 und CDK2 phosphoryliert werden kann. Die Phosphorylierung erfolgt dabei in den Positionen Ser199, 202, 235, 262 und 396, 404 sowie Thr153, 181, 205, 212 und 231.^[122, 125] LEE *et al.* stellten 2017 einen CDK2-vermittelten Zusammenhang zwischen A β -assoziierter Neurotoxizität und der Tauphosphorylierung her. Dabei soll es zu einem A β -induzierten Calciumeinstrom ins Neuron kommen. Dies führt zu einer Aktivierung des PI3K-AKT-mTOR-Signalweges (Abbildung 7, Seite 18). Das in AD ebenfalls hyperaktive mTOR-Protein hemmt die Autophagie und fördert die CDK2-bedingte Tauphosphorylierung. Mit zunehmender Tauphosphorylierung destabilisiert sich die Mikrotubulusfunktion, was laut LEE in neuronaler Apoptose gipfelt. Ein Stummschalten des CDK2-exprimierenden Gens sowie die Inhibition von mTORC1 durch Rapamycin führte zu einer verminderten Phosphorylierung von Tau und senkte so den Verlust neuronaler Zellen.^[114]

Somit wird deutlich, welche enorme Relevanz Zellzyklus regulierende Proteine auf die Ausbildung einer Tauopathie und der damit verbundenen AD-Symptomatik haben. Innerhalb dieser Arbeit wurden die synthetisierten Verbindungen gegen die CDK-Komplexe CDK1/CycB1 und CDK2/E getestet.

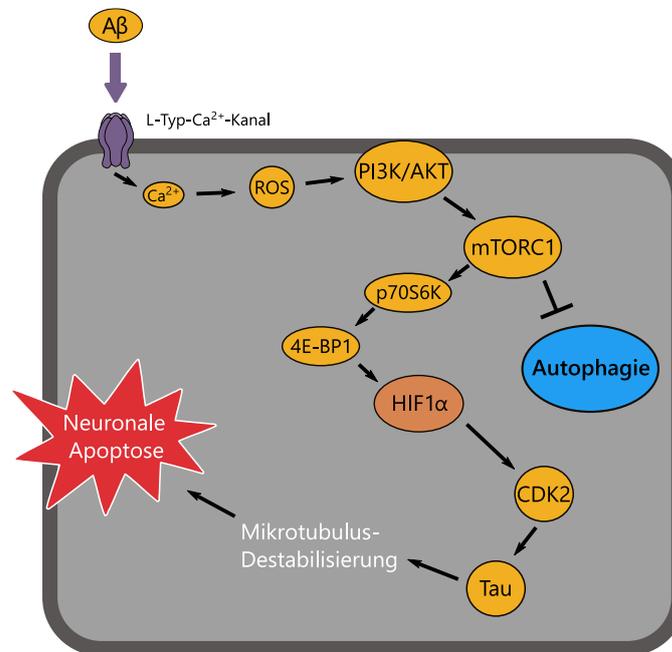


Abbildung 7: Darstellung des PI3K-AKT-mTOR-Signalweges.

Lösliche A β -Oligomere sind in der Lage mit L-Typ-Calciumkanälen zu interagieren. Dadurch kommt es zum vermehrten Calciumionen-Einstrom, der die Bildung von ROS erleichtern soll. ROS aktiviert den PI3K/AKT-Signalweg, wodurch mTORC1 phosphoryliert wird. Das mTORC1 kann nunmehr die Autophagie hemmen und über p70S6K und 4E-BP1 das Protein HIF1 α aktivieren. Die Stimulierung von HIF1 α induziert die vermehrte Bildung von CDK2 und CDK4. Die erhöhte Expression von Zellzyklus-Regulationsproteinen ist für neuronale Zellen toxisch, die durch Inhibierung der Autophagozytose nicht abgebaut werden. Die Folge ist eine Hyperphosphorylierung von Tau, mit anschließender Mikrotubulus-Destabilisierung und neuronaler, Caspase 3-induzierter Apoptose.

4E-BP1 = Eukaryotisches Translations-Initiationsfaktor-4E-bindendes Protein 1 (*Eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein 1*), AKT = Proteinkinase B, mTORC1 = Säugetierziel-von-Rapamycin-Komplex 1 (*mammalian target of rapamycin complex 1*), HIF α = Hypoxie-induzierbarer Faktor 1-alpha (*Hypoxia-inducible factor 1-alpha*), PI3K = Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat 3-kinase, ROS = reaktive Sauerstoffspezies, p70S6K = Ribosomale Protein-S6-Kinase Beta-1 (*Ribosomal protein S6 kinase beta-1*, auch genannt S6K1); (adaptiert nach LEE et al.).^[14]

2.4.1.2 Glykogensynthase-Kinase 3 – GSK 3

Die Glykogensynthase-Kinase 3 (GSK3) ist wohl die bekannteste aller Tauproteinkinasen. Sie wurde erstmals 1980 als eine den Glykogenstoffwechsel beeinflussende Serin/Threoninkinase beschrieben.^[58, 126, 127] Mittlerweile reicht ihre Bedeutung als multifunktionelle Proteinkinase aber bei weitem darüber hinaus. So ist ihre Relevanz in den Insulin/PI3K/Akt-, Wnt/ β -Catenin-, NF κ B-Signalwegen wissenschaftlich anerkannt.^[58] Sie ist mitverantwortlich für eine Reihe zellulärer Aufgaben, wie Zellproliferation, -differenzierung und -apoptose. Des Weiteren beeinflusst sie neuronale, embryonale sowie immunologische Funktionen. Dysregulationen der GSK3 sind mit kardialen, tumorösen, diabetogenen und neurodegenerativen Krankheitsbildern assoziiert.^[58, 126, 128]

Für die GSK3 sind die beiden Isoformen GSK3 α und GSK3 β beschrieben, die auf den Chromosomen 19 beziehungsweise drei kodiert sind.^[126] Sie weisen eine Gesamthomologie von 85 Prozent auf. Im katalytischen Zentrum sind sogar 98 Prozent aller AS gleich.^[106, 126] Die GSK3 α ist mit 51 Kilodalton die um 63 AS-Resten längere Isoform.^[128-130] Sie wird vorrangig in Lunge, Nieren und Gonaden exprimiert.^[106] Die vier Kilodalton leichtere GSK3 β ist hauptsächlich im Gehirn, Lunge und Niere lokalisiert.^[106] Durch alternatives Spleißen des Exons 8a resultiert eine um 13 AS längere Isoform der GSK3 β .^[58] Diese gehirnspezifische GSK3 β 2 macht nur 15 Prozent der gesamten GSK3 β -Menge aus. Im Vergleich zur GSK3 β phosphoryliert sie Tau mit deutlich geringerer Effizienz, was vermutlich mit der stärker ausgeprägten sterischen Hinderung einhergeht.^[58, 131]

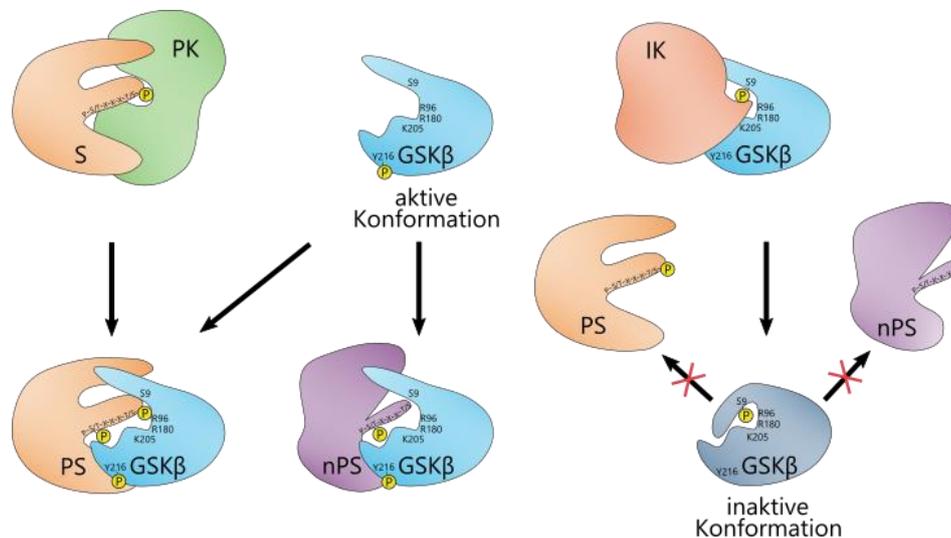


Abbildung 8: Regulierung der GSK3 β -Aktivität.

Die aktive Konformation der GSK3 β kann sowohl durch Kinasen (*Priming Kinase*, PK) vorphosphorylierte Substrate (PS) als auch nicht-vorab-phosphorylierte Substrate (nPS) derivatisieren. Diese aktive Form kann durch die Phosphorylierung von Tyr216 (Y216) stabilisiert werden. Eine inaktivierende Kinase (IK) phosphoryliert die GSK3 β an Ser9 (S9). Infolgedessen greift der Ser9-Phosphatrest als Pseudo-Substrat die Substratbindedomäne selbst an. Damit wird die katalytische Domäne durch die Neuausrichtung des N-terminalen Schwanzes sterisch behindert und die Phosphorylierung jeglicher Substrate unterbunden.^[128, 132]

Die GSK3-Aktivität ist in ruhenden Zellen im Allgemeinen hoch und wird durch extrazelluläre Einflüsse, wie Wachstumsfaktoren, Zytokine und Hormone Signalkaskaden-vermittelt reguliert.^[126] Phosphorylierungen an den N-terminal gelegenen Positionen Ser21 bei GSK3 α sowie Ser9 bei GSK3 β führen zur Desaktivierung der GSK-Enzyme (Abbildung 8, Seite 19). Dieser phosphorylierte Serinschwanz assoziiert mit der Bindungstasche der Kinase und führt zu einer konformationellen Blockade des katalytischen Zentrums. In der Folge werden GSK3-Substratphosphorylierungen unterbunden.^[133] Die Phosphorylierung von Tyr279 (GSK3 α) und Tyr216 (GSK3 β) erhöht die Stabilität der aktiven Konformation der GSK3.^[58, 126] Kinasen, die die GSK3 derivatisieren, sind unter anderem die Proteinkinasen A, B, C oder die Ribosomalen S6 Kinasen, wie p70S6K beziehungsweise p90S6K. Die Letztgenannten werden als Reaktion auf MAPK-Vorgänge aktiviert.^[58]

Die GSK3 bevorzugt vorrangig Zielstrukturen, die schon vorab durch andere Kinasen derivatisiert wurden. Dieses Substratpriming ist nicht unbedingt erforderlich, jedoch erhöht es die Phosphorylierungseffizienz um das bis zu 1000-fache.^[58, 128] Die Vorphosphorylierung erleichtert es der GSK3, ihre β -Strang- und α -Helixdomänen in eine katalytisch aktive Konformation zu bringen. Das von GSK3-adressierte Ser beziehungsweise Thr befindet sich vier AS von der vorab phosphorylierten Ser(Thr)-Position entfernt in Richtung des N-Terminus. Beide Ser(Thr)-Motive umschließen drei weitere AS-Reste und bilden in der Gesamtheit die Ser(Thr)XXXSer(Thr)-Phosphorylierungssequenz.^[58, 128-130] Tau kann von den GSK3-Isoenzymen an 42 AS-Resten phosphoryliert werden, von denen 29 AD-Relevanz aufweisen.^[58] Markante Phosphorylierungsstellen sind dabei Ser126, 202, 208, 214, 396, 404 und 413 sowie Thr205, 212 und 231.^[130, 134]

Bei AD wurde eine Hyperaktivität und Überexpression von GSK3 β beschrieben.^[135] Ihre gesteigerte Ansammlung in Hirnarealen von AD-Patienten korreliert mit der Ausprägung der NFTs.^[134, 136-138] Weiterhin scheint GSK3 β sogar noch vor Bildung von *Pretangle*-Tau in Neuronen hochreguliert vorzuliegen.^[134, 139] Im Nagermodell führte eine GSK3 β -vermittelte Hyperphosphorylierung von Tau zum Leistungsabfall der räumlichen Orientierungsfähigkeit. Die Unterdrückung von überexprimierter GSK3 β verbesserte hingegen das räumliche Gedächtnisdefizit und verringerte die Tauhyperphosphorylierung sowie den neuronalen Tod.^[140] In weiteren Tierexperimenten korrelierte eine GSK3 β -Hyperaktivität mit Neurodegenerationen im Hippocampus, kognitiven Störungen, einer Erhöhung neuronaler Entzündungsmarker sowie mit reduzierter ACh-Synthese.^[58] In den von TERWEL *et al.* durchgeführten *in vivo*-Studien zeigten transgene Nager, die Tau sowie GSK3 β überexprimierten, Störungen in der Objekterkennung und im passiven Vermeidungslernen, noch bevor Ablagerungen von Tauaggregaten erkennbar waren. Das deutet darauf hin, dass allein schon eine erhöhte GSK3 β -Aktivität synaptische Defizite verursacht und zu kognitiver Beeinträchtigung führen könnte.^[141]

Mittlerweile geht man davon aus, dass die GSK3 β eine entscheidene Rolle in der synaptischen Plastizität spielt. Die synaptische Plastizität ist für den Lern- sowie Gedächtnisprozess von elementarer Bedeutung.^[142] Sie ist charakterisiert durch ein sensibles Zusammenwirken von langandauernder Verstärkung (LTP, *long term potential*) und Abschwächung (LTD, *long term depression*) der

synaptischen Erregungsübertragung. Diese werden NMDA- und AMPA-Rezeptor-abhängig beeinflusst (AMPA = α -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionsäure). Ein LTP führt im Neuron zur inhibitorischen Serinphosphorylierung von GSK3 β , eine LTD hingegen, zu einer PP-1-vermittelten Aktivierung der Kinase.^[143, 144] HOOPER *et al.* zeigten, dass eine Überexpression der GSK3 β im Mausmodell die Ausbildung der LTPs beeinträchtigte. Die Nager wiesen dadurch verstärkt Kognitionsstörungen auf.^[143] REAGAN *et al.* vermuten, dass die Aktivierung von GSK3 β eine Endozytose der exzitatorischen AMPA-Rezeptoren induziert, wodurch die LTD verstärkt wird (Abbildung 9). Dabei kommt es durch einen NMDA-Rezeptor-abhängigen Calciumeinstrom zur Aktivierung der GSK3 β . Die GSK3 β phosphoryliert Tau an Ser396, was die Endozytose der AMPA-Rezeptoren initiiert und mit einer verstärkten Ausbildung von LTDs einhergeht.^[145, 146] In welchem Ausmaß die GSK3 β -assoziierte Tauphosphorylierung die synaptische Plastizität beeinflusst, ist noch nicht vollständig geklärt.^[145]

Die GSK3 β ist wahrscheinlich Bindeglied zwischen der A β - und der Taupathologie. So induzierte, ein chronisches Verabreichen von A β -Oligomeren in *in vitro*- und *in vivo*-Studien eine GSK3 β -Hyperaktivität. Zeitgleich stieg auch die Konzentration an phosphoryliertem Tau, an Apoptose-vermittelter Caspase-3 und an aktivierter JNK. Die parallele Infusion des GSK-Inhibitors SB216763 reduzierte die durch A β -Exposition hervorgerufenen Parameter.^[135] Zudem soll eine erhöhte GSK-Aktivität zur vermehrten APP-Phosphorylierung und damit zu einer beschleunigten A β -Produktion führen.^[126]

Somit kann die GSK3 als entscheidender Faktor für die Ausprägung des neuronalen Zelltodes in AD betrachtet werden.

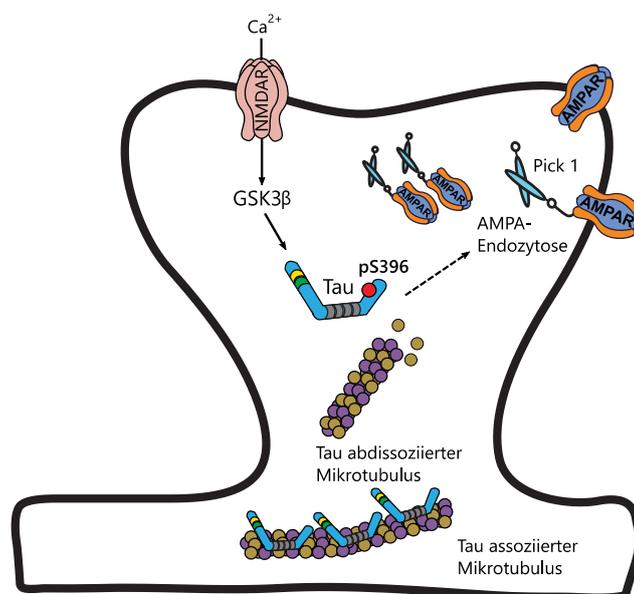


Abbildung 9: AMPA-Endozytose durch GSK3 β -Aktivierung.

Durch eine NMDAR-Aktivierung kommt es zum Calciumeinstrom, der zur Stimulation der GSK3 β führt. GSK3 β phosphoryliert vom Mikrotubulus abdiffundiertes Tau am Ser396 (pS396). Dies wird als kritisches, AMPAR-Endozytose induzierendes Ereignis angesehen (AMPA = α -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionsäure Rezeptor). Eine verstärkte LTD-Ausbildung ist die Folge.^[145]

2.4.1.3 Mitogen-aktivierte Kinasen - MAPK

Die Mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAPK) bilden eine Gruppe von Prolin-gerichteten Serin/Threonin-Kinasen, die durch externe Stimuli, vermittelt über Signalkaskaden, aktiviert werden.^[147] Diese externen Stimuli sind unter anderem Wachstumsfaktoren, Mitogene oder physikalische Prozesse. In der Konsequenz werden Zellfunktionen, wie Zellteilung, Zelldifferenzierung und Apoptose, angeregt. Üblicherweise besitzen MAPK zwei aktivierende Phosphorylierungsstellen, einen Threonin- und einen Tyrosinrest. Diese liegen durch eine einzelne, variable AS voneinander getrennt als TXY-Motiv vor. Trotz der Phosphorylierung der Tyrosinposition werden die Proteine noch nicht in eine aktivierte Konformation überführt. Erst durch die nachgeschaltete Phosphorylierung des Threoninrestes erfolgt dessen Aktivierung. Diese Phosphorylierungen werden durch MAPK-Kinasen (MAPKK) katalysiert, die wiederum von MAPKK-Kinasen (MAPKKK) aktiviert werden (Abbildung 10).^[147, 148]

Im AD-Gehirn wurde die Aktivierung der drei wichtigsten MAP-Kinase-Pfade nachgewiesen. So korreliert eine Hochregulierung von ERK, JNK und p38 mit der abnormalen Phosphorylierung von Tau.^[99, 149-155]

Im Folgenden werden die Kinasen ERK und JNK sowie deren Beteiligung an der AD-assozierten Neurodegeneration näher beschrieben.

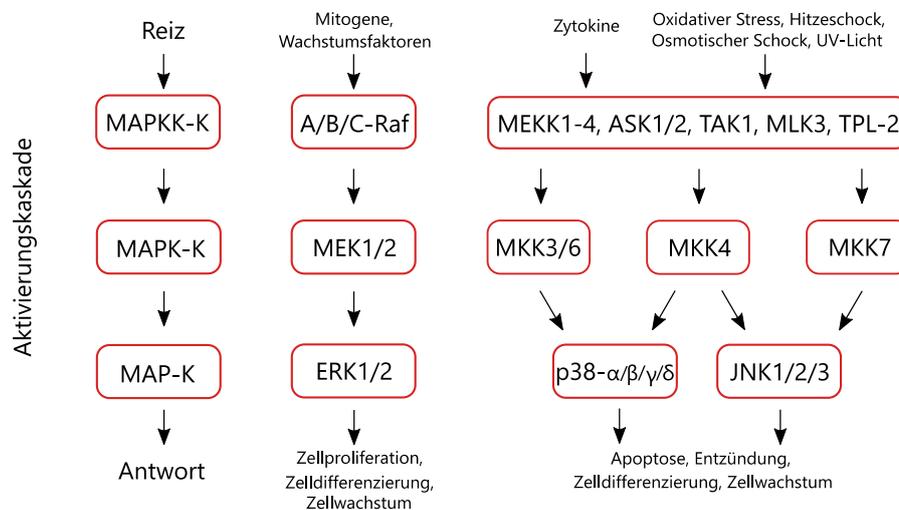


Abbildung 10: Schema der wichtigsten Mitogen-aktivierten Kinasekaskaden.^[132]

Extrazelluläre, signalregulierte Kinasen - ERK

Innerhalb der Gruppe der extrazellulären, signalregulierten Kinasen (*extracellular regulated kinase*, ERK) werden vorrangig die Enzyme ERK1 und ERK2 als AD-relevant angesehen. Sie werden in hohem Maße im ZNS exprimiert und sind mit der Tauhyperphosphorylierung assoziiert.^[156, 157] Die 43 und 41 Kilodalton schweren Kinasen weisen eine 85-prozentige Sequenzhomologie auf.^[148]

In *in vitro*-Studien konnte mit der PK40^{erk} eine weitere Tau-phosphorylierende Kinase charakterisiert werden.^[158]

Die Aktivierung der ERKs hat ihren Ursprung in der extrazellulär gelegenen Wechselwirkung von Wachstumsfaktoren und Zytokinen mit G-Protein-gekoppelten Rezeptoren. Daraus resultiert eine intrazelluläre RAS/RAF-Aktivierung, die wiederum die Kinasen MEK1 und MEK2 stimulieren. Die Letztgenannten phosphorylieren ERK1 und ERK2 an dem Threonin-Glutamat-Tyrosin-Motiv (TEY-Motiv, Abbildung 10, Seite 22).^[148] In der resultierenden Konformation können ERK1 und ERK2 bis zu 15 AD-relevante Positionen am Tau phosphorylieren, unter anderem Ser199, 202, 404 und 422 sowie Thr 181 und 205.^[58, 159]

Untersuchungen an AD-Gehirnen bestätigten, dass in allen Braak-Stadien vermehrt ERK1/2 sowie MEK1/2 kolokalisiert mit *Pretangle*-Tau und NFTs auftraten. Es wird vermutet, dass exogene Faktoren die Aktivierung von ERK1/2 und MEK1/2 im frühen Stadium der neurofibrillären Degeneration induzieren.^[154] PERRY *et. al.* gehen davon aus, dass oxidativer Stress ursächlich für die durch ERKs hervorgerufene, abnormale Tauphosphorylierung ist.^[99] Die gesteigerte Aktivierung von ERK1/2 könnte aber auch auf die AD-bedingte, verminderte Dephosphorylierung durch PP2a oder PP1 zurückzuführen sein.^[154] *In vitro*-Studien belegten, dass Mikroinjektionen von ERK1 in hippocampale Rattenneuronen zu PHF ähnliche Tauhyperphosphorylierungen führten.^[160]

Des Weiteren erhöhte eine dreiwöchige Exposition von A β -Oligomeren in Hippokampusneuronen die Aktivität von ERK1. Parallel dazu stieg die Zahl phosphorylierter, adulter Tausoformen.^[161]

Die im Rahmen dieser Arbeit hergestellten Verbindungen wurden an der ERK1 getestet.

C-Jun-N-terminale Kinasen – JNK

Als weitere MAP-Kinase-Familie, die mit AD in Verbindung gebracht wird, ist die der c-Jun-N-terminalen Kinasen (JNK) hervorzuheben.^[162, 163] Diese besitzt insgesamt zehn Isoformen.^[106] Durch alternatives Spleißen der Gene von JNK1, JNK2 und JNK3 resultieren jeweils vier Isoformen der JNK1 und JNK2 sowie zwei JNK3-Spleißvarianten, die 46 bis 55 Kilodalton schwer sind.^[106, 147] Ihre Gesamthomologie beziffert sich auf rund 70 Prozent.^[147] Innerhalb der ATP-Bindetasche stimmt ihre AS-Sequenz sogar zu bis zu 98 Prozent überein.^[164] Die JNK3 weist im Vergleich zur JNK1 und JNK2 eine um 39 AS längere, N-terminal gelegene Peptidkette auf.^[147] Während die Expression von JNK1 und JNK2 ubiquitär ist, beschränkt sich das Vorkommen der JNK3 vorrangig auf das Gehirn, das Herz und die Hoden.^[147]

Die JNKs werden durch Stressfaktoren, wie entzündliche Zytokine, Endotoxine, osmotischer Schock, UV-Strahlung oder Hypoxie, über Signalkaskaden vermittelt, stimuliert. Deswegen werden sie als stressaktivierte Proteinkinasen (*stress-activated proteine kinase*, SAPK) bezeichnet.^[147, 165, 166] Derartige Stressoren induzieren die Phosphorylierung zahlreicher MAPKKK. Diese überführen die MAPKK MEK4 und MEK7 in ihre aktiven Konformationen. MEK4 und MEK7 wiederum phosphorylieren die JNKs an den AS-Positionen Thr183 und Tyr185 (Abbildung 10, Seite 22). Zusammen mit

Pro184 bilden sie das TPY-Motiv.^[147, 167] Die somit aktivierten JNKs können weitere Zielstrukturen derivatisieren.

Das wichtigste *Target* der JNK ist das Protoonkogen c-Jun, wovon sich der Name der JNK ableitet. Dessen Aktivierung ist mit einer zellulären Stressantwort und mit Caspase-induzierten, apoptotischen Prozessen assoziiert.^[166] Wird die c-Jun jedoch in verstärktem Maße exprimiert, können unkontrollierte Wucherungen maligner, neoplastischer Gewebe resultieren.^[168-170] Außerdem könnte c-Jun bei AD von Relevanz sein. So wurden phosphorylierte c-Jun-Belastungen (p-c-Jun) in NFT-beladenen Neuronen gefunden. Somit kann eine Beteiligung an der Reifung neurofibrillärer Verwicklungen nicht ausgeschlossen werden.^[166]

Die c-Jun phosphorylierenden JNKs wurden ebenfalls verstärkt exprimiert und mit A β - sowie Taupeptiden kolokalisiert in postmortalen Gehirnproben von AD-Patienten beschrieben.^[163, 166, 171] Sie können Tau an bis zu 12 AS-Positionen derivatisieren, unter anderem an Ser199, 202, 396, 404 und 422 sowie Thr 181, 205 und 217. Die höchste Affinität weisen sie zu Ser422 auf.^[58, 159] Dessen Phosphorylierung scheint ausschließlich in AD pathogenen Neuronen zu erfolgen und einen Caspase 3 induzierten Abbau von Tau zu verhindern.^[172, 173] Die Ser422-Phosphorylierung könnte ferner auf eine A β - und Taupathologie verbindende Schlüsselposition der JNK hindeuten.^[174-176] Im transgenen Mausmodell provozierten exponierte A β -Peptide die vermehrte Phosphorylierung von Ser422, die mit einer Ablagerung neurofibrillärer Bündel korrelierte.^[174] In weiteren *in vitro*- und *in vivo*-Studien induzierte A β , über die Aktivierung des JNK-Signalweges, eine Hyperphosphorylierung von Tau und einen gesteigerten neuronalen Zelltod.^[150, 174, 175, 177] Weiterhin kann eine erhöhte JNK-Aktivität die γ -Sekretase stimulieren. Dadurch wird vermehrt APP gespalten und die Bildung neurotoxischer A β -Peptide eingeleitet.^[166, 178]

Die im Rahmen dieser Arbeit hergestellten Verbindungen wurden an der ZNS-spezifischen Isoform JNK3 getestet.

2.4.1.4 Tyrosinkinase Fyn

Fyn ist eine von neun Nicht-Rezeptor-assoziierten Tyrosinkinasen innerhalb der Gruppe der Src Familien Kinasen (SFK).^[179] Sie ist in zahlreiche Signalkaskaden involviert. Somit beeinflusst Fyn die Signalübertragung von Wachstumsfaktoren und Zytokinen sowie auch die Signaltransduktion in B- und T-Zellen. Des Weiteren ist sie an der Thrombozytenaktivierung, Axonelongation und Ionenkanalmodulation beteiligt.^[180] Im Hinblick auf die Zellproliferation und -differenzierung führt eine abnormale Fynexpression zu unkontrollierten Gewebsneubildungen. Erste Hinweise, dass Fyn auch im AD-Gehirn dysreguliert auftreten und womöglich zur Hyperphosphorylierung von Tau beitragen kann, wurden erstmals 1993 beschrieben.^[181] Mittlerweile ist ihr Einfluss auf die Tauphosphorylierung und Symptomausprägung von AD wissenschaftlich anerkannt.^[182]

Die insgesamt drei beim Menschen auftretenden Isoformen sind im Genlocus 6q21 codiert und werden ubiquitär exprimiert.^[142] Deren höchste Konzentrationen wurden im Gehirn (B-Fyn) und in T-Zellen (T-Isoform) nachgewiesen.^[180]

Die Struktur der Fyn ist durch vier Src-Homologie-Domänen (SH1 bis SH4) charakterisiert. Die katalytische Domäne SH1 wird als hochkonserviert beschrieben. Sie bildet die ATP-Bindetasche. Die SH2-Untereinheit wird von den zu phosphorylierenden Tyr-Resten der Zielstruktur besetzt. Zur besseren Ausrichtung des *Targets* interagiert zusätzlich die SH3-Domäne mit prolinreichen Motiven der Zielproteine.^[142] In der B-Isoform von Fyn führt die Phosphorylierung von Tyr420 innerhalb der SH1-Domäne zur Freilegung der katalytischen Bindetasche und stabilisiert die aktive Konformation.^[180] Durch die Autophosphorylierung von Tyr531 im C-terminalen Teil hingegen ordnen sich SH2- und SH3-Untereinheiten in einer inaktiven Konformation an, die es dem Substrat unmöglich macht an Fyn zu binden.^[180, 183]

Fyn phosphoryliert lediglich eine der fünf bekannten Tyr-Reste Tyr18 im Tauprotein.^[142, 184] Jene Derivatisierung wird als ein frühes Ereignis in der Tauopathie beschrieben, da hyperphosphoryliertes Tau scheinbar nicht mehr in der Lage ist, mit der SH3-Untereinheit von Fyn in Wechselwirkung zu treten. Experimente bei denen die Ser- und Thr-Reste der prolinreichen Regionen durch Glutamat (Glu) ersetzt wurden, verminderten die Bindungsaffinität von Fyn an Tau.^[185] Die Glu-Reste simulierten dabei die anionische Oberfläche phosphorylierter OH-Gruppen-tragender AS.^[186] BHASKAR *et al.* postulieren hingegen, dass vor allem vorphosphoryliertes 4R-Tau, durch das zusätzliche repetitive Motiv, die Bindungsfähigkeit zu Fyn deutlich erhöht.^[187] Neben der direkten Tauderivatisierung stimuliert Fyn über die tyrosinphosphorylierende Aktivierung von GSK3 β sowie CDK5 die weitere Phosphorylierung von Tau.^[187, 188] Somit wird ersichtlich, dass eine AD-assoziierte Überexpression von Fyn die Tauaggregation triggern könnte.

In AD-Gehirnen war Fyn in der Nähe von NFTs lokalisiert.^[181, 186, 189] Derartige Tauaggregationen wurden *in vitro* durch eine Fynhemmung reduziert.^[186, 190] Li und GÖTZ beschrieben, dass sowohl die pharmakologische Inhibition als auch die genetische Deletion von Fyn eine A β -vermittelte Tauüberexpression *in vivo* aufhebt.^[182] A β steht weiterhin im Verdacht die vermehrte Bildung von phosphoryliertem Tyr18-Tau zu induzieren.^[191-193]

Im transgenen APP-Mausmodell gingen mit einer verstärkten Fynbildung synaptische Degenerationen sowie Gedächtnisverluste einher, die bei Aktivitätsminderung der Tyrosinkinase verschwanden.^[180, 194, 195] Unter physiologischen Bedingungen ist Fyn und ein geringer Teil des Gesamttaus in den Dendriten lokalisiert. Dort bindet Tau an Fyn und transportiert es zum NMDA-Rezeptor (NMDAR). Nachfolgend wird der NMDAR durch die Fynphosphorylierung aktiviert und die exzitatorische Erregungsleitung stabilisiert.^[183, 186] Aus diesem Grund ist Fyn direkt an der Regulation der synaptischen Plastizität beteiligt.^[193] Unter pathologischen Bedingungen reichern sich in der postsynaptischen dendritischen Umgebung A β -Oligomere an. Sie werden mit einer NMDAR aktivierenden Exzitotoxizität in Verbindung gebracht (Abbildung 11, Seite 26).

ITTNER *et al.* postulierten, dass ein dendritischer Taumangel Neuronen vor einer derartigen Exzitotoxizität schützen könne. Sie erzeugten transgene Mäuse, die APP und verkürztes Tau vermehrt ausbildeten. In diesem modifizierten Tau fehlte allerdings der mit dem Mikrotubulus interagierende C-Terminus, sodass ausschließlich die Bindung an Fyn forciert wurde. Folglich lokalisierte sich der Fyn-Tau-Komplex vorrangig im Soma, was zugleich mit einer Verbesserung von Gedächtnisdefiziten und einer Erhöhung der Überlebenschance der Nager korrelierte.^[196] Analoge Erkenntnisse konnten im *Knockout*-Tau-Mausmodell gewonnen werden.^[197] Eine verstärkte, AD-assoziierte Umverteilung von abnormal hyperphosphoryliertem Tau ins somatodendritische Kompartiment könnte die Tau abhängige Anreicherung von Fyn in den Dendriten fördern und so die exzitotoxischen Signale verstärken. Diese toxische Triade könnte somit ursächlich für den Neuronenuntergang sein.^[198]

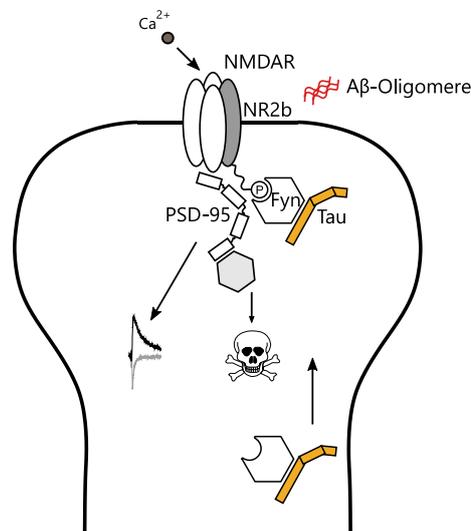


Abbildung 11: Pathologische Aktivierung des NMDAR im Dendrit (adaptiert nach ITTNER *et al.*).^[196]

Fyn phosphoryliert die NR2b-Untereinheit des NMDAR an Position Tyr1472 im postsynaptischen Teil der Nervenzelle.^[183] Diese Phosphorylierung verbessert die Interaktion des NMDAR mit dem postsynaptischen Dichteprotein 95 (PSD-95). Somit wird der NMDAR stabilisiert und die exzitatorischen Effekte verstärkt.^[198] Unter pathologischen Bedingungen können Aβ-Oligomere die exzitatorische NMDAR-Aktivität über die Fynaktivierung induzieren. Durch eine parallel ausgebildete Hyperphosphorylierung von Tau steht mehr frei vorliegendes Tau zur Verfügung, was stärker mit überexprimiertem Fyn interagieren kann. In der Folge würde die exzitatorische Erregung potenziert und Exzitotoxizität forciert werden.

2.4.2 Proteinkinaseinhibitoren

Um in der Therapie von AD den entscheidenden Durchbruch zu erzielen, widmen sich zahlreiche Forschungsgruppen der Entwicklung selektiver Proteinkinaseinhibitoren. Die meisten Verbindungen sind kompetitive Inhibitoren, die mit ATP um die Besetzung der ATP-Bindungsstelle konkurrieren. Sie sind oftmals niedermolekular (unter 600 kDa), lipophil und durch einen rigiden Heterozyklus charakterisiert.^[108, 180] Die ATP-Bindedomäne ist in hohem Maße konserviert, sodass die größte Herausforderung darin besteht, Kinaseinhibitoren mit spezifischen Selektivitätsprofilen zu entwickeln. Durch gezielte Derivatisierungen soll dies, vor allem über die Besetzung der variableren hydrophoben Taschen, ermöglicht werden.

CDK-Inhibitoren

Die kompetitive Inhibition der CDK-Familie scheint aufgrund der oben beschriebenen Problematik besonders herausfordernd zu sein. Bislang existieren keine Hemmstoffe, die ausschließlich gegen eine bestimmte CDK aktiv sind. Des Weiteren zeigen sie sehr häufig eine inhibitorische Potenz gegen GSK3. Der Impuls zur Erforschung selektiver CDK-Inhibitoren hat seinen Ursprung in der häufigen Deregulation von CDKs bei Krebserkrankungen.^[116] Die Verbindungen der ersten Generation waren relativ unspezifisch und werden daher als *Pan*-Inhibitoren bezeichnet.^[199] Ihnen gehören vorrangig das Purinderivat Roscovitin und das Flavon Flavopiridol an (Abbildung 12, Seite 28).^[199] Am Beispiel von Roscovitin ist erkennbar, wie Variationen der Substitutionsmuster zu Selektivitätsveränderungen führen. Ursprünglich als CDK2-Hemmer ($IC_{50} = 0,21 \mu M$) entwickelt, zeigte Roscovitin vergleichbare inhibitorische Aktivitäten an CDK1, CDK2, CDK5 und CDK9 ($IC_{50} \approx 0,25 \mu M$). Zu ERK2 und GSK3 war es mit 11 Mikromolar und 60 Mikromolar deutlich weniger affin.^[200] Substitutionen der Benzylamino-Gruppe in Position sechs durch Stickstoff überbrückte Aza-Heterozyklen führten zur zehnfachen Affinitätssteigerung an CDK2 und CDK5. In gleicher Weise erhöhte sich allerdings der IC_{50} -Wert an der GSK3.^[201] Das Einfügen eines 3-Chloranilinrestes in Stellung vier und einer Isopropylgruppe in der an Position zwei befindlichen Seitenkette korrelierte mit einer 40-fachen Erhöhung der Wirksamkeit an CDK1, CDK2 und CDK5.^[202] Ein Austausch der Seitenkette in Position zwei durch eine 4'-Sulfamoylanilinogruppe sowie in Stellung vier durch ein Biphenylsystem und die Eliminierung des Restes an N7 mündete im Vergleich zur CDK1 in eine fast 2000-fach höhere CDK2-Affinität.^[124] Der an Roscovitin angelehnte CDK5- und GSK3 β -Inhibitor LDC8 reduzierte im Zebrafischmodell nach A β_{42} -Mikroinjektion den Synapsenverfall deutlich, sodass REINHARDT *et al.* ihn als neuroprotektiv einstufen (Abbildung 12, Seite 28).^[203] Durch verstärkte zytotoxische Wirkungen fanden Roscovitin-Analoga bisher nur Anwendung als Krebstherapeutika. So wurde das verwandte Ribociclib in Kombination mit Aromatasehemmern 2017 in der EU für die Behandlung des Mammakarzinoms zugelassen (Abbildung 12, Seite 28).^[204, 205]

Flavopiridol ist ein halbsynthetisches Flavonoid, das von Rohitukin, einem Chromonalkaloid, abgeleitet ist und nachweislich CDK1 (IC_{50} von 30 bis 40 nM), CDK2 (IC_{50} von 100 nM), CDK4 (IC_{50} von 20 bis 40 nM), CDK6 (IC_{50} von 60 nM), CDK7 (IC_{50} von 100 bis 300 nM) und GSK3 β (IC_{50} von 450 nM) hemmt.^[199, 202] Die Einführung eines Schwefel- oder Sauerstoffbrückenatoms erhöhte die Selektivität für CDK1 gegenüber CDK2 und CDK4 um das 20-fache beziehungsweise um das 55- bis 150-fache. Parallel dazu verringerte sich allerdings die Affinität zu den Zielkinasen.^[202] Klinisch wurden Flavopiridol-Analoga in erster Linie gegen diverse Tumorerkrankungen getestet, allerdings mit enttäuschend geringer Wirksamkeit.

PFIZER setzte auf die Erforschung der Cyclobutylpyrazolacetamide CP-668863 und CP-681301 als wirksame und selektive CDK5-Inhibitoren (Abbildung 12, Seite 28). Beide Verbindungen überwinden die Blut-Hirn-Schranke und zeigten sich in *in vitro*-Tests als vielversprechende Hemmer, mit K_i -Werten von 2,9 Nanomolar sowie 13,7 Nanomolar. Ihre *in vivo*-Wirksamkeit bleibt aber fraglich, da sie im Mausmodell zu keiner Veränderung der Tau-phosphorylierung beitrugen.^[206] Mittlerweile

wurden für CP-668863 antitumoröse Eigenschaften gegen kolorektalen Karzinomzellen nachgewiesen.^[207]

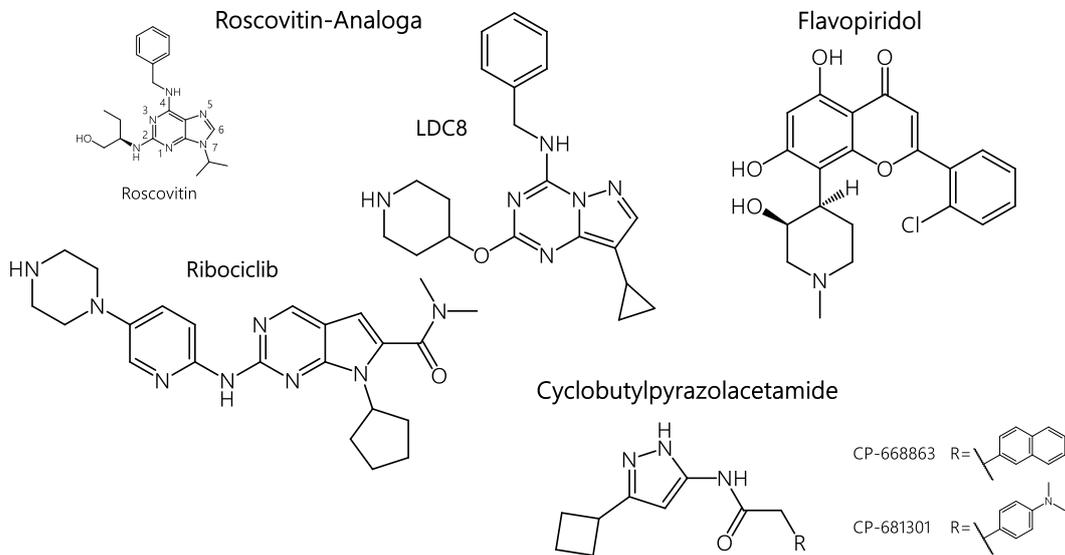


Abbildung 12: Ausgewählte CDK-Inhibitoren.

GSK3-Inhibitoren

Als GSK3-Inhibitoren sind Anilinomaleimide, Indirubine, Paullone und Thiadiazolidinone bekannt, die oftmals auch Aktivitäten an CDK2 und CDK5 aufweisen.^[58] Der erste und wohl bekannteste GSK3-Hemmer ist das nichtkompetitiv wirkende Lithium.^[58] Es inhibiert die GSK3 mit einer IC_{50} von zwei Millimolar.^[208] Die ursprüngliche Hypothese, dass Lithium Magnesium aus der ATP-Bindeta-sche verdrängen und so die Inhibition einleiten kann, ist nicht mehr haltbar.^[209] Das inhibitorische Potential von Lithium scheint eher mit der Phosphorylierung der Positionen Ser21 (GSK3 α) und Ser9 (GSK3 β) zu korrelieren.^[210] Die Beteiligung des PI3K-Akt-Signalweges ist aber eher unwahrscheinlich, da parallel keine erhöhte Konzentration an Position Ser473 phosphoryliertes Akt nachgewiesen werden konnte.^[210] Untersuchungen im Tiermodell sowie in neuronalen Zelllinien bestätigten, dass Lithium die GSK3-assoziierte Tau phosphorylierung hemmt und Tauaggregate reduzieren kann.^[211-213] In einer zehnwöchigen klinischen Studie konnte jedoch nach Lithiumbehandlung keine Veränderung der kognitiven Leistungsfähigkeit bei Patienten mit leichter AD nachgewiesen werden.^[214]

Mit den hochselektiven Anilinomaleimiden SB-216763 ($IC_{50, GSK3\alpha} = 9 \text{ nM}$, $IC_{50, GSK3\beta} = 31 \text{ nM}$) und SB-415286 ($IC_{50, GSK3\alpha} = 34 \text{ nM}$, $IC_{50, GSK3\beta} = 78 \text{ nM}$) gelang es, weitere GSK3-Inhibitoren zu entwickeln (Abbildung 13, Seite 29).^[215] Die β -induzierte Hyperphosphorylierung von Tau wurde durch SB-216763 in hippokampalen Neuronen erheblich gesenkt.^[135] Im Mausmodell konnten dagegen keine Verbesserungen im Hinblick auf die Orientierung und Kognition festgestellt werden.^[216] AR-A014418 scheint ebenfalls als hochselektiver GSK3-Inhibitor sowohl *in vitro* als auch in Zelllinien

die Tauphosphorylierung zu senken (Abbildung 13).^[217] SELENICA *et al.* konnten hingegen eine solche Senkung der Tauphosphorylierung durch AR-A014418 *in vivo* nicht bestätigen.^[211] Derweil reduzierte er aber die A β -Belastung im transgenen APP-Mausmodell und verringerte die Defizite im Morris-Wasserlabyrinth.^[218]

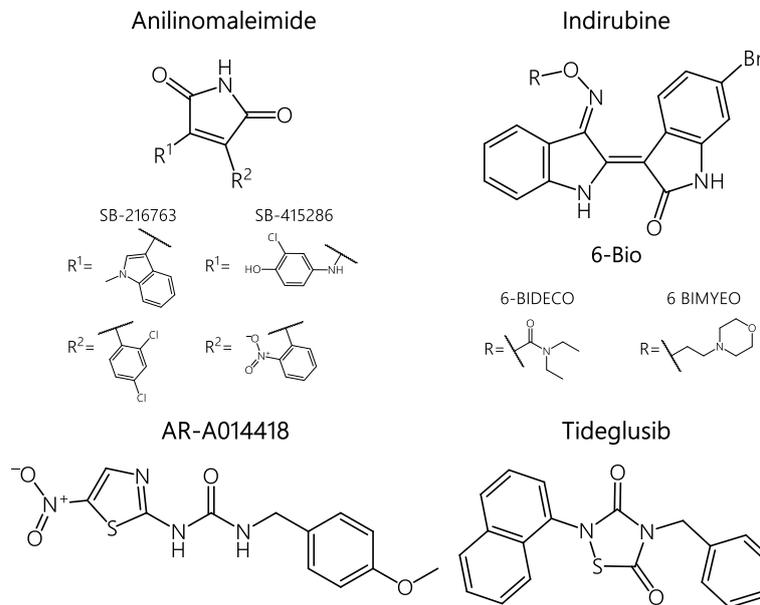


Abbildung 13: Ausgewählte GSK3-Inhibitoren.

Aus der traditionellen chinesischen Medizin stammen die ursprünglich gegen Leukämie eingesetzten Indirubine.^[202, 206] Chemisch gesehen sind sie Bisindoline, die inhibitorische Effekte an CDK1, CDK5 sowie GSK3 β aufweisen. So hemmte Indirubin-3'-monoxim ($IC_{50, GSK3\beta} = 9$ nM, $IC_{50, CDK1} = 25$ nM, $IC_{50, CDK5} = 20$ nM) *in vitro* sowie *in vivo* die Tauphosphorylierung AD-relevanter Epitope.^[219, 220] Im transgenen Mausmodell verringerte es Beeinträchtigungen im Morris-Wasserlabyrinth, die mit einer Abschwächung der A β -Belastung und Tauhyperphosphorylierung korrelierten.^[219] Mit 6-Bromindirubin-3'-oxim (6-BIO) wurde ein weiteres Indirubinderivat beschrieben, allerdings mit hohem zytotoxischen Effekt.^[58] Durch Derivatisierungen der 3'-Oximgruppe, in Form von 6-Bromindirubin-3'-O-(*N,N*-diethylcarbamyl)oxim (6-BIDECO, $IC_{50, GSK3\beta} = 30$ nM) und 6-Bromindirubin-3'-O-(2-morpholin-1-ylethyl)oxim (6-BIMYEO, $IC_{50, GSK3\beta} = 110$ nM) gelang es, die Selektivität zur GSK3 β zu erhöhen und die Neurotoxizität deutlich zu senken (Abbildung 13).^[221]

In vitro konnten beide Verbindungen die Tauhyperphosphorylierung und den apoptotischen Zelltod reduzieren.^[222]

Tideglusib ist ein nichtkompetitiv wirkender GSK3-Inhibitor und gehört zur Gruppe der Thiadiazolidione (Abbildung 13).^[126] Er reduzierte im transgenen Mausmodell die Phosphorylierung von Tau und die Zahl an Amyloidablagerungen.^[223] Dadurch bestärkt, schaffte es Tideglusib bis in die Phase II-Studie. In der von DEL SER *et al.* beschriebenen Pilotstudie konnte eine tägliche, orale Gabe von bis zu 1000 mg bei Patienten mit leichter bis moderater AD einen Vorteil im MMSE- sowie

ADAS cog-Test erzielen.^[224] In der anschließenden IIb-Studie wurden die Erwartungen allerdings nicht erfüllt und die vorab festgelegten primären Endpunkte nicht erreicht.^[225]

JNK-Inhibitoren

Als JNK-Inhibitoren befinden sich zahlreiche Verbindungsklassen in der Arzneimittelforschung. Abgesehen von SP-600125 und SR-3306, haben allerdings die wenigsten JNK-Hemmer eine Bedeutung auf dem Gebiet der neurodegenerativen Erkrankungen. Mit dem *Pan*-JNK-Inhibitor SP-600125 entwickelte CELGENE einen der ersten, niedermolekularen, ATP-kompetitiven Hemmer dieser Zielklasse (Abbildung 14, Seite 31).^[167] Er ist mindestens 110-fach selektiver gegen JNK1/2 ($IC_{50, JNK1/2} = 40 \text{ nM}$) und JNK3 ($IC_{50, JNK3} = 90 \text{ nM}$) als gegen p38 und ERK1/2.^[58, 165] *In vitro* senkte SP-600125 die durch Morphin induzierte Tauhyperphosphorylierung in kortikalen Rattenneuronen, die mit erhöhten phosphorylierten JNK-Spiegeln korrelierte.^[226] Zudem konnte unter dem Einsatz von SP-600125 der APP-vermittelte neuronale Zelltod *in vitro* gesenkt werden.^[227] Im transgenen AD-Mausmodell verbesserte die Verabreichung des JNK-Inhibitors die räumliche Beeinträchtigung im Morris-Wasserlabyrinth und verringerte die oligomere pTau- sowie A β -Belastung.^[228] SR-3306 wurde präklinisch vorrangig in Parkinson-assoziierten Tiermodellen getestet (Abbildung 14, Seite 31). Es weist eine hohe JNK-Selektivität auf, wobei es die höchste Aktivität an der JNK1 zeigt ($IC_{50, JNK1} = 67 \text{ nM}$, $IC_{50, JNK2} = 283 \text{ nM}$, $IC_{50, JNK3} = 159 \text{ nM}$).^[229] Es ist oral bioverfügbar und in der Lage die Bluthirnschranke zu passieren. Im Tiermodell reduzierte SR-3306 die JNK-Aktivität und den damit verbundenen Verlust dopaminergere Zellen.^[229, 230]

ERK-Inhibitoren

Das aus *Nocardiosis sp.* isolierte, Staurosporin analoge K252a wurde als ERK2-Inhibitor mit mäßiger Selektivität identifiziert (Abbildung 14, Seite 31).^[231, 232] *In vitro* reduzierte er in SY5Y-Zellen und in Hippokampus-Hirnschnitten von Ratten die Tauhyperphosphorylierung.^[233] Aufgrund schlechter Bioverfügbarkeit und geringer Penetration ins Gehirn sind ähnliche Ergebnisse im Tiermodell nicht zu erwarten.^[232] Zur Verbesserung dieser Parameter wurde SRN-003-556 entwickelt (Abbildung 14, Seite 31). Leider ist der an ERK2 mit einer IC_{50} von 600 Nanomolar wirkende Inhibitor weniger selektiv als sein natürlich vorkommendes Analogon. So hemmt er unter anderem CDK1, GSK3 β , PKA und PKC mit IC_{50} -Werten von 180 bis 440 Nanomolar. Im Tiermodell konnte nach oraler Sondengabe eine nahezu gleiche Konzentration von SRN-003-556 im Blut sowie im Gehirn der Ratten gemessen werden. Ebenfalls reduzierte er die durch Okadainsäure induzierte pathologische Hyperphosphorylierung von Tau in Hippocampus-Schnitten adulter Ratten.^[234]

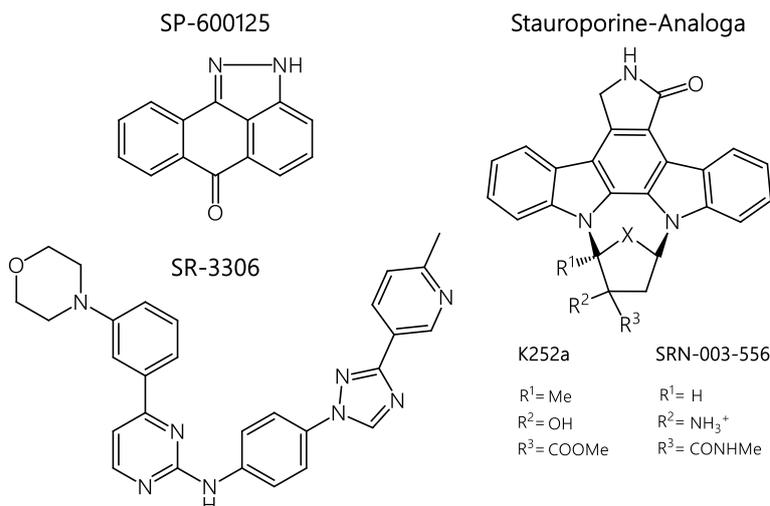


Abbildung 14: Ausgewählte JNK- und ERK-Inhibitoren.

Fyn-Inhibitoren

Saracatinib ist ein *Pan*-SFK-Inhibitor, der ursprünglich von ASTRA ZENECA für verschiedene Krebsarten entwickelt, aufgrund mangelnder Wirksamkeit jedoch in Phase II abgesetzt wurde (Abbildung 15, Seite 32).^[235] Er ist oral bioverfügbar und zeigt eine gute Hirngängigkeit.^[183] Neben Fyn (IC₅₀ = 8 bis 10 nM) hemmt er weitere Kinasen der SFK-Familie, wie zum Beispiel Src (IC₅₀ = 2,7 nM), Yes (IC₅₀ = 4 nM) oder Lyn (IC₅₀ = 5 nM).^[183] Die tägliche Verabreichung von 100 Milligramm Saracatinib beseitigte im transgenen Mausmodell die räumlichen Gedächtnisdefizite, was mit einer verminderten Mikrogliaaktivierung und einer verringerten Ablagerung von Tau proteinen einherging.^[190] Im Rahmen einer Phase Ib-Studie erhielten die Probanden, bei denen eine leichte bis moderate AD diagnostiziert wurde, 50 bis 125 Milligramm des Inhibitors. Leider konnten keine signifikanten Veränderungen bei der ¹⁸F-FDG-PET, dem MMSE- und dem ADAS cog-Test erzielt werden.^[236] Eine derzeit laufende Phase II-Studie soll Klarheit über die Wirksamkeit von Saracatinib bei AD bringen.^[235] Aufgrund seiner stark antiproliferativen Eigenschaften wird in mehreren Phase II-Studien ein Einsatz bei Brust-, Prostata-, Eierstock- und Bauchspeicheldrüsenkrebs getestet.^[180]

Mit Masitinib existiert ein weiterer, klinisch erprobter *Fyn*-Inhibitor (Abbildung 15, Seite 32). Er hemmt *Fyn* mit einer IC₅₀ von 240 Nanomolar.^[183] Der oral applizierbare Inhibitor wurde in einer kleinen Phase II-Studie bei AD untersucht. Als Zusatztherapie zur Standardversorgung, in Form eines Cholinesterase-Hemmers beziehungsweise Memantin, war ein verzögerter kognitiver Verfall bei den AD-Patienten beobachtet worden.^[237] Eine weitaus größere Phase III-Studie, die im Dezember 2019 endet, könnte diese Ergebnisse bestätigen.^[238]

Der von BRISTOL MYERS SQUIBB entwickelte *Pan*-SFK-Inhibitor Dasatinib wurde von der FDA, der *Health Canada* und der EMA zur Behandlung chronischer myeloischer Leukämie zugelassen (Ab-

bildung 15). Er hemmt neben Fyn noch Lck und Src mit einer IC_{50} von 0,2 , 0,4 und 0,5 Nanomolar.^[180] Zusätzlich zeigte Dasatinib im transgenen Mausmodell einen positiven Einfluss auf die neurotoxische Mikrogliaaktivierung und führte zur Verbesserung der Gedächtnisfunktion.^[239]

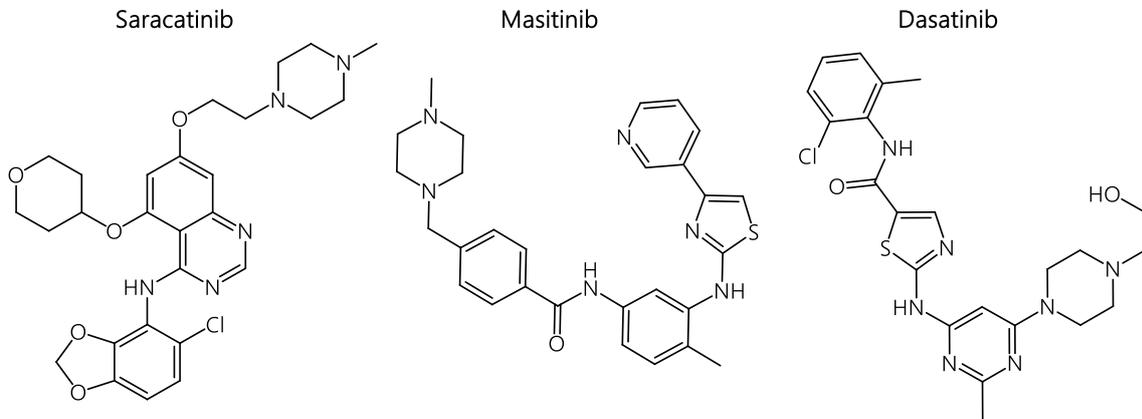


Abbildung 15: Fyn-Inhibitoren.

Fazit

Dieser kleine Einblick in die Arzneistoffentwicklung von Kinaseinhibitoren zeigt, welche Auswirkungen potente und hochselektive Verbindungen haben können. Bisher haben es die wenigsten Kinaseinhibitoren bis zur Marktreife geschafft. Hinzu kommt, dass gerade einmal zwei Prozent aller Verbindungen die Blut-Hirn-Schranke überwinden können. Folglich gibt es keinen ATP-kompetitiven Kinaseinhibitor, der im Hinblick auf die AD-Therapie die klinische Prüfung erfolgreich beendete. Die Hyperphosphorylierung von Tau korreliert mit der Überexpression und Hyperaktivierung gleich mehrerer AD-assoziiierter Proteinkinasen. Aufgrund des Mitwirkens dieser an der multifaktoriellen AD-Pathogenese wären Inhibitoren, die an mehreren dieser Kinasen aktiv sind, pharmakologisch zweckmäßiger. Die parallele Hemmung der Kinasen könnte die phosphorylierten Zustandsformen von Tau normalisieren und möglicherweise die A β - sowie Tau-induzierte Exzitotoxizität reduzieren. Womöglich gelänge es dadurch den kognitiven Verfall der Patienten zu mindern und ein würdevolles Altern zu ermöglichen.^[132]

2.4.3 Inhibitoren AD-assoziiierter Proteinkinasen mit Azoxafluoren-Grundstruktur

Entwicklung und Substituenten abhängige Selektivitätsprofile der Azoxafluorene

Als sauerstoffanalogue 1-Azacarbazole wurden die ersten 1-Aza-9-oxafluorene in der Arbeitsgruppe WIRKSTOFFENTWICKLUNG UND –ANALYTIK um A. HILGEROTH als potentielle Zytostatika entwickelt. In der Antitumoranalyse des NATIONAL CANCER INSTITUTE (NCI, USA) zeigten einige von Ihnen eine moderate zytostatische Aktivität.^[240] Eine mögliche interkalierende DNA-Ligand-Wechselwirkung als Wirkmechanismus konnte aufgrund verschiedenster Untersuchungen ausgeschlossen werden.^[241] Im Rahmen eines Kinase-Assays identifizierte man die 1-Aza-9-oxafluorene als schwachpotente CDK-Inhibitoren mit CDK1- und CDK5-Selektivität. Verbindung **1a** (innerhalb dieser Arbeit Verbindung **22**) und **1b** zeigten dabei an der CDK1 IC₅₀-Werte von 28,8 und 4,2 Mikromolar. Durch enzymkinetische Untersuchungen der LINEWEAVER-BURK-Analyse konnte für **1f** an der GSK3β ein ATP-kompetitiver Wirkungsmechanismus nachgewiesen werden.^[241] Des Weiteren zeigte sich für die Aktivität der Verbindungen, dass die 4-Phenyl- sowie die 6-Hydroxygruppe obligatorisch sind.^[240]

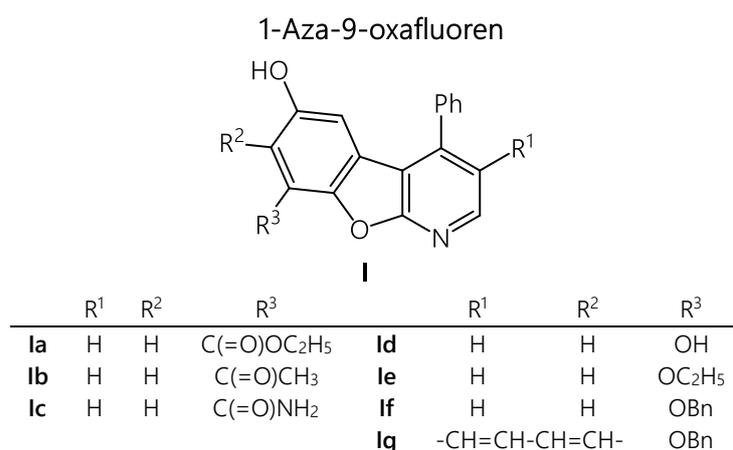


Abbildung 16: Chemische Struktur der 1-Aza-9-oxafluorene.

Anfängliche Strukturmodifikationen, wie die Substitution des aktivitätsbestimmenden 4-Phenylringes gegen eine 4-Methoxygruppe, veränderte das Inhibitionspotential. Die Erweiterung der 4-Phenylgruppe durch einen angefügten 2-Methoxyrest reduzierte die Aktivität an den Kinasen - ausgenommen sind CDK1- und ERK2-Hemmungen - merklich.^[132] Durch die Einführung einer Hydroxy- sowie Alkoxygruppe (**1d** und **1e**) in Stellung drei erhöhte sich zusätzlich die Aktivität an CDK5 und GSK3β.^[241] Somit zeigte sich zum ersten Mal eine duale Hemmung an Vertretern unterschiedlicher Kinasefamilien. Damit bekräftigten die 1-Aza-9-oxafluorene ihr Potential als Leitstruktur. Die Benzylierung von **1d**, unter Bildung von **1f**, verschob die Selektivität von den CDKs zur GSK3β (IC₅₀ = 5,9 ± 1,2 μM (GSK3β), IC₅₀ > 100 μM (CDK5)). Bei Erweiterung des tricyclischen Systems durch apolare Gruppen, wie Methylgruppen oder anellierte Benzenringe, konnten die Affinitäten zu den Kinasen CDK1, CDK5, GSK3β, JNK3 und ERK2 gesteigert werden (**1g**: IC₅₀ = 88 ± 10 nM

(CDK1), $IC_{50} = 2,1 \pm 0,2 \mu M$ (CDK5), $IC_{50} = 1,6 \pm 0,2 \mu M$ (GSK3 β), $IC_{50} = 1,5 \pm 0,07 \mu M$ (ERK2), $IC_{50} = 67 \pm 60 nM$ (JNK3)). Die Methylierung der phenolischen OH-Gruppe führte hingegen bei den meisten Verbindungen zur verminderten Aktivität. Durch einen Wasserstoffbrückendonator in Position drei resultiert eine generelle Affinitätserhöhung, besonders aber zu CDK5. Die Einführung einer Amidstruktur an Position drei (**1c**) steigerte die GSK3 β -Selektivität enorm. Eine anschließende Alkylierung oder Benzilylierung der Amidgruppe von **1c** erweiterte die Selektivität zusätzlich auf die CDK1. Zudem zeigten sich moderate Aktivitäten an ERK2 und JNK3.^[132]

Docking-Untersuchungen

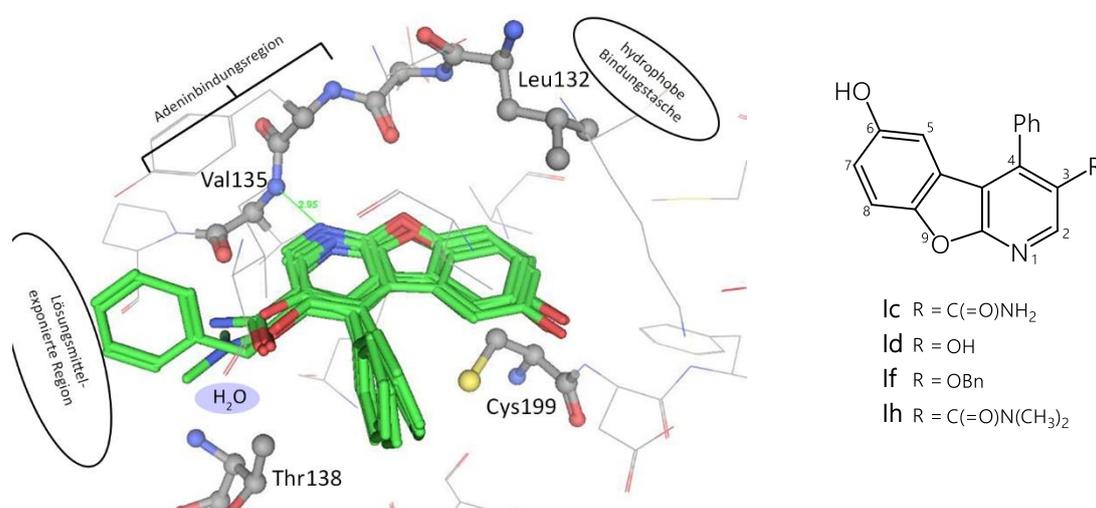


Abbildung 17: Ausrichtung **1**: *Docking*-Ergebnisse der 1-Aza-9-oxafluorene **1c**, **1d**, **1f** und **1h** in der aktiven Konformation der GSK3 β .

Links: Die 1-Aza-9-oxafluorene sind grün dargestellt. Sie interagieren über Wasserstoffbrückenbindungen mit den GSK3 β -AS Val135 und Cys199. Die Amide **1c** und **1h** können zusätzlich über ein Wassermolekül mit Thr138 der Lösungsmittel-exponierten Region (vordere hydrophobe Tasche) wechselwirken.^[242]

Erste *Docking*-Ergebnisse erlangten VOIGT *et al.* bei der Untersuchung der Verbindungen an der aktiven Konformation der GSK3 β (Abbildung 17). Den Fixpunkt bildet eine Wasserstoffbrücke zwischen dem Stickstoffatom des trizyklischen Systems und dem des zum Rückgrat (*Backbone*) der *Hinge*-Region dazugehörigen Valins 135 (Val135). Die optimale Distanz beider Stickstoffatome sollte 2,9 Ångström nicht überschreiten. *Docking*-Studien an CDK5 machten deutlich, dass Verbindungen, wie **1c** und **1d**, die an Position drei einen weiteren Wasserstoffbrückeninteraktionspartner aufweisen, diese essentielle H-Brücke nicht ausbildeten. Ursächlich dafür ist eine Wasserstoffbrücke zwischen der Gruppe an Position drei und des in der vorderen hydrophoben Tasche lokalisierten Asp86. Somit wird die Annäherung des planaren Grundkörpers an die *Hinge*-Region blockiert.^[132] Die Hydroxygruppe in Stellung sechs bildet eine weitere Wasserstoffbrücke mit dem Rückgrat-NH von Cys199 aus. Durch die *Gatekeeper*-AS Leucin 132 (Leu132) scheint eine Interaktion mit der abgeschotteten, hinteren hydrophoben Tasche nicht möglich zu sein. Daher richten sich sperrige, apolare Gruppen in Position drei, wie der Benzyloxyrest bei **1f**, leichter zur vorderen hydrophoben

Region aus. Die Amide **lc** und **lh** sind zusätzlich in der Lage über ein inkorporiertes Wassermolekül mit der Carbonylfunktion von Thr138 innerhalb der Lösungsmittel-exponierten Region zu interagieren und die Affinität zu erhöhen.^[242] Diese beschriebene Orientierung des Moleküls in der Bindetasche wird zur Vereinfachung ab nunmehr „Ausrichtung I“ genannt.

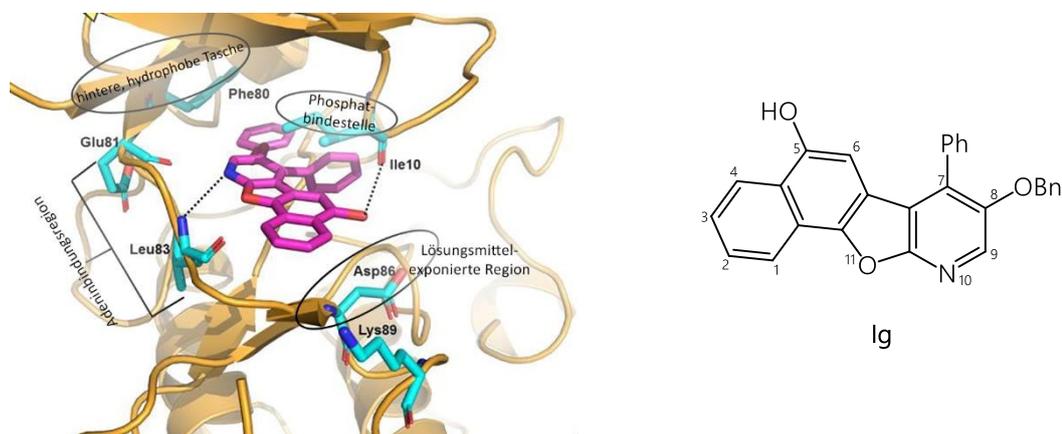


Abbildung 18: Ausrichtung II: *Docking*-Ergebnisse **Ig** in der aktiven Konformation der CDK1. Links: **Ig** ist violett dargestellt. Es liegt um 180 Grad längs gedreht in der Bindetasche vor und interagiert über Wasserstoffbrückenbindungen mit den CDK1-AS Leu83 und Ile10. Die hintere hydrophobe Tasche ist durch Phe80 blockiert.^[132]

Docking-Untersuchungen innerhalb der Arbeit von TELL erweiterten die Erkenntnisse über mögliche Bindungsmodi. Durch das *Docking* der benzoanellierten Verbindung **Ig** an CDK1 und CDK5 konnte eine um 180 Grad um den 7-Phenylring gedrehte Orientierung nachgewiesen werden (Abbildung 18). Als *Gatekeeper*-AS besitzen die CDKs die räumlich anspruchsvolle AS Phe80. Der somit resultierende, stark begrenzte Raum zwingt vor allem größere Moleküle ihre Orientierung in der Bindedomäne zu adaptieren. Wie bei der Ausrichtung I wird als Fixpunkt eine ähnliche Wasserstoffbrücke zwischen dem Rückgrat der *Hinge*-Region und dem Stickstoffatom des planaren Ringsystems beschrieben. **Ig** geht anstatt mit Val135 (GSK3 β) mit Leu83 (CDK1) beziehungsweise mit Cys83 (CDK5) eine Wechselwirkung ein. Eine zweite Wasserstoffbrücke wird zwischen der in Position fünf befindlichen, phenolischen OH-Gruppe von **Ig** und dem Isoleucin 10 (Ile10) der Phosphatbindestelle (*P-Loop*) ausgebildet. Zusätzlich interagiert auch der 7-Phenylring über hydrophobe Wechselwirkungen mit Resten des *P-Loops*. Der Benzyloxyrest von **Ig** ist zur *Gatekeeper*-AS hin orientiert, mit der er über Van-der-Waals- oder sogar π - π -Kräfte in Interaktion treten kann. Der benzoanellierte Teil des Azoxafluoren-Grundkörpers richtet sich zur vorderen hydrophoben Tasche aus, die durch Asp86 eingerahmt ist.^[132] Diese beschriebene Orientierung des Moleküls innerhalb der Bindetasche wird zur Vereinfachung folglich „Ausrichtung II“ genannt.

3 ZIELSTELLUNG DER ARBEIT

Basierend auf der von HILGEROTH *et al.* beschriebenen Cycloadditionsreaktion der 1,4-Dihydropyridine mit 1,4-Benzochinon zu 6-Hydroxy-1,4-4a,9a-tetrahydro-1-aza-9-oxafluoren-Derivaten (Abbildung 19) etablierte VOIGT eine Eintopfsynthese mit dem Resultat aromatischer, 3,4-disubstituierter 6-Hydroxy-1-aza-9-oxafluorene (Abbildung 20).^[241, 243]

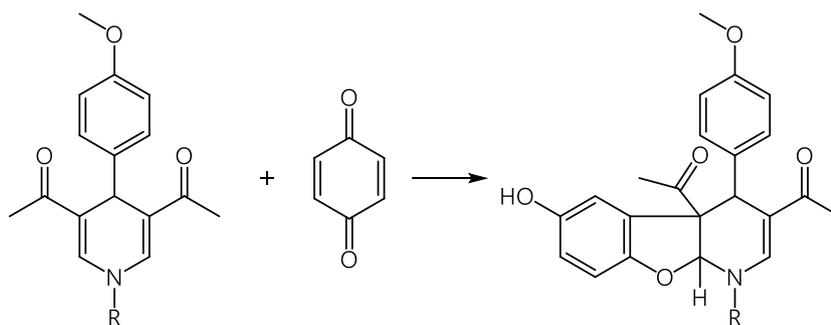


Abbildung 19: Synthese von 6-Hydroxy-1,4-4a,9a-tetrahydro-1-aza-9-oxafluorenen nach HILGEROTH *et al.*^[243]

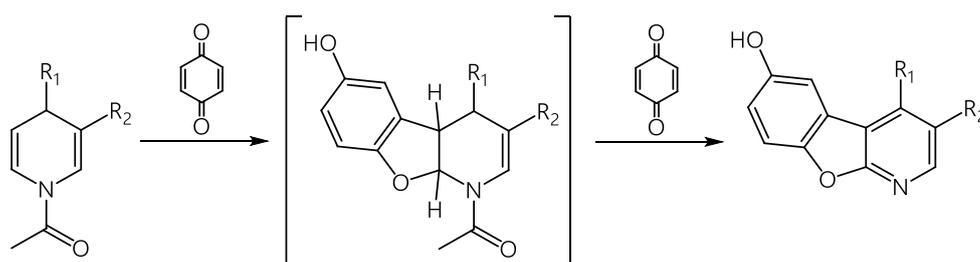


Abbildung 20: Synthese der 6-Hydroxy-1-aza-9-oxafluorene im Eintopfverfahren nach VOIGT.^[241]

TELL gelang auf diesem Weg die Synthese der 6-Hydroxy-1-aza-9-oxafluorene mit Amidpartialstruktur. Das Benzylamid-Derivat **28** zeigte dabei in einer vorangegangenen Testung potente inhibitorische Eigenschaften an den Proteinkinasen CDK1/B, ERK2 und JNK3.^[132] Daher definierte man als erstes Ziel dieser Arbeit, den Substanzpool um **28** (6-Hydroxy-1-aza-9-oxafluoren des Benzylamidtyps) zu erweitern und neue 6-Hydroxy-1-aza-9-oxafluorene mit Anilidpartialstruktur in Stellung drei zu etablieren (Abbildung 21, Seite 37). Man wählte die Amid- sowie Anilidpartialstruktur vor allem deshalb aus, um die Affinitäten zu den Kinasen über potentielle Wasserstoffbrücken zu erhöhen. Würden sich die Moleküle nach Ausrichtung I orientieren, wäre eine Wasserstoffbrücke über ein inkorporiertes Wassermolekül zum Thr138 (GSK3 β) denkbar. Bei der Orientierung nach Ausrichtung II erhoffte man sich das Auftreten einer H-Brücke mit Ile10 (CDK1) der Phosphatbindestelle. Weiterhin sollte die Größe und die Lipophilie der Amidsubstituenten variiert werden. Hinzu kamen die Erweiterung des planaren Systems zum Tetrazyklus sowie die Substitution des Wasserstoffatoms durch eine Methoxygruppe in Position eins am benzanellierten Azoxafluoren. Damit

sollte eine Bindungssteigerung mit der möglichen Ausbildung weiterer Wasserstoffbrücken angestrebt werden.

Zur Grundkörpersynthese kamen neben 1,4-Benzochinon und 2-Chlor-1,4-benzochinon auch 1,4-Naphthochinon und 5-Methoxy-1,4-naphthochinon zum Einsatz. Für die Amidbildung wurden chlorierte sowie Methoxygruppen-verknüpfte Aniline oder Benzylamine eingesetzt. Anschließend sollten die tri- und tetrazyklischen Verbindungen auf ihre inhibitorischen Aktivitäten an einer Reihe von AD-assoziierten Proteinkinasen untersucht werden. Dies wurde in Kooperation mit der PROQINASE GmbH sowie mit den Arbeitsgruppen um KOCH (Tübingen, Deutschland) und KRYSSTOF (Olomouc, Tschechische Republik) realisiert.

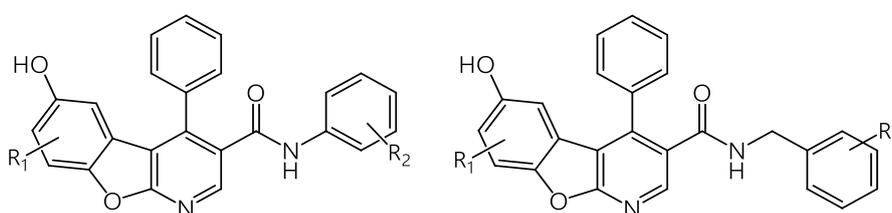


Abbildung 21: Allgemeine Strukturformeln der Zielverbindungen mit Carbamidpartialstruktur des Teilabschnitts I.

Der zweite Teil der Arbeit beschäftigte sich mit dem Ersatz des Amids durch eine neue charakteristische Gruppe, die durch eine gewisse thermodynamische Stabilität sowie Hydrolyseresistenz charakterisiert sein sollte. Man entschied sich auf Grundlage bereits etablierter Arzneistoffe, wie Roxithromycin, Cefpodoxim, aber auch Fluvoxamin, für das Einführen der in der Natur eher unüblichen Oximetherstruktur (Abbildung 22).^[244] Auch hier erhoffte man sich Affinitätssteigerungen durch die Ausbildung weiterer Wasserstoffbrücken. Daher sollten vorrangig und aufgrund einer, im Vergleich zu *O*-Alkyloximethern, größeren thermodynamischen Stabilität *O*-Benzyloximether-derivate in Betracht gezogen werden. Ferner wurden diese Verbindungen auf ihre inhibitorische Proteinkinaseaktivität von KOCH und KRYSSTOF untersucht.

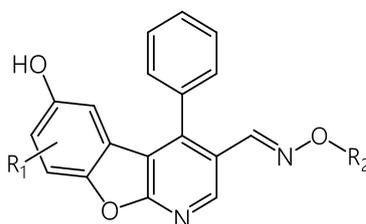


Abbildung 22: Allgemeine Strukturformel der Zielverbindungen mit Oximetherpartialstruktur des Teilabschnitts II.

4 ERGEBNISSE UND DISKUSSION

4.1 Teilabschnitt I: Synthese und Analytik von 1-Aza-9-oxafluoren- sowie 10-Aza-11-oxabenzofluoren-Derivaten des Carbamidtyps

Die Synthese der 3/8-Carbamidderivate der 6-Hydroxy-4-phenyl-1-aza-9-oxafluorene, bei der Anwendung von 1,4-Benzochinon, beziehungsweise der 5-Hydroxy-7-phenyl-10-aza-11-oxabenzofluorene, bei dem Einsatz der 1,4-Naphthochinone, erfolgte über eine drei-Stufen-Synthese. Der größte Teil der Endverbindungen wurde über den Syntheseweg A (Abbildung 23) realisiert, bei dem anfangs Nicotinsäure zu dem jeweiligen Nicotinamid umgesetzt wurde (i_a). Diese Nicotinamide dienten weiterhin der Gewinnung von 3-carbamidsubstituierten *N*-Acetyl-1,4-dihydropyridinen. Sie konnten durch eine *N*-Acetylierung am Pyridinring sowie durch eine regio-selektive Grignard-Addition eines Phenylrestes an Position vier synthetisiert werden (ii_a). Die entstandenen Zwischenprodukte wurden final mit 1,4-Benzochinon, 1,4-Naphthochinon oder 5-Methoxy-1,4-naphthochinon zu den entsprechenden Endverbindungen umgesetzt (iii_a).

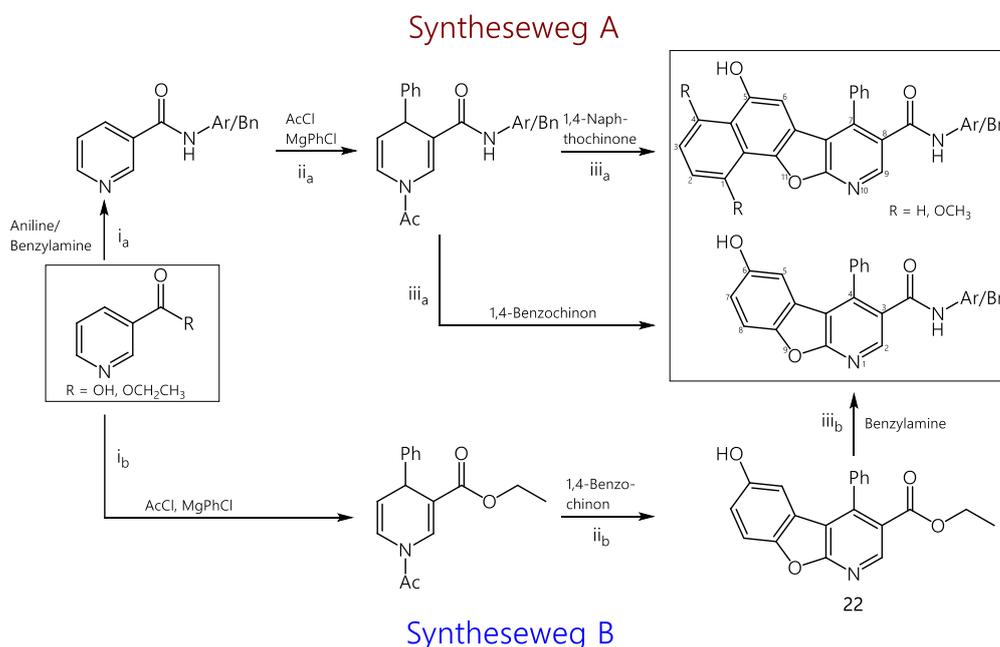


Abbildung 23: Drei-Stufen-Synthese zur Darstellung der 6-Hydroxy-4-phenyl-1-aza-9-oxafluorene beziehungsweise der 5-Hydroxy-7-phenyl-10-aza-11-oxabenzofluorene des Carbamidtyps über zwei Reaktionswege.

Im Synthesepfad B (Abbildung 23) reagierte Nicotinsäureethylester, über die Bildung seines *N*-Acetyl-1,4-dihydropyridinderivats (i_b), zum Ethyl-6-hydroxy-4-phenylbenzofuro[2,3-*b*]pyridin-3-carboxylat (**22**, ii_b). **22** wurde weiter mit dem betreffenden Amin zum jeweiligen 3-Benzylamidderivat umgesetzt (iii_b).

Die Nummerierung der Positionen am aromatischen Grundgerüst erfolgte unter Berücksichtigung der von IUPAC beschriebenen Regeln. Somit ergibt sich für die benzoanelierten Endverbindungen, im Vergleich zu den 1-Aza-9-oxafluorenen, eine inverse Zählrichtung.

4.1.1 Synthese kommerziell nicht zugänglicher Ausgangsstoffe

Für den in Schritt iii_a beschriebenen Ringschluss (siehe 4.1, Abbildung 23, Seite 38) benötigte man als Edukt 5-Methoxy-1,4-naphthochinon. Als Ausgangssubstanz wurde hierfür ein Äquivalent an 5-Hydroxy-1,4-naphthochinon in Dichlormethan (DCM) gelöst. Man versetzte den Ansatz mit 1,2 Äquivalenten Silber-(I)-oxid sowie anteilig mit 28 Äquivalenten Iodmethan und erhitzte ihn vier Stunden unter Rückfluss. Anschließend trennte man das suspendierte Silber-(I)-oxid ab, entfernte das halogenhaltige Lösungsmittel am Rotationsverdampfer und trocknete den erhaltenen, orangebraun gefärbten Feststoff drei Tage lang im Exsikkator (75 % Ausbeute). Silber-(I)-oxid fungiert bei dieser Reaktion als Base, dass die phenolische Hydroxygruppe des 5-Hydroxy-1,4-naphthochinon deprotoniert. Dieses kann folglich als besseres Nukleophil Iodmethan effektiver angreifen (Abbildung 24).

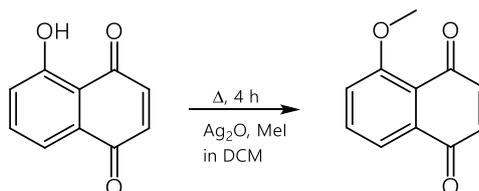


Abbildung 24: Umsatz von 5-Hydroxy-1,4-naphthochinon zu 5-Methoxy-1,4-naphthochinon.

4.1.2 Synthese der Nicotinamide

Als erster Syntheseschritt (i_a, siehe 4.1, Abbildung 23, Seite 38) wurde die Umsetzung von Nicotinsäure mit Anilinen oder Benzylaminen geplant. Da die Produkte zur Weiterreaktion gedacht waren, sollten sie effizient und in hohen Ausbeuten gebildet werden. Die Reaktion von Carbonsäuren mit Aminen stellt eine typische Protolyse dar. Durch drastisches Erhitzen gelingt allerdings die Umsetzung zu Carbonsäureamiden mit schlechten Ausbeuten. Daher sind für die Umsetzung deutlich stärkere Acylierungsmittel erforderlich, als das mesomeriestabilisierte Carboxylat. Klassisch gelingt die Synthese über die Intermediatbildung von Carbonsäurechloriden oder Carbonsäureanhydriden. Sie stellen aufgrund mangelnder Mesomeriestabilisierung deutlich bessere Acylierungsmittel dar. Die Gewinnung der Carbonsäurechloride ist allerdings weder gesundheitsfördernd noch umweltfreundlich. Umweltverträglichere Reaktionsbedingungen, verknüpft mit guten Ausbeuten, zeigen sich dagegen bei dem Einsatz von Arylboronsäurederivaten.^[245, 246] Diese werden von Carbonsäuren nukleophil angegriffen und bilden *in situ* eine deutlich bessere Abgangsgruppe. In der Konsequenz können sie die Nukleophile erheblich besser acylieren. Außerdem werden erfolgreiche

Umsetzungen mit Lewissäuren, wie Aluminiumoxid, Ceroxid oder Zirkoniumchlorid beschrieben.^[247] Letztendlich entschied man sich, als kosteneffizienteste Methode und mit dem größten Ertrag an Nicotinamiden, für die klassische Zwischenproduktbildung der Carbonsäurechloride. Alle Synthese- und Aufreinigungsschritte wurden unter dem Abzug durchgeführt. Als Referenz diente eine von POCHET *et al.* publizierte Arbeit.^[248]

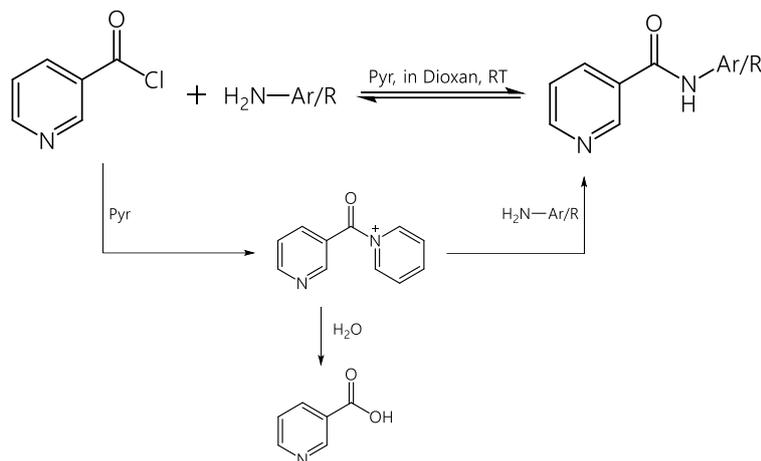


Abbildung 25: Darstellung von Carbonsäureaniliden/ -amiden mittels Carbonsäurechlorid bei Raumtemperatur (RT). Bei der Umsetzung mit nukleophilen Hilfsbasen (Pyridin, Pyr) sind Nebenreaktionen denkbar, die die Ausbeute limitieren können (unterer Teil des Bildes).^[249]

Man suspendierte zu Beginn ein Äquivalent Nicotinsäure in zehn Äquivalenten Thionylchlorid und erhitzte den Ansatz drei Stunden unter Rückfluss. Im Anschluss entfernte man das überschüssige Thionylchlorid am Rotationsverdampfer. Das nunmehr hellgelbe Nicotinsäurechlorid wurde in trockenem Dioxan aufgenommen und mit je 1,1 Äquivalenten an Amin oder Anilin und wasserfreiem Pyridin anteilig ergänzt. Pyridin dient hierbei als Hilfsbase, das freiwerdende Protonen bindet. Nach Abschluss der Reaktion erfolgte eine Chloroform-Wasser-Extraktion. Die halogenhaltige Phase wurde am Rotationsverdampfer eingengt und das Produkt bis zu drei Tage im Exsikkator getrocknet. Somit gelang es, Verbindung **1** bis **10** in Ausbeuten von 32 bis 71 Prozent zu gewinnen (Tabelle 1).

Tabelle 1: Gewonnene Nicotinanilide (links) und -amide (rechts) mit Ausbeuten.

1-5				6-10			
Verbindung	R ¹	R ²	Ausbeute	Verbindung	R ¹	R ²	Ausbeute
1	H	H	50 %	6	H	H	35 %
2	Cl	H	71 %	7	Cl	H	49 %
3	H	Cl	66 %	8	H	Cl	35 %
4	OCH ₃	H	63 %	9	OCH ₃	H	38 %
5	H	OCH ₃	61 %	10	H	OCH ₃	32 %

Erstaunlicherweise konnten bei den Nicotinsäureaniliden, trotz des delokalisierten Elektronenpaars, bessere Ausbeuten gewonnen werden, als bei der Umsetzung mit den Benzylaminen. Generell scheint der Einsatz von nukleophilen Hilfsbasen, wie Pyridin, limitierend für die Produktbildung zu sein, da diese ebenfalls das aktivierte Carbonsäurederivat angreifen können. Die dabei *in situ* gebildete, acylierte Pyridiniumverbindung kann als noch reaktiver angesehen werden. Das nicht-mesomeriestabilisierte Intermediat könnte nunmehr mit dem jeweiligen Amin zum gewünschten Produkt umgesetzt werden oder aber mit vorhandenem Wasser zu Nicotinsäure abreagieren und folglich die Ausbeuten schmälern (siehe Abbildung 25, Seite 40).^[249] Der Einsatz nicht-nukleophiler Basen, wie 2,6-Di-*tert*-butylpyridin, wäre zukünftig vorzuziehen.

4.1.3 Darstellung und Charakterisierung der *N*-Acetyl-1,4-dihydropyridin-Derivate des 3-Carbamidtyps

In vorangegangenen, biologischen Testungen der 6-Hydroxy-1-aza-9-oxafluorene zeigten diejenigen Verbindungen mit einem Phenylrest in Position vier die besten inhibitorischen Aktivitäten. Die Syntheseschritte ii_a und i_b sollten dazu beitragen den Arylrest in diese Stellung des Pyridinrings einzuführen und ein reaktives Intermediat zur Weiterreaktion zu bilden (siehe 4.1, Abbildung 23, Seite 38).

Entwicklung von 4-substituierten N-Acyl-1,4-dihydropyridinen bis hin zu VOIGTs Eintopfsynthese

Der Heterozyklus ist aufgrund des negativ induktiven Effekts des Stickstoffatoms und der damit verbundenen geringen Elektronendichte generell reaktiver gegenüber nukleophilen Angriffen als das homoanaloge Benzen. Mit Hilfe des freien Elektronenpaars am Heteroatom lassen sich Pyridinderivate durch Acylierung, Alkylierung oder Sulfonierung, in reaktivere Pyridiniumsalze überführen. Dadurch wird der Effekt der positiven Partialladungsverteilung an den Positionen zwei, vier

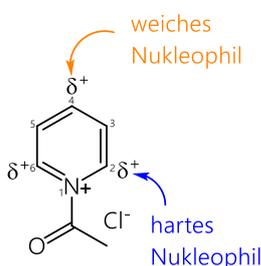


Abbildung 26: Verteilung der positiven Partialladung im Pyridiniumsalz.

und sechs deutlich verstärkt, sodass diese Stellungen präferiert für einen nukleophilen Angriff sind.^[250] (Abbildung 26). FRAENKEL *et al.* zeigten 1970, dass sich bei der Umsetzung von Ethylchlorformiat mit 4-substituierten Pyridinen problemlos ihre *N*-Acylpyridiniumsalze bildeten, die wiederum nach Zugabe von Grignardreagenzien leicht in 2-substituierte 1-(Ethoxycarbonyl)-1,2-dihydropyridine überführt wurden.^[251] Sechs Jahre später gelang LYLE *et al.* die Addition von Grignardverbindungen sowie Organocadmiumreagenzien an 3,4-disubstituierten Pyridinen unter Nutzung von Acetyl- oder Benzoylchlorid. Sie konnten Gemische von

Verbindungen mit zusätzlicher Kohlenstoff-Kohlenstoff-Bindung in den Positionen zwei, vier und sechs isolieren.^[252] Grundsätzlich binden dabei harte C-Nukleophile, wie Lithiumalkylverbindungen oder Grignardreagenzien, vorrangig in Position zwei und sechs. Bei sterisch anspruchsvollen

N-Acylresten ist aber auch ein vermehrter Angriff der Position vier zu beobachten.^[250] PIERS und SOUCY setzten 1974 Lithiumdiarylcuprate beziehungsweise Lithiumdialkylcuprate (GILMAN-Cuprate, mit allgemeiner Formel R_2CuLi) mit *N*-acylierten Pyridiniumsalzen um, die den aktivierten Heterozyklus regioselektiv an Position vier angriffen.^[253] COMINS und ABDULLAH bekräftigten diese Aussagen, indem sie *N*-acylierte, unsubstituierte Pyridiniumsalze mit Grignardreagenzien in Anwesenheit katalytischer Mengen von Kupfer-(I)-jodid (CuI) umsetzten. Sie erhielten dabei in hohem Maße 4-substituierte *N*-Acyl-1,4-dihydropyridine. Sie schlossen daraus, dass *in situ* eine Ummetallierung unter Bildung magnesiumhaltiger Organylcuprate (NORMANT-Cuprate, mit allgemeiner Formel R_2CuMgX) möglich wäre.^[254] Derartige Organylcupratverbindungen sowie auch zinkhaltige, kupferorganische Verbindungen (KNOCHEL-Cuprate, mit allgemeiner Formel $RCu(Cn)ZnX$) gelten als weiche C-Nukleophile, die nahezu regioselektiv an Position vier des *N*-Acyl-Pyridiniumgerüsts angreifen (Abbildung 26, Seite 41).^[254-256] Auf Grundlage der von COMINS und ABDULLAH beschriebenen Erkenntnisse etablierte VOIGT im Arbeitskreis von ANDREAS HILGEROTH als erster die Synthese von 3,4-disubstituierten *N*-Acyl-1,4-dihydropyridinen aus 3-substituierten Pyridinderivaten. Dabei verwendete er anfangs anstelle von Kupfer-(I)-jodid den in etherischen Lösungsmitteln besser löslichen Kupfer-(I)-jodid-Dimethylsulfid-Komplex ($CuI \cdot SMe_2$).^[241] Ähnliche Ergebnisse konnten jedoch auch bei der Verwendung von einem Äquivalent Kupfer-(I)-jodid mit zwei Äquivalenten Lithiumchlorid (LiCl) erzielt werden. Dabei bildet sich *in situ* ein in Tetrahydrofuran (THF) gut löslicher $CuI \cdot 2 LiCl$ -Komplex. Dieser wurde fortwährend eingesetzt.^[241, 257] VOIGTs Eintopfverfahren stellt somit die Grundlage der Syntheseschritte ii_a und ib dar (Abbildung 27).^[241]

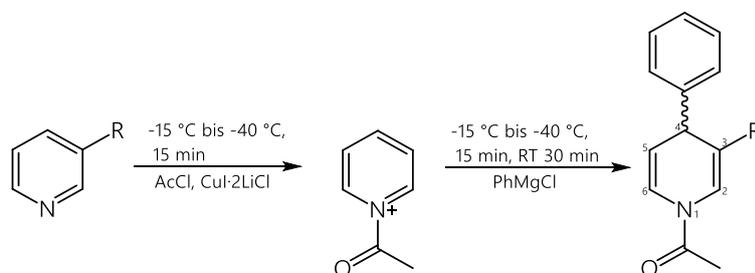


Abbildung 27: Darstellung der 3-substituierten *N*-Acetyl-4-phenyl-1,4-dihydropyridin-Derivate **11** bis **21** nach COMINS, adaptiert von VOIGT.^[241, 254]

Beschreibung der experimentellen Durchführung

Dabei wurden in einem Mehrhalsrundkolben ein Äquivalent der Nicotinamide **1** bis **10**, 0,1 Äquivalente Kupfer-(I)-jodid und 0,2 Äquivalente vorab getrocknetes Lithiumchlorid in absolutem THF gelöst beziehungsweise suspendiert und der Ansatz unter Argonatmosphäre auf -15 bis -40 Grad Celsius gekühlt. Beim Ergänzen des Lithiumchlorids zeigte sich eine leichte Farbvertiefung, die die erhöhte Löslichkeit des Schwermetallsalzes – über die Bildung des Kupfer-Lithium-Komplexes – visualisierte. Weiterhin könnte die Farbveränderung aber auch eine Interaktion der Kupfer-(I)-Ionen mit dem Heterozyklus anzeigen. Hinzu kommt, dass die Reaktion

unter Luftausschluss zu erfolgen hat, da mögliche Kupfer-Sauerstoff-Bindungen sehr viel stärker sind, als die zwischen Kupfer und Kohlenstoff. Darin liegt auch die höhere Reaktivität der meisten organischen Kupferverbindungen gegenüber Sauerstoff und Wasser begründet. Die anfänglichen Reaktionen führte man bei -40 Grad Celsius durch. Dazu verwendete man Trockeneis in Kombination mit einer Methanol-Isopropanol-Mischung, im Verhältnis von eins zu eins. Im späteren Verlauf der praktischen Arbeit erhöhte man zur Kostenreduktion die Reaktionstemperatur auf -15 Grad Celsius. Bei dieser Temperatur verliefen die Synthesen ebenfalls erfolgreich. Dies konnte durch das Anwenden einer unterkühlten Schmelze aus Natriumchlorid und Eis, im Verhältnis von eins zu drei, realisiert werden. Nach Erreichen der jeweiligen Temperaturen fügte man 1,2 Äquivalente frisch destilliertes Acetylchlorid hinzu und wartete, unter ständiger Temperaturkontrolle, 15 Minuten. Die dabei beobachtete Farbveränderung - oftmals dunkelrot gefärbte Lösungen - wies auf eine positive *N*-Acetylierung hin. Anschließend ergänzte man tropfenweise 1,1 Äquivalente Phenylmagnesiumchlorid (2 Mol in THF) und ließ den Ansatz erneut 15 Minuten unter den oben genannten Bedingungen ruhen. Der Kolben wurde aus dem Kältebad herausgenommen und 30 Minuten bei Raumtemperatur sich selbst überlassen. Zum Abbruch der Reaktion wurden 100 Milliliter einer 20-prozentigen Ammoniumchloridlösung ergänzt und dreimal mit 100 Milliliter Chloroform extrahiert. Darauf extrahierte man die organische Phase solange mit jeweils 100 Milliliter ammoniakalischer Ammoniumchloridlösung, im Verhältnis von eins zu eins, bis in der wässrigen Phase keine blaue Färbung mehr zu erkennen war. Das basische Gemisch überführt dabei die Schwermetallionen in einem leicht in Wasser löslichen, blau gefärbten Komplex. Anschließend extrahierte man den Ansatz zweimal gegen 100 Milliliter einer zehnpromzentigen Salzsäurelösung sowie gegen eine gesättigte Kochsalzlösung (Brine). Nach Entfernen des halogenhaltigen Lösungsmittels am Rotationsverdampfer wurde der ölig viskose Rückstand säulenchromatographisch aufgereinigt (LM 1 und LM 3, siehe 6.2.2.1). Die resultierende Fraktion engte man ein und ließ das Addukt aus kaltem Methanol, bei zwei bis acht Grad Celsius, ausfallen. Die resultierenden Verbindungen wurden unterhalb von -20 Grad Celsius unter Argonatmosphäre gelagert.

Ausbeutenvariabilität

Die dabei erhaltenen Ausbeuten sind in Tabelle 2 (Seite 44) aufgelistet. Die Produkterträge im Hinblick auf die *N*-Acetyl-4-phenyl-1,4-dihydropyridin-3-carbamide sind recht ernüchternd. Schließlich zeigten die vorangegangenen Arbeiten von VOIGT und TELL, sowie meine Erfahrungen, bei der Umsetzung von Nicotinsäureethylester oder von den *O*-Alkylcarbaldehydoximethern (Teilabschnitt II), dass diese Synthesevorschrift Potential besitzt, weitaus bessere Ausbeuten hervorzu-
bringen.^[132, 241]

Betrachtet man die Reaktivität des aromatischen Heterozyklus, so verstärken Substituenten mit negativ mesomeren sowie negativ induktiven Eigenschaften in Position drei die positive Partialladung in Stellung zwei und vier.^[250] Eine höhere Ausbeute an 1,4-Dihydropyridinen bei dem Umsatz mit weichen Nukleophilen wäre somit zu erwarten gewesen, was in Anbetracht von **11** auch zutrifft.

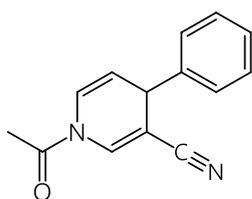


Abbildung 28: *N*-Acetyl-4-phenyl-1,4-dihydropyridin-3-carbonitril.

Bei den Verbindungen **12** bis **21** hingegen greift diese Hypothese, trotz des -M-Effekts, nicht. Auch bei dem Umsatz von Nicotinonitril zum *N*-Acetyl-4-phenyl-1,4-dihydropyridin-3-carbonitril konnte ich, obgleich des stark ausgeprägten negativ mesomeren Effekts, lediglich eine Ausbeute von 30 Prozent erzielen (Abbildung 28). Beim Einsatz von 3-Nitropyridin blieb der positive Umsatz gänzlich aus. 3-Substituierte Pyridinderivate mit positiv induktiven sowie positiv mesomeren Effekten sollten folglich, durch eine verstärkte Desaktivierung des heteroaromatischen Systems für einen nukleophilen Angriff, die Ausbeute deutlich schmälern.^[250] Allerdings widerlegen VOIGTs Erfahrungen diese Aussage. Seine Ausbeuten von Pyridinen mit Oxymethyl- (40 %), Oxyethyl- (56 %) sowie Methylresten (61 %) in Stellung drei sind merklich besser als sie in der Theorie zu erwarten gewesen wären.^[241] Somit zeigt sich, dass ein elektronischer Effekt auf die Reaktion weniger Einfluss hat, als angenommen. Auffällig war allerdings, dass 3-substituierte Pyridine mit sterisch kleinen Resten bessere Produktumsätze ergaben, als diejenigen, mit raumgreifenden Substituenten.

Tabelle 2: Dargestellte Verbindungen des *N*-Acetyl-4-phenyl-1,4-dihydropyridin-3-carboxylats (**11**) sowie der *N*-Acetyl-4-phenyl-1,4-dihydropyridin-3-carbamide (**12-21**) mit Ausbeuten. Es werden keine absoluten Konfigurationen oder Rotamerenformen berücksichtigt.

11 (63 %)

12-16

17-21

Verbindung	R ¹	R ²	Ausbeute	Verbindung	R ¹	R ²	Ausbeute
12	H	H	15 %	17	H	H	22 %
13	Cl	H	11 %	18	Cl	H	11 %
14	H	Cl	16 %	19	H	Cl	15 %
15	OCH ₃	H	16 %	20	OCH ₃	H	20 %
16	H	OCH ₃	12 %	21	H	OCH ₃	25 %

Weiterhin ist das Löslichkeitsverhalten der 3-substituierten Pyridinderivate ausschlaggebend für einen positiven Reaktionsumsatz. Bei dem Versuch das in THF schlecht lösliche *N*-(4-Nitrophenyl)nicotinamid umzusetzen, konnten nach Aufreinigung keine nennenswerten

Mengen an *N*-acyliertem 1,4-Dihydropyridin festgestellt werden. Das Edukt lag während des gesamten Syntheseablaufs suspendiert im Lösungsmittel vor. Weiterhin waren auch die für diese Reaktion markanten visuellen Veränderungen während des gesamten Synthesezeitraums nicht beobachtet worden (Abbildung 29).

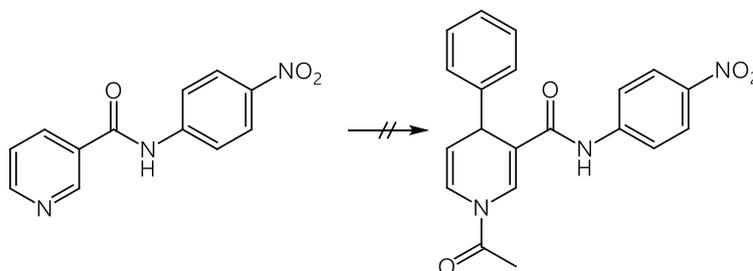


Abbildung 29: Geplante Darstellung von 1-Acetyl-*N*-(4-nitrophenyl)-4-phenyl-1,4-dihydropyridin-3-carboxamid.

Stabilität und besondere molekulare Eigenschaften von N-acylierten 1,4-Dihydropyridinen

Die Verbindungen **11** bis **21** waren während des gesamten praktizierenden Zeitraums bei einer Lagerung von -20 Grad Celsius stabil. Sie konnten problemlos einige Tage in gekühlter Umgebung ohne Qualitätsverlust gelagert werden. Jene Stabilität könnte mit der Erweiterung des konjugierten, delokalisierten π -Elektronensystems und der damit verbundenen Erniedrigung der Elektronendichte im Ringsystem korrelieren (negativ mesomerer Effekt).^[258] Daher stellen **11**, als *N*-acyliertes, vinyloges Carbamat, aber auch **12** bis **21**, als *N*-acylierte, vinyloge Harnstoffderivate durchaus beständige Verbindungen dar. Beide vinylogenen Systeme werden in ihrer Stabilität allerdings durch die ringständige Acetylgruppe gemindert. Weiterhin reduzieren Substituenten mit einem positiv mesomeren Effekt in Position drei die Robustheit der 1,4-Dihydropyridine.^[258] Ähnliche Beobachtungen beschrieb TELL bei der Synthese der *N*-Acetyl-1,4-dihydropyridine mit Benzyloxygruppen in Stellung drei. Schon während des Aufarbeitungsprozesses konnte er den Zerfall und die Bildung der Oxidationsprodukte, wie die 4-Phenylpyridinderivate, mittels Dünnschichtchromatographie (DC) detektieren.^[132] Die Oxidationsreaktion des Dihydropyridinrings zum rearomatisierten Produkt ist literaturbekannt und stellt als solche den wohl größten ausbeutelimierenden Faktor während der Umsetzung dar.^[258]

Weiterhin bestimmt auch die Variabilität der *N*-Substituenten die Stabilität der 1,4-Dihydropyridine. Verbindungen mit *N*-Alkylresten wurden als deutlich instabiler identifiziert als jene, die Acylgruppen tragen.^[259, 260] Bei der Umsetzung von Chlorameisensäurephenylester mit Nicotin säuremethylester konnte VOIGT carbamatähnliche *N*-acylierte 1,4-Dihydropyridine gewinnen, die so stabil waren, dass die anschließende Bildung der 1-Aza-9-oxafluorene ausblieb. Sie wurden für eine Weiterreaktion als ungeeignet erachtet.^[241] Diesbezüglich erweisen sich **11** bis **21** als optimale Zwischenprodukte, die ausreichend stabil aber auch noch reaktiv genug sind, um einen erfolgreichen Umsatz der Syntheseschritte iii_a/ii_b (Abbildung 23, Seite 38) zu realisieren.

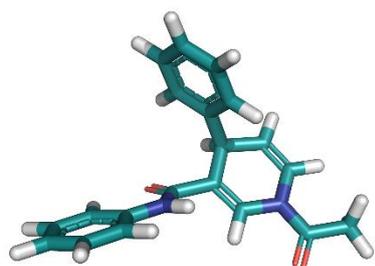


Abbildung 30: Energieminimierte Darstellung von **12**.

Zu den bekanntesten *N*-unsubstituierten 1,4-Dihydropyridinderivaten gehören Calciumkanalblocker, wie Nifedipin oder Amlodipin. In der geringsten potentiellen Energie liegen ihre Dihydropyridinringe in einer Wannenkongformation vor. Eine Derivatisierung des Heteroatoms führt zu einer Veränderung der Konformation.^[258] Somit liegt in *N*-acylierten Verbindungen, wie **11** bis **21**, der 1,4-Dihydropyridinring als planares System vor. Die Planarität ist die Folge des durch die *N*-Acetylgruppe, erweiterten konjugierten und delokalisierten π -Elektronensystems. *In silico*-Untersuchungen von **12** – durchgeführt von Dr. DINA ROBAA – bestätigten diesen planaren Grundkörper im energieminimierten Modell. Zudem ist erkennbar, wie sich die Acetylgruppe in einer Ebene mit dem 1,4-Dihydropyridinring ausrichtet. Der Phenylrest in Position vier hingegen orientiert sich pseudo-axial zum Grundkörper (Abbildung 30).^[261]

Die 3,4-disubstituierten Verbindungen **11** bis **21** sind durch ein neu entstandenes Stereozentrum in Position vier charakterisiert. Das kann aufgrund der nicht stereoselektiv verlaufenden Grignard-Addition *R*- oder *S*-konfiguriert vorliegen. Ihre Existenz konnte in Arbeiten unserer Arbeitsgruppe zur Photodimerisierung von *N*-Alkyl-1,4-dihydropyridinen belegt werden. Dieses chirale Zentrum wird durch die sich anschließende Cycloaddition und nachfolgender Aromatisierung zum 1-Aza-9-oxafluoren wieder egalisiert, sodass eine nähere Charakterisierung beider Konfigurationen in diesem Zusammenhang nicht zweckmäßig ist.

Eine weitere prägnante Eigenschaft korreliert mit der *N*-ständigen Carbonsäureamidgruppe in Position eins. Aufgrund des partiellen Doppelbindungscharakters können Amide ihre Carbonylfunktion *cis*- oder *trans*-ständig zu den Methylenprotonen des sterisch gehinderten Dihydropyridinrings ausrichten (Abbildung 31, oben, Seite 47). Sie sind dadurch in ihrer freien Beweglichkeit eingeschränkt, wodurch es zur Ausbildung von *E*- und *Z*-Rotationsisomeren kommt.^[262, 263] Derartige Rotamere lassen sich durch einen bestimmten Energieeintrag ineinander umwandeln. Durch den Einfluss äußerer Magnetfelder (B_0) - wie sie in der NMR-Spektroskopie auftreten - induzieren Doppelbindungssysteme magnetische Gegenfelder. Dadurch sind im Molekül Anisotropieeffekte zu beobachten. In der Amidgruppe richtet sich der damit verbundene Anisotropiekegel entlang der Kohlenstoff-Sauerstoff-Doppelbindung aus.^[264] Protonen, die sich ober- und unterhalb dieser gedachten Bindungsebene befinden, erfahren eine verstärkte Abschirmung des B_0 -Feldes, sodass höhere Resonanzfrequenzen für eine ^1H -NMR-Signalentwicklung notwendig sind (Abbildung 31, unten: Pluszeichen des Anisotropiekegels). Ihre Signale sind in höheren Bereichen des ^1H -Spektrums verschoben. Befinden sich die Protonen auf der gedachten Bindungsebene, so liegen sie, aufgrund verstärkter Entschirmung, tieffeldverschoben im ^1H -NMR-Spektrum vor (Abbildung 31, unten: Minuszeichen des Anisotropiekegels).^[262]

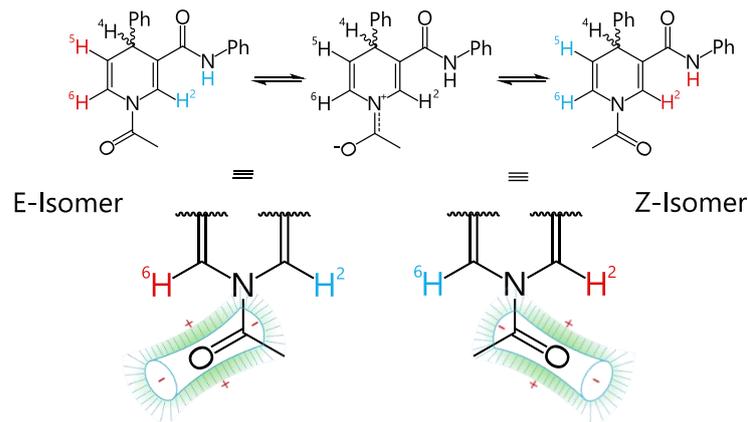


Abbildung 31: oben: partieller Doppelbindungscharakter der ringintegrierten Carbonsäureamidfunktion und Ausbildung der Z- und E-Rotamere, beispielhaft an **12**; unten: Einfluss des Anisotropiekegels auf räumlich nahe Protonen. Pluszeichen am Anisotropiekegel = Verstärkte Abschirmung, rote Wasserstoffatome = Hochfeldverschiebung der Protonen im $^1\text{H-NMR}$; Minuszeichen am Anisotropiekegel = Entschirmungseffekt, blaue Wasserstoffatome = Tieffeldverschiebung der Protonen im $^1\text{H-NMR}$.

Durch die unterschiedlichen, Rotameren-vermittelten Anisotropieeffekte sind in den $^1\text{H-NMR}$ -Spektren aller 1,4-Dihydropyridinintermediate – exemplarisch ist hierfür das $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von **12** abgebildet – Signalverdopplungen der ringständigen Wasserstoffatome sowie der Amidgruppe in Position drei zu erkennen (Abbildung 32 oder Anlage, Seite I). Das H-2-Signal von **12** ist im Z-Isomer stärker abgeschirmt und hochfeldverschoben bei 7,70 *parts per million* (ppm), während das von H-6 stärker entschirmt im Tieffeld gelegen ist ($\delta = 7,31\text{--}7,17$ ppm, durch Phenylsignale nicht zu erkennen). In der E-Form tritt genau Gegenteiliges in Erscheinung (H-2 tieffeld- und H-6 hochfeldverschoben; $\delta = 8,07$ und $7,04\text{--}6,95$ ppm).

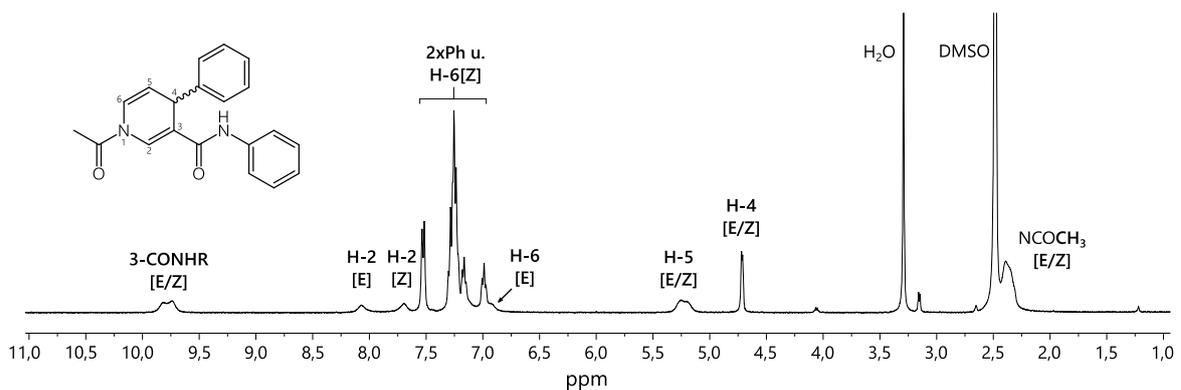


Abbildung 32: $^1\text{H-NMR}$ von **12**.

Erkennbar sind die flachen, verbreiterten sowie verdoppelten Signale der Protonen, aufgrund unterschiedlicher Rotameren-vermittelter Anisotropieeffekte. Die Signale von H-6 liegen im Bereich der Phenylgruppen und sind daher nicht beziehungsweise nur schwach zu identifizieren. Das Signal von H-6 [E] ist noch bei 6,95 zu beobachten.

Die Signale von H-2 [E] und H-2 [Z] differieren um 160 Hertz und liegen voneinander getrennt vor. Je weiter das vom Ursprung der Anisotropie beeinflusste Proton entfernt ist, desto schwächer wird der Einfluss des magnetischen Gegenfeldes der Carbonylfunktion. Daher sind die Signalunterschiede der E- sowie Z-Form von den Protonen H-4, H-5 und des N-H in Position drei bei einer

400 Megahertz-Messung so gering. Aufgrund der ermittelten Integralhöhen ist davon auszugehen, dass beide Rotamerenformen in annähernd gleichen Verhältnissen vorliegen. Exemplarisch sind die Signalverschiebungen der ringständigen Protonen sowie der Acetylgruppe von **11** und **12** in Tabelle 3 zusammengefasst.

Hinzu kommt, dass die Signale der ringständigen Protonen schlecht aufgelöst und daher, bei einer 400 Megahertz-Messung, nur als breite „Singulets“ oder dublettähnlich erkennbar sind. Ursächlich hierfür können einerseits Lösungsmiteleinflüsse – Vermessung nur im deuteriertem Dimethylsulfoxid (d_6 -DMSO) – und andererseits die durch minimale Energieeinträge induzierten schnellen Rotamerenumwandlungen sein. Dadurch verringert sich die Wahrscheinlichkeit, dass das jeweilige Rotationsisomer zu einem bestimmten Zeitpunkt der Messung anzutreffen ist, was eine Abflachung und Verbreiterung der Signale bewirkt.

Tabelle 3: Chemische Verschiebung [ppm] der ringständigen Wasserstoffatome und der Acetylgruppe in Abhängigkeit des Rotamers von **11** und **12** (Z = Rotationsisomer der Z-Form, E = Rotationsisomer der E-Form).

Verb.	H-2		H-6		H-5		H-4		NCOCH ₃	
	Z	E	Z	E	Z	E	Z	E	Z	E
11	7,84	8,13	7,24	6,97	5,22		4,41		2,34	
12	7,70	8,07	7,31-7,17	7,04-6,95	5,25		4,71		2,38	

Möglicher Reaktionsverlauf und Parallelen zu α,β -ungesättigten Carbonylverbindungen

Die Reaktion wurde als solches in der Literatur bisher nicht ausführlich beschrieben, weshalb ihr Mechanismus zur Diskussion steht. Ein selektiver Angriff von Organylcupraten in Position vier ist ebenfalls bei der 1,4-Addition von α, β -ungesättigten Carbonylverbindungen dokumentiert. Dabei übertragen die oben erwähnten NORMANT-, GILMAN- und KNOCHEL-Cuprate ihr Nukleophil selektiv auf die Position vier des konjugierten Carbonylsystems.^[265] Mit diesen Cupraten gelang auch die regioselektive Synthese von 4-substituierten 1,4-Dihydropyridinen. Daher wären die Prinzipien der 1,4-Addition von α, β -ungesättigten Carbonylverbindungen auf die vorliegende Reaktion übertragbar. Daraus ergibt sich folgende Hypothese zum Reaktionsablauf. Bei der Zugabe des Kupfer(I)-chlorids und des Lithiumchlorids in katalytischen Mengen wird ein löslicher Kupfer(I)-Lithium-Komplex gebildet. Nach Ergänzung des Phenylmagnesiumchlorids erfolgt eine Ummetallierung zum *in situ* geformten NORMANT-Cuprat, mit der allgemeinen Formel R_2CuMgX .^[265, 266] Dieses aktive Agens tritt nun in Wechselwirkung mit dem aktivierten Pyridinring. Eine Interaktion des Kupferions mit dem Ringsystem könnte den nukleophilen Angriff auf Position vier erleichtern und zu einem stabileren Übergangszustand verhelfen. Anschließend wird der Kupferkatalysator als hochreaktives $[PhCu]$ freigegeben, das wiederum durch Interaktion mit einem weiteren Grignardmolekül zum $Ph_2CuMgCl$ -Intermediat reaktiviert wird.^[266] Der mesomeriestabilisierte Übergangszustand des aktivierten Pyridiniumsalzes geht indes, unter Verlust seiner Aromatizität, in das 4-substituierte 1,4-Dihydropyridinderivat über (Abbildung 33, Seite 49).

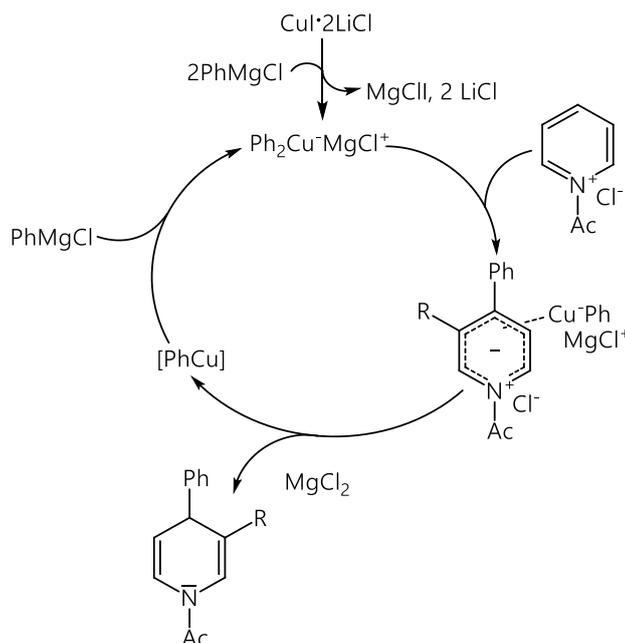


Abbildung 33: Möglich denkbare Reaktionsmechanismus zur Bildung von 1,4-Dihydropyridinen. Das *in situ* gebildete aktive Agens Ph_2CuMgCl interagiert mit dem acylierten Pyridiniumsalz. Unter Bildung des 1,4-Dihydropyridins wird die hochreaktive Kupferspezies $[\text{PhCu}]$ wieder frei und formt mit einem weiteren Grignardreagens (PhMgCl) das Ph_2CuMgCl -Intermediat (inspiriert durch eine Darstellung von MUELLER-HENDRIX).^[266]

4.1.4 Darstellung und Charakterisierung der 1-Aza-9-oxafluoren- sowie der 10-Aza-11-oxabenz[o]fluoren-Derivate des Carbamidtyps

HILGEROTH ebnete mit seinen Erfahrungen zur Synthese der 1,4,4a,9a-Tetrahydro-1-aza-9-oxafluorene den Weg zur Darstellung der 1-Aza-9-oxafluoren- beziehungsweise der 10-Aza-11-oxabenz[o]fluoren-Derivate.^[243] Dank VOIGTS Etablierung der Eintopfsynthese gelang die Umsetzung der 3,4-disubstituierten 1,4-Dihydropyridine **11** bis **20** zu den Verbindungen **22** bis **28** sowie **31** bis **50** (siehe 4.1, Abbildung 23, Seite 38, iii_a, ii_b). Dabei ging man wie folgt vor.

Beschreibung der experimentellen Durchführung

Ein Äquivalent von **11** bis **20** wurde mit 1,2 Äquivalenten des jeweiligen 1,4-Chinons in wenig trockenem Dioxan bei Raumtemperatur und unter Argonatmosphäre gelöst beziehungsweise suspendiert. Man ergänzte anschließend tropfenweise eine etwa fünfprozentige Perchlorsäure (70 %)-in-Dioxan-Lösung, woraufhin sich der Ansatz rötlich verfärbte. Falls notwendig fügte man zur vollständigen Aromatisierung des Zwischenprodukts wöchentlich ein halbes Äquivalent des entsprechenden 1,4-Chinons hinzu, bis dieses nicht mehr nachweisbar war. Nach 20 bis 50 Tagen ergänzte man zum Abbruch der Reaktion 20 bis 50 Milliliter destilliertes Wasser und stellte den pH-Wert des Gemisches auf acht bis neun ein. Nach anschließender Chloroformextraktion wurde die organische Phase am Rotationsverdampfer eingengt und säulenchromatographisch aufgearbeitet (LM 1 bis LM 5, siehe 6.2.2.1). Im Falle der Darstellung von **40** und **50** waren zusätzliche präparative HPLC-Aufreinigungen erforderlich. Der gewonnene Rückstand wurde aus dem jeweiligen

Fällungsmittel, bei zwei bis acht Grad Celsius beziehungsweise bei -20 °Grad Celsius, auskristallisiert.

Postulierter Reaktionsmechanismus

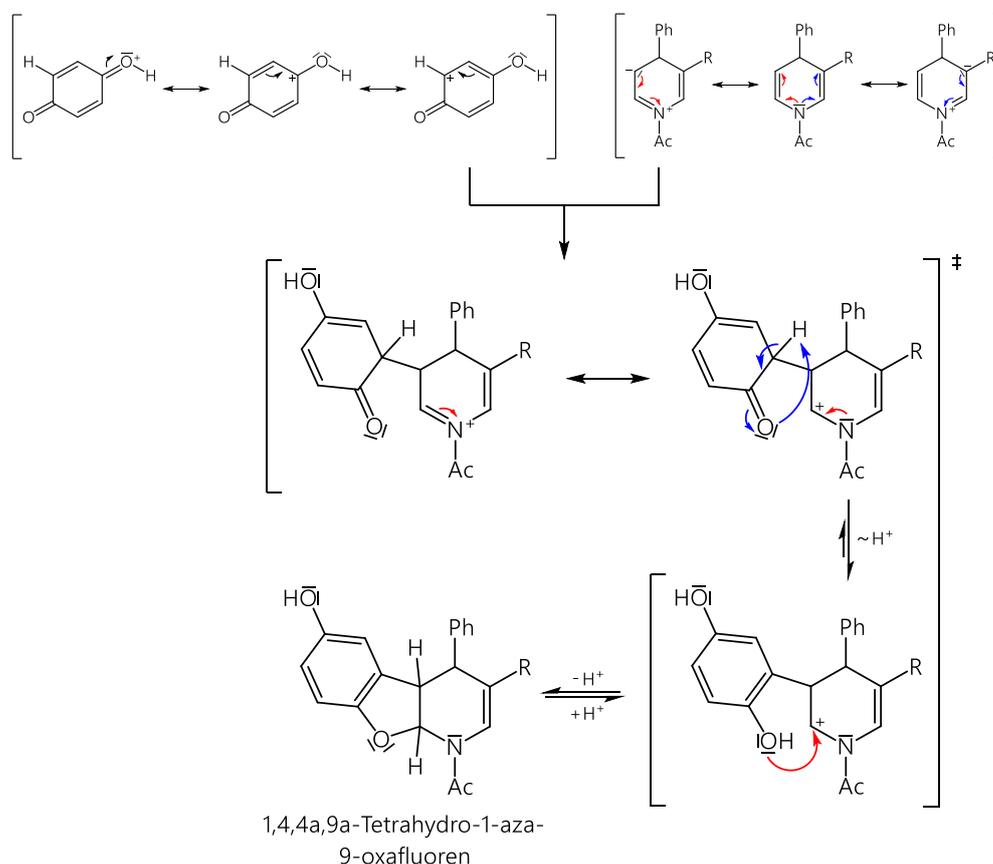


Abbildung 34: Postulierter Reaktionsweg Schritt 1 zur Gewinnung der 1,4,4a,9a-Tetrahydro-1-aza-9-oxafluorene, exemplarisch mit 1,4-Benzochinon.^[241]

Charakterisiert ist die Reaktion durch eine Keto-Enol-Tautomerie. Nach dem nukleophilen Angriff des 1,4-Dihydropyridins auf das protonierte 1,4-Benzochinon, greift wiederum die *in situ* gebildete Hydrochinonpartialstruktur die Position sechs des Heterozyklus an.

Im ersten Schritt des Reaktionsverlaufs führt eine [2+3]-Cycloaddition der 3,4-disubstituierten 1,4-Dihydropyridine mit 1,4-Chinonen zu den nicht isolierten Zwischenprodukten 1,4,4a,9a-Tetrahydro-1-aza-9-oxafluorenen beziehungsweise 6b,7,10,10a-Tetrahydro-10-aza-11-oxa-benzo[a]fluorenen (Abbildung 34). Dabei greift das 1,4-Dihydropyridinderivat mit seiner Enaminpartialstruktur - vermutlich als Michaeladdition-analoge Reaktion - das protoniert vorliegende 1,4-Chinon in Position drei nukleophil an. Anschließend wird im sauren Milieu das angegriffene 1,4-Chinon durch einen Protonentransfer in ein reduziertes, 3-substituiertes 1,4-Hydrochinonderivat umgewandelt. Wahrscheinlich liegt das Tautomeriegleichgewicht auf Seiten des energetisch bevorzugten Hydrochinons. Dieses greift wiederum intramolekular über seine Hydroxygruppe die partiell positiv geladene Position sechs der Iminiumstruktur des Dihydropyridinteils an. Daraus resultieren die oben genannten Zwischenprodukte.

Eine ähnliche Synthese beschrieben FUKUZUMI *et al.*, bei der eine Scandium-katalysierte, radikalische [2+3]-Cycloaddition von 1-Benzyl-4-*tert*-butyl-1,4-dihydropyridin und 1,4-Benzochinon zum 1-Benzyl-6-hydroxy-4-isopropyl-1,4,4a,9a-tetrahydrobenzofuro[2,3-*b*]pyridin-3-carboxamid führte (Abbildung 35).^[267]

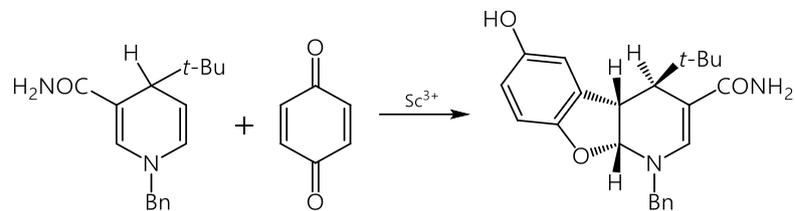


Abbildung 35: Bruttogleichung der Scandium-katalysierten Reaktion nach FUKUZUMI *et al.* unter Bildung von 1-Benzyl-6-hydroxy-4-isopropyl-1,4,4a,9a-tetrahydrobenzofuro[2,3-*b*]pyridin-3-carboxamid.^[267]

Derartige Zwischenprodukte könnten sich allerdings auch nach dem Ansatz von ENGLER *et al.* bilden. Dabei regiert Methylstyren unter Titan(IV)-vermittelter Katalyse mit einem 1,4-Benzochinon-derivat zum Cyclobutenzwischenprodukt. Dieser Reaktionsschritt könnte konzertiert ablaufen. Das gebildete Cyclobutenintermediat lagert sich final über einen pentazyklischen Übergangszustand zum stabileren 2,3-Dihydrobenzofuran-Derivat um (Abbildung 36).^[268]

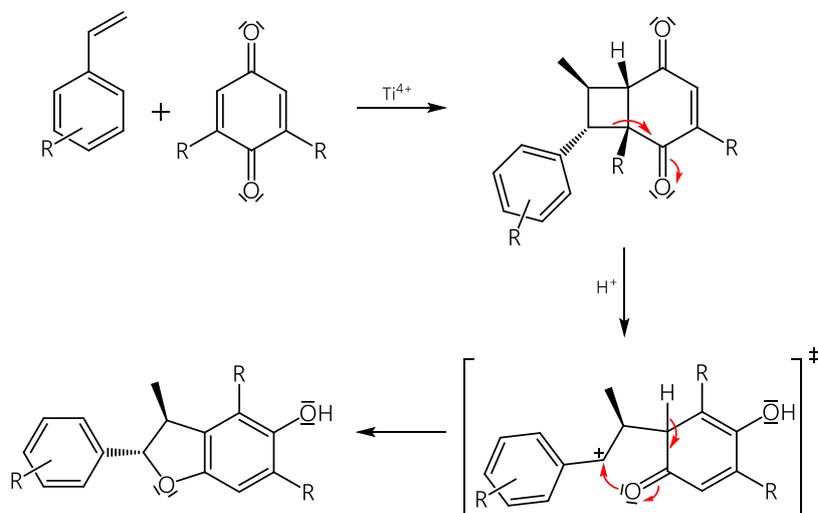


Abbildung 36: Postulierter, konzertierter Reaktionsmechanismus mit anschließender Umlagerung zum stabileren 2,3-Dihydrobenzofuran-Derivat nach ENGLER *et al.*^[268]

Der Cycloaddition schließt sich im zweiten Reaktionsschritt eine durch einen Chinonüberschuss-vermittelte Oxidation zum aromatisierten System an (Abbildung 37, Seite 52).^[241]

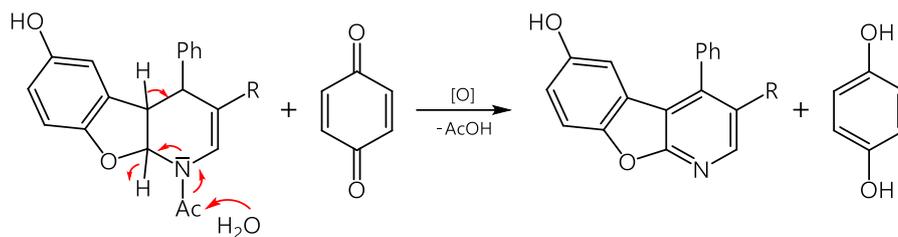
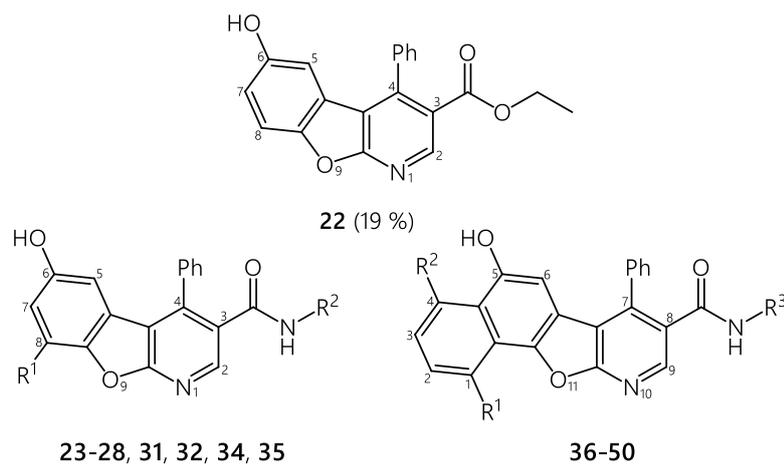


Abbildung 37: Postulierter Reaktionsweg Schritt 2 zur Gewinnung der 1-Aza-9-oxafluorene, exemplarisch mit 1,4-Benzochinon.

Ausbeuten, Nebenprodukte und charakteristische Eigenschaften

Betrachtet man die Tabelle 4 wird ersichtlich, dass die Ausbeuten der 1-Aza-9-oxafluoren- (**22-28**, **31**, **32**, **34**, **35**) beziehungsweise der 10-Aza-11-oxabenz[o]fluoren-Derivate (**36-50**) schwanken und die Reaktion nicht selektiv erfolgen kann.

Tabelle 4: Dargestellte Verbindungen der 1-Aza-9-oxafluoren- (**22-28**, **31**, **32**, **34**, **35**) beziehungsweise der 10-Aza-11-oxabenz[o]fluoren-Derivate (**36-50**) mit Ausbeuten.



Verb.	R ¹	R ²	Ausbeute	Verb.	R ¹	R ²	R ³	Ausbeute
23	H	H	3 %	36	H	H	Ph	3 %
24	H	4-CIPh	15 %	37	H	H	4-CIPh	2 %
25	H	3-CIPh	9 %	38	H	H	3-CIPh	3 %
26	H	4-MeOPh	3 %	39	H	H	4-MeOPh	2 %
27	H	3-MeOPh	3 %	40	H	H	3-MeOPh	1 %
28	H	Bn	4 %	41	H	H	Bn	3 %
31	H	2-CIBn	6 %	42	H	H	4-CIBn	2 %
32	H	4-MeOBn	2 %	43	H	H	4-MeOBn	2 %
34	H	2-MeOBn	5 %	44	MeO	H	Ph	5 %
35	Cl	3-CIPh	2 %	44-Iso	H	MeO	Ph	1 %
				45	MeO	H	4-CIPh	2 %
				46	MeO	H	3-CIPh	1 %
				46-Iso	H	MeO	3-CIPh	1 %
				47	MeO	H	4-MeOPh	2 %
				47-Iso	H	MeO	4-MeOPh	2 %
				48	MeO	H	3-MeOPh	2 %
				49	MeO	H	Bn	1 %
				50	MeO	H	4-MeOBn	1 %

Die größte Ausbeute konnte bei der Darstellung von **22** erzielt werden. Die Ausbeuten bei den 1-Aza-9-oxafluoren-Derivaten sind leicht höher als die ihrer benzoanellierten Analoga. Ursächlich hierfür sind wahrscheinlich mehrere Faktoren. Die größte Konkurrenzreaktion stellt die Oxidation des acylierten 1,4-Dihydropyridinrings, unter Bildung der aromatisierten 4-Phenylpyridinderivate, dar.^[258] Derartige Verbindungen sind literaturbekannt und wurden in vorangegangenen Arbeiten ausführlich beschrieben, sodass sie trotz ihrer Isolierung nicht weiter charakterisiert wurden.^[132, 241]

Interessanter hingegen war die Gewinnung der Nebenprodukte **31 NP** und **32 NP** bei der Darstellung von **31** und **32** (Abbildung 38). Zum einen könnten sie aus einer unvollständigen Cyclisierung und nachgelagerten Aromatisierung beider Ringssysteme resultieren. Zum anderen wäre auch denkbar, dass das Zwischenprodukt, als pH instabiles gemischtes *N, O*-Acetal, im sauren Milieu hydrolysiert und die entstandene 1,4-Dihydropyridinstruktur zum aromatischen System oxidiert wird.

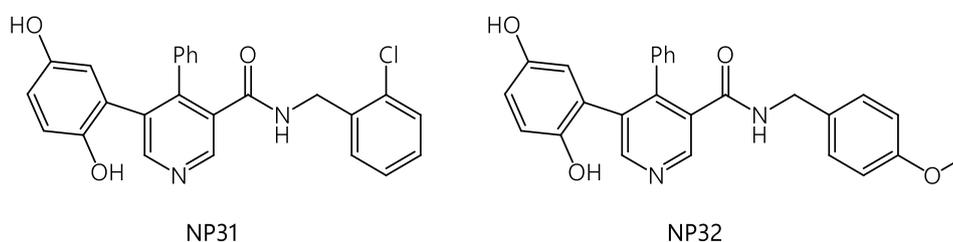


Abbildung 38: Isolierte Nebenprodukte: *N*-(2-Chlorobenzyl)-5-(2,5-dihydroxyphenyl)-4-phenylnicotinamid (**NP31**) und *N*-(4-Methoxybenzyl)-5-(2,5-dihydroxyphenyl)-4-phenylnicotinamid (**NP32**).

Des Weiteren neigen 1,4-Chinone im sauren Milieu zur Ausbildung verschiedenster polymerisierter Nebenprodukte, was zu einer Verminderung ihrer Oxidationskraft führt und somit in eine verringerte Zwischenprodukt-Aromatisierung münden kann.^[269] Der eingesetzte Überschuss an 1,4-Chinonen und ihr wöchentliches Ergänzen sollte diesen Faktor allerdings minimieren.

Nach Bildung des aromatisierten Systems waren die 1-Aza-9-oxafluorene gegenüber äußeren Einflüssen äußerst stabil. Selbst in Lösung konnten nach einem halben Jahr keine Zerfallsprodukte dünnschichtchromatographisch detektiert werden. Ihre benzoanellierten Analoga hingegen wiesen schon nach geraumer Zeit eine geringere Stabilität in Lösung sowie nach UV-Einstrahlung auf. Sie waren im gleichen Zeitraum dünnschichtchromatographisch nicht mehr zu identifizieren.

Das regide, aromatische System geht mit einer ausgeprägten Planarität einher. Damit verknüpft zeigen fast alle 1-Aza-9-oxafluorene beziehungsweise 10-Aza-11-oxabenz[*a*]fluorene eine Fluoreszenz, was ihre Detektion nach säulenchromatographischer Aufreinigung deutlich erleichterte. Dabei zeigten die 1-Aza-9-oxafluorene in Lösung sowie auf feuchter DC-Platte bei einer Wellenlänge von 254 Nanometern eine blaue sowie bei 365 Nanometern eine violette Fluoreszenz. Die benzoanellierten Verbindungen ließen aufgrund der Erweiterung des Fluorophors bei beiden Wellenlängen eine hellblaue Lumineszenz erkennen. Die isolierten 1-Methoxy- und 4-Methoxy-10-aza-11-oxabenz[*a*]fluorene fluoreszierten hingegen bei 365 Nanometern mit noch

höherer Intensität türkis. Aufgrund der quenchenden Eigenschaften von Chlorsubstituenten am Aromaten konnte im Fall von **35** bei beiden Wellenlängen keine Lumineszenz beobachtet werden.

Syntheseweg B, Schritt iii_b: Darstellung der 1-Aza-9-oxafluorene des 3-Carbamidtyps durch Aminolyse

Die aminolytische Umsetzung des 1-Aza-9-oxafluoren-3-ethylesters (**22**) zur Darstellung der Carbonsäurebenzylamide sollte unter milden Bedingungen schnell und effektiv erfolgen. Zur Gewährleistung eines erfolgreichen Umsatzes sind Amine mit hoher nukleophiler Potenz vorzuziehen. Idealerweise wären daher sterisch kleine, aliphatische Amine, aufgrund des isolierten freien Elektronenpaares an der Aminogruppe, die erste Wahl. Diese Voraussetzung erfüllen die aromatischen Analoga, bei denen das freie Elektronenpaar im delokalisierten Ringsystem inkorporiert ist, nicht. Die daraus resultierende, verminderte Nukleophilie lässt die Carbonsäureamidbildung aus Carbonsäureestern unvollständig ablaufen beziehungsweise gänzlich versagen.

Durch die zusätzliche Methylenbrücke in den Benzylaminderivaten ist das freie Elektronenpaar der Aminogruppe vom Phenylring separiert. Der Phenylring übt lediglich einen $-I$ -Effekt auf die Aminogruppe aus. In der Konsequenz ist die nukleophile Reaktivität der Aminopartialstruktur gesenkt und die aminolytische Umsetzung erschwert. Zur erhofften leichter zugänglichen Gewinnung der Carbonsäurebenzylamide verfolgte man daher eine von HUANG *et al.* beschriebene Methode. Sie setzten Ethylester und Lactone mit benzyllischen Aminen innerhalb weniger Stunden, unter Verwendung von Diisobutylaluminiumhydrid (DIBAL), um. Sie postulieren, dass sich *in situ* aus DIBAL und dem Amin eine Organoaluminium-Spezies, mit der allgemeinen Formel $i\text{-Bu}_2\text{AlH-BnNH}_2$, bildet. Dieses aktive Agens soll zu Produktisolierungen mit hohen Ausbeuten führen.

Zu Beginn löste man dafür ein Äquivalent DIBAL bei null Grad Celsius sowie unter Argon-Schutzgasatmosphäre in absolutem THF. Folglich ergänzte man ein Äquivalent von 4-Chlorobenzylamin. Die resultierende Wasserstoffentwicklung sollte die Entstehung des aktiven Agens anzeigen. In einem separaten Ansatz wurde **22** ebenfalls in THF gelöst und das $i\text{-Bu}_2\text{AlH-4-ClBnNH}_2$ enthaltene Gemisch nach zweistündiger Wartezeit tropfenweise hinzugefügt. Nach wiederum zwei Stunden konnte mittels dünnschichtchromatographischer Verlaufskontrolle kein Umsatz beobachtet werden, sodass man den Ansatz weitere vier Tage lang ruhen ließ. Nach Ablauf dieser Zeit konnte zusätzlich zum Edukt ein weiterer blau fluoreszierender Spot auf der DC detektiert werden. Mit Hilfe einer massenspektrometrischen Untersuchung konnte die zum Produkt gehörige Massenzahl von 429,1 nachgewiesen werden. In Erwartung, dass der Umsatz sich weiter steigern würde, ließ man den Ansatz weitere Wochen bei Raumtemperatur rühren. Nach insgesamt drei Monaten wurde der Versuch abgebrochen und säulenchromatographisch aufgereinigt. Das gewünschte Produkt konnte jedoch nicht isoliert werden.

Nach dem Versagen dieser Methodik entschloss man sich, einen herkömmlichen Weg zu verfolgen. Dazu wurde **22** in einer Methanol-Wasser-Mischung, im Verhältnis von eins zu eins, gelöst und mit einem großen Überschuss des jeweiligen Benzylamins versetzt (Abbildung 39, Seite 55).

Die Ansätze lagerte man unter gelegentlichem Schwenken für eineinviertel Jahre bei zwei bis acht Grad Celsius. Anschließend reinigte man sie säulenchromatographisch auf. Dabei konnten die Verbindungen **29** (10 %), **30** (11 %) und **33** (19 %) erhalten werden.

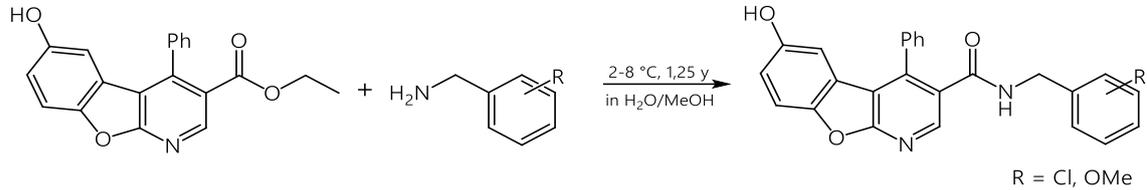


Abbildung 39: Darstellung von **29**, **30** und **33** durch Aminolyse von **22**.

4.1.4.1 Strukturaufklärung mittels NMR-Analytik

Zur Strukturaufklärung der 1-Aza-9-oxafluoren- beziehungsweise der 10-Aza-11-oxa-benzo[*a*]fluoren-Verbindungen kam im Wesentlichen die ^1H -NMR-Analytik zum Einsatz. Zur weiteren Absicherung der Substitutionsmuster wurden teilweise ^{13}C -, ^1H - ^1H -COSY-, NOESY-, HSQC- und HMBC-Spektren aufgenommen. Da das Lösungsmittelsignal von deuteriertem Chloroform im ^1H -NMR-Spektrum innerhalb der für die Auswertung wichtigen aromatischen Wasserstoffsignale - im Bereich von 6,96 bis 7,14 *part per million* (ppm) - liegt, wurden die Proben ausschließlich in DMSO- d_6 – Lösungsmittelsignal bei 2,50 ppm – aufbereitet. Die NMR-Spektren der hier beschriebenen Verbindungen sind in den Anlagen nochmals vergrößert dargestellt beziehungsweise befinden sich dort die hier nicht abgebildeten Spektren.

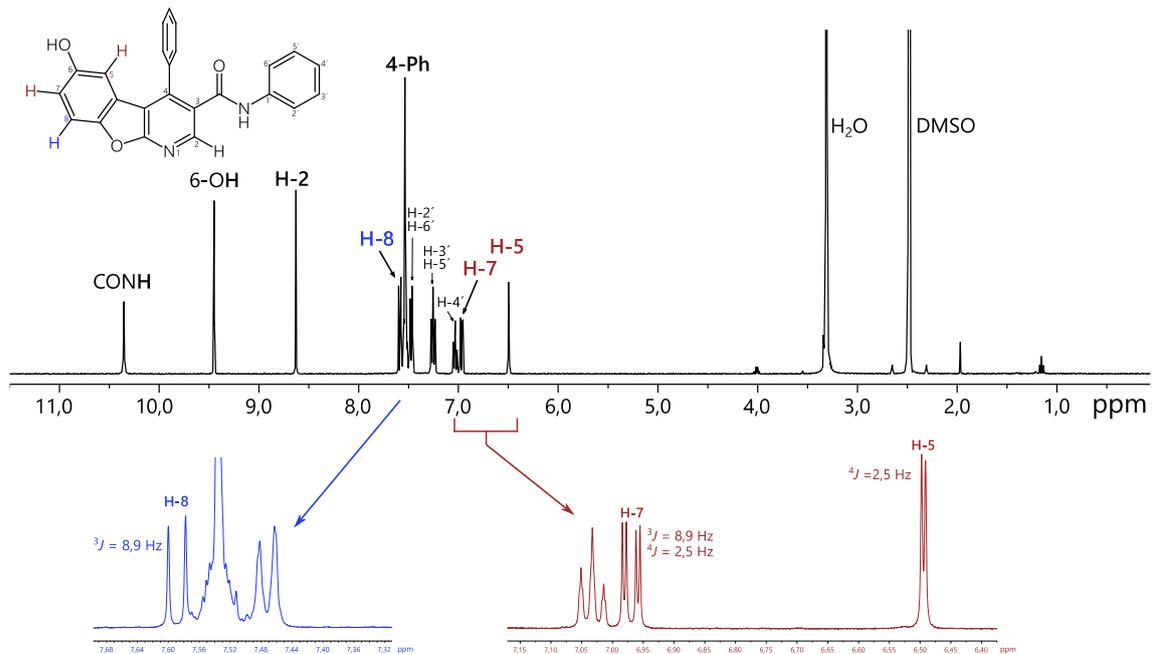


Abbildung 40: oben: ^1H -NMR-Spektrum von **23**; unten: vergrößerte Bereiche zur Charakterisierung von H-5, H-7 und H-8.

Beispielhaft für die 1-Aza-9-oxafluoren-Derivate soll das $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von **23** näher betrachtet werden (Abbildung 40, Seite 55 oder Anlage, Seite II). Erwartungsgemäß liegen die Signale der Protonen H-2, H-7 und H-8 tieffeldverschoben im aromatischen Bereich des $^1\text{H-NMR}$ -Spektrums vor. H-2 weist, verursacht durch das ringständige Stickstoffatom in Position eins, die größte Tieffeldverschiebung ($\delta = 8,62$ ppm) auf.

Die Signale von H-5 ($\delta = 6,51$ ppm) und H-7 ($\delta = 6,98$ ppm) sind aufgrund des Orthoeffekts der Hydroxygruppe in Position sechs – der +M-Effekt der OH-Gruppe erhöht die Elektronendichte im Aromaten und die damit verbundene Abschirmung auf benachbarte Protonen – im Vergleich zu H-8 ($\delta = 7,58$ ppm) hochfeldverschoben. H-7 zeigt zusätzlich zur vicinalen Kopplung mit H-8 ($^3J_{7/8} = 8,9$ Hz) eine *long range*-Kopplung mit H-5 ($^4J_{5/7} = 2,5$ Hz), sodass sich sein Signal in einem Dublett von Dublett aufspaltet. Durch die Kopplung mit H-7 ist H-5 als Dublett ($^4J_{5/7} = 2,5$ Hz) aufgelöst und liegt am stärksten hochfeldverschoben vor. Diese Feldverschiebung liegt, zusätzlich zum Orthoeffekt der Hydroxygruppe, in der sterischen Ausrichtung des Phenylringes in Position vier begründet. Dieser orientiert sich in seiner kleinsten energieminierten Konformation um 109 Grad gedreht zum restlichen rigidem Gerüst (Abbildung 41 links). Das bestätigen *in silico*-Untersuchungen von **23**, die von Dr. DINA ROBAA durchgeführt wurden.^[261] Ähnlich, wie der in Abschnitt 4.1.3 beschriebene Anisotropieeffekt der Carbonylgruppe, induziert auch das delokalisierte π -Elektronensystem des aromatischen Ringes ein magnetisches Gegenfeld. Kerne die ober- und unterhalb der Ringebene liegen, wie H-5, erfahren durch die magnetische Abschirmung eine Hochfeldverschiebung (Abbildung 41 rechts). Liegt im zeitlichen Mittel der $^1\text{H-NMR}$ -Messung vorrangig die Konformation mit der geringsten potentiellen Energie vor, so sind die Signale von H-5 ins Hochfeld verschoben. Dieses Phänomen war in allen $^1\text{H-NMR}$ -Spektren der Endverbindungen festzustellen.

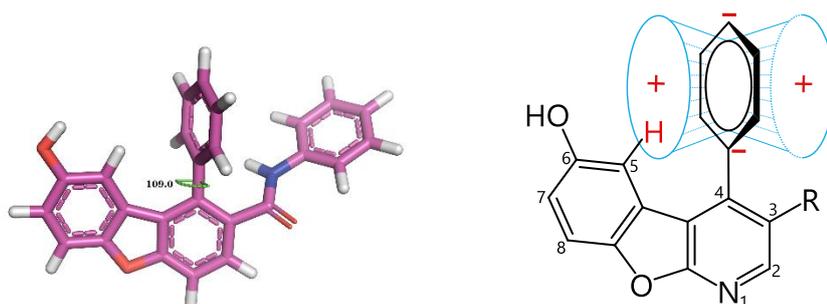


Abbildung 41: links: Energieminimierte Darstellung von **23** mit einem 109 Grad Torsionswinkel des 4-Phenylringes zum rigidem System; rechts: Ringstrommodell zur Erklärung der Anisotropie des 4-Phenylringes und die Einflussnahme auf das Protonen H-5.

In den ^1H -Spektren der 1-Aza-9-oxafluoren-3-anilide ist das N-H-Signal stark entschirmt (**23**, $\delta = 10,35$ ppm). Ursächlich hierfür sind zum einen der Anisotropieeffekt der Carbonylgruppe und zum anderen die elektronenziehende Eigenschaft des N-ständigen Phenylrestes. In den 3-Benzylamidderivaten hingegen isoliert die zusätzliche Methylenbrücke die Carbamidfunktion

vom Phenylrest. In der Folge wird sein elektronischer Einfluss minimiert und eine Signalverschiebung des N-H (**28**, $\delta = 8,81$ ppm) um 616 Hertz bei einer 400 Megahertz-Messung beobachtet. Zudem geht das N-H-Signal, aufgrund zusätzlicher Kernkopplung mit der Methylengruppe, von einem Singulett in ein Triplett ($^3J_{\text{NH/CH}_2} = 5,9$ Hz) über.

Bei der Synthese von **35** – unter Verwendung von 2-Chloro-1,4-benzochinon – ist die Entstehung zweier Stellungsisomere prinzipiell möglich. Dabei befindet sich der Chlorrest entweder in Position sieben oder acht des Grundkörpers. Aus sterischen Gesichtspunkten sollte sich das 8-Chlor-Stellungsisomer deutlich häufiger bilden. Bei der säulenchromatographischen Aufreinigung konnte nur eines der beiden Isomere isoliert werden. Im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum des 7-Chlor-Stellungsisomers wären isolierte Singulett-Signale von H-5 und H-8 zu erwarten. Bei Betrachtung des ^1H -Spektrums zeigten sich hingegen (siehe Anlage, Seite IV) bei 7,07 ppm und 6,46 ppm Dublettsignale mit je einer Kopplungskonstante von 2,3 Hertz, was eindeutig auf das 8-Chlor-Stellungsisomer schließen lässt.

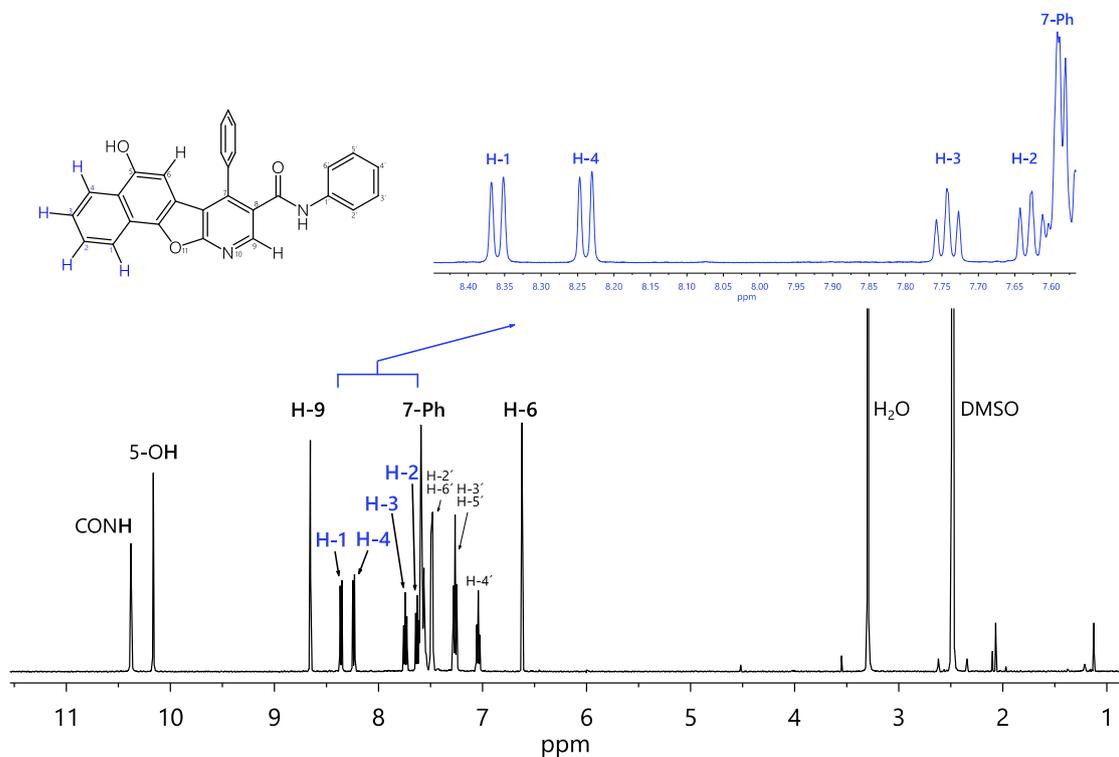


Abbildung 42: $^1\text{H-NMR}$ von **36**, oben rechts: Hervorhebung des Bereiches von 8,40 bis 7,60.

Vergleicht man die $^1\text{H-NMR}$ -Spektren von **23** und **36** miteinander, so lässt sich erkennen, dass die Anellierung eines zusätzlichen Benzenringes eine Tieffeldverschiebung der ringständigen Kerne bewirkt. Durch diese Erweiterung des konjugierten Systems verstärken sich der Anisotropieeffekt des rigiden Ringgerüsts und die damit einhergehende Entschirmung. Daher ist vor allem das Signal der phenolischen Hydroxygruppe bei **36** ($\delta = 10,17$ ppm, Abbildung 42 oder Anlage, Seite VI), im Vergleich zu **23** ($\delta = 9,45$ ppm, Abbildung 40, Seite 55 oder Anlage, Seite II), um 288 Hertz tieffeldverschoben. Durch die Anellierung bildet der zur Hydroxygruppe benachbarte

Kern von H-6 ($\delta = 6,62$ ppm) in **36** keine *long-range*-Kopplung mehr aus. Somit ist bei einer 400 Megahertz-Messung nur noch ein Singulett vorhanden.

Die Zuordnung von H-1 ($\delta = 8,36$ ppm) und H-4 ($\delta = 8,24$ ppm) sowie die von H-2 und H-3 erfolgte unter Zuhilfenahme von ^1H - ^1H -COSY-, HSQC- und HMBC-Spektren. Mittels des *Heteronuclear Single Quantum Coherence*-Spektrums (HSQC) ermittelt man ^1H - ^{13}C -Korrelationen von direkt aneinander gebundenen Wasserstoff- und Kohlenstoffatomen (1J -Kopplungen, von **36** siehe Anlage, Seite VIII). Daraus ableitend lassen sich im *Heteronuclear Multiple Bond Correlation*-Experiment (HMBC) geminale, vicinale sowie *long range*-Kopplungen, also 2J -, 3J - und 4J -Kopplungen, von ^1H - mit ^{13}C -Kernen identifizieren.

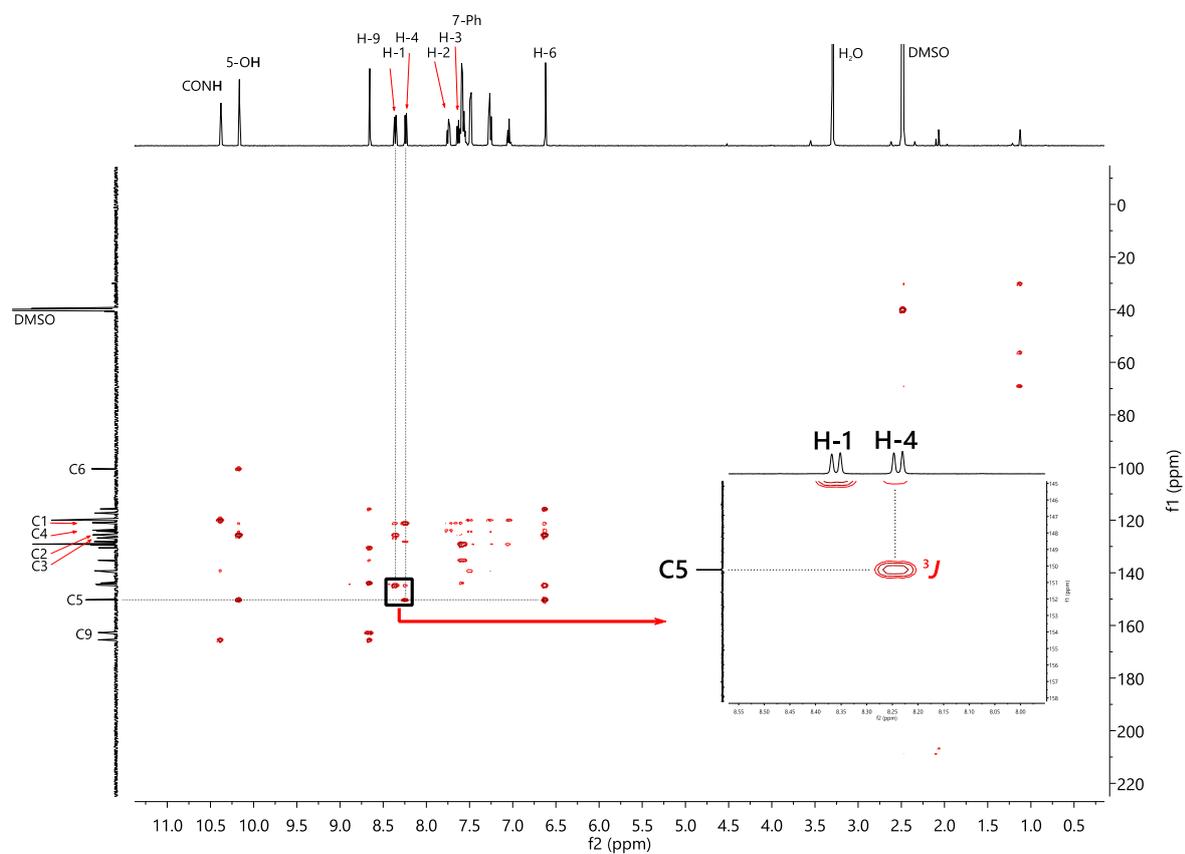


Abbildung 43: Gesamt-HMBC-Spektrum von **36**, mit Ausschnitt des Bereiches, der die vicinale Kopplung von H-4 und C5 anzeigt.

Als erstes sollte bei **36** mittels HMBC (Abbildung 43 oder Anlage, Seite IX) das Signal des quartären C-5-Kerns ermittelt werden. Dieser sollte geminale Kopplungen – visualisiert durch Kreuzsignale - zu den ^1H -Kernen des 5-OH und H-6 aufzeigen. Das Kohlenstoff-Signal bei 150,23 ppm erfüllte diese Voraussetzungen. Der C-5-Kern würde lediglich mit H-4 ein deutliches Kreuzsignal (3J -Kopplung) ausbilden. H-1 ist sterisch weiter vom C-5-Kern entfernt, sodass eine Signalbildung (4J -Kopplung) im 400 Megahertz-Spektrum schwach bis gar nicht ausgeprägt wäre. Allein das Wasserstoffsignal bei 8,24 ppm zeigt eine solch starke Kopplung. Somit können eindeutig die Signale bei 8,24 ppm dem H-4-Kern und bei 8,36 ppm dem H-1-Atom zugeordnet werden.

Die ^1H - ^1H -COSY-Auswertung dient zur Ermittlung der Korrelation von Nachbarschaftswasserstoffkernen. Das ^1H - ^1H -COSY-Spektrum von **36** zeigte starke Kreuzsignale von H-2 ($\delta = 7,74$ ppm) mit H-4 und H-3 ($\delta = 7,66$ bis $7,35$ ppm) mit H-1 (siehe Anlage Seite VII). Somit ist es gelungen die Protonen des anellierten Ringsystems eindeutig zuzuordnen.

Das theoretische Aufspaltungsmuster von H-1 und H-4 in den ^1H -NMR-Spektren der 10-Aza-11-oxabenz[*a*]fluoren-Verbindungen wäre, aufgrund drei möglicher Kopplungspartner, durch ein Dreifachdublett (ddd) charakterisiert. Infolge kleiner 4J - und 5J -Kopplungskonstanten kollabieren die Signale in allen 400 Megahertz-Spektren allerdings zum Doppeldublett (dd) beziehungsweise zum Dublett (d). Daher wurden alle Signale vereinheitlicht als Dubletts im experimentellen Teil ausgewertet. H-2 und H-3 zeigen ebenfalls Dreifachdublett-Aufspaltungsmuster. Aufgrund zweier vicinaler Kopplungen konnte im Falle von **39** bei H-2 diese Signalaufspaltung softwaregestützt nachgewiesen werden ($^3J = 8,2$ Hz, $^3J = 6,9$ Hz, $^4J = 1,2$ Hz). Alle anderen Signale von H-2 sowie H-3 lösen sich bei einer 400 Megahertz-Messung nur als Pseudotriplett („t“) auf.

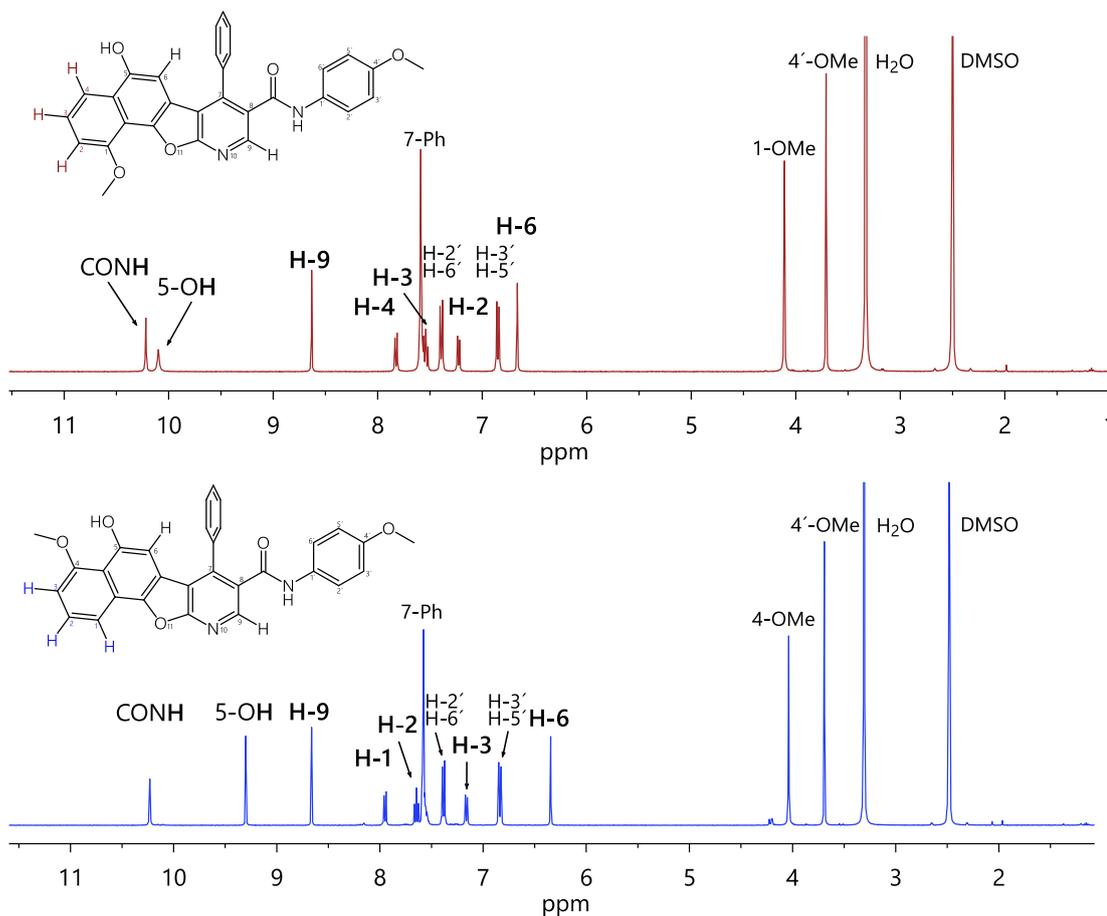


Abbildung 44: ^1H -NMR-Spektren von **47** (rotbraun, oben) und **47 Iso** (blau, unten).

Bei der Umsetzung der 1,4-Dihydropyridine mit 5-Methoxy-1,4-naphthochinon entstehen zwei Stellungsisomere. Nach säulenchromatographischer Aufreinigung konnten 1-Methoxy-10-aza-11-oxabenz[o]fluorene sowie ihre 4-Methoxy-Analoga im ungefähren Verhältnis von zwei zu eins isoliert werden. Zur Strukturaufklärung und Zuordnung des Substitutionsmusters führte man wie die bei **36** beschriebenen NMR-Experimente durch. Exemplarisch dafür wird die Spektrenaufklärung von **47** und **47 Iso** beschrieben.

Bei Betrachtung der ^1H -NMR-Spektren ist auffällig, dass das Signal von H-6 bei **47 Iso** ($\delta = 6,34$ ppm) um 124 Hertz stärker hochfeldverschoben vorliegt als bei seinem Stereoisomer **47** ($\delta = 6,65$ ppm, Abbildung 44, Seite 59, **47** oben und rotbraun, **47 Iso** unten und blau oder Anlage, Seite XI und XV). Das könnte mit den unterschiedlichen negativen Partialladungsverteilungen in den mesomeren Grenzstrukturen zusammenhängen. Im Gegensatz zu **47** (siehe Anlage, Seite XII) ist die partiell negative Ladung bei **47 Iso** an Position sechs stärker vorherrschend. Diese führt zu einer größeren Abschirmung des H-6-Protons und äußert sich in eine Hochfeldverschiebung (Abbildung 45).

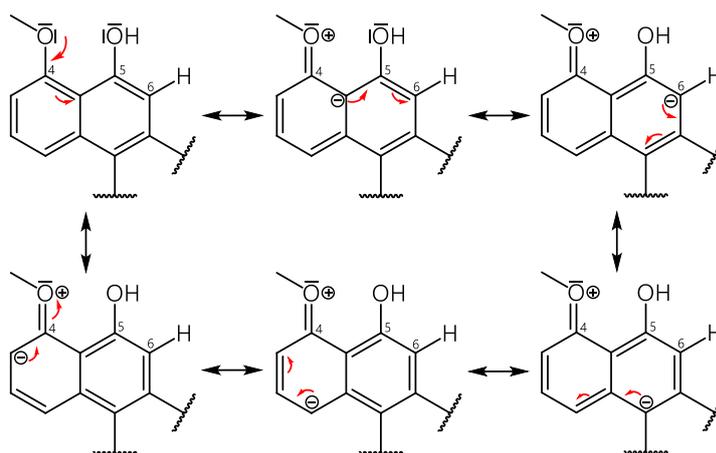


Abbildung 45: Mesomere Grenzstrukturen der Naphtholpartialstruktur von **47 Iso**.

In beiden Isomeren ist weiterhin eine deutliche Differenz der 5-OH-Signale zu erkennen (**47** $\delta = 10,08$ ppm; **47 Iso** $\delta = 9,30$ ppm). Die Methoxygruppe, als großer voluminöser Rest, ist befähigt durch ihre Van-der-Waals-Kräfte die Elektronenhülle sterisch naher Gruppen zu beeinflussen. Daher bestand die Hypothese, dass sie in **47 Iso** die Hydroxygruppe in Richtung des Anisotropiekegels der Phenylgruppe in Position sieben drängt. Folglich wäre die Hydroxyfunktion stärker abgeschirmt und ihr ^1H -NMR-Signal hochfeldverschoben. Diese Vermutung konnte *in silico* leider nicht bestätigt werden. Dennoch scheint der sterische Einfluss für diese Signalverschiebung bedeutsam zu sein. Zudem sind die Eigenschaften des eingesetzten Lösungsmittels zu berücksichtigen. Bei allen in $\text{DMSO-}d_6$ vermessenen ^1H -NMR-Proben der 1-Aza-9-oxafluoren- sowie 10-Aza-11-oxabenz[o]fluoren-Verbindungen, abgesehen von den 4-Methoxy-10-Aza-11-oxa-

benzo[*a*]fluorenen, sind die Signale der 6-OH-, beziehungsweise 5-OH-Gruppe, durch starke Tieffeldverschiebungen charakterisiert (**23**, $\delta = 9,45$ ppm; **36**, $\delta = 10,17$ ppm). Sterisch nicht gehinderte Hydroxygruppen werden vom DMSO, unter Ausbildung intermolekularen Wasserstoffbrücken, maximal solvatisiert. Die Folge ist eine verstärkte Entschirmung des Protons, die sich durch eine Tieffeldverschiebung zeigt. In anderen Lösungsmitteln, die keine oder im geringen Maße Wasserstoffbrücken zum Molekül aufbauen, sind ihre Resonanzsignale deutlich hochfeldverschoben. Befinden sich raumgreifende Gruppen in Nachbarschaft zur Hydroxygruppe, wie bei **47 Iso**, wird diese nicht vollständig vom DMSO solvatisiert. Dadurch wird das Proton der phenolischen Gruppe weniger stark entschirmt und ihr Resonanzsignal verschiebt sich ins Hochfeld.

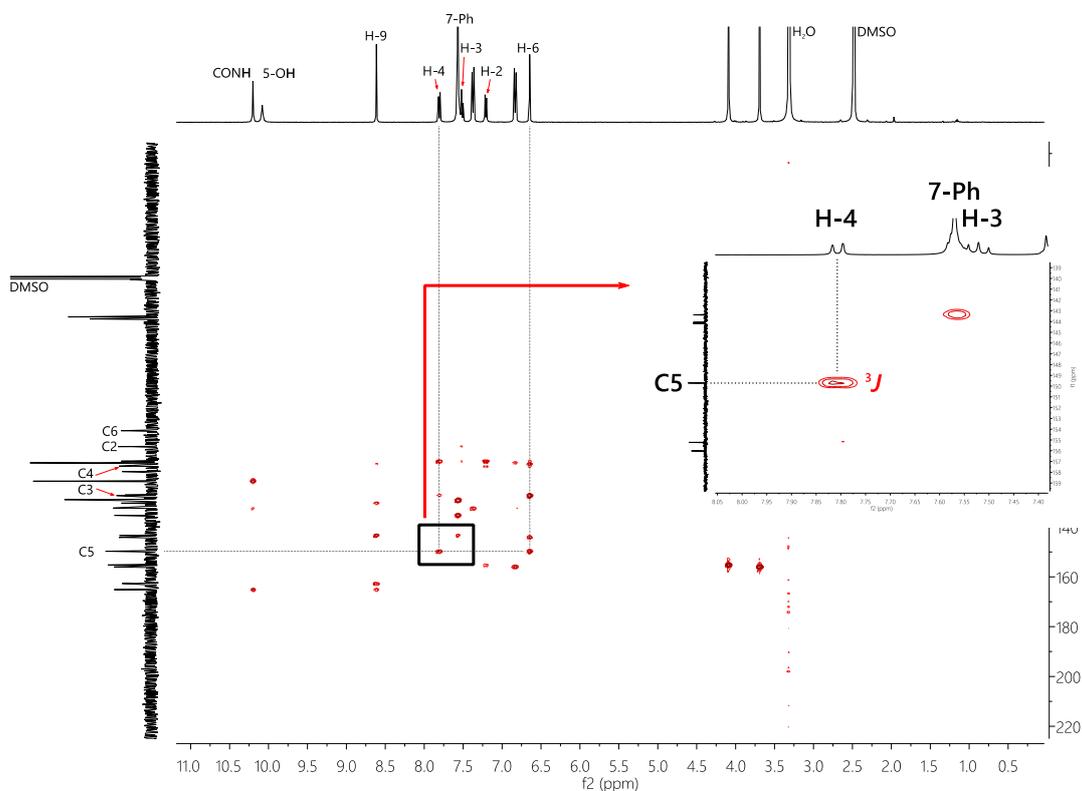


Abbildung 46: HMBC von **47** zur Differenzierung der Strukturisomere.
Hervorgehobener Bereich zeigt eine Kreuzkopplung der Kerne H-4 und C5.

Zur eindeutigen Unterscheidung der Stereoisomere und Zuordnung zu den jeweiligen NMR-Spektren betrachtete man zusätzlich die HMBC-Ergebnisse von **47** und **47 Iso**. Essentiell für die Strukturaufklärung ist wiederum das quartäre Kohlenstoffatom an Position fünf, das Kreuzsignale zu den ^1H -Kernen des 5-OH und H-6 aufweisen sollte. Im HMBC-Spektrum von **47 Iso** war das für das Signal des Kohlenstoffkerns bei 151,10 ppm zutreffend (siehe Anlage Seite XVII). Im HMBC-Spektrum von **47** (Abbildung 46) kann nur die Wechselwirkung mit dem H-6 ermittelt werden. Das Signal von 5-OH ist, aufgrund des zu schnellen Austausches des Protonens mit den Deuteriumatomen des Lösungsmittels, zu schwach ausgeprägt und verbreitert, sodass keine Kopplung

zum C5-Kern registriert werden kann. Derartige Vorkommnisse sind literaturbekannt und beeinflussen den Tatsachenbestand nicht. Somit ist das Signal bei 149,71 ppm dem C5 zuzuordnen. Das C5 muss im HMBC-Spektrum von **47** eine 3J -Kopplung zum H-4 ausbilden. Bei **47 Iso** hingegen ist die Position vier substituiert, sodass eine Wasserstoff-Kohlenstoff-Wechselwirkung nicht auftreten sollte. Das C5 von **47 Iso** kann lediglich eine 4J -Kopplung zum H-1 aufbauen, die allerdings deutlich schwächer im HMBC-Spektrum zu erkennen wäre. Nach Auswertung der HMBC-Spektren kann somit eindeutig die Isomerenzuordnung erfolgen. Tatsächlich zeigt nur **47** eine Kreuzkopplung von den Kernen H-4 und C5 (Abbildung 46, Seite 61). Das HMBC-Spektrum von **47 Iso** zeichnet sich durch das Fehlen dieses Kreuzsignals aus (siehe Anlage Seite XVII). Somit gelingt es eindeutig mittels NMR-Analytik die Stellungsisomere zu differenzieren. Anschließend erfolgte durch Auswertung der ^1H - ^1H -COSY-Experimente die Zuordnung von H-2 und H-3.

4.2 Teilabschnitt II: Synthese und Analytik von 1-Aza-9-oxafluoren- sowie der 10-Aza-11-oxabenz[*a*]fluoren-Derivate des Oximethertyps

Laut dem Stand von 2001 enthielten 20 der durch die *Food and Drug Administration* (FDA) auf dem US-Markt zugelassenen Arzneimittel eine Oximetherpartialstruktur.^[270] Diese charakteristische Gruppe ist unter physiologischen Bedingungen stabil.^[271] Aufgrund des negativ induktiven Effekts des Heteroatoms in Nachbarschaft zur Iminfunktion wird die Basizität des Oximethers verringert. In der Folge ist die Protolyse im Vergleich zur normalen Iminfunktion erschwert. Aus dem gleichen Grund sind Oximether hydrolyseresistenter als ihre Stickstoff-tragenden Analoga, die Hydrazone.^[272] Befinden sich Aromaten, wie Pyridin, in Konjugation zur Oximfunktion, so steigert sich die Stabilität enorm.^[273] Daher stellen aromatische *O*-Alkyl- sowie *O*-Benzyloximether interessante Zielstrukturen mit potentieller Proteinkinaseaktivität dar. Durch das Einführen variierend großer lipophiler Reste an der Oximfunktion sollten unterschiedlich stark ausgeprägte Wechselwirkungen mit der hydrophoben Bindetasche des *Target*-Enzyms untersucht werden. Weiterhin war man bestrebt, die Interaktion des freien Oxims als OH-acider Wasserstoffbrückendonator abschätzen zu können.

Die Synthese von 3/8-*O*-Alkyl- oder 3/8-*O*-Benzyloximether-Derivaten der 6-Hydroxy-4-phenyl-1-aza-9-oxafluorene beziehungsweise der 5-Hydroxy-7-phenyl-10-aza-11-oxabenz[*a*]fluorene erfolgte zum einen über eine drei-Stufen-Synthesekaskade ausgehend vom Nicotinaldehyd (Abbildung 47, Seite 63, Syntheseweg A). Dabei wurden in den Schritten i_{a1} , i_{a2} und i_{a3} die *O*-Nicotinaldehydalkyloxime sowie -benzyloxime durch die Synthese des intermediär gebildeten Nicotinaldehydoxims (**65**) mit Alkylantien oder durch die Umsetzung von Nicotinaldehyd mit vorab isolierten *O*-Benzylhydroxylaminhydrochloriden gewonnen. Die erhaltenen Verbindungen wurden analog

zum Teilabschnitt I über die *N*-Acetyl-4-phenyl-1,4-dihydropyridin-Derivate (ii_a) zu ihren aromatisierten Systemen umgesetzt (iii_a). Zum anderen gelang die Darstellung der Endverbindungen über den Syntheseweg B (Abbildung 47). Hierbei erfolgte die Synthese über die Gewinnung von Nicotinaldehyd-*O*-ethyloxim (**67**), das als Schutzgruppe der Aldehydfunktion dienen sollte (i_b). Im weiteren Schritt forcierte man die Darstellung des *N*-Acetyl-4-phenyl-1,4-dihydropyridin-3-carbaldehyd-*O*-ethyloxims (**72**, ii_b). Im Anschluss daran setzte man das isolierte 1,4-Dihydropyridinsubstrat mit 1,4-Benzochinon oder 1,4-Naphthochinon zum 6-Hydroxy-4-phenylbenzofuro[2,3-*b*]pyridin-3-carbaldehyd-*O*-ethyloxim (**79**) sowie zu dessen benzoanellierten Analogon (**90**) um (iii_b). Die Schutzgruppe wurde im darauffolgenden Schritt abgespalten (iv_b), sodass die resultierende freie Aldehydfunktion (**76**, **87**) mit weiteren *O*-Benzylhydroxylaminhydrochlorid-Derivaten zu den gewünschten Endverbindungen umgesetzt werden konnte (v_b).

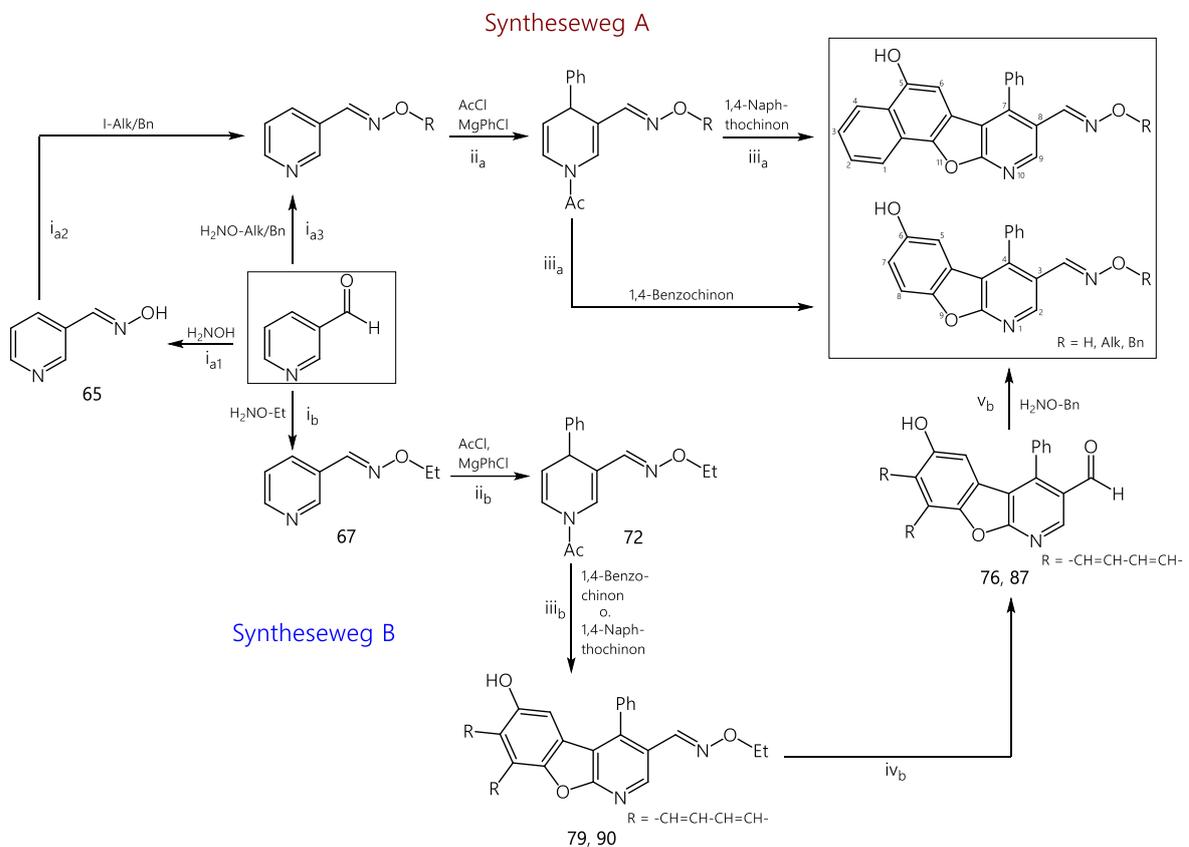


Abbildung 47: Synthesepfad der 6-Hydroxy-4-phenyl-1-aza-9-oxafluorene beziehungsweise der 5-Hydroxy-7-phenyl-10-aza-11-oxabenzofuro[2,3-*b*]fluorene des Oximethertyps über zwei Reaktionswege.

4.2.1 Synthese der O-Alkyl- und O-Benzylloximether

Synthese von Nicotinaldehydoxim (**65**)

Die Darstellung der Nicotinaldehyd-O-alkyloxime sowie -O-benzylloxime sollte anfangs traditionell über das Nicotinaldehydoxim-Zwischenprodukt (**65**) erfolgen. Zur Darstellung von **65** wurde im Schritt i_{a1} (Abbildung 47, Seite 63, Syntheseweg A,) ein Äquivalent Nicotinaldehyd mit zwei Äquivalenten Hydroxylaminhydrochlorid, unter Zugabe von zwei Äquivalenten Natriumacetat, in Ethanol umgesetzt. Die anfangs farblose Lösung ging nach 24 Stunden in eine Suspension über. Zum Abbruch der Reaktion extrahierte man den Ansatz mit Ethylacetat gegen Brine und befreite ihn von organischem Lösungsmittel. Nach 48 -stündiger Trocknung im Exsikkator konnte die gewünschte Verbindung mit 99 Prozent Ausbeute erhalten werden.^[274]

Natriumacetat fungiert als Base und deprotoniert das quartäre Ammoniumion des Hydroxylaminhydrochlorids. Die dadurch gebildete Essigsäure protoniert wiederum die Carbonylfunktion des Nicotinaldehyds, die somit stärker polarisiert vorliegt. Die freie Base des Hydroxylamins ist somit in der Lage, dass partiell positiv polarisierte Kohlenstoffatom der Carbonylgruppe, unter Bildung eines Halbaminals, leichter nukleophil anzugreifen. Im sauren Milieu erfährt die temporär gebildete Hydroxygruppe eine zusätzliche Protonierung. Als nunmehr bessere Abgangsgruppe wird sie, unter der Bildung des Oxims (**65**), abgespalten (Abbildung 48).

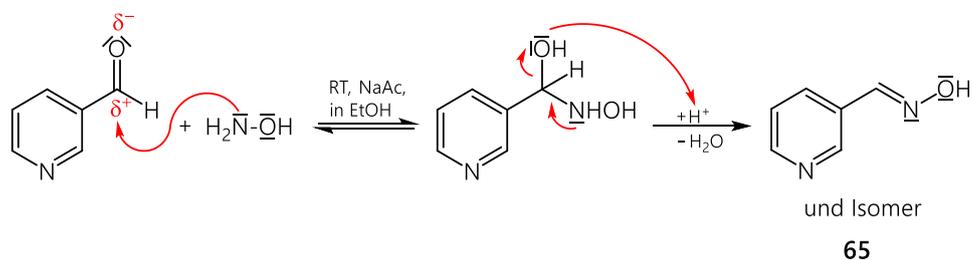


Abbildung 48: Darstellung von Nicotinaldehydoxim (**65**) über eine instabile Halbaminbildung.

Hydroxylamin ist ein typischer Vertreter der α -Nucleophile. Sie sind deutlich nucleophiler als normale Amine. Diese Eigenschaft, auch α -Effekt genannt, korreliert mit den freien Elektronenpaaren des benachbarten Heteroatoms. Durch die erhöhte Nucleophilie wird auch das intermediär gebildete Halbamin, aufgrund eines geringeren anomeren Effekts, weniger stabilisiert. Folglich verläuft die Reaktion unter Abspaltung eines Wassermoleküls effektiver als bei den Nichtheteroatom-tragenden Analoga. Der anomere Effekt ist besonders stark, wenn sich an einem Kohlenstoffatom ein Substituent mit starkem Elektronenschub (Hydroxygruppe) und ein weiterer mit elektronenziehendem Effekt (Fluoratom) befinden. Dabei kommt es laut Molekülorbitaltheorie zwischen dem freien Elektronenpaar des Heteroatoms (OH-Gruppe), das im p-Orbital lokalisiert ist, und dem antibin-

denden Orbital der C-F-Bindung (σ^* -Orbital) zu einer negativen Hyperkonjugation. Diese ist energetisch begünstigt. Jener energetische Vorteil geht allerdings verloren, sobald sich an Stelle des Fluors eine elektronenschiebende Gruppe am Kohlenstoffatom befindet.^[265]

Bei der Umsetzung sind prinzipiell zwei Stellungsisomere möglich. Nach Auswertung des $^1\text{H-NMR}$ -Spektrums von **65** lag nur ein Isomer vor, das mit hoher Wahrscheinlichkeit dem E-Isomer zuzuordnen ist. Eine genaue Isomeriecharakterisierung war aufgrund des sehr breiten Hydroxygruppensignals, das einen schnellen Protonenaustausch der OH-Gruppe anzeigt, und der Isochronie der Wasserstoffatome am Heteroaromaten nicht möglich. Nach dem Alkylierungsschritt konnte man allerdings die Bildung des Z-Isomers in minimalen Mengen nachweisen. Eine säulenchromatographische Auftrennung war zum diesem Zeitpunkt nicht zweckmäßig, sodass man mit dem E/Z-Isomerengemisch den nächsten Reaktionsschritt plante.

4.2.1.1 Synthese von Nicotinaldehyd-O-alkyloximen sowie –O-benzyloximen: Alkylierung und Benzylierung

Das Nicotinaldehydoxim (**65**) sollte anschließend an seiner freien Hydroxygruppe derivatisiert werden (Abbildung 47, Seite 63, Syntheseroute A, Schritt i_{a2}). Präferiert wurden alkylierte sowie benzylierte Verbindungen. Des Weiteren waren auch arylierte Produkte ein erstrebenswertes Ziel. Zu Beginn der Versuchsarbeiten konzentrierte man sich auf den Umsatz von einem Äquivalent **65** mit zwei Äquivalenten Benzylchlorid in trockenem 1,4-Dioxan. Man nahm an, dass die zusätzliche Iminpartialstruktur bei **65** und der damit verbundene stärkere Elektronenzug die Nucleophilie der Hydroxygruppe abschwächt. Somit war für einen besseren nucleophilen Angriff deren Deprotonierung obligat. Zur Aktivierung von **65** wählte man ein Äquivalent Pyridin. Nach 24 Stunden zeigte sich bei Raumtemperatur weder dünnschichtchromatographisch noch massenspektrometrisch ein Umsatz. Daher erhitzte man den Ansatz bei gleicher Dauer unter Rückfluss. Auch unter diesen Bedingungen blieb die Produktbildung aus. Unter gleichen Gegebenheiten, mit Verwendung von Triethylamin (TEA) anstelle des Pyridins, erhoffte man sich eine verbesserte Aktivierung der Hydroxygruppe. Leider konnte durch diese Veränderung keine erfolgreiche Reaktion detektiert werden.

RUBINA *et al.* verwendeten für die Benzylierung von 2-Pyridinaldoxim anstelle von TEA eine zehnprozentige Natriumhydroxidlösung zur Deprotonierung, bei der gleichzeitig eine Phasentransferkatalyse Anwendung fand.^[275] Hierbei liegen die jeweiligen Reaktanten in binären miteinander nicht mischbaren Lösungsmittelsystemen getrennt vor. Unter Vermittlung eines Phasentransferkatalysators erfolgt der Durchtritt des einen Edukts durch die Phasengrenze in die Phase, in der die zweite Substanz gelöst vorliegt. In dieser Phase läuft schließlich die chemische Reaktion ab. Dabei wird nach LE CHATELIER das Gleichgewicht auf die Produktseite verlagert. Die Synthese wurde, wie folgt, geplant und durchgeführt: Ein Äquivalent von **65** wurde in zehnprozentiger Natriumhydroxidlösung suspendiert. Anschließend fügte man die organische Phase, in der 1,5 Äquivalente Benzylchlorid und 0,05 Äquivalente Tetrabutylammoniumbromid in Benzen gelöst waren, hinzu.

Man erhitzte den Ansatz vier Stunden unter Rückfluss. Danach ließ man ihn weiter bei Raumtemperatur ruhen. Nach weiteren 24 Stunden konnte weder in der wässrigen noch in der organischen Phase das gewünschte Produkt identifiziert werden.

Nachdem die Versuchsreihen mit Benzylchlorid keine nennenswerten Erfolge brachten, verwendete man das bromierte Analogon. Die Syntheseexperimente wurden wie die beiden Erstgenannten geplant. Dennoch blieb ein positives Ergebnis aus. Folglich sollten drastischere Bedingungen die Reaktivität erhöhen. Dazu wurde **65** in eine vorab hergestellte Natriumethanolatlösung suspendiert.^[276] Zur besseren Löslichkeit erhöhte man den Lösungsmittelanteil. Nach 30-minütiger Verweilzeit ergänzte man zum Ansatz anteilig Benzylbromid. Dieser verfärbte sich sofort von hellgelb nach orange. Dünnschichtchromatographische und massenspektrometrische Kontrollen bestätigten die Bildung von (*E/Z*)-Nicotinaldehyd-*O*-benzyloxim (**68**). Nach weiteren 24 Stunden wurde der mittlerweile dunkelrot gefärbte Ansatz mit Chloroform extrahiert und säulenchromatographisch aufgereinigt. Nach dem finalen Trocknen erhielt man **68** mit 46 Prozent Ausbeute.

Um die Synthese zu optimieren, entschied man sich, die bestehenden Benzylchloride mittels einer FINKELSTEIN-Umhalogenierung in ihre jodhaltigen Analoga zu überführen. Dazu löste man Natriumjodid in Aceton und fügte das entsprechende Alkyl- oder Benzylchlorid hinzu. Das dabei entstehende Natriumchlorid fällt aufgrund seiner geringeren Löslichkeit in Aceton als Präzipitat aus. Den Ansatz extrahierte man anschließend mit Diethylether gegen destilliertes Wasser. Nach Entfernen des Lösungsmittels erhielt man im Falle der Benzyljodidderivate farblose bis braun gefärbte, nadelförmige Kristalle, die bei 20 bis 25 Grad Celsius schmolzen. Alle folgenden Alkylierungsschritte von **65** wurden mit Alkyl- oder Benzyljodiden geplant.

Mit Blick auf die Syntheseoptimierung beschrieben HUANG *et al.* den Umsatz von **65** mit Natriumhydrid und Benzylbromid, bei der eine Ausbeute von 80 Prozent postuliert wurde.^[277] Natriumhydrid ist eine starke Base mit vergleichbarer Potenz von der von Natriumethanolat. In Erwartung, ähnliche Ausbeuten reproduzieren zu können, suspendierte man 1,1 Äquivalente Natriumhydrid in wenig Dimethylformamid (DMF). Man kühlte die Suspension auf null Grad Celsius. Anschließend ergänzte man tropfenweise ein Äquivalent von vorab in DMF gelöstem **65**. Nach einer Stunde fügte man zur mittlerweile tiefgelb gefärbten Suspension insgesamt zwei Äquivalente Benzyljodid hinzu. Die resultierende Mischung wurde über Nacht bei Raumtemperatur ruhen gelassen. Eine Farbvertiefung nach orange zeigte am nächsten Tag den gewünschten Umsatz an. Zum Abbruch der Reaktion extrahierte man den Ansatz mit Diethylether gegen eine gesättigte Ammoniumchloridlösung. Nach zusätzlicher Schwerkraftsäulenchromatographie konnte **68** nur in enttäuschenden Ausbeuten von 12 Prozent gewonnen werden.

Da **65** in DMF die beste Löslichkeit zeigte, sollten weitere Versuche die Ausbeute zu maximieren, unter Beibehaltung des Lösungsmittels, unternommen werden. Deshalb wurde **65** in einem weiteren Ansatz mit Kalium-*tert*-butoxid umgesetzt. Kalium-*tert*-butoxid ist als nichtnukleophile Base deutlich basischer als Natriumhydrid und Natriumethanolat. Dafür wurde **65** in DMF, unter Bildung einer hellgelben Färbung, gelöst. Zur Aktivierung ergänzte man die Base. In der Folge zeigte eine

sofortige Farbvertiefung die Deprotonierung der Hydroxygruppe an. Nach Zusatz von 4-Chlorobenzyljodid war eine schlagartige Rotfärbung des Ansatzes zu erkennen. Die dünnschichtchromatographische Verlaufskontrolle wies dabei auf einen fast vollständigen Umsatz zum gewünschten Produkt hin. Nach einer Stunde wurde der Versuch mittels Wasser-Chloroform-Extraktion beendet und säulenchromatographisch aufgereinigt. Man konnte (*E/Z*)-Nicotinaldehyd-*O*-4-chlorobenzylloxim (**69**) mit 52 Prozent Ausbeute isolieren. Dehnte man die Reaktionszeit auf drei sowie 24 Stunden aus, zeichnete sich ein Zerfall von **69** ab. Nach 24 Stunden war kein Produkt mehr detektierbar. **69** zerfiel, aufgrund der zu stark basischen Bedingungen, in 3-Nicotinaldehyd und *O*-4-Chlorobenzylhydroxylamin. Ähnliche Erfahrungen konnte man auch bei dem Austausch des Lösungsmittels gegen THF gewinnen. Anfangs war eine deutliche Produktbildung dünnschichtchromatographisch nachzuweisen, die durch das Verfärben des Ansatzes von gelb über orange zu rotbraun charakterisiert war. Nach 24 Stunden und weiterer säulenchromatographischer Auftrennung konnte allerdings nur eine Ausbeute von fünf Prozent dokumentiert werden.

Für die Darstellung von (*E/Z*)-Nicotinaldehyd-*O*-(4-methoxybenzyl)oxim (**70**) stand zum betreffenden Zeitpunkt kommerziell nur 4-Methoxybenzylalkohol zur Verfügung. Daher entschloss man sich die Mitsunobu-Reaktion durchzuführen. Bei dieser Reaktion gelingt mittels Triphenylphosphin und Diisopropylazodicarboxylat (DIAD) die Derivatisierung von Alkoholen. Nach Durchführung der vorgeschlagenen Versuchsanordnung konnte jedoch kein Umsatz zum gewünschten Produkt registriert werden. Die genaue Beschreibung der Mitsunobu-Reaktion (Seite 71) ist 4.2.1.2 Synthese von 2-(Benzyloxy)isoindolin-1,3-dion-Derivaten zu entnehmen. In Tabelle 5 (Seite 68) sind alle Versuchsexperimente nochmals aufgelistet.

Die Verbindungen **66** bis **69** konnten mit der allgemeinen Arbeitsvorschrift AAV 6a erhalten werden (siehe 7.1, Seite 124) und sind in Abbildung 49 mit Ausbeuten und *E/Z*-Isomerenverhältnissen aufgelistet.

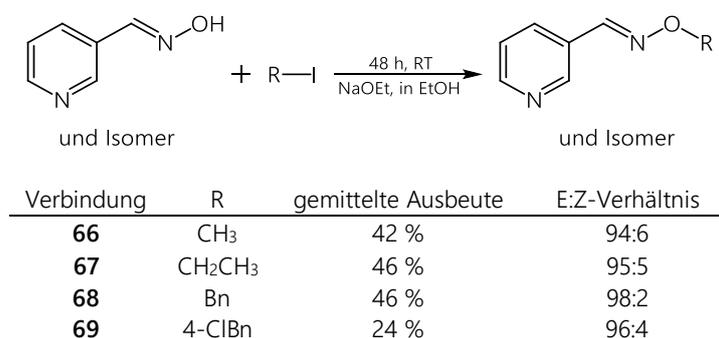


Abbildung 49: Darstellung von (*E/Z*)-Nicotinaldehyd-*O*-alkyloximether und -*O*-benzyloximether nach AAV 6a.

Ergebnisse und Diskussion

Tabelle 5: Experimente zur Darstellung von (*E/Z*)-Nicotinaldehyd-*O*-benzyloxim-Derivaten.

Zielverb.	Edukte	Base	Lösungsm.	Temp.	Zeit	Ausbeute
68	1 eq 65 , 2 eq Benzylchlorid	1 eq Pyridin	1,4-Dioxan	RT	24 h	-
68	1 eq 65 , 2 eq Benzylchlorid	1 eq Pyridin	1,4-Dioxan	100 °C	24 h	-
68	1 eq 65 , 2 eq Benzylchlorid	1 eq TEA	1,4-Dioxan	RT	24 h	-
68	1 eq 65 , 2 eq Benzylchlorid	1 eq TEA	1,4-Dioxan	100 °C	24 h	-
68	Phasentransferkatalyse: 1 eq 65 , 2 eq Benzylchlorid, 0,05 eq TBAB	10 %-NaOH-Lsg.	10 %-NaOH-Lsg., Benzen	80 °C, RT	4 h, 24 h	-
68	1 eq 65 , 2 eq Benzylbromid	NaOEt	EtOH	RT	24 h	46 %
68	1 eq 65 , 2 eq Benzyljodid	NaOEt	EtOH	RT	24 h	46 %
68	1 eq 65 , 2 eq Benzyljodid	NaH	DMF	0 °C, RT	1 h, 24 h	12 %
69	1 eq 65 , 2 eq Benzyljodid	<i>tert</i> -BuOK	DMF	RT	1 h	52 %
69	1 eq 65 , 2 eq Benzyljodid	<i>tert</i> -BuOK	DMF	RT	3 h	15 %
69	1 eq 65 , 2 eq Benzyljodid	<i>tert</i> -BuOK	DMF	RT	24 h	-
69	1 eq 65 , 2 eq Benzyljodid	<i>tert</i> -BuOK	THF	RT	24 h	5 %
70	1 eq 65 , 1,2 eq 4-Methoxybenzylalkohol, 1,2 eq DIAD, 1,2 eq PPh ₃		THF	0 °C, RT	2-3 h, 12 h	-

- = kein Umsatz; DIAD = Diisopropylazodicarboxylat; DMF = Dimethylformamid; EtOH = Ethanol; Lösungsm. = Lösungsmittel; Lsg = Lösung; NaH = Natriumhydrid; NaOEt = Natriumethanolat; PPh₃ = Triphenylphosphin; RT = Raumtemperatur; TBAB = Tetrabutylammoniumbromid; TEA = Triethylamin; Temp. = Temperatur; *tert*-BuOK = Kalium *tert*-Butoxid; THF = Tetrahydrofuran; Zielverb. = Zielverbindung.

Die ¹H-NMR-Spektren von **66** bis **69** zeichneten sich besonders durch die immer gleichen, markanten Singulettsignale der Methinprotonen aus. Sie lagen zwischen 8,28 ppm und 8,36 ppm. Weiterhin war zu erkennen, dass bei allen Verbindungen eine literaturbekannte Charakteristik der *E/Z*-Stellungsisomerie vorlag. Mittels Auswertung der Integralhöhen konnte das *E/Z*-Isomerenverhältnis abgeschätzt werden. Dabei liegt vorrangig aufgrund geringerer sterischer Hinderung das *E*-Isomer vor. Dieses ist durch die entgegengesetzte Ausrichtung des Pyridinrings und der *O*-Alkyl- beziehungsweise *O*-Benzylreste an der Doppelbindung definiert. In jeweils gegenteiligem Fall spricht man von der *Z*-Isoform.^[278, 279] SHINOZAKI *et al.* beschrieben, dass die *Z*-Isomere von aromatischen Oximen bei ihren nukleophilen Angriff auf ein Alkylans, im Vergleich zu den *E*-Isomeren, deutlich häufiger Nitrone bilden.^[280] Nitrone sind dadurch charakterisiert, dass anstelle des Sauerstoffatoms das Stickstoffatom alkyliert wird. Dadurch bilden sich reaktive Betaine, die einen deutlich differenzierteren *R_f*-Wert aufweisen und bei dem gewählten Laufmittelgemisch (LM 1, siehe 6.2.2.1) auf der Säule verweilen. Damit ist auch zu erklären, warum der *Z*-Isomerenanteil in den *E/Z*-Isomerenmischungen von **66** bis **69** so gering und die Ausbeute auf unter 50 Prozent limitiert ist. Eine Separierung beider Oximetherisomere war zu diesem Zeitpunkt mittels normaler Schwerkraftsäulenchromatographie nicht möglich, sodass man mit dem Gemisch in die nächsten beiden Reaktionsschritte ging und erst die Endverbindungen erfolgreich fraktionierte.

Versuche zur Synthese von Nicotinaldehyd-O-phenyloxim

Eine weitere Herausforderung bestand in der Umsetzung von **65** zu seinem Nicotinaldehyd-O-phenyloxim. DE *et al.* beschrieben die kupferkatalysierte Darstellung von Acetophenonoxim mit Jodbenzen unter Bildung der gewünschten Produkte mit 20- bis 40-prozentiger Ausbeute.^[281] In Analogie zur beschriebenen Versuchsanordnung sollte ein Äquivalent **65** in Toluol suspendiert werden. Zum Ansatz ergänzte man ein Äquivalent Kupfer-(I)-jodid sowie drei Äquivalente basisches Caesiumcarbonat und erhitzte ihn unter Rückfluss. **65** ging fast vollständig in Lösung. Anteilig fügte man insgesamt zwei Äquivalente Jodbenzen hinzu und ließ den Ansatz zwei Stunden lang ruhen. Dabei sollte Jodbenzen transmetalliert und die intermediär gebildete Kupferspezies leichter umgesetzt werden. Nach Ablauf der Zeit konnte kein Umsatz registriert werden, sodass man wiederum ein Äquivalent Jodbenzen und 0,5 Äquivalente Kupfer-(I)-jodid dazugab. Nach weiteren 20 Stunden wurde der Versuch ohne jegliche Bildung des gewünschten Produkts abgebrochen. In einem sich anschließenden Experiment wurde **65** in Toluol suspendiert und mit katalytischen Mengen an Kupfer-(I)-jodid sowie Phenanthrolin versetzt. Letztgenanntes fungiert als Chelatbildner und stabilisiert den intermediär gebildeten Kupfer-Ionen-Komplex wahrscheinlich. Zusätzlich fügte man zwei Äquivalente Caesiumcarbonat hinzu und erhitzte den Ansatz unter Rückfluss.^[281] Auch bei dieser Versuchsanordnung konnte nach 20-stündiger Versuchsdauer entgegen der Referenzaussage kein Umsatz dokumentiert werden. MULLA *et. al* beschrieben eine erfolgreiche, Kupferionen-vermittelte Arylierung mit Arylboronsäure-Derivaten. Dazu wurden ein Äquivalent **65** und 1,5 Äquivalente Arylboronsäure in Methanol suspendiert und mit einem Äquivalent Kupfer-(II)-chlorid sowie 1,5 Äquivalente Caesiumcarbonat versetzt.^[282] Den Ansatz ließ man bei Raumtemperatur ruhen. Unter engmaschiger, dünnschichtchromatographischer Kontrolle konnte auch nach 30 Tagen sowie nach weiterer Zugabe von einem Äquivalent Kupfer-(II)-chlorid und Arylboronsäure weder ein Umsatz zum gewünschten Produkt noch die Bildung von Nebenprodukten verzeichnet werden. Ursächlich für das Ausbleiben einer positiven Reaktion könnten einerseits Löslichkeitsprobleme und andererseits die abweichende Auswahl des Kupfer-(II)-Katalysators gewesen sein.

Ein weiterer Versuch sollte über die Diazotierung von Anilin mit anschließendem nukleophilem Angriff von **65** gelingen und zum gewünschten Produkt führen. Dazu löste man ein Äquivalent Anilin sukzessiv in drei Äquivalenten sechs molarer Salzsäure. Die Lösung wurde unter starkem Rühren auf null Grad Celsius heruntergekühlt und 0,9 Äquivalente einer 2,5 molaren, wässrigen Natriumnitritlösung anteilig zugegeben. Dabei sollte die Temperatur nicht über fünf Grad Celsius ansteigen.^[283] Eine positive Reaktion wurde durch die Farbveränderung von gelb nach orange angezeigt. In einem weiteren Rundkolben wurde ein Äquivalent **65** in einer vorab hergestellten Natriumethanolatlösung suspendiert und tropfenweise die oben beschriebene Diazoniumsalzlösung, unter Vertiefung der Ansatzfarbe, ergänzt. Die anschließende massenspektrometrische Untersuchung wies mit einer Massenzahl von 199,0 auf das gewünschte Produkt hin. Nach weiteren

24 Stunden wurde der Versuch abgebrochen und der Ansatz säulenchromatographisch aufgereinigt. Nach Auswertung des $^1\text{H-NMR}$ -Spektrums der isolierten Verbindung fehlte das charakteristische Methinprotonensignal. Somit konnte die Bildung von Nicotinaldehyd-*O*-phenyloxim ausgeschlossen werden. Stattdessen wurde unter den beschriebenen Bedingungen (*E/Z*)-Phenyl(pyridin-3-yl)methanonoxim als Feststoff (8 %) gewonnen.

Die Entstehung wäre über den folgenden Mechanismus denkbar: Über Mesomeriestabilisierung kommt es bei der deprotonierten Form von **65** zur Bildung einer Nitrosopartialstruktur. Das Carbanion greift das intermediär gebildete Diazoniumsalz nukleophil an und stabilisiert sich final, durch eine Oxim-Nitroso-Tautomerie, zum energetisch bevorzugten Oxim (Abbildung 50).

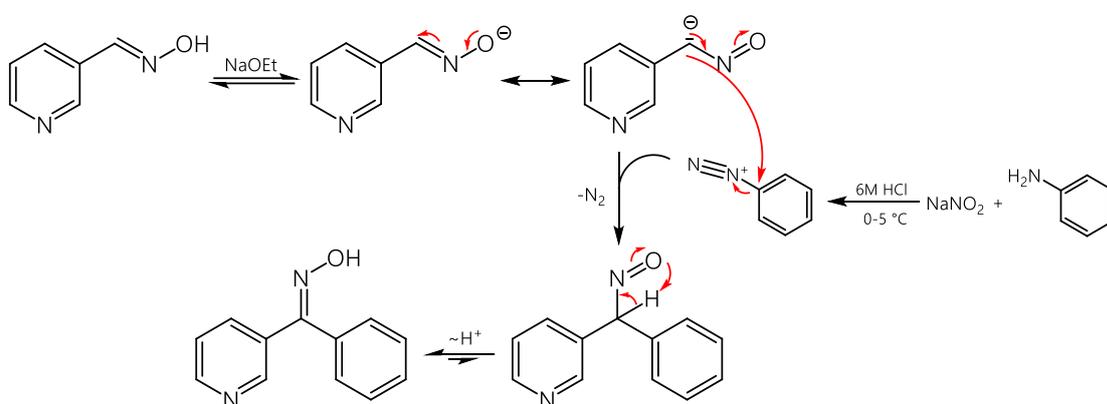


Abbildung 50: Möglicher Reaktionsmechanismus bei der Umsetzung von **65** mit einem Diazoniumsalz. Das deprotonierte und mesomeriestabilisierte Oxim greift das *in situ* gebildete Diazoniumsalz nukleophil an. Das entstandene Nitroso-Produkt geht durch Nitroso-Oxim-Tautomerie in das stabilere Oxim über.

Somit blieb die Darstellung von Nicotinaldehyd-*O*-phenyloxim erfolglos. Um diese Verbindung dennoch zu gewinnen und die Ausbeuten der (*E/Z*)-Nicotinaldehyd-*O*-Benzoyloximether zu optimieren, verfolgte man die Idee der Benzylierung und Arylierung von *N*-Hydroxyphthalimid mit anschließender Hydrazinolyse. Die dabei freiwerdenden *O*-Benzylhydroxylaminhydrochloride sollen wiederum mit Nicotinaldehyd umgesetzt werden.

4.2.1.2 Synthese von Nicotinaldehyd-O-benzyloximen: Kondensationsreaktion von Nicotinaldehyd mit O-Benzylhydroxylaminderivaten

Synthese von 2-(Benzyloxy)isoindolin-1,3-dion-Derivaten

Ein weiterer Ansatz Nicotinaldehyd-O-benzyloxime zu synthetisieren, bestand in der Umsetzung von Nicotinaldehyd mit O-Benzylhydroxylaminderivaten (Abbildung 47, Seite 63, Syntheseroute A, Schritt i_{a3}). Dabei stand anfänglich die Bildung der Letztgenannten im Vordergrund. Ihre Darstellung erfolgte ausgehend von einem Äquivalent N-Hydroxyphthalimid (NHPI) sowie ein bis drei Äquivalenten des jeweiligen Benzylchloridderivats mit einem Äquivalent TEA. Schrittweise wurden die Substanzen in DMF gelöst und die Reaktion bei 90 Grad Celsius in zwei Stunden umgesetzt. Im Anschluss wurden dem Ansatz DMF-äquivalente Mengen an destilliertem Wasser, unter Bildung eines Präzipitats, zugesetzt. Die im Folgenden zwei Stunden ruhende Suspension filtrierte man durch eine G3-Fritte und trocknete das Produkt für 36 Stunden im Exsikkator. Man erhielt **51** bis **57** in Ausbeuten von 73 bis 98 Prozent (Abbildung 51).^[284]

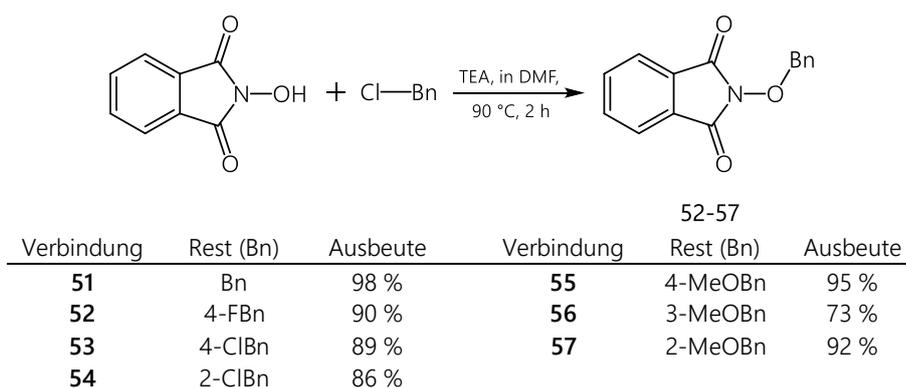


Abbildung 51: Synthese der 2-(Benzyloxy)isoindolin-1,3-dion-Derivate mit Ausbeuten durch Benzylierung.^[284]

Zur Darstellung von **54**, **55** und **57** waren anstelle der Benzylchloride ausschließlich die Benzylalkohole kommerziell erhältlich. Zur Knüpfung der Sauerstoff-Benzyl-Bindung wurde daher die Reaktion nach MITSUNOBU präferiert. Unter Verwendung zweier Hydroxygruppen-tragender Verbindungen gelingt hierbei die Umsetzung zu den gewünschten benzylierten NHPI-Derivaten. Der Versuchsaufbau stellte sich folgendermaßen dar: Es wurde ein Äquivalent NHPI mit einem Äquivalent Triphenylphosphin in absoluten THF gelöst und der Ansatz auf null Grad Celsius heruntergekühlt. Unter Verfärbung der Lösung von farblos zu dunkelrot fügte man ein Äquivalent Diisopropylazodicarboxylat (DIAD) hinzu. Der Ansatz wurde für 20 Minuten mit Argon begast und anschließend zwei Stunden ruhen gelassen. Zu der sich dabei bildenden, gelb gefärbten Suspension wurde ein Äquivalent des jeweiligen Benzylalkohols hinzugefügt und die Reaktion auf Raumtemperatur gebracht. Dabei wurde die Suspension wieder als Lösung klar. Man ließ das Gemisch über einen Zeitraum von 24 Stunden weiterreagieren. Die resultierende, farblos bis hellgelb gefärbte Lösung wurde nach einer Wasser-Chloroform-Extraktion und anschließendem Entfernen der

organischen Phase säulenchromatographisch aufgereinigt. Die Produktfraktion engte man zum öligen Rückstand ein, verdünnte ihn mit Aceton und gab anteilig destilliertes Wasser bis zur Präzipitatbildung hinzu. Der entstandene Niederschlag ist mit einer G3-Fritte filtriert und 24 bis 36 Stunden im Exsikkator getrocknet worden.^[285]

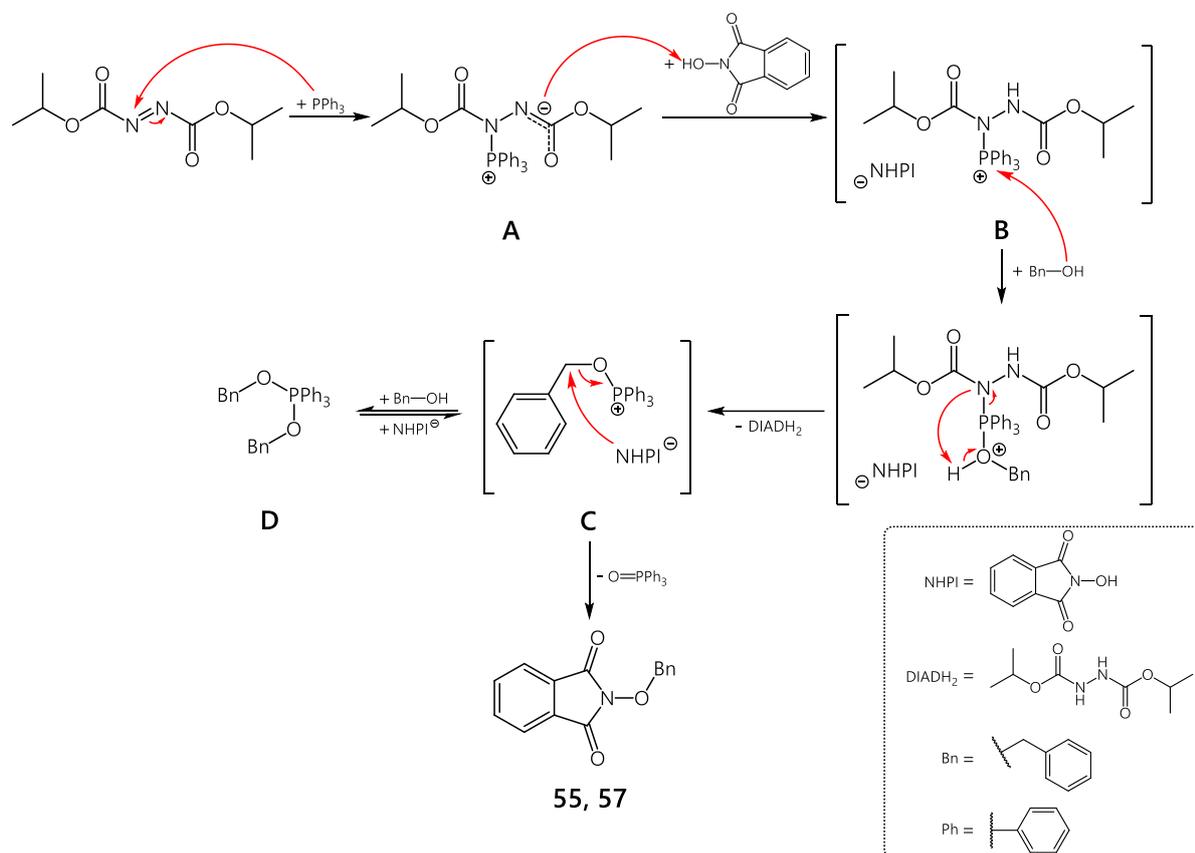


Abbildung 52: Postulierter Reaktionsmechanismus nach MITSONUBU.

PPh₃ greift DIAD nukleophil unter Ausbildung von **A** an. **A** deprotoniert daraufhin NHPI. Es bildet sich das Ionenpaar **B**. Im Anschluss greift der Benzylalkohol die Verbindung **B** an, was in **C**, unter Abspaltung von DIADH₂, mündet. **C** kann sich über eine weitere Anlagerung von Benzylalkohol stabilisieren (**D**) oder mit dem deprotonierten NHPI zum 2-(Benzyloxy)isoindolin-1,3-dion abreagieren.^[286-288]

Bn = Benzylrest; DIAD = Diisopropylazodicarboxylat; NHPI = *N*-Hydroxyphthalimid; Ph = Phenylrest; PPh₃ = Triphenylphosphin.

Während der Reaktion wird DIAD nukleophil an einem Stickstoffatom der Azo-Brücke, unter Bildung von Verbindung **A**, angegriffen (Abbildung 52). Das folglich gebildete Betain stabilisiert seine negative Partialladung über die Konjugation mit der benachbarten Carbonylfunktion.^[286] Im Anschluss deprotoniert **A** NHPI unter Entstehung des Ionenpaares **B**. **B** wird von dem zum Ansatz hinzugefügten Benzylalkohol nukleophil an der Triphenylphosphonium-Partialstruktur, unter simultaner Abspaltung des Diisopropylhydrazin-1,2-dicarboxylats (DIADH₂), angegriffen.^[287] Das dabei gebildete Produkt **C** steht als Ionenpaar laut CAMP und JENKINS im Gleichgewicht mit dem sich in Lösung befindlichen Dioxaphospholan-Intermediat **D**. Final wird die thermostabilere Oxyphosphonium-Spezies **C** nukleophil vom deprotonierten NHPI angegriffen und zu **54**, **55** sowie **57** umgesetzt.^[288]

54 wurde mit einem Umsatz von 74 Prozent isoliert. **55** und **57** konnten sogar in sehr guten Ausbeuten (98 sowie 99 %) gewonnen werden. Allerdings ist die Reaktion im Vergleich zur vereinfachten Benzilylierung aufgrund säulenchromatographischer Aufreinigung (LM 1, siehe 6.2.2.1) sowie strengerer Reaktionsbedingungen benachteiligt. Daher entschied man sich, die bestehenden Benzylalkohole in ihre halogenierten Analoga umzuwandeln und folglich die vereinfachte Benzilylierung zu präferieren (Abbildung 51, Seite 71).

Zur Substitution der Alkoholgruppe wurde ein Äquivalent des jeweiligen Benzylalkohols in Diethylether gelöst und 0,05 Äquivalente Pyridin zugesetzt. Vorsichtig ergänzte man tropfenweise 1,7 Äquivalente Thionylchlorid und erhitzte den Ansatz unter Rückfluss. Nach zwei Stunden wurde das Gemisch mit einer Diethylether-Wasser-Extraktion aufgereinigt und die organische Phase am Rotationsverdampfer eingeengt.^[289]

Synthese von 2-Phenoxyisoindolin-1,3-dion (98)

Für die Darstellung des Nicotinaldehyd-O-phenyloxims wird zunächst das O-Phenylhydroxylamin durch Arylierung von NHPI gewonnen. Dazu wurden nach PETRASSI *et al.* ein Äquivalent NHPI und zwei Äquivalente Phenylboronsäure mittels einem Äquivalent frisch hergestelltem Kupfer-(I)-chlorid und 1,1 Äquivalenten trockenem Pyridin in DCM bei Raumtemperatur umgesetzt. Es wird vermutet, dass der sich *in situ* bildende Kupferkomplex aus Pyridin und Kupfer-(I)-chlorid die Arylboronsäure transmetalliert und anschließend an NHPI bindet.^[270] Lam *et al.* postulieren, dass Sauerstoffeinfluss zur Verbesserung der *N*-Arylierung gesättigter Heterocyclen führt. Somit könnte molekularer Sauerstoff, über die Oxidation der Kupfer-(I)- zu der Kupfer-(III)-Spezies, zur leichteren Umsetzung führen. Nach Bildung des Komplexes kommt es wahrscheinlich zur reduktiven Eliminierung des O-Aryloxyphthalimids (Abbildung 53, Seite 74).^[270, 290, 291] Nach sechs Tagen Reaktionsdauer konnte ein Umsatz dünnschichtchromatographisch festgestellt und der Ansatz abgebrochen werden. Man extrahierte ihn mit Chloroform gegen eine 20-prozentige Ammoniumchloridlösung. Anschließend wurde die organische Phase solange mit einem eins zu eins Gemisch aus Ammoniak (25 %) und Ammoniumchloridlösung (20 %) extrahiert, bis in der wässrigen Phase keine blaue Färbung mehr wahrnehmbar war. Dann wurde die halogenhaltige Phase gegen eine zehnprozentige Salzsäurelösung extrahiert. Der Ansatz wurde bis zum ölig viskosen Rückstand vom Lösungsmittel befreit und säulenchromatographisch aufgereinigt (LM 1, siehe 6.2.2.1). Nach dem Einengen des Laufmittels nahm man die ölige Produktfraktion in Aceton auf und ergänzte destilliertes Wasser bis zur Fällung. Man gewann die Verbindung 2-Phenoxyisoindolin-1,3-dion (**98**) nach Filtration über eine G3-Fritte sowie anschließender Trocknung im Exsikkator mit einer Ausbeute von 34 Prozent.

Die Resultate bei analogen Versuchen durch Substitution der Kupferspezies gegen Kupfer-(II)-acetat, Kupfer-(II)-chlorid und Kupfer-(I)-jodid brachten hingegen nicht den erwünschten Erfolg. Auch ist die unmittelbare Darstellung von Kupfer-(I)-chlorid vor Synthesebeginn zweitrangig. Bei einem wiederholten Syntheserversuch mit einer länger gelagerten Charge des Salzes

konnte eine Ausbeute von 25 Prozent erzielt werden. Zwar könnte der Einfluss von Luftsauerstoff eine leichtere Arylierung von NHPI provozieren, aber auch zur verstärkten Zersetzung der Arylboronsäure führen und so die Ausbeute limitieren.^[270]

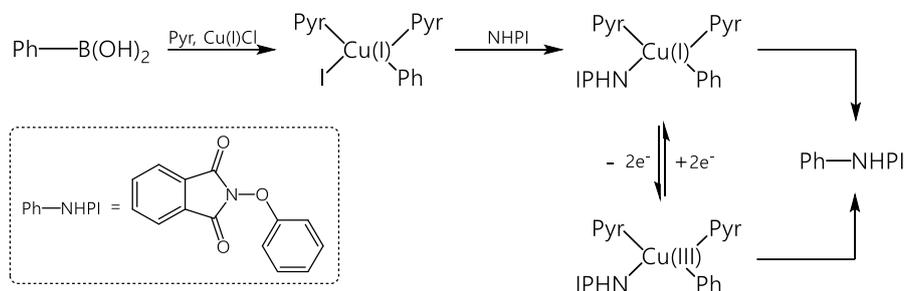


Abbildung 53: Möglicher Reaktionsmechanismus der O-Arylierung von NHPI.

Die Arylboronsäurekomponente wird transmetalliert. Das Zentralion des *in situ* entstandenen Kupfer(I)-Pyridin-Komplexes ist in der Lage, unter oxidativen Einfluss, die Oxidationsstufe von eins auf drei zu verändern. Diese Oxidation kann zur erleichterten Arylierung von NHPI beitragen.^[270, 290, 291]

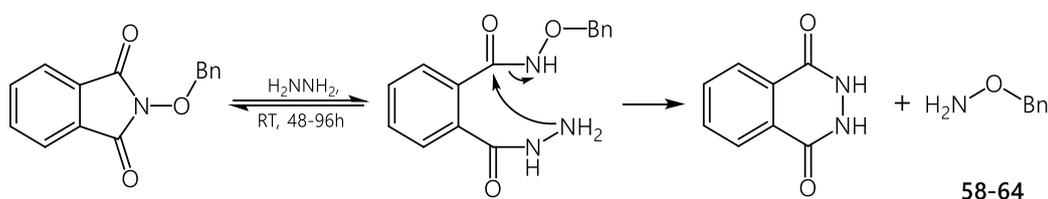
NHPI = N-Hydroxyphthalimid; Pyr = Pyridin; Ph = Phenylrest.

Hydrazinolyse der 2-(Benzyloxy)isoindolin-1,3-dion-Derivate

Die Hydrazinolyse wurde erstmals von ING und MANSKE bei der Gewinnung von Aminen mittels der Gabrielsynthese beschrieben.^[292] GABRIEL gelang 1887 die Hydrolyse von N-substituiertem Phthalimid mit „rauchender Salzsäure“ innerhalb von zwei Stunden bei 200 Grad Celsius.^[293] Die resultierenden Ausbeuten waren allerdings sehr schlecht. Durch den Einsatz des α -Nucleophile Hydrazin gelang es, eine milde Variante für die Synthese primärer Amine aus Phthalimiden zu etablieren. Aufgrund des α -Effekts stellt das Hydrazinmolekül, ähnlich wie Hydroxylamin, ein besonders starkes Nucleophil dar. Somit kann die Spaltung der 2-(Benzyloxy)isoindolin-1,3-dion-Derivate mit Hydrazin unter wesentlich milderen Bedingungen und mit deutlich besseren Ausbeuten durchgeführt werden. Während der Reaktion greift Hydrazin die Imidpartialstruktur der 2-(Benzyloxy)isoindolin-1,3-dion-Derivate an und stabilisiert sich als Hydrazid-Intermediat. Durch diese Bindung ist die Nucleophilie der zweiten Aminstruktur des substituierten Hydrazins abgeschwächt. Sie ist aber noch ausreichend stark, um O-substituiertes Hydroxylamin aus der Hydroxamsäureester-Partialstruktur herauszulösen (Abbildung 54, Seite 75). Bei der Umsetzung entsteht als Nebenprodukt in äquimolaren Mengen 2,3-Dihydrophthalazin-1,4-dion.

Bei der Versuchsanordnung wurde ein Äquivalent des jeweiligen O-Benzylisoindolin-1,3-dion-Derivats in DCM gelöst beziehungsweise suspendiert. Nach Ergänzung von zwei Äquivalenten Hydrazinhydrat (100 %) gingen auch die Suspensionen in Lösung. Den Ansatz ließ man 48 bis 96 Stunden bei Raumtemperatur ruhen.^[294] Die anfängliche Präzipitatsbildung von farblosem 2,3-Dihydrophthalazin-1,4-dion wies auf eine positive Reaktion hin. Dieser Niederschlag bildete sich je nach Position des Restes des am Sauerstoff-substituierten Benzenrings mehr oder weniger schnell und effektiv. So zeigten die unsubstituierte Verbindung **51** sowie die *para*-substituierten Substrate **52**, **53** und **55** eine rasche Niederschlagsbildung. Hingegen war die Präzipitatsent-

stehung bei den *ortho*-positionierten Substanzen **54** und **57** erst sechs bis zehn Stunden nach Synthesebeginn zu erkennen. Die Suspension wurde anschließend durch einen Papierfilter gegeben und das Filtrat vollständig vom Lösungsmittel befreit. Die erhaltene ölige Flüssigkeit löste man in wenig Isopropanol und ergänzte ein Äquivalent konzentrierte Salzsäure. Aus den Lösungen fielen sofort oder erst nach Zugabe von wenigen Mengen Diethylether sowie nach Lagerung bei zwei bis acht Grad Celsius die jeweiligen Hydrochloridsalze aus.^[295] Eine derartige Salzbildung erwies sich für den anschließenden Kondensationsschritt mit Nicotinaldehyd als vorteilhaft. Den Niederschlag trennte man vom Filtrat ab und trocknete ihn 24 bis 72 Stunden im Exsikkator. Es resultierten farblose bis hellgelb gefärbte Feststoffe (**58** bis **60** und **62**, **63**) mit 13 bis 78 Prozent Ausbeute. Die *ortho*-substituierten *O*-Benzylhydroxylaminhydrochloride **61** und **64** waren durch einen hohen Wasseranteil charakterisiert, was die Folgereaktion nur unwesentlich beeinflusste. Dennoch wäre in Zukunft eine fünf-Mol-in-Dioxan gelöste Salzsäure zur Hydrochloridsalzbildung zu präferieren.



Verbindung	Rest (Bn)	Ausbeute	Verbindung	Rest (Bn)	Ausbeute
58	Bn	15 %	62	4-MeOBn	33 %
59	4-FBn	78 %	63	3-MeOBn	55 %
60	4-ClBn	37 %	64	2-MeOBn	37 %
61	2-ClBn	13 %			

Abbildung 54: Hydrazinolysen der 2-(Benzyloxy)isoindolin-1,3-dion-Derivate mit Ausbeuten der *O*-Benzylhydroxylaminhydrochloride.

Das Intermediat greift nukleophil mit seiner Hydrazid-Partialstruktur die Hydroxamsäure-Teilstruktur an. Dadurch werden *O*-Benzylhydroxylamin und 2,3-Dihydrophthalazin-1,4-dion gewonnen.

Bei der Umsetzung der arylierten Verbindung **98** konnte weder die Isolierung der freien Base noch die Gewinnung des Hydrochloridsalzes dokumentiert werden, sodass auch auf diesem Wege kein Nicotinaldehyd-*O*-phenyloxim darstellbar war.

Um den Einsatz von gesundheits- sowie umweltschädlichem Hydrazin zu vermeiden, verfolgte man alternativ den Ansatz von GHOSH und OLOFSSON. Sie nutzten zur Gewinnung von *O*-Arylhydroxylaminen anstelle von Hydrazin Hydroxylamin.^[296] Unter Berücksichtigung gleicher Reaktionsbedingungen konnte nach drei Stunden die Niederschlagsbildung von 1*H*-Benzo[*d*][1,2]oxazin-1,4(3*H*)-dion registriert werden. Nach 48 Stunden wurde der Ansatz wie oben beschrieben aufgereinigt und **60** mit acht Prozent Ausbeute isoliert. Wahrscheinlich ist die höhere Elektronegativität des Sauerstoffatoms für die verminderte Ausbeute ausschlaggebend. Die intermediär gebildete Hydroxamsäure ist im Vergleich zum Hydrazid in seiner Nukleophilie herabgesetzt. Somit wäre ein weiterer nukleophiler Angriff auf die zweite Carbonylpartialstruktur weniger

wahrscheinlich. Ein Verharren der Reaktion in der Zwischenstufe wäre denkbar. Derartige Intermediate konnten allerdings nicht isoliert werden. Alle weiteren Versuche wurden daher mit Hydrazinhydrat (100 %) geplant.

Widererwartend zeigten **58** bis **64** bei der dünnschichtchromatographischen Analytik, trotz der chromophoren Partialstrukturen, eine deutlich abgeschwächte UV-Löschung bei 254 Nanometern.

Kondensationsreaktion von Nicotinaldehyd mit O-Benzylhydroxylaminderivaten

Zu Beginn versuchte man Nicotinaldehyd und **58** in Ethanol zu lösen und mit zwei Äquivalenten Natriumacetat umzusetzen. Nach säulenchromatographischer Aufreinigung konnte man **68** mit 48 Prozent Ausbeute gewinnen. Bei der Verwendung von **62** konnte **70** mit 19-prozentiger Ausbeute isoliert werden.

Zur Optimierung der Synthese sollte der Ansatz von DIRKSEN *et al.* verfolgt werden. Sie nutzten Anilin zur Oximligation von Peptiden.^[271] Einerseits setzt Anilin durch seine basische Eigenschaft die O-Benzylhydroxylamine aus ihren Hydrochloridsalzen frei. Andererseits greift es den Aldehyd-tragenden Abschnitt des Peptids an und überführt ihn in eine reaktive Schiffsche Base. Diese soll zu einer deutlich schnelleren Reaktion mit dem Peptid, an dem sich das O-Hydroxylamin befindet, beitragen. Die Bildung der Schiffschen Base stellt dabei den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Reaktion dar.^[297] Das Kohlenstoffatom des *in situ* gebildeten Iminiumions ist aufgrund der positiven Ladung am Stickstoffatom deutlich stärker partiell positiv geladen als bei seinen Carbonylanalogen. Der anschließende nukleophile Angriff des O-Hydroxylamins erfolgt daher sehr rasch. Es bildet sich als nicht isolierbares Zwischenprodukt ein reaktives Aminal aus, das in eine Oximetherbildung münden oder sich reversibel zur Ausgangsverbindung zurückbilden kann.^[297] Experimentell wurde dazu ein Äquivalent Nicotinaldehyd in THF gelöst und mit jeweils einen Äquivalent Essigsäure sowie Anilin versetzt. Den Ansatz ließ man 30 Minuten ruhen, fügte 1,5 Äquivalente **60** hinzu und ließ ihn weitere 24 Stunden bei Raumtemperatur rühren. Nach einer Salzsäure (5 %)-Chloroform-Extraktion und einer säulenchromatographischen Aufreinigung konnte **69** mit 11 Prozent Ausbeute gewonnen werden.

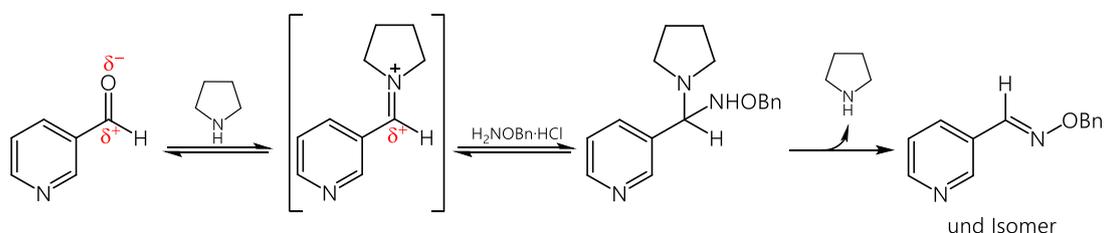


Abbildung 55: Kondensationsreaktion von Nicotinaldehyd mit O-Benzylhydroxylamin.

Aus Nicotinaldehyd wird die Schiffsche Base 1-(Pyridin-3-ylmethyl)pyrrolidin-1-ium gebildet. Als reaktives Intermediat erleichtert sie den nukleophilen Angriff des vorab deprotonierten O-Benzylhydroxylaminhydrochlorids. Durch den Abgang des Pyrollidins kommt es zur Bildung des Oximeters.^[298]

MORALES *et al.* verwendeten zur Ausbildung der Schiffischen Base anstelle von Anilin Pyrrolidin (Abbildung 55, Seite 76).^[298] Die Umsetzung erfolgte analog zu den oben aufgeführten Versuchsaufbau mit vorab frisch destilliertem Pyrrolidin. Nach Zusatz des Pyrrolidins war eine schlagartige Farbvertiefung der Lösung von hellgelb zu gelb wahrnehmbar. Nach Zugabe der jeweiligen O-Benzylhydroxylaminhydrochlorid-Derivate färbte sich der Ansatz schnell orange bis rot. Dieser Farbverlauf wies auf eine positive Reaktion hin. Schon nach zwei Minuten konnte dünnschichtchromatographisch ein Umsatz von mehr als 50 Prozent registriert werden. Die Ansätze ließ man 24 bis 96 Stunden bei Zimmertemperatur ruhen und reinigte sie schließlich durch Extraktion und Schwerkräftenchromatographie (LM 1, siehe 6.2.2.1) auf. Die Verbindungen **68** bis **70** konnten mit Ausbeuten von 80 bis 91 Prozent gewonnen werden (Tabelle 6). Somit gelang es, die Ausbeuten bei der Kondensationsreaktion von Nicotinaldehyd mit den O-Benzylhydroxylaminhydrochloriden enorm zu steigern.

Tabelle 6: Isolierte Verbindungen **68** bis **70** und ihre Ausbeuten.

Verbindung	Rest	Ausbeute	E:Z-Verhältnis
68	Bn	90 %	95:5
69	4-ClBn	91 %	92:8
70	4-MeOBn	80 %	90:10

Verwendete man anstelle der O-Benzylhydroxylaminhydrochloride ihre öligen, freien Basen, so war ein anfänglicher Umsatz erst nach 48 Stunden detektierbar. Die vollständige Produktbildung erreichte man noch nicht einmal nach zwei Wochen. Weiterhin lagen die Ausbeuten nach der Aufreinigung bei 15 bis 30 Prozent.

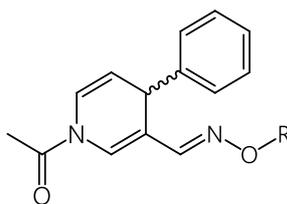
Der Anteil an Z-Isomeren, der sich bei der Reaktion bildete, war, nach Auswertung der jeweiligen ¹H-NMR-Spektren, im Vergleich zur Benzylierung von **65** marginal höher (Tabelle 6). Diese Isomengemische waren säulenchromatographisch nicht aufzutrennen. Somit wurden die nachfolgenden Reaktionen mit jenen Gemischen geplant und erst im finalen Schritt chromatographisch isoliert.

4.2.2 Synthese der *N*-Acetyl-1,4-dihydropyridin-Derivate des 3-Oximethertyps

Die Synthese (Abbildung 47, iia, iib, Seite 63) erfolgte analog zu der Darstellung der *N*-Acetyl-1,4-dihydropyridin-Derivate des 3-Carbamidtyps (siehe 4.1.3 Beschreibung der experimentellen Durchführung, Seite 42). Auffällig war, dass **66** bis **70** eine deutlich bessere Löslichkeit in absolutem THF aufwiesen als die Nicotinamide beziehungsweise die Nicotinamide. Das könnte mitbestimmend für die deutlich höheren Umsätze der 3-Oximetherderivate sein (Tabelle 7).

Die Ausbeutendifferenzierung zu den 3-Carbamiden wurde schon vorab im Abschnitt 4.1.3 Ausbeutenvariabilität (Seite 43) diskutiert. Eine Unterscheidung der *E*- und *Z*-Isomeren konnte mittels Dünnschichtchromatographie nicht getroffen werden. Somit konnte auch keine Trennung mittels Schwerkraftsäulenchromatographie erzielt werden, sodass die Produktgemische für die darauffolgende Reaktion genutzt wurden. Die ¹H-NMR-Spektren von **71** bis **75** zeigen die gleichen Rotamerencharakteristika wie die Vertreter der 3-Carbamidreihe.

Tabelle 7: Gewonnene *N*-Acetyl-1,4-dihydropyridin-Derivate des 3-Oximethertyps (**71** bis **75**). Diese Abbildung berücksichtigt keine absoluten Konfigurationen oder Rotamerenformen.



71-75

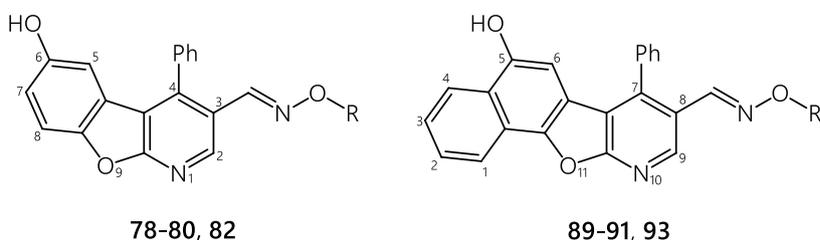
Verbindung	R	Ausbeute
71	Me	49 %
72	Et	48 %
73	Bn	60 %
74	4-ClBn	57 %
75	4-MeOBn	28 %

4.2.3 Darstellung und Charakterisierung der 1-Aza-9-oxafluoren- beziehungsweise der 10-Aza-11-oxabenz[*a*]fluoren-Derivate des Oximethertyps

Anfänglich wurden die 6-Hydroxy-1-aza-9-oxafluoren- beziehungsweise die 5-Hydroxy-10-aza-11-oxabenz[*a*]fluoren-Derivate des 3-Oximethertyps in Analogie zu den cyclischen Verbindungen des 3-Carbamidtyps synthetisiert (Abbildung 47, Seite 63, Synthesepan A, iii_a). Nach erfolgter Schwerkraftsäulenchromatographie gelang es, **78** bis **80**, **82**, **90**, **91** sowie **93** zu isolieren. **80** wurde im Anschluss durch eine *Middle Pressure Liquid Chromatography* (MPLC; siehe 6.2.2.3, Methode B) aufgereinigt. **91** war in so geringen Mengen isoliert worden, dass eine weitere Aufarbeitung mittels MPLC nicht möglich war. Daher konnte es nur in einem *E/Z*-Isomerenmisch von **93** zu **7** gewonnen werden. Die erhaltenen Ausbeuten sind mit denen der 3-Carbamidderivate vergleichbar und in Tabelle 8 (Seite 79) aufgelistet. Die Darstellung der Methoxybenzyl-tragenden Vertreter gelang über den Syntheseweg A hingegen nicht.

Die $^1\text{H-NMR}$ -Spektren der synthetisierten Verbindungen zeigten im Grundgerüst die gleichen Signale wie die der 3-Carbamide. Die OH-Signale treten bei den 6-Hydroxy-1-aza-9-oxafluorenen bei 9,42 ppm und bei den benzoanellierten Vertretern bei 10,13 ppm auf. Das vom Anisotropiekegel erfasste H-5 (6,33 ppm) der 6-Hydroxy-1-aza-9-oxafluorene beziehungsweise das H-7 (6,45 ppm) der 5-Hydroxy-10-Aza-11-oxabenzofluorene erfuhren im Vergleich zu ihren 3-Carbamidanaloga eine Hochfeldverschiebung (H-5 = 6,45 ppm, H-7 = 6,62). Das Methinprotonsignal der Oximethergruppe tritt bei einer 400 Megahertz-Messung zwischen 7,86 ppm und 7,95 ppm (im E-Isomer) fast ausschließlich als Singulett auf (Abbildung 57 oben, Seite 81). Im Falle von **79** konnte ein Dublett mit einer Kopplungskonstante zum H-2 von 0,6 Hertz nachgewiesen werden. Die weiterführende Diskussion zur $^1\text{H-NMR}$ -Analytik erfolgt in den folgenden Kapiteln.

Tabelle 8: Dargestellte Verbindungen der 6-Hydroxy-1-aza-9-oxafluoren- (**78** bis **80**, **82**) sowie der 5-Hydroxy-10-aza-11-oxabenzofluoren-Derivate (**89** bis **91**, **93**) mit Ausbeuten.



Verb.	R	Ausbeute	Verb.	R	Ausbeute
78	Me	2 %	89	Me	2 %
79	Et	9 %	90	Et	8 %
80	Bn	5 %	91	Bn	2 %
82	4-ClBn	1 %	93	4-ClBn	9 %

Synthese von **77** und **88**

Mit Hilfe von Wasserstoff in Kombination mit einem Katalysator sollte unter milden Bedingungen der Benzylrest von **80** und **93** entfernt werden. Daraus sollten hydrophilere Derivate resultieren, die beidseitig Wasserstoffbrücken zum aktiven Zentrum der Proteinkinasen ausbilden können.

Dazu wurde ein Äquivalent **80** beziehungsweise **93** in Lösung gebracht. Zur besseren Lösungsvermittlung verwendete man anstatt das von COREY *et al.* beschriebene Ethanol ein eins zu eins Gemisch aus THF und Methanol.^[299] Zu dem Ansatz gab man 0,5 Äquivalente Palladium auf Kohle (10 %, als Palladiumanteil angegeben) hinzu und begaste den schüttelnden Ansatz 12 Stunden mit einer Atmosphäre Wasserstoff. Dabei bindet Wasserstoff an der Oberfläche des Palladiumkatalysators äußerst effektiv und wird für die Reduktion aktiviert (Abbildung 56, Seite 80). Der Reaktionsansatz wurde anschließend mittels einer Wasser-Chloroform-Extraktion und einer Schwerkraftsäulenchromatographie (LM 4, siehe 6.2.2.1) aufgereinigt. Man konnte (*E*)-6-Hydroxy-4-phenylbenzofuro[2,3-*b*]pyridin-3-carbaldehydoxim (**77**) mit 29 Prozent und (*E*)-5-Hydroxy-7-phenylnaphtho[2',1':4,5]furo[2,3-*b*]pyridin-3-carbaldehydoxim (**88**) mit 20 Prozent Ausbeute gewinnen. Trotz

des nach dünnschichtchromatographischer Verlaufskontrolle vollständigen Reaktionsumsatzes waren die Ausbeuten überraschend niedrig. Mit der zweiten OH-Gruppe als zusätzlichen Wasserstoffbrückendonator können **77** und **88** bei der säulenchromatographischen Aufreinigung vermehrt H-Brücken zu den Silanolgruppen der stationären Phase aufbauen. Somit würde ein größerer Teil der Verbindungen, bei dem verwendeten lipophilen Laufmittel, auf der Säule verharren und die Ausbeuten deutlich limitieren.

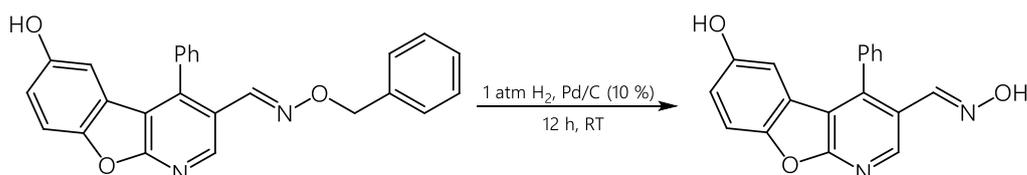


Abbildung 56: O-Debenzylierung von **80** durch klassische Hydrogenolyse unter Bildung von **77**.

Bei einem vorhergehenden Versuchsaufbau führte man die oben beschriebene Reduktion in einem metallischen Überdruckreaktor durch. Zur Durchmischung des Ansatzes nutzte man ein Rührwerk, das man in den Überdruckreaktor einließ. Anstelle von einer Atmosphäre Wasserstoff verwendete man einen Wasserstoffdruck von fünf Bar. Nach 24 Stunden konnte bei Raumtemperatur kein Umsatz festgestellt werden, sodass man den Ansatz mit 50 Bar Wasserstoff begaste. Die anschließenden 24 Stunden führten ebenfalls nicht zum erwünschten Erfolg. Somit entschied man, sich die Reaktion auf eine Temperatur von 40 und später auf 60 Grad Celsius einzustellen. Trotz dieser zusätzlichen Energiezufuhr konnte man nach 48 Stunden keinen Umsatz dokumentieren. Wahrscheinlich geht dieses Ergebnis mit der Verteilung des Palladiumkatalysators einher. Durch die Rotationsbewegung des in den Überdruckreaktor eingelassenen Rührwerks wird der Großteil des Katalysators an die Innenwand des Metallgehäuses gedrückt. Faktisch ist kaum Katalysator für den Reaktionsumsatz vorhanden und die Reaktion ineffizient. Bei dem oben beschriebenen Reaktionen nutzte man zur besseren Durchmischung hingegen eine Schüttelapparatur. Somit wird deutlich, wie essentiell eine optimale Verteilung des Katalysators und die damit verbundene, verbesserte Wasserstoffaktivierung ist.

Beim Vergleich der ¹H-NMR-Spektren von **80** und **77** erkennt man den Erfolg der Reaktion. Bei **80** sind eindeutig die Methylenprotonen als Singulett bei 5,13 ppm und die Wasserstoffatome des benachbarten Phenylrings als Multiplett zwischen 7,40 ppm und 7,25 ppm zu erkennen (Abbildung 57 oben Seite 81 oder Anlage Seite XX). Nach erfolgter Reduktion zu **77** treten diese Signale nicht mehr auf. Stattdessen zeigt sich nun tieffeldverschoben ein Singulett bei 11,45 ppm, das der Oximpartialstruktur zuzuordnen ist (Abbildung 57 unten Seite 81 oder Anlage Seite XIX).

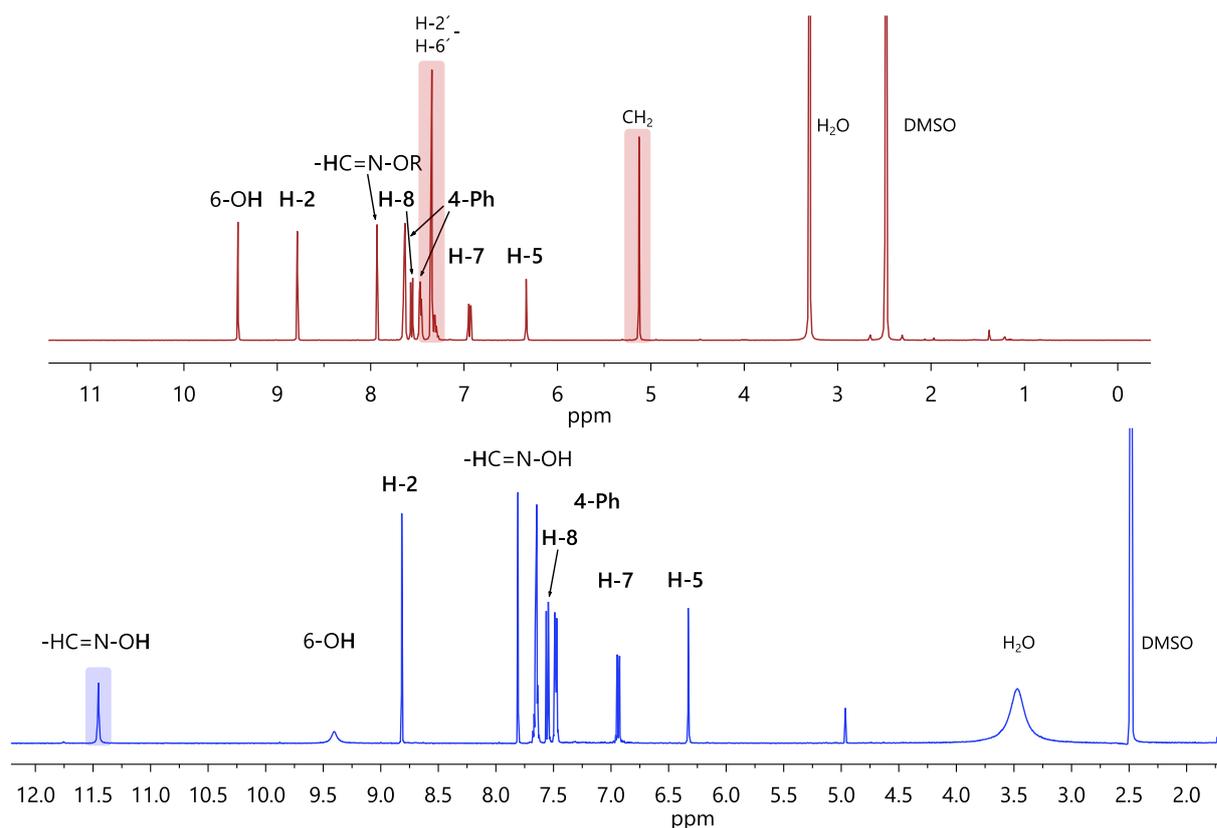


Abbildung 57: $^1\text{H-NMR}$ von **80** (oben, rot); $^1\text{H-NMR}$ von **77** (unten, blau).

Oben: Erkennbar sind die Methylenprotonen bei $\delta = 5,13$ ppm und die angrenzenden Wasserstoffatome des Phenylrings bei $\delta = 7,40$ bis $7,25$ ppm (rot unterlegt); unten: das charakteristische Benzylsignal von **80** ist verschwunden und das Oximsignal erscheint bei $\delta = 11,45$ ppm (blau unterlegt).

4.2.3.1 Darstellung der 1-Aza-9-oxafluoren- beziehungsweise der 10-Aza-11-oxa-benzo[*a*]fluoren-Derivate des Oximethertyps nach Syntheseweg B

Das Synthesekonzept B (Abbildung 47, Seite 63) sah ursprünglich den Schutz der oxidationsempfindlichen Aldehydfunktion mittels einer Acetalgruppe vor. Das resultierende Acetal sollte ausreichend stabil für eine nukleophile 1,4-Addition der Grignardverbindungen sein. Erst bei der anschließenden Cyclisierung zum 1-Aza-9-oxafluoren-Gerüst war dessen Hydrolyse, unter Beibehaltung der Aldehydgruppe, im sauren Milieu vorgesehen. Zu Beginn sollte Nicotinaldehyd in ein cyclisches Acetal überführt werden. Diese Derivatisierung wird aufgrund des $-I$ -Effekts des Pyridinrings als stabiler gegenüber saurer Hydrolyse im Vergleich zu den acyclischen Vertretern mit elektronenschiebenden Substituenten beschrieben. Bei der hydrolytischen Spaltung des Acetals würde das *in situ* entstehende Carbeniumion durch elektronenziehende Gruppen destabilisiert werden. Daher ist die Triebkraft für die Ausbildung derartiger Carbokationen deutlich verringert und die jeweiligen Acetale thermodynamisch stabiler.^[300] Für die Darstellung wurde ein Äquivalent Nicotinaldehyd mit zwei Äquivalenten Ethylenglykol unter sauren Bedingungen in Toluol bis zum Rückfluss erhitzt. Innerhalb von drei Stunden resultierte nach basisch wässriger Ethylacetatextraktion und nach 48-stündiger Trocknung des eingedampften Rückstands 3-(1,3-Dioxolan-2-yl)pyridin (**99**) als hellgelbes Öl mit 56 Prozent Ausbeute.

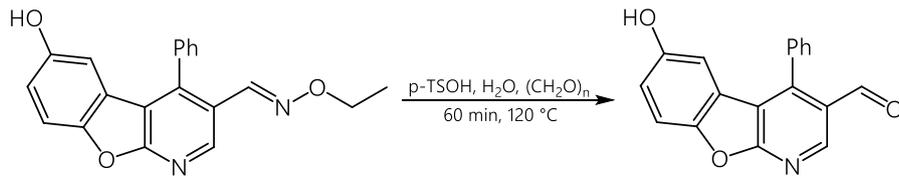
99 wurde im nächsten Schritt nach AAV 2 in sein *N*-Acetyl-1,4-dihydropyridin überführt (siehe 7.1, Seite 124). Nach Zugabe von Phenylmagnesiumchlorid wurde der Ansatz massenspektrometrisch vermessen. Tatsächlich blieb das Acetal ($m/z = 272,1$) unter den gegebenen Bedingungen erhalten. Nach ammoniakalischer sowie saurer Extraktion war allerdings nur noch eine Massenzahl von 228,1 nachweisbar. Die anschließende $^1\text{H-NMR}$ -Messung des isolierten Feststoffs offenbarte, dass das Acetal während der Extraktion zum freien Aldehyd (*EZ,RS*)-1-Acetyl-4-phenyl-1,4-dihydropyridin-3-carbaldehyd (**100**, 49 % Ausbeute) gespalten wurde.

Nichtsdestotrotz wurde **100** einer [2+3]-Cycloaddition mit 1,4-Benzochinon unterzogen. Nach 40 Tagen wurde der Versuch abgebrochen und säulenchromatographisch aufgereinigt. Es konnte weder das gewünschte Produkt 6-Hydroxy-4-phenylbenzofuro[2,3-*b*]pyridin-3-carbaldehyd noch seine höher oxidierte Carbonsäureform nachgewiesen werden.

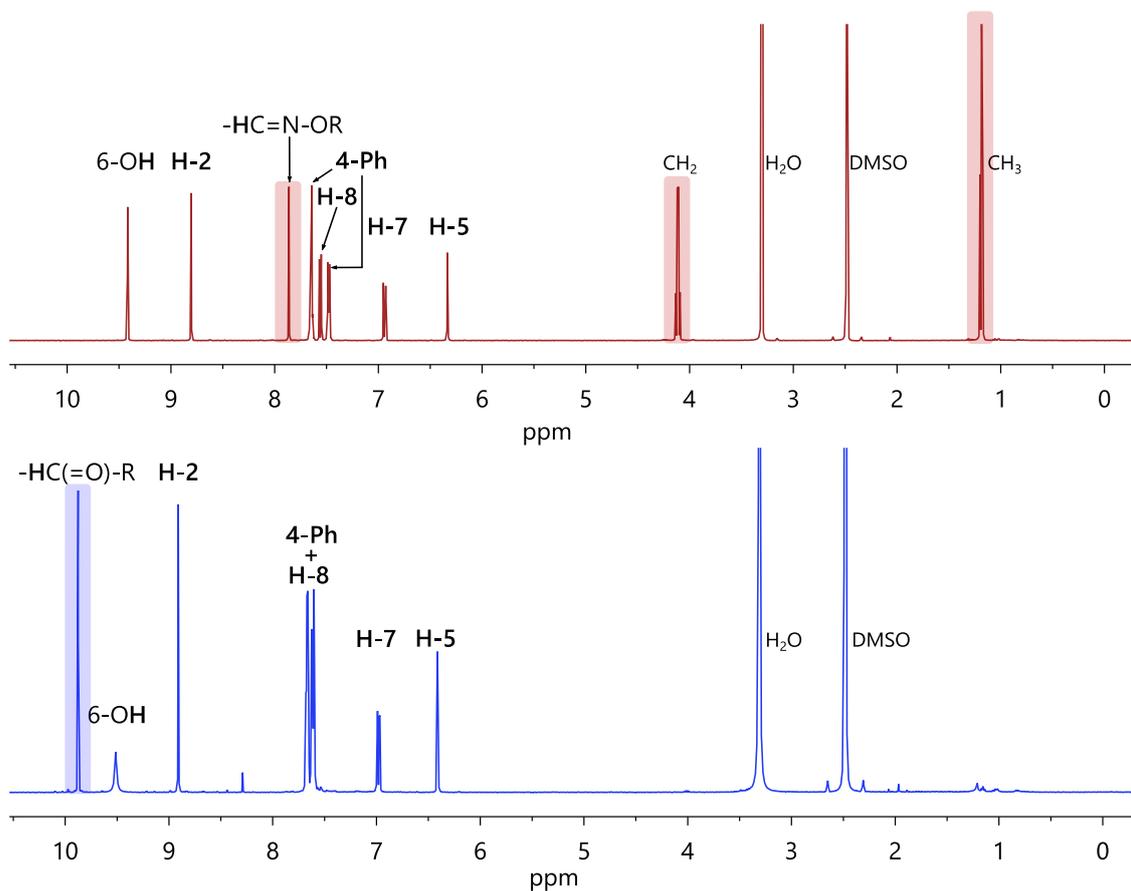
Aufgrund der vorhergehenden Erfahrungen war man sich der Beständigkeit der 6-Hydroxy-4-phenylbenzofuro[2,3-*b*]pyridin-3-carbaldehydoximether sowie ihrer benzoanellierten Vertreter in perchlorsaurem Milieu bewusst. Daher entschied man sich, die *O*-Ethyloximether **79** und **90** wiederum zu hydrolysieren, um die Aldehydfunktion für weitere Umsetzungen freizugeben (Synthesekonzept B, Abbildung 47, *iv_b*, Seite 63).

Synthese von 76 und 90

Dieser Schritt diente dem Entschützen der Aldehydgruppe (Abbildung 47, Seite 63, *iv_b*). Dabei wurde ursprünglich ein Äquivalent **90** in THF gelöst und mit zwei Milliliter destilliertes Wasser, zwei Äquivalenten 4-Toluensulfonsäure sowie Paraformaldehyd, entsprechend zehn Äquivalenten Formaldehyd, ergänzt.^[301] 4-Toluensulfonsäure erfüllt dabei zwei Aufgaben. Zum einen leitet es durch Protonierung des Stickstoffatoms der *O*-Ethyloximetherstruktur dessen Hydrolyse zum Aldehyd ein. Zum anderen kommt es durch den protolytischen Zerfall des Paraformaldehyds zur Bildung von Formaldehyd, das wiederum eine Oxidation des hydrolysierten Aldehyds vermeiden soll. Der Ansatz wurde bis zum Rückfluss erhitzt und die Reaktion unter engmaschiger dünnschichtchromatographischer Kontrolle beobachtet. Auf der DC-Platte bildete sich unterhalb des bei 254 Nanometer blaufluoreszierenden Punktes von **90** ein weiterer, fluoreszenzlöschender *Spot*. Nach insgesamt 96 Stunden und weiteren Zusätzen an 4-Toluensulfonsäure sowie Paraformaldehyd konnte kein zusätzlicher Umsatz registriert werden. Man ließ den Ansatz abkühlen und reinigte ihn mittels einer Wasser-Chloroform-Extraktion sowie einer Schwerkraftsäulenchromatographie auf. Verbindung **76** konnte mit 74 Prozent Ausbeute gewonnen werden. Zur Verkürzung der Reaktionsdauer entschloss man sich, die weiteren Reaktionsansätze mikrowellengestützt zu planen. Analog zu der oben genannten Darstellung erfolgten die künftigen Umsetzungen bei 120 Grad Celsius und 60 Minuten lang im Mikrowellenreaktor.^[301] Dann reinigte man die Ansätze wie oben beschrieben auf und erhielt 6-Hydroxy-4-phenylbenzofuro[2,3-*b*]pyridin-3-carbaldehyd (**76**) mit 75 Prozent sowie 5-Hydroxy-7-phenylnaphtho[2',1':4,5]furo[2,3-*b*]pyridin-3-carbaldehyd (**90**) mit 84 Prozent Ausbeute (Abbildung 58, Seite 83).

Abbildung 58: Mikrowellengestützte Hydrolyse am Beispiel von **79** unter Bildung von **76**.

Beim Vergleich der $^1\text{H-NMR}$ -Spektren von **79** und **76** zeigt sich das Signal des Methinprotons von **79** bei 7,86 ppm. Weiterhin sind die Methylengruppe als Quartett bei 4,11 ppm und die Methylgruppe als Triplet bei 1,19 ppm zu erkennen (Abbildung 59 oben, rot unterlegt oder Anlage, Seite XXIV). Nach der hydrolytischen Abspaltung des O-Ethylhydroxylaminrestes beobachtete man im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von **76**, dass das Methinproton des Aldehyds tieffeldverschoben bei 9,88 ppm vorliegt (Abbildung 59, unten, blau unterlegt).

Abbildung 59: $^1\text{H-NMR}$ von **79** (oben, rot); $^1\text{H-NMR}$ von **76** (unten, blau).

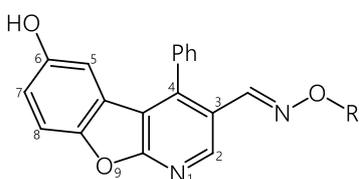
Oben: Erkennbar ist das Methinproton bei $\delta = 7,86$ ppm, die Methylengruppe als Quartett bei $\delta = 4,11$ ppm und die Methylgruppe als Triplet bei $\delta = 1,19$ ppm (rot unterlegt); Unten: Nach Hydrolyse des Oximethers liegt das Methinproton des Aldehyds bei $\delta = 9,88$ ppm vor (blau unterlegt).

Kondensationsreaktion von 76 und 90 mit O-Benzylhydroxylaminhydrochlorid-Derivaten

76 und **90** sollten im Anschluss wiederum derivatisiert werden. Dazu ging man ähnlich wie in 4.2.1.2 bei der Kondensationsreaktion von Nicotinaldehyd mit O-Benzylhydroxylaminderivaten vor. Es wurde ein Äquivalent **76** beziehungsweise **90** mit zwei Äquivalenten Essigsäure und drei Äquivalenten frisch destilliertem Pyrrolidin in THF versetzt. Der Ansatz wurde 30 Minuten ruhen gelassen. Anschließend ergänzte man drei Äquivalente des jeweiligen O-Benzylhydroxylaminhydrochlorid-Derivats.^[298]

Die gelbe Lösung verfärbte sich innerhalb von fünf Minuten orange und zeigte in der dünn-schichtchromatographischen Verlaufskontrolle einen fast vollständigen Umsatz an. Dennoch ließ man den Ansatz vier Tage lang ruhen. Anschließend reinigte man ihn mittels einer Salzsäure (5 %)-Chloroform-Extraktion und einer Schwerkraftsäulenchromatographie auf. Die resultierenden Öle wurden durch Methanol oder Ethylacetat zur Fällung gebracht. Das entstandene Präzipitat wurde gegebenenfalls gewaschen und drei Tage im Exsikkator getrocknet. **85**, **86**, **92 E**, **92 Z**, **96 E** sowie **96 Z** mussten zusätzlich mittels MPLC (siehe 6.2.2.3, Methode A) weiter aufgereinigt werden.

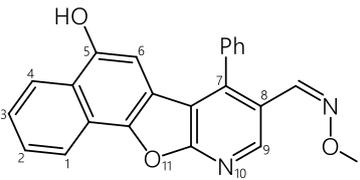
Tabelle 9: Dargestellte Verbindungen der 6-Hydroxy-1-aza-9-oxafluoren- (**81**, **83** bis **86**) sowie der 5-Hydroxy-10-aza-11-oxabenzofluoren-Derivate (**92 E/Z**, **94** bis **96 E/Z**) mit Ausbeuten.



81, 83-86



92E, 94, 95, 96E



92Z, 96Z

Verb.	R	Ausbeute	Verb.	R	Ausbeute
81	4-FBn	86 %	92 E	4-FBn	62 %
83	3-ClBn	76 %	92 Z	4-FBn	26 %
84	4-MeOBn	81 %	94	3-ClBn	62 %
85	3-MeOBn	72 %	95	4-MeOBn	20 %
86	2-MeOBn	55 %	96 E	3-MeOBn	25 %
			96 Z	3-MeOBn	12 %

In welchem Verhältnis sich die E/Z-Isomere darstellen lassen, hängt zum einen vom Grundgerüst und zum anderen von der Substitutionsposition des jeweiligen Rests an der Benzylpartialstruktur ab. Vorrangig bildete sich das E-Isomer. Hierbei lagen die Ausbeuten zwischen 25 bis 86 Prozent (Tabelle 9, Seite 84). Bei den 6-Hydroxy-1-aza-9-oxafluoren-Derivaten isolierte man ausschließlich die E-Isomerenform. Bei den benzoanellierten Vertretern konnten bei **92** und **96** zusätzlich die Z-Formen gewonnen werden. Je näher die Substituenten des Benzylrests an der Oximpartialstruktur gelegen waren, desto unselektiver verlief die Reaktion. Das *meta*-Chlorobenzyl-Derivat **94** konnte nur als Isomerengemisch in einem Verhältnis von 90 zu 10 (E- zu Z-Isomer) isoliert werden. Bei der *meta*-Methoxybenzyl-Verbindung **96** lag das E/Z-Verhältnis, nach erfolgreicher MPLC-Aufreinigung, bei zwei zu eins. Die Isomerentrennung des *ortho*-Methoxy-analogen Derivats zu **96** gelang hingegen nicht. Jenes Isomerenverhältnis lag nach der $^1\text{H-NMR}$ -Auswertung bei eins zu eins.

Betrachtet man die Molekülstruktur wird deutlich, dass aus sterischen Gründen die E-Form im größeren Ausmaß entstehen muss. Die energieminierten Konformationen von **92 E** und **92 Z** in Abbildung 60 offenbaren, dass der O-(4-Fluorobenzyl)-Rest in der E-Form (links) so ausgerichtet ist, dass er den größtmöglichen Abstand zum Grundgerüst bewahrt. Die sterische Hinderung ist somit enorm minimiert. Im Z-Isomer (rechts) erfährt die am Sauerstoff befindliche benzyliche Gruppe durch den Azoxafluorenring eine derartige sterische Hinderung, dass sie nur durch Torsion dieser Lage entgehen kann. Somit ist die Triebkraft, dass die Z-Isomere gebildet werden, entscheidend limitiert.

Somit wird deutlich, dass rein aus räumlichen Gesichtspunkten vermehrt die E-Form bei der Kondensationsreaktion gebildet werden müsste. Arbeiten von KARABATSOS *et al.* und JOHNSON *et al.* mit raumgreifenden Carbonylverbindungen und arylierten beziehungsweise alkylierten Hydroxylaminen sowie Hydrazinen bekräftigen diese Ansicht. ^[279, 302, 303]

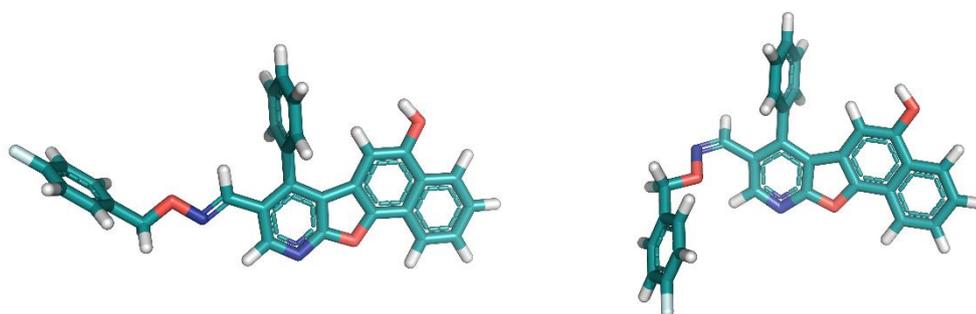


Abbildung 60: Energieminimierte Konformationen des O-(4-Fluorobenzyl)-Derivats **92 E** (links) und **92 Z** (rechts).^[261]

4.2.3.2 Festlegung der E/Z-Isomerie und Isomereninversion

Festlegung der E/Z-Isomerie

Nach erfolgreicher Isolierung der E- und Z-Isomere von **92** und **96**, gelang es, sie mittels $^1\text{H-NMR}$ -Analytik zu differenzieren. Beispielhaft sollen die $^1\text{H-NMR}$ -Spektren von **92 E** und **92 Z** analysiert werden (Abbildung 61, Seite 87). Am auffälligsten ist die Verschiebung des Methinprotons der Oximetherpartialstruktur. Bei der $^1\text{H-NMR}$ von **92 E** liegt dieses Signal bei 7,95 ppm (Abbildung 61 oben, rot unterlegt oder Anlage, Seite XXV) vor. Bei **92 Z** ist es durch eine Hochfeldverschiebung charakterisiert ($\delta = 7,30$ ppm, Abbildung 61 unten, blau unterlegt oder Anlage Seite XXVII). Diese unterschiedliche chemische Verschiebung könnte mit dem entschirmenden Effekt des Sauerstoffatoms der Oximetherstruktur einhergehen. PHILLIPS postulierte in seiner Arbeit zur NMR-spektroskopischen Aufklärung von Nitrosaminen, Alkylnitriten und Aldoximen, dass die Methinprotonen im E-Isomer einen paramagnetischen *Shift* durch das räumlich nahe Sauerstoffatom erfahren.^[304] Diese Protonen liegen folglich tieffeldverschoben vor. Im Z-Isomer ist das Sauerstoffatom entgegengesetzt zum Methinwasserstoff ausgerichtet. Somit bleibt der entschirmende Effekt auf das Methinproton aus und das Signal tritt im höheren Magnetfeld in Resonanz.

Die chemischen Verschiebungen der H-9-Signale bekräftigen ebenfalls die vorab festgelegte Zuordnung. Das H-9-Signal von **92 E** tritt bei 8,81 ppm auf. Geht man davon aus, dass der Anisotropiekegel des Oximethers sich analog zu dem der Carbonylgruppe ausrichtet, wird H-9, neben dem entschirmenden Einfluss des Azoxafluorenrings, auch dem abschirmenden Effekt der Oximetherstruktur ausgesetzt sein. Aus Abbildung 60 links lässt sich erkennen, dass die Doppelbindung der Oximetherpartialstruktur bei **92 E** in der Konformation mit dem geringsten Energieinhalt direkt parallel zum H-9 ausgerichtet ist. Diese Doppelbindungsstruktur liegt im energieminierten Konformer von **92 Z** aus sterischen Gründen verdreht vor (siehe Abbildung 60 rechts, Seite 85). Ausgehend davon, dass im zeitlichen Mittel vorrangig die Konformation mit der geringsten potentiellen Energie anzutreffen ist, wird H-9 in **92 Z** deutlich schwächer vom Anisotropiekegel der Oximethergruppe abgeschirmt. Das H-9-Signal weist folglich in der $^1\text{H-NMR}$ eine Tieffeldverschiebung auf. Weiterhin war die leichte Verschiebung von H-6 auffällig. Bei **92 E** liegt es bei 6,45 ppm und bei **92 Z** bei 6,50 ppm.

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass durch einen unterschiedlich starken entschirmenden Effekt des Sauerstoffatoms der Oximetherpartialstruktur auf die Methinprotonen und der differenzierte Anisotropieeinfluss der Doppelbindung auf die H-9 Protonen die $^1\text{H-NMR}$ -Spektren der Isomere klar unterscheidbar waren und folglich den jeweiligen Isomeren zugeordnet werden konnte.

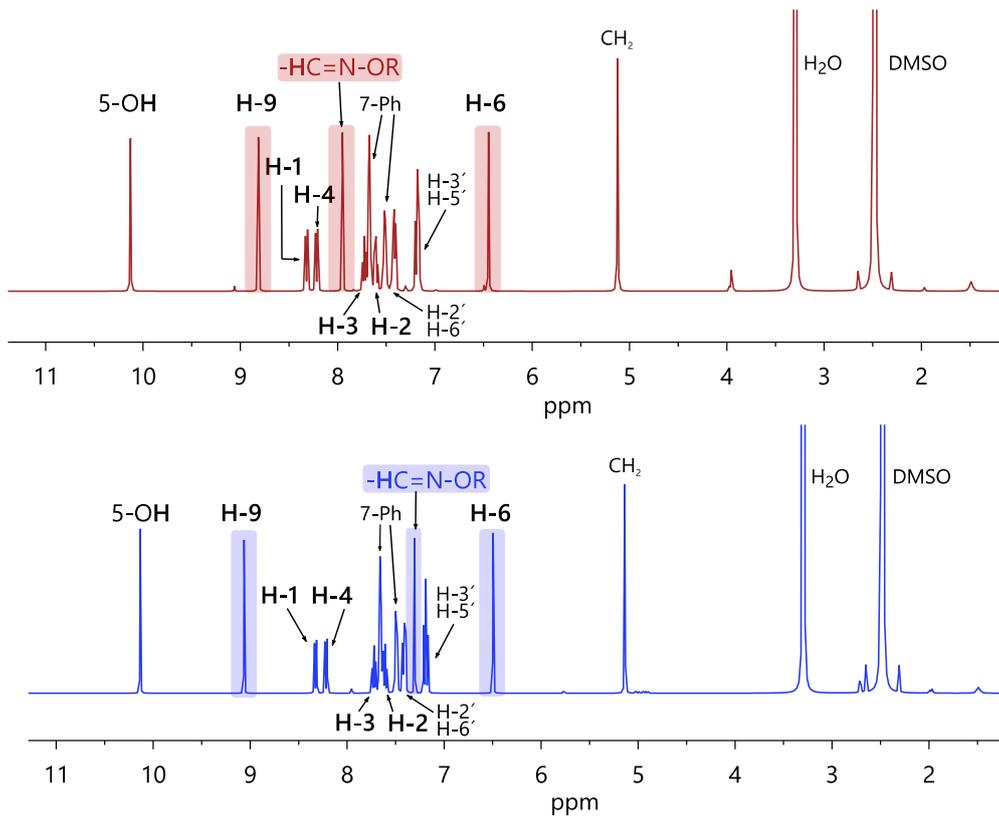


Abbildung 61: $^1\text{H-NMR}$ von **92 E** (oben, rot); $^1\text{H-NMR}$ von **92 Z** (unten, blau).
Vergleicht man beide $^1\text{H-NMR}$ -Spektren erkennt man, dass das Methinproton bei **92 E** im Gegensatz zu **92 Z** tieffeldverschoben vorliegt und H-6 sowie H-9 eine Hochfeldverschiebung erfahren (farbig unterlegt).

Isomereninversion

Laut GARCIA-IRIEPA und MARAZZI sind die *E/Z*-Isomere bistabile Systeme – auch Molekulare Schalter genannt –, die durch externe Stimuli in unterschiedliche elektronische Zustände gebracht werden können. Derartige Zustandsänderungen können durch pH-Veränderung, thermischen Einfluss oder Lichteinwirkung provoziert werden.^[278, 305, 306] Die Isomereninversion erfolgt umso schlechter, je größer die konfigurative Stabilität der Kohlenstoff-Stickstoff-Doppelbindung ($\text{C}=\text{N}$) ist. Befindet sich laut VÖGTLE ein Heteroatom mit freien Elektronenpaar in Nachbarschaft zur besagten Bindung, wird deren Stabilität außerordentlich gesteigert. Hingegen erleichtern Substituenten, die die Elektronendichte am Iminostickstoff vermindern, die Isomerisierung.^[307] Die *E*- und *Z*-isomeren Formen der *O*-Alkyl- beziehungsweise *O*-Benzylloximether weisen ebenso unterschiedliche thermodynamische Stabilitäten auf. Deren Überführung ineinander gelingt nur durch Überwindung einer Energiebarriere, der Aktivierungsenergie. Bei thermischen Reaktionen würde der Energieeintrag zur Erreichung der Aktivierungsenergie im Falle von (*E/Z*)-*O*-Alkyloximethern so hoch sein, dass sie nicht ohne weiteres durch Wärmezufuhr überwunden werden kann. So beschrieben CURTIN *et al.* 1966 eine nichtkatalysierte Umwandlung von dem *Z*-Isomer des Chlorophenylphenylmethanon-*O*-methyloxims in die *E*-Form mittels einer Energiezufuhr von 230 Grad Celsius über 170 Stunden. Für den inversen Prozess waren sogar 528 Stunden bei 200 Grad Celsius notwen-

dig.^[305] Bei einer photoinduzierten E/Z-Isomerisierung – auch Photochromie genannt – wird hingegen solche Transformation durch den Einsatz von Lichteinstrahlung bewirkt. Dieser photochemische Prozess erfolgt als diabatische Reaktion, bei der das Edukt in einen angeregten Zustand überführt wird und über sein angeregtes Minimum ins Produkt mündet.^[308, 309] Daher entschied man sich für eine angestrebte Isomerenumwandlung innerhalb dieser Arbeit, die Ultraviolettstrahlung zu nutzen. Dazu wurde **80** in DMSO-*d*₆ gelöst und mittels einer Ultra-Vitalux-Lampe bestrahlt. Dieses Leuchtmittel emittiert ein ähnliches Spektrum wie das Sonnenlicht (> 270 nm).^[310] Der Reaktionsverlauf wurde mittels ¹H-NMR- und HPLC-Analytik dokumentiert. Nach einem Tag Bestrahlung war noch keine Isomerisierung vom E-Isomer der Verbindung **80** zu erkennen. Der Ansatz wurde weitere sechs Tage den UV-Strahlen ausgesetzt. Tatsächlich traten nunmehr alle charakteristischen chemischen Verschiebungen - Signale von H-2, H-5, der Methin- und Methylengruppe - doppelt auf (Abbildung 62, unten, Seite 89 oder Anlage, Seite XXII). Mit den Erkenntnissen, die bei der Isomerendifferenzierung von **92** gewonnen wurden, konnten die neu auftretenden Signale eindeutig dem Z-Isomer zugeordnet werden. Auch bei der HPLC-Analytik traten ab dem siebten Tag und fortwährend bei jeder Messung zwei aufeinanderfolgende *Peaks* auf (Abbildung 62, oben rechts, Seite 89 oder Anlage, Seite XXIII). Beide Isomere lagen annähernd im Verhältnis von eins zu eins vor. Man ließ den Ansatz in Erwartung, dass sich das Isomerenverhältnis weiter zu Gunsten der Z-Form verschieben würde, noch weitere 14 Tage bestrahlen. Diese Hypothese konnte nicht bestätigt werden. Auch nach 21 Tagen blieb die Relation beider Isomere zueinander unverändert. Die Isomerenformen lagen lichtinduziert somit im photostationären Zustand (*c*(E)/*c*(Z)) vor. Dessen Konzentrationsverhältnis definiert sich durch das Verhältnis der Quantausbeuten von Hin- und Rückreaktion (Φ_{E-Z} und Φ_{Z-E}) sowie des Absorptionskoeffizienten ϵ in Abhängigkeit von der Wellenlänge λ .^[308]

$$\frac{c(E)}{c(Z)} = \frac{\epsilon_Z^\lambda \Phi_{Z-E}}{\epsilon_E^\lambda \Phi_{E-Z}}$$

Gleichung 1: Berechnung des photostationären Zustands.^[306, 308]

Prinzipiell sind E/Z-Isomerisierungen durch π - π^* - sowie n - π^* -Übergänge charakterisiert.^[309] Nach der Molekülorbitaltheorie wäre das Anheben eines π -Elektrons von seinem energiereichsten, besetzten π -Orbital (*Highest Occupied Molecular Orbital*; HOMO) ins energieärmste, unbesetzte π^* -Orbital (*Lowest Unoccupied Molecular Orbital*; LUMO) denkbar. Dadurch wird das bindende Potential des Orbitals aufgehoben und die freie Drehbarkeit, aufgrund der noch bestehenden σ -Bindung, ermöglicht. Aus den aktivierten Zuständen können wiederum nach Rückkehr des π -Elektrons ins HOMO E- und Z-Isomere gleichermaßen gebildet werden. Damit wäre auch das Verhältnis im photostationären Gleichgewicht nachvollziehbar.^[309] Diese π - π^* -Orbitalübergänge postulierten auch PADWA und ALBRECHT bei ihren photochemischen Untersuchungen von 1-Phenylethan-1-on-O-methyloxim. Absorptionen, die auf energieärmere n - π^* -Übergänge hindeuten würden, konnten sie nicht nachweisen. Die n - π^* -Zustände sollten einen beträchtlichen

Doppelbindungscharakter behalten und so einen großen Widerstand gegen Rotationsbewegungen bieten.^[311]

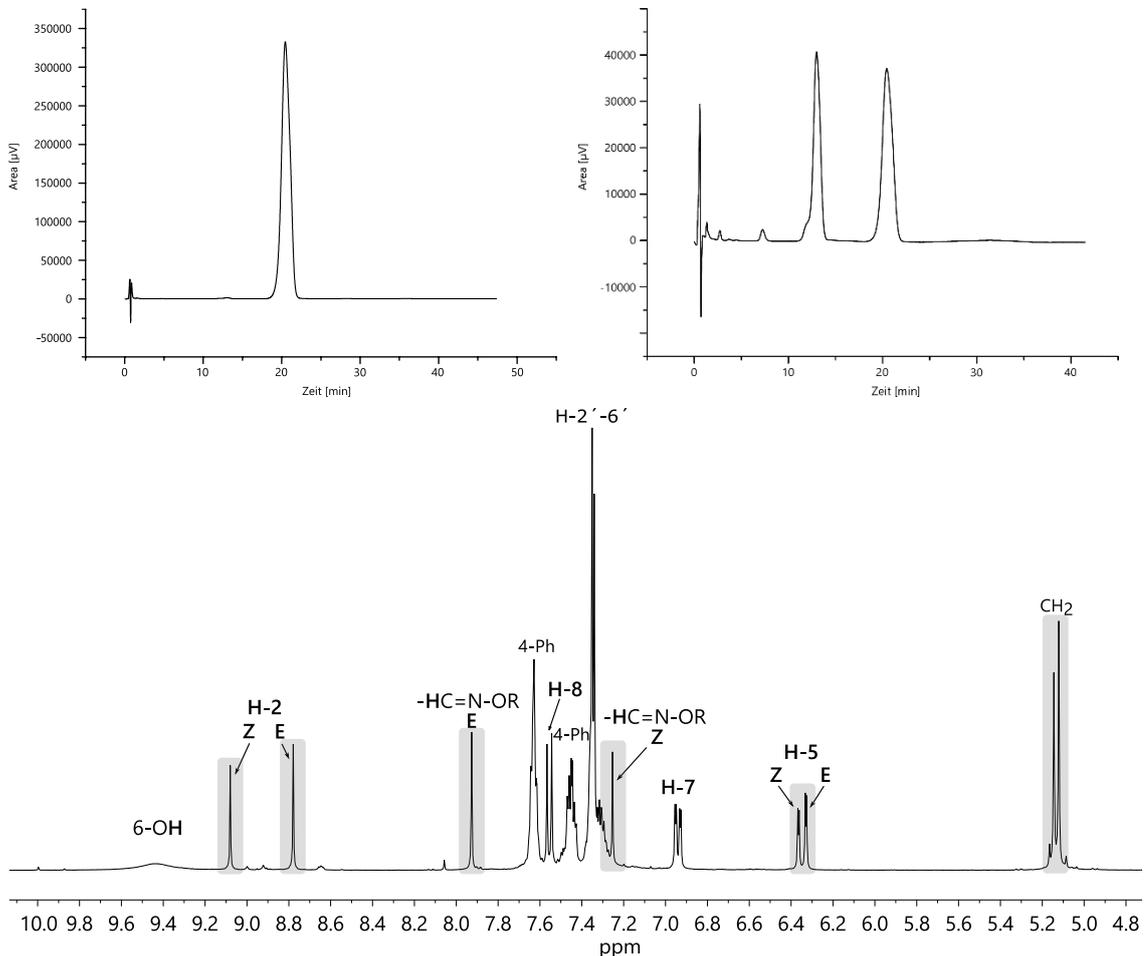


Abbildung 62: Isomerisierung der E-Form von **80** zum Z-Isomer anhand von HPLC- und ¹H-NMR-Analytik.

Oben links: HPLC Ergebnis von **80** ($t_R = 20,417$ min, 99,39 %); oben rechts: HPLC Ergebnis von **80** nach sieben Tagen UV-Bestrahlung (Z-Form: $t_R = 12,992$ min, 44,02 %, E-Form: $t_R = 20,442$ min, 55,98 %); unten: ¹H-NMR von **80** mit charakteristischer Signalverdopplung von H-5, H-2 und den Methinprotonen. Weiterhin zeigt die Methylengruppe ein zusätzliches Signal.

Betrachtet man die Valenzbindungstheorie ist der E/Z-Isomerisierungsprozess von O-Alkyl-oximethern im Detail nicht vollends aufgeklärt. Grundsätzlich werden die zwei ursprünglich von CURTIN *et al.* beschriebenen Ansätze in der Literatur genauer diskutiert.^[305] Zum einen griff MARULLO und WAGENER 1966 den von CURTIN postulierten Rotationsmechanismus um die C=N-Bindung herum auf. Ihre Ergebnisse zur Isomerisierung von Iminokohlensäureestern legen aufgrund der sehr niedrigen Aktivierungsenergie und der großen Isomerisierungsrate der Verbindungen einen Reaktionsablauf mit polarem Übergangszustand nahe. Dabei kommt es zur Delokalisierung der π -bindenden Elektronen.^[312] KESSLER befasste sich zwei Jahre später mit dem zweiten möglichen Ansatz, bei dem sich im Übergangszustand die an der Iminostickstoff-gebundenen Gruppe in einer Ebene mit der Iminofunktion ausrichtet. Dieser lineare Mechanismus wird vorrangig für Verbindungen mit raumgreifenden Resten beschrieben.^[313] Dabei bleibt die π -Bindung intakt und das Orbital,

in dem das nicht gebundene Elektronenpaar des Stickstoffs lokalisiert ist, rehybridisiert zum p-Orbital. Diese Transformation soll die Interaktion der π -Elektronen mit dem p-Orbital erleichtern.^[314] PADWA und ALBRECHT halten es sogar für möglich, dass die Isomerisierung über eine 1,3-sigmatrope Wasserstoffverschiebung abläuft, können sie aber nicht im Detail belegen.^[311]

Bei noch intensiverer Bestrahlung würde auf der Isomerisierung eine Fragmentierung folgen, die durch die Entstehung von Iminylradikalen charakterisiert ist. Als Folgeschritte würden sich die Radikale zum Imin absättigen und hydrolytisch, unter Bildung eines Aldehyds, gespalten werden.^[306]

4.3 Proteinkinasehemmung

Der erste Teil der Testung wurde in Zusammenarbeit mit der PROQINASE GmbH (Freiburg) realisiert. Der dort entwickelte ³³PANQINASE®-Assay basiert auf einer radiometrischen Aktivitätsbestimmung von Kinasen, bei dem [γ -³³P]-ATP, als Phosphatdonator, radioaktives ³³P-Phosphat (³³P_i) auf das Zielsubstrat überträgt, was nachfolgend quantitativ detektiert wird. Dort wurden die Verbindungen **23** bis **27**, **36** bis **41** sowie **44** bis **48** (siehe Tabelle 10, Seite 92) an CDK1/CycB1, GSK3 β , ERK1, JNK3 und Fyn Wild Typ (Fyn wt) getestet (siehe 8.1).

Der zweite Teil der Testung erfolgte in Kooperation mit den Arbeitskreisen P.KOCH aus Tübingen und V. KRYSTOF aus Olomouc (Tschechien). P.KOCH und Mitarbeiter ermittelten die inhibitorische Aktivität der Verbindungen **28**, **30** bis **35**, **42**, **43**, **49**, **50** (siehe Tabelle 11, Seite 92) sowie **77** bis **86** und **88** bis **96** (siehe Tabelle 12, Seite 93) an GSK3 β und JNK3. Dabei nutzten sie zum einen den relativ neuen ADP-Glo™-Kinase-Assay, bei dem das durch Verbrauch von ATP entstandene ADP wiederum in ATP umgewandelt und dessen erneuter Umsatz über eine Luciferase-Reaktion bestimmt wird (für GSK3 β , siehe 8.2). Zum anderen wurde für die Aktivitätsermittlung an der JNK3 ein *Enzyme-linked Immunosorbant Assay* (ELISA) genutzt, bei dem ein antiphospho-basierter Antikörper mit einer Meerrettichperoxidase verknüpft ist. Diese induziert die Umwandlung des Farbstoffes 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB), was mit der Ausprägung der Hemmaktivität korreliert (siehe 8.3). Der von der Arbeitsgruppe um V. KRYSTOF verwendete Assay funktioniert in analoger Weise zu dem ³³PANQINASE®-Assay. Er diente zur Aktivitätsbestimmung der oben genannten Verbindungen, einschließlich **29**, an der CDK1/CycB, CDK2/CycE und Fyn wt (siehe 8.4).

In jedem Assay wurden für alle Testsubstanzen Verdünnungsreihen angefertigt und vermessen. Zusätzlich wurden Kontrollwerte in Abwesenheit der zu testenden Verbindung, aber mit Kinasezusatz (Positivkontrolle) und ohne Kinase (Negativkontrolle) bestimmt. Im Anschluss ermittelte man je nach Assay die prozentuale Restaktivität beziehungsweise die prozentuale Hemmaktivität (Differenz von 100 und der prozentualen Restaktivität). Zur Vereinheitlichung werden in dieser Arbeit ausschließlich die prozentualen Restaktivitäten betrachtet.

$$\% \text{ Restaktivität} = \frac{\text{Messwert} - \text{Negativkontrolle}}{\text{Positivkontrolle} - \text{Negativkontrolle}} \times 100$$

Gleichung 2: Berechnung der prozentualen Restaktivität.^[315]

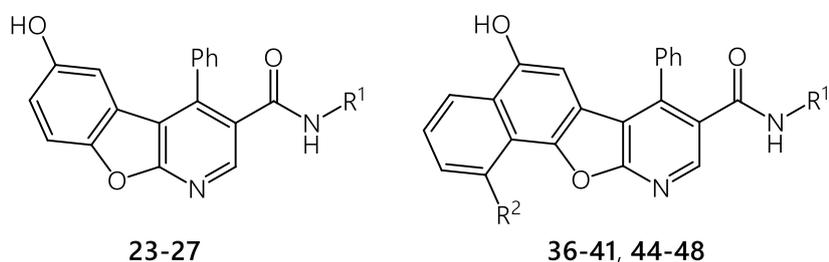
Aus den prozentualen Restaktivitäten lassen sich die IC₅₀-Werte softwareunterstützt ermitteln. Der IC₅₀-Wert gibt die Konzentration an, bei der eine halbmaximale Hemmung erfolgt und wird als Maß für die Stärke der inhibitorischen Wirkung angesehen.^[132] Im Falle der ersten Teilstellung wurden von der PROQINASE alle Werte als IC₅₀ angegeben. IC₅₀-Werte größer 100 Mikromol betrachtete PROQINASE als nicht aktiv und wurden folgendermaßen deklariert: >1E-04 M. Bei den Untersuchungen von P.KOCH erfolgte die Bestimmung der IC₅₀-Werte bei 10 Mikromol Substanz- sowie ATP-Konzentration. Nur bei prozentualen Restaktivitäten unter 55 Prozent wurden exakte

IC₅₀-Werte ermittelt. Bei höheren Restaktivitäten wurden die IC₅₀-Werte als größer (> 10 μM) oder deutlich größer (>> 10 μM) deklariert.

Die Arbeitsgruppe um V. KRYSOF bestimmte die IC₅₀-Werte bei 20 Mikromol Substanz- und 15 Mikromol ATP-Konzentration. Die exakten IC₅₀-Werte wurden nur bei prozentualen Restaktivitäten bis 58 Prozent bestimmt. IC₅₀-Werte höherer Restaktivität wurden als größer 20 Mikromol (> 20 μM) deklariert.

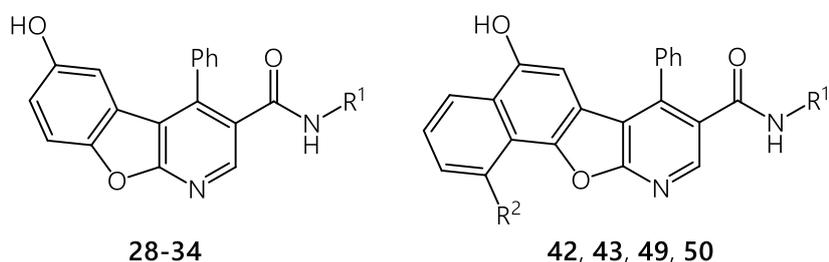
Alle hier angeführten Werte sind noch einmal tabellarisch in den jeweiligen Abschnitten im experimentellen Teil (siehe 8.1, 8.2, 8.3 und 8.4) oder in der Anlage von Seite XXIX bis XXXII angegeben.

Tabelle 10: Strukturübersicht der im ersten Teil getesteten Verbindungen mit Amid-Partialstruktur.



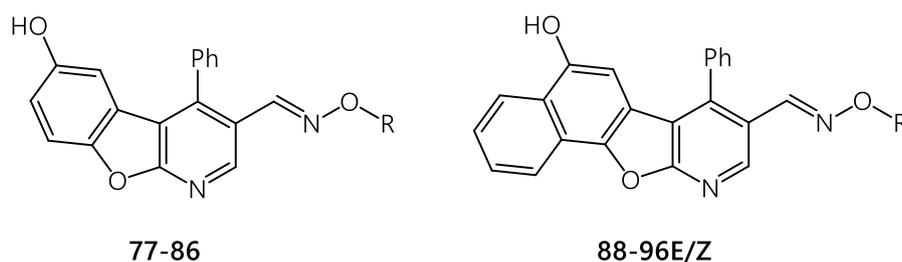
Verb.	R ¹	Verb.	R ²	R ¹
23	H	39	H	4-MeOPh
24	4-ClPh	40	H	3-MeOPh
25	3-ClPh	41	H	Bn
26	4-MeOPh	44	MeO	Ph
27	3-MeOPh	45	MeO	4-ClPh
36	H	46	MeO	3-ClPh
37	H	47	MeO	4-MeOPh
38	H	48	MeO	3-MeOPh

Tabelle 11: Strukturübersicht der im zweiten Teil getesteten Verbindungen mit Amid-Partialstruktur.



Verb.	R ¹	Verb.	R ²	R ¹
28	Bn	42	H	4-ClBn
29	4-ClBn	43	H	4-MeOBn
30	3-ClBn	49	MeO	Bn
31	2-ClBn	50	MeO	4-MeOBn
32	4-MeOBn			
33	3-MeOBn			
34	2-MeOBn			

Tabelle 12: Strukturübersicht der im zweiten Teil getesteten Verbindungen mit Oxim- und Oximether-Partialstruktur.



Verb.	R	Verb.	R
77	H	88	H
78	Me	89	Me
79	Et	90	Et
80	Bn	91	Bn
81	4-FBn	92E	4-FBn
82	4-ClBn	92Z	4-FBn
83	2-ClBn	93	4-ClBn
84	4-MeOBn	94	2-ClBn
85	3-MeOBn	95	4-MeOBn
86	2-MeOBn	96E	3-MeOBn
		96Z	3-MeOBn

4.3.1 Interpretation der Testergebnisse von der PROQINASE GmbH

Laut früheren *in vitro*-Ergebnissen galt **28** mit einer CDK1/CycB1-Aktivität von 1,47 Mikromol als potenter Inhibitor für diese Kinaseklasse. Man postulierte eine verstärkte, hydrophobe Wechselwirkung mit der *Gatekeeper*-AS Phe80 (bei Ausrichtung II, Abbildung 18, Seite 35).^[132] Somit ging man davon aus, dass die um eine Methylengruppe verkürzten Anilide in Position drei zu ähnlichen Ergebnissen führen. Weder **23** bis **27** noch ihre benzoanellierten oder die 1-Methoxy-tragenden, benzoanellierten Verbindungen zeigten eine Aktivität an der CDK1/CycB1 ($IC_{50} > 100 \mu M$). Dies könnte einerseits daran liegen, dass die Anilide den Phenylring im Gegensatz zu **28** nicht parallel zur *Gatekeeper*-AS ausrichten können und somit keine π - π -Wechselwirkungen möglich sind. Andererseits könnten Derivatisierungen am Anilidgerüst oder in den benzoanellierten Verbindungen **36** bis **48** zu einer derart großen sterischen Hinderung führen, dass eine Interaktion mit dem katalytischen Zentrum nicht mehr möglich ist. Ähnlich sah die Datenlage bei der Testung an der GSK3 β aus. Alle der oben genannten Verbindungen zeigten IC_{50} -Werte über 100 Mikromol und wurden daher als nicht aktiv gewertet.

An der ERK1 zeigte **23** keine relevante Hemmaktivität. Sein *para*-Chlor-substituiertes Analogon **24** hingegen wies einen IC_{50} -Wert von 63,5 Mikromol auf. Wahrscheinlich orientiert sich **24** nach Ausrichtung I (Abbildung 17, Seite 34), sodass der Rest in Position drei in die vordere hydrophobe Tasche ragt und sich über van-der-Waals-Kräfte stabilisiert. Diese Orientierung würde es der phenolischen OH-Gruppe erlauben mit der *Gatekeeper*-AS der ERK1 Glutamin 103 (Gln103) eine Wasserstoffbrücke auszubilden. Die Substitution des Chlorrestes durch eine Methoxygruppe sowie die Positionierung beider Reste in *meta*-Stellung scheint für die Wechselwirkung mit der vorderen

hydrophoben Bindetasche nachteilig zu sein. Die Verbindungen **25** bis **27** zeigten folglich keinerlei Hemmaktivität ($IC_{50} > 100 \mu M$). Verbindung **41** wies einen IC_{50} -Wert von 85,2 Mikromol auf. Die Anilid-analogen Verbindungen waren dagegen an der ERK1 inaktiv ($IC_{50} > 100 \mu M$). Anscheinend wirken sich die durch die Methylenbrücke zusätzlich gewonnenen Freiheitsgrade bei **41** positiv auf die Hemmaktivität aus. Das könnte mit zusätzlichen hydrophoben Wechselwirkungen und einer Erhöhung der Entropie einhergehen.

An der JNK3 waren ausschließlich die 1-Aza-9-oxafluorene mit Carbanilidstruktur in Position drei aktiv. Verbindung **23** wies einen IC_{50} -Wert von 38,7 Mikromol auf. Zusätzlich zu der Ausbildung einer Wasserstoffbrücke über das Stickstoffatom des Azoxafluoren-Ringes zu Met149 der *Hinge*-Region sind hydrophobe Wechselwirkungen zur hinteren hydrophoben Tasche wahrscheinlich.^[261] In *Docking*-Experimenten konnte die Ausbildung dieser hydrophoben Tasche *in silico* nachgewiesen werden.^[261] Daher ist von einer Orientierung nach Ausrichtung II auszugehen (siehe 4.4 *Docking*-Untersuchungen, Seite 101). Diese Hypothese wird durch die leichte Affinitätssteigerung aufgrund der Erweiterung des 3-Anilidrestes mit einem Chlorsubstituenten in Position vier unterstützt (**24** mit $IC_{50} = 35,7 \mu M$). Der Austausch des Chlorsubstituenten durch eine Methoxygruppe führte hingegen zur Reduzierung der Hemmaktivität (**26** mit $IC_{50} = 93,3 \mu M$). Bei **26** scheint der sterische Einfluss folglich so groß zu sein, dass eine optimale Orientierung des Restes in Stellung drei nicht gewährleistet ist. Bei den *meta*-substituierten Aniliden **25** und **27** ist der Substituent sterisch unvorteilhaft, sodass Hemmaktivitäten größer 100 Mikromol die Folge sind. Die benzoanellierten Verbindungen zeigten ebenfalls keine Hemmwirkung. Eine Orientierung nach Ausrichtung II im katalytischen Zentrum wäre am wahrscheinlichsten. Allerdings scheint der Ligand ein so großes Raumvolumen einzunehmen, dass die Verbindungen sich nicht ideal in der Bindetasche orientieren können.

Verbindung **23** ist weiterhin an der Fyn wt aktiv ($IC_{50} = 37,2 \mu M$). Neben der Ausbildung einer Wasserstoffbrücke zu Met85 der *Hinge*-Region wäre **23** bei Ausrichtung II in der Lage, über die phenolische Hydroxygruppe in Position sechs eine weitere H-Brücke mit der Carbonyleinheit von Leu17 im vorderen Bereich der Bindetasche auszubilden. Dies bestätigen die *Docking*-Ergebnisse im nächsten Abschnitt (4.4, Seite 101).^[261] **24** bis **27** zeigten mit IC_{50} -Werten größer 100 Mikromol deutlich geringere Wechselwirkungen mit der ATP-Bindedomäne. Trotz des kleineren Molekülvolumens des *Gatekeeper*-Threonins (Thr82) und des damit verbundenen Zuganges zur hinteren hydrophoben Bindedomäne, scheint die Interaktion mit dieser nur eingeschränkt bis gar nicht zu bestehen.^[316] Ein Grund dafür wäre die nicht flexible Anilidpartialstruktur, die den lipophilen Rest in Stellung drei nicht optimal ausrichtet und so die Wechselwirkung mit der hinteren hydrophoben Tasche ausbleibt. Hinzukommt, dass weitere AS, wie Met58, Glu54 und Lys39 den hinteren Teil der Bindedomäne räumlich stark limitieren (siehe 4.4, Seite 101).^[261] **36** ist das benzoanellierte Analogon zu **23**, das allerdings keine Hemmaktivität zeigt ($IC_{50} > 100 \mu M$). Eine Interaktion mit der *Hinge*-Region bei Ausrichtung II scheint nicht ausreichend zu sein, um IC_{50} -Werte unterhalb von 100 Mikromol zu erhalten. Die Substitution des Phenylrings durch einen Benzylrest in Position

acht, wie bei **41**, führt hingegen zur Verbesserung der IC_{50} -Werte ($IC_{50} = 41,8 \mu\text{M}$). Denkbar wäre, dass durch die zusätzliche Methylenbrücke des Restes in Stellung acht sowie die damit verbundenen vermehrten Freiheitsgrade **41** dazu verhelfen, dem sterischen Hindernis der *Gatekeeper*-AS deutlich besser auszuweichen. Somit wäre eine Interaktion mit der hinteren hydrophoben Binde-tasche gegeben.

Die 1-Methoxy-11-aza-10-oxabenz[*a*]fluorene synthetisierte man in Erwartung, dass sich die Ver-bindungen in der aktiven Bindetasche nach Ausrichtung II orientieren und die zusätzliche Me-thoxygruppe über weitere Wechselwirkungen mit Resten der vorderen hydrophoben Bindetasche interagieren könne. Verbindung **44** zeigte mit IC_{50} -Werten über 100 Mikromol an keiner der getes-teten Kinasen eine Hemmwirkung. Erweiterte man den Anilidrest um einen Chlorsubstituenten in *meta*- beziehungsweise um eine Methoxygruppe in *para*-Position, sind Affinitätssteigerungen an der Fyn-Kinase von 62,2 Mikromol (**46**) und 66,4 Mikromol (**47**) verzeichnet worden. Eine plausible Struktur-Wirkungsbeziehung ist allerdings nicht ableitbar, da Verbindung **45** und **48** IC_{50} -Werte über 100 Mikromol präsentieren, obwohl ähnliche Hemmwerte erwartbar wären.

Somit ist festzuhalten, dass **23** eine dual inhibierende Verbindung an JNK3 und Fyn wt mit mo-deraten Hemmeigenschaften darstellt.

4.3.2 Interpretation der Testergebnisse von P.KOCH

Enzymatische Restaktivität der Verbindungen an der GSK3 β

Bei der Testung der Verbindungen an der GSK3 β waren vor allem die 1-Aza-9-oxafluorene mit Benzylaminrest in Stellung drei auffällig. Sie sind im Gegensatz zu den 3-Anilid-Vertretern an der GSK3 β aktiv. Das unsubstituierte Benzylamidderivat **28** wies eine Restaktivität von 54 Prozent ($IC_{50} = 20,25 \mu\text{M}$) auf. Diese erhöhte sich bei dem *meta*-substituierten Chlorderivat (**30**) auf 73 Pro-zent ($IC_{50} > 10 \mu\text{M}$). Befand sich der Chlorrest in *ortho*-Position, senkte sich die restliche Aktivität der Kinase auf 52 Prozent (**31**, $IC_{50} = 22,50 \mu\text{M}$) ab. Substanzen mit Methoxygruppen zeigten fol-gende Restaktivitäten: **32** 61 Prozent ($IC_{50} > 10 \mu\text{M}$, *para*-substituiert), **33** 55 Prozent ($IC_{50} = 10,23 \mu\text{M}$, *meta*-substituiert) und **34** 59 Prozent ($IC_{50} > 10 \mu\text{M}$, *ortho*-substituiert). Die Orientierung in der Bindetasche ist nach beiden Ausrichtungen denkbar. Aufgrund der moderaten Hemmaktivitäten einzelner 1-Aza-9-oxafluorene mit Benzylamidrest ist jedoch Ausrichtung II wahr-scheinlicher. Somit kann eine neue Wasserstoffbrücke zwischen der phenolischen Hydroxygruppe und der Aminofunktion des Arg141 in der vorderen hydrophoben Tasche der GSK3 β ausgebildet werden.^[132] Dies gewährleistet zugleich eine hydrophobe Wechselwirkung der 3-substituierten Reste mit der *Gatekeeper*-AS. Zweifelsohne beeinflussen die lipophilen Reste an der Benzylamidpartialstruktur die Affinität, allerdings ohne erkennbare Struktur-Wirkungsbeziehung. Die benzoanellierten Verbindungen **42** und **43** sowie die Vertreter der 1-Methoxy-benzoanellierten Substanzen **49** und **50** zeigten eine deutlich höhere Restaktivität (von 80 bis 92 %). Wahrscheinlich

ist deren Molekülvolumen zu stark ausgeprägt, um die optimale Wechselwirkung mit der katalytischen Domäne zu gewährleisten.

Das 1-Aza-9-oxafluoren-3-carbaldehydoxim (**77**) zeigte mit einer Restaktivität von 43 Prozent und einem IC_{50} -Wert von 4,8 Mikromol die besten Hemmeigenschaften aller getesteten Verbindungen. Aus früheren *Docking*-Studien geht hervor, dass durch eine Hydroxygruppe in Position drei die Bindungsaffinität der 1-Aza-9-oxafluorene zur GSK3 β deutlich gesteigert wird. Sie interagiert bei Ausrichtung II über ein inkorporiertes Wassermolekül mit Asp200 im hinteren Teil der ATP-Bindetasche. Eine weitere Wasserstoffbrücke bildet sich zwischen der phenolischen Hydroxygruppe und der Aminofunktion des Arg141 in der vorderen hydrophoben Tasche der GSK3 β .^[132] Ein ähnlicher Bindungsmodus wäre auch bei **77** denkbar. Derivatisiert man **77** zum *O*-Methyloximether (**78**) erhöht sich die Restaktivität auf 73 Prozent ($IC_{50} > > 10 \mu M$), was mit einem Verlust der erstgenannten Wasserstoffbrücke korrelieren könnte. Parallel dazu sind eine Verdrängung des Wassermoleküls und eine verstärkte Van-der-Waals-Interaktion zu Leu132 wahrscheinlich. Diese These bekräftigt sich im Hinblick auf die Restaktivität des *O*-Ethyloximetherderivats (**78** mit 59 %, $IC_{50} > 10 \mu M$). Durch die zusätzliche Methylengruppe erhöhen sich nicht nur die Freiheitsgrade, sondern auch die Möglichkeit zur Ausbildung hydrophober Wechselwirkungen. Erweitert man den Rest am Oxim um eine Benzylgruppe, erhöht sich die Restaktivität deutlich (**80** mit 87 %, $IC_{50} > > 10 \mu M$). Betrachtet man die weiteren *O*-Benzyloximether **81** bis **86**, so lassen sich Restaktivitäten von bis zu 93 Prozent feststellen. Dabei sind diese unabhängig von der Position zusätzlicher Substituenten am Benzylrest – abgesehen von **84**. Das *para*-Methoxybenzyl-Derivat (**84**) weist eine Restaktivität von 81 Prozent ($IC_{50} > > 10 \mu M$) auf. Dessen Methoxyposition scheint im Vergleich zu den *meta*- und *ortho*-substituierten Verbindungen (**85** und **86** mit 91 % und 93 %) eine stärkere Wechselwirkung mit den AS-Resten im hinteren Teil der Bindetasche einzugehen. Eine schwach ausgeprägte Wasserstoffbrückenbildung zur Aminogruppe des Peptidrückgrates, die **85** und **86** nicht ausbilden, wäre vorstellbar.

Erweitert man **77** um eine benzanellierte Gruppe, erhöht sich dessen Restaktivität ebenfalls deutlich (**88** mit 79 %, $IC_{50} > > 10 \mu M$). Durch die Volumenerhöhung des Moleküls ist eine schwächere Ausbildung der oben genannten Wasserstoffbrücken oder gar ein Wegfall derer denkbar. Die Derivatisierung von **88** führt zu einem weiteren Affinitätsverlust, der mit einer ausgeprägten Molekülgröße korrelieren könnte (**89** bis **96** mit 83 % bis 99 %).

Enzymatische Restaktivität der Verbindungen an der JNK3

Die 1-Aza-9-oxafluorene mit Benzylamidrest in Stellung drei waren ebenso wie ihre 3-Anilid-Vertreter an der JNK3 aktiv. Das unsubstituierte Benzylamidderivat **28** wies eine Restaktivität von 50 Prozent ($IC_{50} = 13,00 \mu M$) auf. Diese erhöhte sich bei den Chlor-substituierten Derivaten **30** und **31** gleichermaßen auf 57 Prozent ($IC_{50} > 10 \mu M$). Von den Methoxygruppen-tragenden Substanzen zeigten die *para*-substituierte (**32**) und die *ortho*-substituierte Verbindung (**34**) mit 59 Prozent und 58 Prozent ähnliche Restaktivitäten. Die *meta*-substituierte Verbindung **33** wies widererwartend mit

52 Prozent ($IC_{50} = 36,20 \mu\text{M}$) die beste Hemmeigenschaft der genannten Substanzen auf. Betrachtet man diese Werte, wird deutlich, dass mit zunehmender Größe des lipophilen Restes ebenso die Restaktivität ansteigt. Das lässt vermuten, dass sich alle Verbindungen nach Ausrichtung II positionieren und zusätzlich zur gebildeten Wasserstoffbrücke zwischen dem Stickstoffatom des Ligandengrundkörpers und dem Met149 der *Hinge*-Region mit der durch Met146, Ile124, Met115, Leu 126 und Leu144 ausgekleideten hydrophoben Tasche im hinteren Teil der Bindedomäne in Van-der-Waals-Wechselwirkungen treten (siehe 4.4, Seite 101).^[261] Mit zunehmendem Volumen des Seitenkettenrestes verringert sich allerdings die Möglichkeit der Verbindungen zur adäquaten Orientierung. Erniedrigungen der Hemmeigenschaften sind die Folge. Würden sich die Verbindungen nach Ausrichtung I positionieren und somit der 3-Benzylamidrest mit der vorderen hydrophoben Bindedomäne wechselwirken, wären diese Restaktivitäten nicht zu erwarten. Mit Erweiterung des raumgreifenden Molekülvolumens, wie bei **42**, **43**, **49** und **50**, stieg auch die Restaktivität der Verbindungen an der JNK3 deutlich an (83 % bis 87 %).

77 zeigte auch an der JNK3 mit einer Restaktivität von 21 Prozent ($IC_{50} = 1,22 \mu\text{M}$) die besten Hemmeigenschaften aller getesteten Verbindungen. Ihre Orientierung nach Ausrichtung II ist wahrscheinlich. **77** bildet dabei zwei Wasserstoffbrücken zur Bindetasche aus, zum einen zu Met149 der *Hinge*-Region, zum anderen zu Ile70 der Phosphatbindenden Domäne (siehe 4.4, Seite 101). Von einer Wechselwirkung des Oximrestes mit *Gatekeeper*-Met146 ist nur eingeschränkt auszugehen. Die Oximgruppe ist nicht in der Lage, sich über hydrophobe Wechselwirkungen mit der *Gatekeeper*-AS zu stabilisieren. Auch die Interaktion mit dem Schwefelatom, über die Ausbildung einer schwachen Wasserstoffbrücke, ist fraglich. Laut WENMOHS ist das Schwefelatom im Methionin *in silico* nicht in der Lage, eine solche H-Brücke zum Liganden auszubilden. Dies bestätigte er in seinen mathematisch- und computergestützten Studien, wo er die mögliche Wechselwirkung zwischen dem heterozyklischen Rest von Trp199 eines Liganden und Met213 im katalytischen Zentrum der α -lytischen Protease untersuchte.^[317] Nunmehr ist die Nukleophilie der Oximstruktur, als definiertes α -Nukleophil, deutlich stärker als die der inkorporierten Aminpartialstruktur im Indolkörper des Trp199, sodass die Ausbildung einer schwachen Wasserstoffbrücke dennoch denkbar wäre. *Docking*-Untersuchungen, durchgeführt von Dr. DINA ROBAA, bestärkten allerdings die Hypothese, dass sich keine Wasserstoffbrücke, weder zum *Gatekeeper*-Met146 noch zu einer Carbonylfunktion des AS-Rückgrats, ausbildet (siehe 4.4, Seite 101).^[261] Durch die Methylierung (**78**) sowie Ethylierung (**79**) der Oximgruppe erhöht sich die Restaktivität auf 50 Prozent ($IC_{50} = 11,60 \mu\text{M}$) und 52 Prozent ($IC_{50} \approx 10 \mu\text{M}$). Erweitert man den hydrophoben Rest um eine Benzylgruppe (**80**), erhöht sich die Restaktivität weiterhin (73 %, $IC_{50} \gg 10 \mu\text{M}$). Substituiert man die Wasserstoffatome des Benzylrestes durch Halogen- sowie Methoxyreste, ist eine weitere Erhöhung der Restaktivität zu beobachten (**81** bis **83** und **85**, **86** mit 78 bis 82 %). Verbindung **84** zeigt hingegen eine geringere Restaktivität. Der *para*-Methoxybenzylrest scheint wohl besser po-

sitioniert zu sein und effektiver mit AS im hinteren Teil der Bindetasche zu interagieren - wahrscheinlich sogar über eine schwache Wasserstoffbrücke. Die Orientierung der Verbindung **80** bis **86** nach Ausrichtung I ist aufgrund des ausladenden Restes in Stellung drei ebenfalls denkbar.

Verbindung **88** zeigt mit 54 Prozent Restaktivität ($IC_{50} \approx 10 \mu\text{M}$) eine deutlich geringere Hemmeigenschaft als sein nicht-benzoanelliertes Analogon **77**. Von einem ähnlichen Bindungsmechanismus nach Ausrichtung II ist auszugehen.^[261] Allerdings scheint die Wechselwirkung aufgrund des raumgreifenden Molekülvolumens deutlich eingeschränkt zu sein. Nachfolgende Alkylierungen (**89** und **90**) schränkten die Hemmeigenschaften an der JNK3 weiter ein. Die an Position acht benzylierten Vertreter waren schließlich so voluminös, dass vereinzelt, wie bei **96E**, ein kompletter Verlust der Inhibition resultierte (**91** bis **96**, von 84 bis 100 %).

4.3.3 Interpretation der Testergebnisse von V.KRYSTOF

Enzymatische Restaktivität der Verbindungen an der CDK1/CycB und CDK2/CycE

Aufgrund der sehr hohen Sequenzhomologie der katalytischen Domänen von CDK1 und CDK2 ist eine erhöhte Selektivität der Verbindungen innerhalb der CDK-Familie nicht zu erwarten.^[318]

Die früheren *in vitro*-Ergebnisse von **28** mit einer CDK1/CycB1 Aktivität von 1,47 Mikromol konnten bei dieser Testung nicht bestätigt werden.^[132] **28** wies eine Restaktivität an CDK1/CycB sowie an CDK2/CycE von 72 und 65 Prozent auf, was mit einem IC_{50} -Wert über 20 Mikromol korreliert. Die Orientierung nach Ausrichtung II ist dennoch plausibel. Somit kann einerseits eine verstärkte π - π -Wechselwirkung mit der *Gatekeeper*-AS Phe80 erfolgen und sich parallel die Wasserstoffbrücke zwischen der phenolischen Hydroxygruppe und Ile10 der Phosphatbindestelle ausbilden. Die Erweiterung des Benzylrestes mit Halogenatomen und Methoxygruppen in *ortho*-, *meta*-, und *para*-Stellung zeigte keinen deutlichen Einfluss auf die Hemmeigenschaft (**29** bis **34** mit 66 bis 71 % an CDK1/CycB und 59 bis 64 % an CDK2/CycE). Durch die Benzanellierung erhöhte sich die Restaktivität deutlich (**42**, **43** und **49**, **50** mit 86 bis 105 % an CDK1/CycB und 63 bis 90 % an CDK2/CycE).

77 wies mit einer Restaktivität von 14 Prozent ($IC_{50} = 3,60 \pm 1,78 \mu\text{M}$) an der CDK1/CycB und 19 Prozent ($IC_{50} = 2,31 \pm 0,39 \mu\text{M}$) an der CDK2/CycE gute Hemmeigenschaften auf. Bei Ausrichtung II ist die Wechselwirkung mit Ile10 über eine H-Brücke sowie eine weitere mit dem *Backbone* im hinteren Teil der Bindetasche - zum Beispiel Glu81 der *Hinge*-Region - am wahrscheinlichsten. Durch die Alkylierung der Oximpartialstruktur werden die Hemmeigenschaften an beiden Kinasen abgemildert, wodurch die Wasserstoffbrücke im hinteren Teil der katalytischen Domäne erlischt (**78** mit 21 %, $IC_{50} = 6,89 \pm 1,65 \mu\text{M}$ an CDK1/CycB und mit 24 %, $IC_{50} = 4,88 \pm 2,67 \mu\text{M}$ an CDK2/CycE; **79** mit 25 %, $IC_{50} = 7,59 \pm 1,05 \mu\text{M}$ an CDK1/CycB und mit 28 %, $IC_{50} = 6,21 \pm 2,05 \mu\text{M}$ an CDK2/CycE). Der Effekt der H-Brücke wird allerdings durch mögliche hydrophobe Wechselwirkungen zur Phe80 kompensiert. Durch die zusätzliche Methylengruppe (**79**) resultiert im Ver-

gleich zu **78** nur ein marginaler Verlust der Hemmeigenschaft. Die Ausweitung des 3-Oximetherrestes auf das *O*-Benzylderivat **80** führt zur deutlichen Erhöhung der Restaktivität (83 % an CDK1/CycB und 53 % an CDK2/CycE). Ersetzt man das Wasserstoffatom in *para*-Stellung durch ein Fluoratom, tritt eine bessere Hemmung an der CDK1/CycB auf (**81**, 58 % an CDK1/CycB und 70 % an CDK2/CycE). Vergleicht man die 3-*O*-Benzylloximetherderivate (**80** bis **86**) mit den 3-Benzylamidverbindungen, so lassen sich ähnliche Restaktivitäten feststellen. Daher ist zu vermuten, dass sich **80** bis **86** ebenfalls über π - π -Wechselwirkungen mit der *Gatekeeper*-AS Phe80 unabhängig von Art und Position des weiteren Substituenten am Benzenring stabilisieren. Aufgrund der sterischen Limitierung der Bindedomäne resultieren allerdings höhere Restaktivitäten.

Das benzoanelierte Derivat **88** wies im Vergleich zu **77** höhere Restaktivitäten an CDK1/CycB und CDK2/CycE auf (36 %, $IC_{50} = 8,73 \pm 1,93 \mu\text{M}$ und 30 %, $IC_{50} = 5,77 \pm 2,20 \mu\text{M}$). Wahrscheinlich positioniert sich **88**, analog zu **77**, nach Ausrichtung II und der Abfall der Hemmeigenschaft korreliert mit der voluminöseren Grundkörperstruktur. Durch die Alkylierung des Oxims kam es zu zusätzlichen Einbußen in der Inhibition (**89** und **90** mit 76 % an CDK1/CycB und 79 % an CDK2/CycE), die bei weiterem Zuwachs der Molekülgröße (**91** bis **96** mit 82 bis 106 % an CDK1/CycB und CDK2/CycE) nochmals abnahmen.

Enzymatische Restaktivität der Verbindungen an der Fyn wt

Von den 1-Aza-9-oxafluorenen mit Benzylamidrest in Stellung drei erhoffte man sich durch eine zusätzliche Interaktion mit der hinteren hydrophoben Bindetasche positive Auswirkungen auf die Hemmung der Fyn wt. Das unsubstituierte Benzylamidderivat **28** enttäuschte allerdings mit einer Restaktivität von 83 Prozent. Diese erhöhte sich bei den Chlor-substituierten Derivaten **30** und **31** auf 91 Prozent beziehungsweise 105 Prozent. Befand sich das Chloratom hingegen in *ortho*-Position, verbesserte sich dessen Hemmeigenschaft (76 %). Von den Methoxygruppen-tragenden Substanzen zeigten die *para*- (**32**) und die *ortho*-substituierte Verbindung (**34**) mit 75 Prozent und 86 Prozent deutlich höhere Restaktivitäten als ihr *meta*-ständiges Analogon (**33**, 64 %). Aus diesen Daten wird ersichtlich, dass weder aus der Art noch aus der Position der Substituenten eine plausible Struktur-Wirkungsbeziehung ableitbar ist. Weiterhin ist fraglich, ob eine Wechselwirkung mit der hinteren hydrophoben Bindetasche besteht. Wahrscheinlicher ist, dass das *Gatekeeper*-Thr82 ein sterisches Hindernis darstellt, sodass die Reste in Position drei die hydrophobe Tasche nicht besetzen. Hinzukommt, dass weitere AS, wie Met58, Glu54 und Lys39 den hinteren Teil der Bindedomäne räumlich stark limitieren (siehe 4.4, Seite 101).^[261] Durch eine Benzanellierung von **29** kommt es zur Reduzierung der Restaktivität auf 75 Prozent (**42**). Bei dem *para*-Methoxy-Derivat (**43**) führt die Benzanellierung hingegen zum kompletten Hemmverlust (103 %). Auffällig ist, dass die Substitution des Wasserstoffatoms an Position eins des 10-Aza-11-oxabenz[*a*]fluoren-Grundkörpers durch eine Methoxygruppe zu deutlich besseren Hemmeigenschaften führt. Bei der Inhibition der Fyn wt mit **49** konnte eine Restaktivität von 65 Prozent ermittelt werden. Erweitert man den Benzylrest in Stellung acht um eine *para*-positionierte Methoxygruppe (**50**), sinkt die

Restaktivität weiter auf 56 Prozent ($IC_{50} = 12,4 \pm 0,3 \mu\text{M}$). Denkbar wäre, dass die Methoxygruppe in Stellung eins eine H-Brücke zu dem Stickstoff-Rückgrat von Leu17 der vorderen hydrophoben Tasche ausbildet, die dazu verhilft, das Molekül besser auszurichten. In der Folge könnte parallel die am Benzylrest *para*-positionierte Methoxystruktur eine weitere H-Brücke zum *Gatekeeper*-Threonin aufbauen.

In der Annahme, dass sich **77** nach Ausrichtung II orientiert und neben einer Wasserstoffbrückenbindung zur *Hinge*-Region eine zusätzliche zum *Backbone* aufbauen könnte, forcierte man dessen Synthese. Erstaunlicherweise war die Restaktivität von **77** (77 %) an Fyn wt deutlich größer als erwartet, sodass die hypothetische Wechselwirkung nicht sehr wahrscheinlich ist. Das benzanellierte Analogon zeigte ähnliche Inhibitionseigenschaften (**88**, 71 %). Alkyliert man den Wasserstoffbrückendonator hingegen, so konnte eine deutliche Erniedrigung der Restaktivität (**78** mit 63 % und $IC_{50} = 16,3 \pm 0,5 \mu\text{M}$, **79** mit 66 % und $IC_{50} > 20 \mu\text{M}$) registriert werden. Der somit entstandene Wasserstoffbrückenakzeptor könnte nunmehr mit der Hydroxygruppe des *Gatekeeper*-Thr82 wechselwirken und zur Affinitätssteigerung beitragen. *Docking*-Studien legen allerdings eine Orientierung nach Ausrichtung I nahe und entkräften somit diesen Wechselwirkungscharakter.^[261] Die zusätzliche Benzanellierung beeinflusste die Aktivität von **89** und **90** an der Fyn wt weiterhin positiv (64 % und $IC_{50} = 13,1 \pm 1,6 \mu\text{M}$ sowie 58 % und $IC_{50} = 17,2 \pm 4,0 \mu\text{M}$), welche mit zusätzlichen Van-der-Waals-Wechselwirkungen einhergehen könnte.

Die Benzylierung der 1-Aza-9-oxafluorenoxime führte zu einer Erhöhung der Restaktivität von 61 bis 70 Prozent (**80** bis **81** und **84** bis **86**). Durch dieses erweiterte Molekülvolumen erfährt der Ligand - geht man von der Ausrichtung I aus - wohl keine optimale Orientierung des Oximetherrestes in der vorderen hydrophoben Bindetasche. Laut *Docking*-Experimente kommt es hier allerdings zu einer Kation- π -Wechselwirkung, die die Affinitätserniedrigung abmildert.^[261] Die sterische Hinderung ist besonders groß, sobald sich ein Chloratom in *ortho*-Position befindet (**83**). Die Restaktivität betrug 78 Prozent. Hingegen haben *para*-Chlor- (**82**) sowie *para*-Methoxysubstituenten (**84**) im Vergleich zum unsubstituierten Derivat **80** keinerlei Auswirkungen auf die Hemmeigenschaft an der Fyn wt.

Die benzanellierte Verbindung **91** wies, wie **80**, eine unveränderte Restaktivität von 62 Prozent auf. Bei den *para*-Fluor-substituierten Stellungsisomeren **92E** und **92Z** unterscheiden sich die Hemmeigenschaften deutlich. Während die Restaktivität von **92E** bei 77 Prozent liegt, konnte für **92Z** eine von 58 Prozent ($IC_{50} > 20 \mu\text{M}$) bestimmt werden. Denkbar wäre, dass die oben genannte Kation- π -Wechselwirkung bei **92Z** zwar aufgehoben wird, allerdings eine parallele Stabilisierung über eine zusätzliche Wasserstoffbrücke zwischen dem Sauerstoffatom der Oximetherpartialstruktur und dem Tyr84 der *Hinge*-Region erfolgt. Ähnliche Ergebnisse wären somit auch bei den *meta*-Methoxy-substituierten Stellungsisomeren **96E** und **96Z** zu erwarten gewesen. Ihre Restaktivitäten unterscheiden sich allerdings überhaupt nicht (75 %). Aufgrund des deutlich größeren Volumens der Methoxygruppe im Vergleich zum Fluoratom könnte der gesamte Rest in Position acht so stark sterisch beeinträchtigt sein, dass die oben beschriebenen Wechselwirkungen gar nicht

mehr möglich sind. Das *para*-Chlor-substituierte Derivat **93** zeigt hingegen mit 63 Prozent Restaktivität und mit einem IC₅₀-Wert von 19,3 Mikromol (\pm 1,0 μ M) moderate Hemmeigenschaften.

Mit **77** respektive **88** ist es gelungen, Verbindungen zu entwickeln, die gute bis moderate Hemmwirkungen an GSK3 β , JNK3 sowie an CDK1/CycB und CDK2/CycE zeigen, deren Affinität aber zur Fyn wt, aufgrund ihres zusätzlichen Wasserstoffbrückendonators, deutlich reduziert ist.

4.4 Docking-Untersuchungen

Zum besseren Verständnis der Wechselwirkungen der in dieser Arbeit synthetisierten Verbindungen mit ihren Zielproteinen wurden *Docking*-Experimente durchgeführt. Das *Docking* wurde von Dr. DINA ROBAA aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. WOLFGANG SIPPL am Institut für Pharmazie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg realisiert.

Zur Untersuchung wählte man insgesamt sieben Verbindungen (**23**, **28**, **77**, **78**, **88**, **89**, **90**) aus, die gute inhibitorische Eigenschaften in der biologischen Testung zeigten. Sie wurden an den Röntgenkristallstrukturen der JNK3 und der Fyn-Tyrosinkinase *in silico* getestet. Die verwendeten *Docking*-Methoden und-Parameter sind im Abschnitt 6.2.9 *In silico* Untersuchungen (Seite 122) näher beschrieben.^[261]

JNK3-Docking-Ergebnisse

Um die plausibelsten Bindungsmodi auszuwählen, analysierte man die am besten bewerteten *Docking*-Stellungen in neun repräsentativen Proteinstrukturen. Es wurden nur *Docking*-Positionen beibehalten, bei denen der Pyridinstickstoff eine Wasserstoffbrücken-Wechselwirkung mit dem Grundgerüststickstoff von Met149 der *Hinge*-Region aufwies. Die Annahme, dass diese Wasserstoffbrückenbindung wesentlich für die Bindung ist, basiert auf der Beobachtung, dass analoge Verbindungen die gleiche Wasserstoffbindung mit dem Grundgerüststickstoff des konservierten Methionins der *Hinge*-Region in anderen Kinasen zeigen, wie zum Beispiel Furanopyrimidinderivate in EGFR.^[261]

Für die Verbindungen **23** und **28** beobachtete man zwei mögliche Bindungsmodi, bei denen eine konservierte Wasserstoffbrückenbindung zwischen dem Pyridinstickstoff und Met149 gebildet wird. Bei der ersten möglichen Bindungsorientierung sind der Phenyl- beziehungsweise Benzylrest in Position drei zur vorderen hydrophoben Bindetasche ausgerichtet (Ausrichtung I, am Protein PDB 1PMV, Abbildung 63, Seite 102). Eine weitere Interaktion, als die oben beschriebene Ausbildung der Wasserstoffbrücke, konnte nicht gefunden werden. Währenddessen nehmen im Protein PDB ID 3G9L die Seitenketten von Met146 (*Gatekeeper*-AS) und Ile124 eine andere Konformation an, als die in 1PMV beobachtete. Dadurch öffnet sich im hinteren Teil der Bindedomäne eine mit den Resten Met146, Ile124, Met115, Leu126 und Leu144 ausgekleidete hydrophobe Tasche, in der sich der Phenyl- beziehungsweise Benzylrest in Position drei von **23** sowie **28** orientieren. Der zweite

Bindungsmodus ist daher plausibler (Ausrichtung II, am Protein PDB 3G9L, Abbildung 64, Seite 102).^[261]

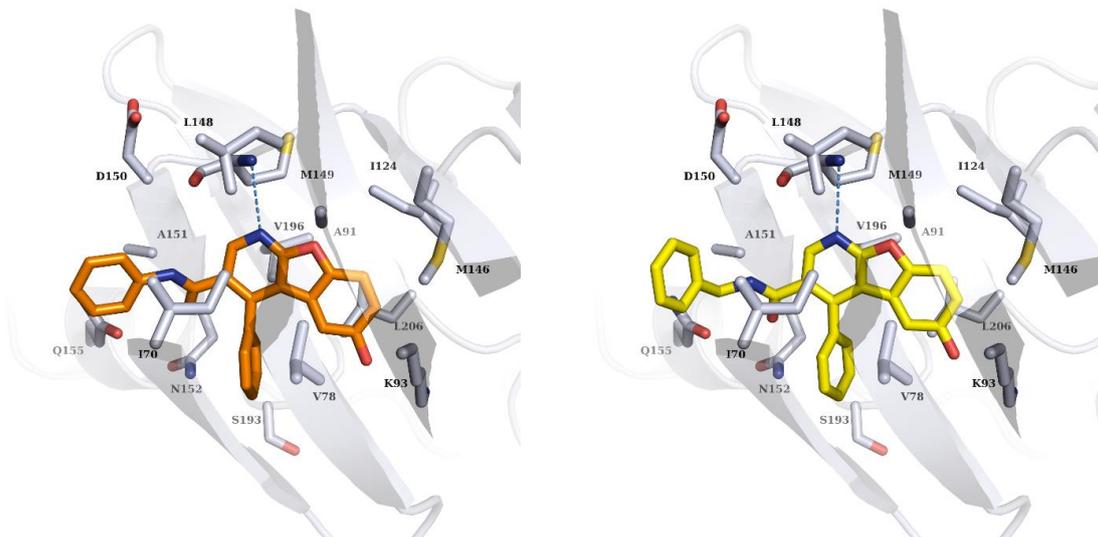


Abbildung 63: Möglicher Bindungsmodus von **23** (orange, links) und **28** (gelb, rechts) nach Ausrichtung I. Außer die ausgebildete Wasserstoffbrücke zwischen dem Stickstoff des Ligandengrundkörpers und dem Met149 der Hinge-Region sind keine weiteren Interaktionen ermittelt worden.^[261]

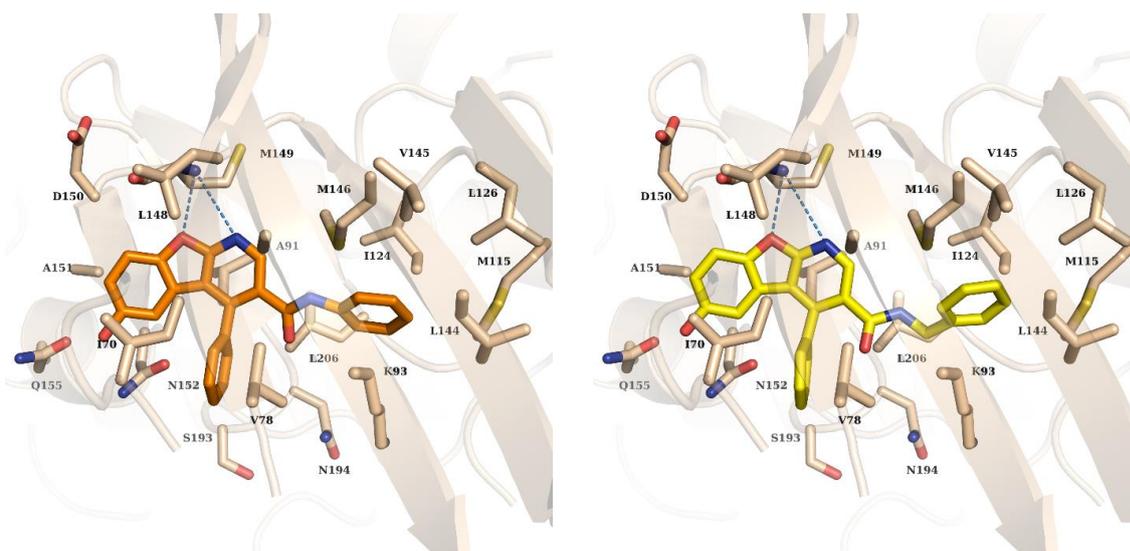


Abbildung 64: Wahrscheinlicher Bindungsmodus von **23** (orange, links) und **28** (gelb, rechts) nach Ausrichtung II. Es öffnet sich, dadurch das Met146 und Ile124 eine andere Konformation einnehmen, eine hydrophobe Bindetasche im hinteren Teil der Bindedomäne, die durch Met 146, Ile124, Met115, Leu 126 und Leu144 begrenzt ist.^[261]

Die Verbindungen **77** und **88** zeigten einen sehr ähnlichen Bindungsmodus nach Ausrichtung II. Dabei bildet sich eine Wasserstoffbrücke zwischen dem Pyridinstickstoff des Liganden und Met149 aus. Weiterhin sind hydrophobe Wechselwirkungen zwischen dem Kernheterozyklus und Val196, Ala151 und Ile70 sowie eine Wasserstoffbrückenwechselwirkung zwischen der phenolischen OH-Gruppe und dem Grundgerüst-Carbonyl von Ile70 nachgewiesen worden. Eine schwache Wasserstoffbrücke des Oximrestes zum *Gatekeeper*-Met146 oder zu einem Grundgerüst-Carbonyl konnte nicht gezeigt werden. Entgegen der im Fall von **23** und **28** beschriebenen hydrophobe

Bindetasche im hinteren Teil der Domäne öffnet sich diese bei **77** und **88** nicht, (Ausrichtung II, Abbildung 65).^[261]

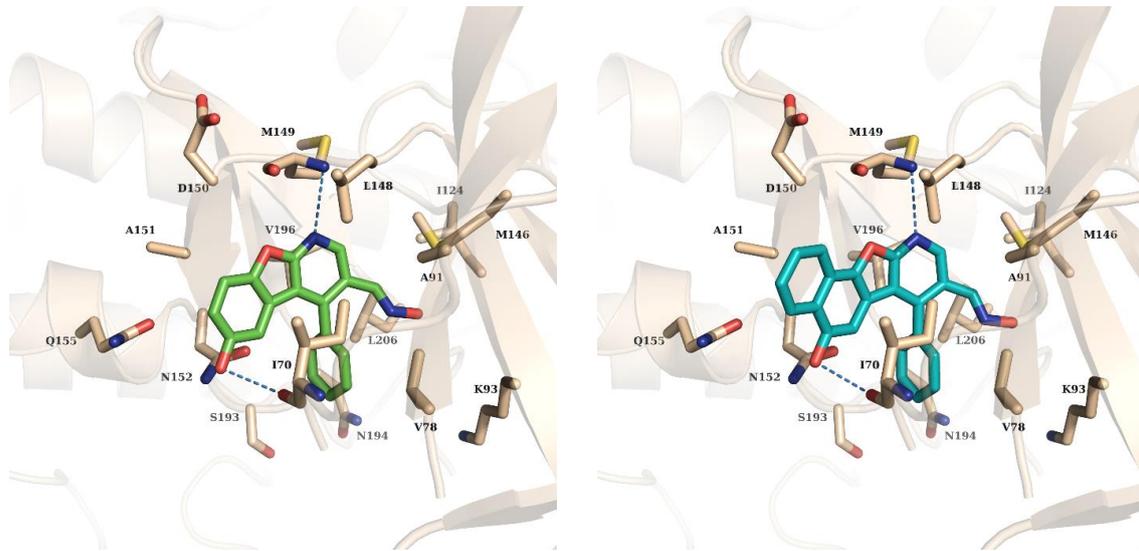


Abbildung 65: Wahrscheinlicher Bindungsmodus von **77** (grün, links) und **88** (cyan, rechts) nach Ausrichtung II. Die Liganden bilden zwei Wasserstoffbrücken aus. Zum einen zu Met149 der *Hinge*-Region, zum anderen zu Ile70 der Phosphatbindenden Domäne. Des Weiteren sind hydrophobe Wechselwirkungen des Grundgerüsts mit Val196, Ala151 und Ile70 nachgewiesen worden. Eine weitere Wasserstoffbrücke des Oximrestes bleibt hingegen aus.^[261]

Fyn-Docking-Ergebnisse

Die einzig verfügbare Kristallstruktur der Fyn-Kinase war die PDB ID 2DQ7. Sie wurde für das *Docking* verwendet. Der Aufbau der Wasserstoffbrücke zwischen dem Pyridinstickstoff des Grundgerüsts der Liganden mit dem Amidstickstoff von Met85 im *Hinge*-Bereich wurde als Dreh- und Angelpunkt für alle gedockten Verbindungen definiert. Das *Docking* von **23** an Fyn zeigte die Orientierung des Liganden nach Ausrichtung II (Abbildung 66 A, Seite 104). Dabei baut er neben der oben genannten Wasserstoffbrücke eine weitere, ausgehend von der phenolischen OH-Gruppe, zum Rückgrat-Carbonyl von Leu17 der vorderen hydrophoben Tasche auf. Die Anilideinheit zeigt hydrophobe Wechselwirkungen mit Met58 im hinteren Teil der Bindetasche. Die Verbindungen **78** und **89** wiesen nur die oben aufgeführte Wasserstoffbrücke auf. Beide Liganden orientierten sich innerhalb der Bindetasche nach Ausrichtung I (Abbildung 66 B und C). Eine Wechselwirkung des Sauerstoffs des Furanringes mit der *Gatekeeper*-AS Thr82 ist aufgrund der vorab genannten H-Brücke und des damit einhergehenden zu großen Abstandes beider Interaktionspartner unrealistisch. Weiterhin konnten keine hydrophoben Wechselwirkungen mit weiteren Teilen der Bindetasche gefunden werden. Erweiterte man **89** um einen Phenylrest (**90**), so zeigte sich eine zusätzliche Kation- π -Wechselwirkung des Benzenringes mit Lys15 der vorderen hydrophoben Tasche (Abbildung 66 D). Eine Wechselwirkung mit der *Gatekeeper*-AS oder der hinteren hydrophoben Tasche blieb ebenfalls aus.^[261]

Ergebnisse und Diskussion

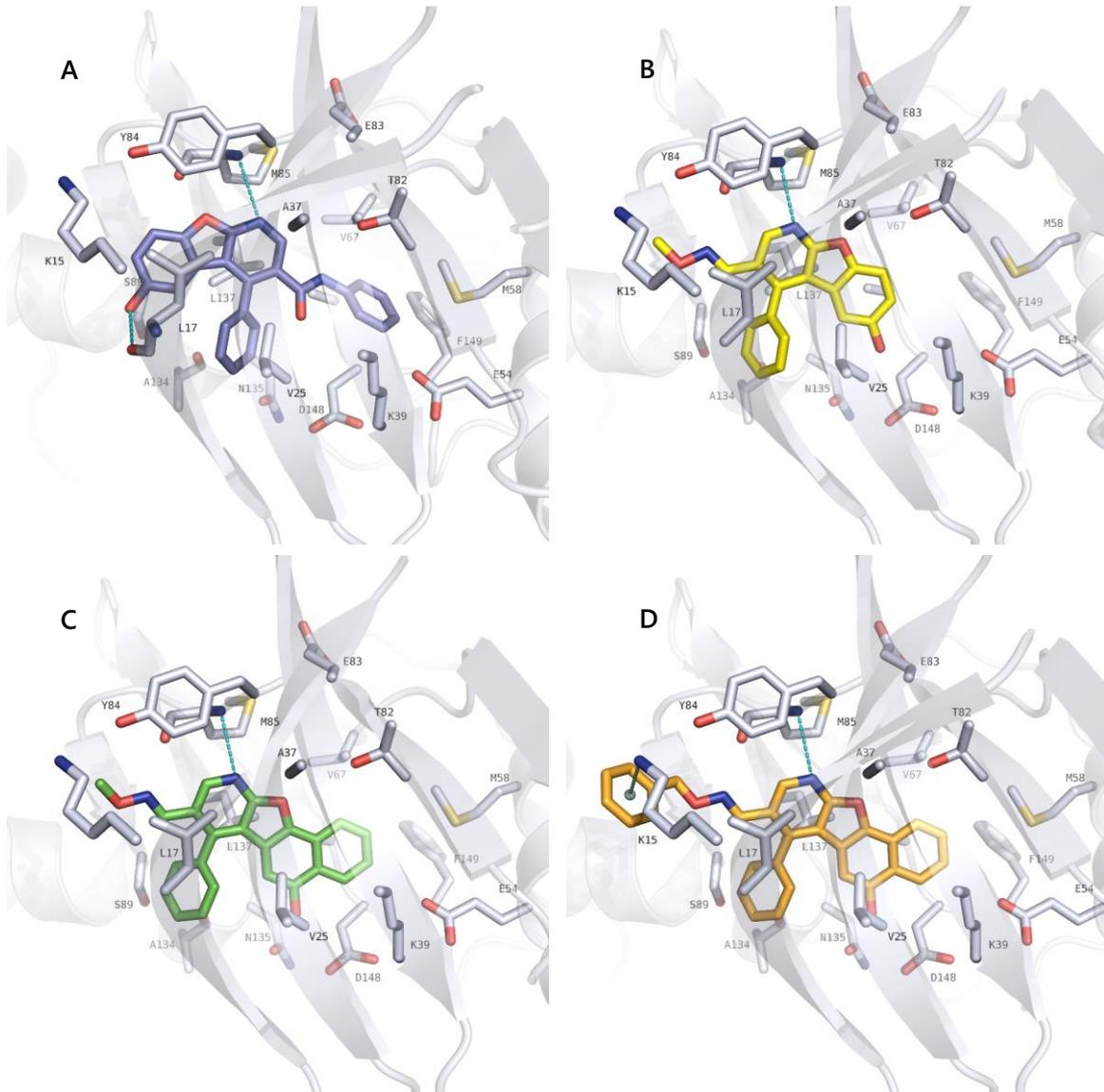


Abbildung 66: Wechselwirkung der Liganden mit Fyn wt.

A) **23** mit der Ausbildung zweier H-Brücken zu Met85 und Leu17; B,C) **78** und **89** mit nur einer Wechselwirkung als H-Brücke zu Met85; D) **90** mit einer zusätzlichen Kation- π -Wechselwirkung zu Lys15.^[261]

5 ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK

Zusammenfassung

Mit dem Tod von Rudi Assauer – einer der wohl bekanntesten Fussballprofis und Bundesligamanager vergangener Zeiten – rückte auch die schwere und zu seinem Ableben geführte Erkrankung Alzheimer (AD) in den medialen Fokus. AD ist charakterisiert durch den kognitiven und damit einhergehenden sozialen Verfall des Erkrankten. Histopathologisch lassen sich nach der Obduktion zwei charakteristische Marker, die extrazellulären A β -Proteine sowie die intrazellulär gelegenen NFT's, nachweisen. Während das Fortschreiten des Erkrankungsbildes nicht mit der Ausbreitung der A β -Proteine, wie anfangs vermutet, korreliert, zeigt die lokale Ausprägung der NFT's einen deutlichen Zusammenhang mit der AD-Symptomatik und dessen Stadien. NFT's stellen agglomerierte Tauproteine dar, die aus der Deregulation ihres Phosphorylierungsstatus resultieren. Damit einhergehend konnten verminderte Aktivitäten von Phosphatasen sowie gesteigerte von Proteinkinasen nachgewiesen werden. Folglich stellen vor allem die Proteinkinasen potentielle *Targets* für die Bekämpfung von AD dar. Anfänglich assoziierte man mit der Tauhyperphosphorylierung nur die CDK5 und die GSK3 β . Mittlerweile werden jedoch ebenfalls CDK1, CDK2 sowie MAP-Kinasen und Tyrosin-phosphorylierende Kinasen, wie Fyn, als relevant erachtet. Weiterhin ist bekannt, dass GSK3 β sowie Fyn nicht nur die Tauphosphorylierung katalysieren, sondern zusätzlich für die Ausbildung von Lernvorgängen essentiell sind. Nach heutigem Stand geht man davon aus, dass eine verstärkte Hochregulation dieser Proteinkinasen NFT-unabhängig die AD-Symptomatik beeinflussen kann.

Trotz einer großen Zahl unterschiedlichster Substanzklassen, die als Kinaseinhibitoren fungieren, sind bisher keine Verbindungen bekannt, die bei AD therapeutisch eingesetzt werden. Oftmals scheiterten derartige Verbindungen aufgrund ihrer Kinaseselektivität, Wirkstärke sowie Zytotoxizität. Erreichten sie die Phase der klinischen Studien, konnte bisweilen nur verminderte Wirksamkeiten in kognitiven Tests erzielt werden. Aufgrund dessen scheinen monoselektive Kinaseinhibitoren für die AD-Therapie nicht zielführend zu sein. Somit ist die Etablierung neuerer Leitstrukturen mit besserem Selektivitätsprofil und potenterer Wirkstärke obligat.

Die Erforschung der ersten 1-Aza-9-oxafluorene sollten derartige Parameter erfüllen. Einige Vertreter dieser neuartigen Leitstrukturklasse hemmten CDK5 und GSK3 β kompetitiv in mikro- und nanomolaren Konzentrationen, ohne ein zytotoxisches Potential zu entwickeln. Weiterführende Derivatisierungen vergrößerten das Selektivitätsprofil auf CDK1, JNK3 und ERK2. Durch zusätzliche *Docking*-Studien konnten die Bindungsmodi der Verbindungen nach Ausrichtung I und II aufgeklärt werden.

Innerhalb dieser Arbeit sollten im ersten Teilabschnitt neuartige 6-Hydroxy-4-phenyl-1-aza-9-oxafluorene mit einem Carbamidrest in Position drei sowie deren benzoanellierte Analoga dargestellt und auf ihre inhibitorische Qualität hin untersucht werden. Als Grundlage diene dabei die

von VOIGT etablierte zwei-Stufen-Synthese. Die vorab dargestellten 3-substituierten Pyridin-carbamide wurden durch eine regioselektive Grignardreaktion nach COMINS zu unsymmetrischen, 3,4-disubstituierten *N*-Acetyl-1,4-dihydropyridinen umgesetzt. Diese überführte man im Anschluss mit 1,4-Benzochinon, 1,4-Naphthochinon oder 5-Methoxy-1,4-naphthochinon nach VOIGT's Eintopfmethod in die gewünschten, tri- und tetrazyklischen Azoxafluorene. Somit ist es gelungen 28 Zielverbindungen darzustellen, von denen 26 der Literatur unbekannt sind. Darüber hinaus konnten durch Aminolyse drei weitere 6-Hydroxy-4-phenyl-1-aza-9-oxafluorene gewonnen werden. Nach Isolierung der Verbindungen wurden alle analytisch vermessen und charakterisiert. Ein besonderes Augenmerk galt der NMR-Strukturanalytik. Die ¹H-NMR-Spektren der *N*-Acetyl-1,4-dihydropyridin-Zwischenprodukte zeigten dabei verbreiterte Signalverdopplungen, die durch den Rotamereneffekt verursacht werden. Die oben genannten Endverbindungen wiesen ebenfalls charakteristische ¹H-NMR-Signalverschiebungen auf. So zeigten zum Beispiel alle H-5- beziehungsweise H-6-Signale, aufgrund des Anisotropieeffekts des Phenylrings in Position vier (Trizyklus) oder sieben (Tetrazyklus), eine deutliche Hochfeldverschiebung. Durch 2D-korrelierende NMR-Spektren gelang es, alle koppelnden Wasserstoff- sowie Kohlenstoffkerne zuzuordnen und die gewonnenen Strukturisomere bei der Umsetzung mit 5-Methoxy-1,4-naphthochinon zu differenzieren.

Im Teilabschnitt II sollte die Substanzbibliothek durch 6-Hydroxy-4-phenyl-1-aza-9-oxafluorene und 5-Hydroxy-7-phenyl-10-aza-11-oxabenz[*a*]fluorene mit Oxim- sowie Oximetherpartialstruktur in Stellung drei beziehungsweise acht erweitert werden. So ist es gelungen, mittels VOIGT's Eintopfsynthese acht literaturunbekannte Azoxafluorene mit 3/8-O-Alkyl- beziehungsweise 3/8-O-Benzylloximether-Teilstruktur darzustellen. Dazu forcierte man als erstes die Bildung entsprechender Nicotinaldehyd-O-alkyloxime und -O-benzylloxime. Diese wurden durch Alkylierung beziehungsweise Benzylierung von Nicotinaldehydoxim oder durch die Kondensationsreaktion von Nicotinaldehyd mit vorab hergestellten O-Benzylhydroxylaminhydrochloriden dargestellt. Anschließend setzte man sie zu ihren 1,4-Dihydropyridinderivaten um und überführte sie final mit 1,4-Benzochinon oder 1,4-Naphthochinon in die gewünschten Zielverbindungen. Zur Erhöhung der Variabilität der Oximetherpartialstruktur sollten des Weiteren Azoxafluorene mit Aldehydfunktion (**76** und **87**) realisiert werden. Diese wurden im nächsten Schritt mit O-Benzylhydroxylaminhydrochloriden umgesetzt. Dazu war es unabdingbar die Aldehydfunktion vorab zu schützen, was durch Derivatisierung mit Ethylenglykol gelingen sollte. Nach Versagen der Reaktionsreihe mit 3-(1,3-Dioxolan) als Schutzgruppe nutzte man zur Gewinnung der freien Aldehyde die O-Ethylloximether-Abkömmlinge (**79** und **90**). Die O-Ethylloximether-Partialstruktur stellte sich dabei als sehr potente und hydrolyse stabile Schutzgruppe heraus. Somit konnten weitere 11 literaturunbekannte Azoxafluoren-Verbindungen gewonnen werden. Die Darstellung der 3/8-Carbaldehydoxime **77** und **88** gelang durch Hydrogenolyse der 3/8-O-Benzylloximether-Vertreter **80** und **93**. Mittels ¹H-NMR-Analytik konnte die Differenzierung der E-sowie Z-Isomere, am Beispiel von **92 E**

und **92 Z**, erfolgreich beschrieben werden. Final isomerisierte man **80** durch eine siebentägige UV-Einstrahlung, unter Erhalt eines eins zu eins Gemisches aus E- sowie Z-Isomeren.

Die Versuche zur Proteinkinasehemmung erfolgten zu zwei unterschiedlichen Zeitpunkten. Der erste Teil der Testung wurde von der PROQINASE GmbH durchgeführt. In ihrem ³³PANQINASE®-Assay untersuchten sie die inhibitorische Potenz der synthetisierten Verbindungen an der CDK1/CycB1, ERK1, GSK3 β , JNK3 und Fyn wt. Dabei waren die getesteten Substanzen vorrangig gegen die beiden letztgenannten Proteinkinasen aktiv. An der JNK3 waren ausschließlich die 3-Anilid-substituierten 1-Aza-9-oxafluorene aktiv. Je sterisch komplexer das anellierte rigide Ringsystem war, desto unwahrscheinlicher war die Wechselwirkung mit dem aktiven Zentrum. Daher waren alle benzoanellierten Verbindungen an der JNK3 inaktiv. An der Fyn wt war das Hemmprofil der Substanzen uneinheitlich, sodass keine allgemein gültige Aussage zur Struktur-Wirkungsbeziehung getroffen werden kann. Wiederum war vor allem, wie auch an der JNK3, Verbindung **23** an der Fyn wt am aktivsten. Sie inhibierte beide Proteinkinasen mit folgender Effektivität: IC₅₀ = 38,7 Mikromol (JNK3), IC₅₀ = 37,2 Mikromol (Fyn wt). Somit gelang es, mit **23** eine dual inhibierende Verbindung mit moderaten Hemmeigenschaften zu entwickeln. Die benzoanellierten Substanzen **41** und **46** kristallisierten sich als monoselektive Fyn wt-Inhibitoren (**41**: IC₅₀ = 41,8 μ M, **46**: 62,2 μ M) heraus.

Der zweite Teil der Testung wurde in Kooperation mit den Arbeitskreisen von P. KOCH (Testung an GSK3 β und JNK3) und V. KRYSSTOF (Testung an CDK1/CycB1, CDK2/CycE, Fyn wt) realisiert. Bei den 3-Benzylamid-substituierten Verbindungen zeigten die 1-Aza-9-oxafluorene deutlich bessere Hemmeigenschaften als ihre benzoanellierten Analoga. Dabei konnten mit den Verbindungen **28** und **33** zwei Benzylamidderivate gewonnen werden, die vor allem dualselektiv gegen GSK3 β und JNK3 wirken (**28**: IC₅₀ = 20,3 μ M (GSK3 β), IC₅₀ = 13,0 μ M (JNK3); **33**: IC₅₀ = 10,2 μ M (GSK3 β), IC₅₀ = 36,2 μ M (JNK3)). An der Fyn wt hingegen zeigten mit Ausnahme von **50** (IC₅₀ = 12,4 μ M) die Benzylamid-substituierten Verbindungen geringe bis keine inhibitorischen Eigenschaften. In der Substanzklasse der Azoxafluorene mit Oxim- beziehungsweise Oximetherstruktur in Stellung drei oder acht war besonders 1-Aza-9-oxafluoren-3-oxim (**77**) auffällig aktiv. Abgesehen von dessen Fyn-Aktivität konnte **77** an allen weiteren Proteinkinasen durch potente, inhibitorische Eigenschaften bestehen (**77**: IC₅₀ = 4,8 μ M (GSK3 β), IC₅₀ = 1,2 μ M (JNK3), IC₅₀ = 3,6 μ M (CDK1/CycB), IC₅₀ = 2,3 μ M (CDK2/CycE)). Die Alkylierung der Oximstruktur führte zu Verbindungen, die im Vergleich zu den anderen Proteinkinasen, stärker CDK-selektiv waren (**78**: IC₅₀ = 6,9 μ M (CDK1/CycB), IC₅₀ = 4,9 μ M (CDK2/CycE); **79**: IC₅₀ = 7,6 μ M (CDK1/CycB), IC₅₀ = 6,2 μ M (CDK2/CycE)). Erweiterte man den Oximether um eine Benzylgruppe (**80**: IC₅₀ = 15,9 μ M (CDK2/CycE)), so nahm zwar die Hemmeigenschaft im Allgemeinen ab, man gewann aber parallel dazu eine Verbindung mit höherer CDK2/CycE-Selektivität. Die Benzanellierung von **77** brachte mit **88** eine Substanz hervor, die triselektiv auf CDK1/CycB1, CDK2/CycE und JNK3 wirkte (**88**: IC₅₀ = 8,7 μ M (CDK1/CycB), IC₅₀ = 5,8 μ M (CDK2/CycE), IC₅₀ \approx 10 μ M (JNK3)). Ihre Methylierung sowie Ethylierung führte zu

potenten, monoselektiven Fyn-Inhibitoren (**89**: $IC_{50} = 13,1 \mu\text{M}$; **90**: $IC_{50} = 17,2 \mu\text{M}$). Eine weitere sterische Ausdehnung des Restes in Stellung acht stellte sich hingegen als unvorteilhaft heraus.

Weiterhin wurden in Kooperation mit dem Arbeitskreis W. SIPPL *Docking*-Experimente der Verbindungen **23**, **28**, **77**, **78**, **88**, **89** und **90** an den Proteinstrukturen der JNK3 und der Fyn-Tyrosinkinase durchgeführt. Dabei orientieren sich **23** und **28** in der ATP-Bindestelle der JNK3 nach Ausrichtung II. Die Liganden bauen eine Wasserstoffbrücke zum Met149 der *Hinge*-Region auf und interagieren mit einer hydrophoben Bindetasche im hinteren Teil der Bindedomäne. **77** und **88** favorisieren ebenfalls die Interaktion mit dem Protein nach Ausrichtung II unter Ausbildung der oben genannten H-Brücke und einer weiteren zwischen der phenolischen OH-Gruppe und Ile70 der phosphatbindenden Bindestelle. In der Fyn-Tyrosinkinase richtet sich **23** nach Ausrichtung II aus, bei der es zur Bildung zweier Wasserstoffbrücken zu Met85 und Leu17 sowie zu hydrophoben Wechselwirkungen im hinteren Teil der Bindetasche kommt. **78** und **89** positionieren sich nach Ausrichtung I in der ATP-Bindetasche. Ihre Interaktion mit dem Zielprotein erfolgt ausschließlich über eine Wasserstoffbrücke zwischen Met85 und dem Pyridinstickstoff des Liganden. Erweitert man die Seitenkette des Liganden um einen Benzenring (**90**), so zeigt sich eine Kation- π -Wechselwirkung.

Ausblick

Basierend auf die im Rahmen dieser Arbeit synthetisierten und auf biologische Aktivität hin untersuchten Verbindungen wäre in künftigen Projekten die Entwicklung neuartiger Zielstrukturen mit Variationen im Hinblick auf den rigiden Grundkörper, die Wasserstoffbrücken-bildenden Gruppen und der Lipophilie vorzunehmen. Somit könnten bisher bekannte Aussagen zur Struktur-Wirkungsbeziehung bekräftigt beziehungsweise erweitert und effektivere Substanzen mit dual- oder triselektiver Potenz entwickelt werden.

Zur Untersuchung weiterer potentieller Wasserstoffbrücken und damit einhergehender Affinitätssteigerungen wären folgende Derivatisierungen denkbar. Zum einen wäre es interessant das Sauerstoffatom des Azoxafluoren-Grundkörpers gegen ein Stickstoffatom zu substituieren (Abbildung 67, Seite 109). Dadurch würde man die Wasserstoffbrückenakzeptorfunktion durch die eines Donators austauschen. Betrachtet man die bisher durchgeführten *Docking*-Experimente an der GSK3 β und CDK1 (siehe 2.4.3, Abbildung 17, Seite 34, Abbildung 18, Seite 35), könnte die postulierte Leitstruktur nunmehr analog zum ATP eine zweite Wasserstoffbrücke zur *Hinge*-Region aufbauen. Unter Beibehaltung des bisherigen, rigiden Grundkörpers würde auch die Einführung einer Hydroxygruppe in Position zwei zu einer ähnlichen Interaktion führen. In Erwartung, dass zusätzliche Wasserstoffbrücken zur Phosphat-bindenden Domäne möglich wären, ist es ratsam eine Hydroxygruppe in Position zwei oder vier des vierständigen Phenylrings einzuführen. Ebenso wäre interessant, wie sich die Substitution dieses Phenylrings durch einen sauren Heterozyklus, wie einem Tetrazolring, auf die Bindungsaffinität an den Proteinkinasen auswirken würde (Abbildung 67, Seite 109). Als saure Komponente sollte dieser ideal in Wechselwirkung mit der Phosphatbindestelle

treten können. Gelingen könnte die Synthese durch die Umsetzung von 4-Pyridinacarbonitril mit Natriumazid in einer mit Ammoniumchlorid angesäuerten Lösung. Nach Bildung des Tetrazolrings würde man den Pyridinring zum Dihydropyridin reduzieren und mittels VOIGT's Eintopfsynthese zum Azoxafluoren umsetzen.

Weiterhin wäre der Austausch der Amidgruppe in Position drei durch metabolisch stabilere Gruppen, wie Amine, diskutabel (Abbildung 67). Am Ende meiner experimentellen Phase gelang es, mit **101** eine derartige Aminverbindung zu synthetisieren. Die Darstellung erfolgte ausgehend von 6-Hydroxy-4-phenylbenzofuro[2,3-*b*]pyridin-3-carbaldehyd (**76**). Ein Äquivalent **76** wurde dazu mit einem Äquivalent Anilin in Toluol unter Rückfluss zum Iminzwischenprodukt umgesetzt. Im Anschluß entfernte man das Lösungsmittel und löste den Rückstand in Methanol. Folglich ergänzte man Natriumborhydrid bis zum vollständigen Umsatz. Nach Extraktion und säulenchromatographischer Aufreinigung konnte **101** isoliert und auf seine biologische Aktivität hin untersucht werden.^[319] Der isosterische Austausch der Amidgruppe führte im Vergleich zu **23** zu deutlich besseren Hemmeigenschaften an der GSK3 β und an den CDKs ($IC_{50} = 10,66 \mu\text{M}$ (GSK3 β), $IC_{50} = 12,85 \mu\text{M}$ (CDK1CycB), $IC_{50} = 6,51 \mu\text{M}$ (CDK2/CycE)). Das könnte einerseits mit den durch den Wegfall der Amidfunktion neu gewonnenen Freiheitsgraden und damit besseren Wechselwirkungen mit der *Gatekeeper*-AS hereingehen. Andererseits stellt ein Amin einen deutlich besseren Wasserstoffbrückendonator im Vergleich zum Amid dar. Somit könnte die Aminpartialstruktur zukünftig die Substanzbibliothek der Azoxafluorene enorm bereichern.

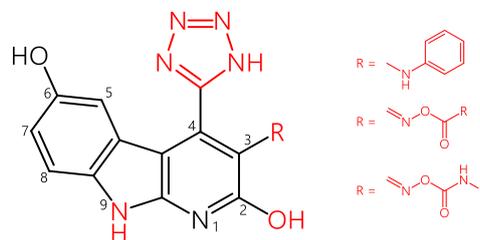


Abbildung 67: Überblick über potentielle Derivatisierungen der Leitstruktur.

In Zukunft sollte man den Fokus auf die Oximderivatisierung intensivieren. So wäre es ratsam, anstelle der lipophilen *O*-Benzyloximether *O*-Oximester oder *O*-Oximcarbamate zu etablieren (Abbildung 67). Zum einen würde man dadurch die Hydrophilie der Verbindungen erhöhen, zum anderen könnten die charakteristischen Gruppen als ideale Prodrugstrukturen beziehungsweise als metabolisch resistenterer Verbindungen mit längeranhaltender Wirksamkeit fungieren. Beide Parameter wären für die Alzheimertherapie im Hinblick auf der Hirngängigkeit und auf der Anreicherung wirksamer Konzentrationen obligat.

Weiterhin sollte der Faktor der Lipophilie zukünftig stärker bedacht werden. Verbindungen mit ausgeprägt hydrophobem Charakter neigen oftmals zu Löslichkeitsproblemen in der Analytik und während der biologischen Testung. Außerdem spielt sie eine enorme Rolle bei der bei AD erfor-

derlichen Hirngängigkeit und bei der gastrointestinalen Resorption. Somit sollten sich weiterführende Arbeiten zusätzlich mit der Bestimmung vom Verteilungs- beziehungsweise Distributionskoeffizienten beschäftigen. Als Anreiz dazu wurde nach Ablauf meiner experimentellen Phase der Verteilungskoeffizient (Log P) ausgewählter Verbindungen bestimmt. Die Bestimmung erfolgte unter Einbeziehung der OECD-Leitlinie 117. In dieser werden die Log P-Werte mit Hilfe der HPLC-Methodik bestimmt. Dazu ermittelt man als erstes die Retentionszeiten der notwendigen Referenzsubstanzen. Mittels diesen und der Totzeit der Säule können deren k-Werte berechnet werden. Ihre logarithmierten Formen werden gegen die literaturbekannten Log P-Werten linear aufgetragen. Folglich werden die experimentell ermittelten Retentionszeiten der Testverbindungen sowie die erstellte Regressionsgerade zur Bestimmung der gesuchten Log P-Werte herangezogen.^[320] Eine detaillierte Beschreibung zur Bestimmung des Log P-Wertes ist dem Abschnitt 8.5 zu entnehmen. Die ermittelten Verteilungskoeffizienten sind Tabelle 13 zu entnehmen. Betrachtet man den Log P-Wert losgelöst von anderen die Hirngängigkeit beeinflussenden, physikalischen Eigenschaften, so ist die Wahrscheinlichkeit die Bluthirnschranke zu passieren bei **23** und **77** mit einem Log P-Wert von jeweils 2,4 am höchsten. Das Optimum diese Barriere zu überwinden, liegt im Bereich um 1,5 bis 2,5.^[95, 321] Diese beiden Verbindungen waren auch diejenigen mit den besten Hemmeigenschaften an den jeweiligen Proteinkinasen. **24, 36, 78** und **80** weisen hingegen deutliche höhere Log P-Werte auf, sodass man davon ausgehen kann, dass sie nur in geringen Maßen die Bluthirnschranke überwinden oder gastrointestinal resorbiert werden.

Tabelle 13: Experimentell bestimmte Verteilungskoeffizienten ausgewählter Verbindungen.

Verbindung	Verteilungskoeffizient
23	2,4
24	3,2
36	3,8
77	2,4
78	3,8
80	5,1

Des Weiteren wäre es von Vorteil, die Ausbeuten der Cyclisierungsreaktion zu optimieren. Dies könnte gelingen, in dem man anstelle von oxidierenden Brønsted-Säuren, wie Perchlorsäure, auf nicht-oxidierende, wie der 4-Toluensulfonsäure, zurückgreift. Außerdem ist die Anwendung von Lewis-Säuren, wie Zink-(II)-chlorid, Aluminium-(III)-chlorid oder Titan-(IV)-chlorid bei diesem Reaktionstyp noch nicht erprobt.

Zudem sollte die biologische Testung der Verbindungen auf weitere AD-pathologisch spezifische Proteinkinasen ausgedehnt werden. Beispielsweise könnte man dazu die vielversprechenden Kandidaten **23, 77** und **88** einem *Target*-basierten *High-Throughput-Screening* unterwerfen. Des Weiteren sollten die drei genannten Substanzen auf ihre Hirngängigkeit hin in tierexperimentellen Studien untersucht werden.

II Experimenteller Teil

6 CHEMIKALIEN, GERÄTE UND METHODEN

6.1 Chemikalien

Die verwendeten Lösungsmittel wurden nach literaturbekannten Methoden gereinigt bzw. getrocknet.^[283]

Zur Synthese und Analytik der Verbindungen wurden die folgenden Chemikalien kommerziell erworben oder aus dem Bestand des Pharmazieinstitutes bezogen:

1,4-Benzochinon (SIGMA ALDRICH)
 1,4-Dioxan (GRÜSSING GmbH)
 1,4-Naphthochinon (SIGMA ALDRICH)
 2-Chloro-1,4-benzochinon (ACROS ORAGNICS)
 5-Hydroxy-1,4-naphthochinon (SIGMA ALDRICH)
 2-Chlorobenzylamin (SIGMA ALDRICH)
 2-Chlorobenzylchlorid (SIGMA ALDRICH)
 2-Methoxybenzylalkohol (SIGMA ALDRICH)
 2-Methoxybenzylamin (SIGMA ALDRICH)
 3-Chloranilin
 3-Chlorobenzylamin (SIGMA ALDRICH)
 3-Methoxyanilin
 3-Methoxybenzylalkohol (SIGMA ALDRICH)
 3-Methoxybenzylamin (SIGMA ALDRICH)
 3-Methoxybenzylchlorid (SIGMA ALDRICH)
 4-Chloranilin
 4-Chlorobenzylamin (SIGMA ALDRICH)
 4-Chlorobenzylchlorid (SIGMA ALDRICH)
 4-Fluorobenzylchlorid (MERCK-SCHUCHARDT)
 4-Methoxyanilin
 4-Methoxybenzylamin (FERAK BERLIN)
 4-Methoxybenzylchlorid (SIGMA ALDRICH)
 Aceton
 Acetylchlorid (MERCK KGaA)
 Ammoniak 25 % (GRÜSSING GmbH)
 Ammoniumchlorid 99,5 % (GRÜSSING GmbH)
 Anilin
 Benzylamin (SIGMA ALDRICH)
 Benzylchlorid (MERCK KGaA)
 Calciumchlorid (GRÜSSING GmbH)
 Chloroform
 Cyclohexan (>99,5 % zur Synthese; CARL ROTH GmbH & Co KG)
 Diethylether
 Dimethylsulfoxid (SIGMA ALDRICH)
 Dimethylsulfoxid-*d*₆ (EURISO TOP)
 Ethylacetat
 Ethylenglykol 99 % (GRÜSSING GmbH)
 Ethylnicotinat 99 % (ALFA AESAR)
 Hydrazinhydrat 100 % (MERCK KGaA)
 Iodethan

Chemikalien, Geräte und Methoden

Iodmethan

Kalium-*tert*-butoxid (SIGMA ALDRICH)

Kieselgel 60 (63-200 nm; MACHEREY-NAGEL)

Kupfer-(I)-jodid

Lithiumchlorid

Methanol

Methanol für HPLC (CARL ROTH GmbH)

Natrium

Natriumchlorid (ORG LABORCHEMIE GmbH)

Natriumhydroxid (GRÜSSING GmbH)

n-Hexan (GRÜSSING GmbH)

N-Hydroxyphthalimid 97 % (SIGMA ALDRICH)

Nicotinaldehyd (JANSSEN CHIMICA, SIGMA ALDRICH)

N,N-Dimethylformamid 99 % (GRÜSSING GmbH)

Palladium auf Aktivkohle 10 % (SIGMA ALDRICH)

Paraformaldehyd

Perchlorsäure 70 % (VEB LABORCHEMIE APOLDA)

Phenylboronsäure (SIGMA ALDRICH)

Phenylmagnesiumchlorid 2 M in THF (SIGMA ALDRICH)

Phosphorpentoxid (CARL ROTH GmbH)

Pyridin (GRÜSSING GmbH)

Salzsäure 37 % (ORG LABORCHEMIE GmbH)

Seesand (GRÜSSING GmbH)

Silikonöl (bis 220 °C; GRÜSSING GmbH)

Tetrahydrofuran (GRÜSSING GmbH)

Thionylchlorid (VEB LABORCHEMIE APOLDA)

Toluol 99 % (ORG LABORCHEMIE GmbH)

Toluol-4-sulfonsäure Monohydrat (CARL ROTH GmbH & Co KG)

Triethylamin 99 % (GRÜSSING GmbH)

6.2 Geräte und Methoden zur Synthese und Analytik

6.2.1 Allgemeine Methoden zur Synthese

Reaktionen

Die Synthesen erfolgten in Rundkolben aus Borosilikatglas (50-500 mL) unter Zuhilfenahme von Magnetrührwerken und -stäbchen zur permanenten Durchmischung. Bei Synthesen höherer Temperaturen wurden zum Erhitzen Silikonölbäder (bis 220 °C) genutzt. Bei Reaktionen unterhalb der Raumtemperatur verwendete man Kältebäder (Trockeneis sowie ein 1:1 Gemisch aus Isopropanol und Methanol oder Eis und Natriumchlorid im Verhältnis 3:1). Jeder Umsatz wurde dünn-schichtchromatographisch sowie massenspektrometrisch verfolgt.

Extraktion

Auf dem Reaktionsschritt folgte das Extraktionsverfahren. Extrahiert wurde, unter Nutzung eines Scheidetrichters, jeweils dreimal der wässrigen Phase entsprechende Volumina mit Extraktionsmittel. Extraktionsmittel sowie pH-abhängige Bedingungen während der Extraktion sind in den Allgemeinen Arbeitsvorschriften (AAV), 7.1, Seite 124) bzw. in den Verbindungsmonographien (7.2, ab Seite 127) hinterlegt.

Filtration

Die Filtration erfolgte durch Rundfilter aus Zellulose der Firma MUNKTELL AHLSTROM mittels Schwerkraft. Des Weiteren wurden gröbere Feststoffe durch eine Porzellanfritte G3 oder G4 vom Filtrat abgetrennt. Dazu legte man an einer Saugflasche mit darauf applizierter Fritte einen Unterdruck an und goss das zu trennende Gemisch in die selbige. Zur Klärung des Reaktionsansatzes von feinverteilten, suspendierten Palladium-Aktivkohle-Katalysator wurde zusätzlich in eine G3-Fritte Kieselgel 60 eingefüllt und der Ansatz unter Vakuum filtriert.

Schwerkraftsäulenchromatographie

Siehe 6.2.2.1 Schwerkraftsäulenchromatographie (Seite 116).

Umkristallisation

Der Ansatz wurde in einem Lösungsmittel, indem er sich wenig löste, suspendiert und erwärmt bis eine vollständige Lösung vorlag. Schließlich wurde dieser bei 2-8 °C oder -20°C mehrere Stunden gelagert. Das entstandene Präzipitat wurde filtriert oder der flüssige Überstand mit einer Einmalpasteurpipette aus dem Kolben entfernt, gegebenenfalls mit unterschiedlichen Lösungsmitteln gewaschen und final getrocknet.

Trocknung

Vorrangig wurden die Verbindungen im Exsikkator über Calciumchlorid mehrere Tage getrocknet. Beim Nutzen einer Trockenpistole wurde diese standardisiert mit Phosphorpentoxid befüllt. Zur Trocknung legte man die Substanz in die Trockenkammer der Apparatur, evakuierte sie und beheizte sie mit siedendem Methanol mehrere Stunden.

6.2.2 Chromatographie

6.2.2.1 Schwerkraftsäulenchromatographie

Die Schwerkraftsäulenchromatographie diente zur Auftrennung von Substanzgemischen. Dafür standen Glassäulen, mit Teflonhähnen, verschiedenster Längen und Durchmesser zur Verfügung, die mit Kieselgel 60 (stationäre Phase, 63–200 nm Partikelgröße) befüllt wurden. Vorab schlämmte man dazu das Kieselgel 60 mit dem zu verwendenden Laufmittelgemisch auf. Feste und flüssige Rohprodukte wurden direkt auf die Säule aufgetragen. Bei erhöhter Viskosität der Öle brachte man diese vorab auf Kieselgel 60 auf. Dazu löste man den Ansatz in Chloroform, fügte pro 500 mg Rohprodukt 800 mg Kieselgel 60 hinzu und entfernte das Lösungsmittel am Rotationverdampfer. Als mobile Phase dienten die folgenden Laufmittelgemische (LM), die als Volumen-Volumen-Verhältnisse (V/V) angegeben sind (siehe Tabelle 14).

Tabelle 14: Relative Laufmittelgemische Teil 1 (V/V).

	Cyclohexan	Ethylacetat
LM 1	2	3
LM 2	1	1
LM 3	3	2
LM 4	7	3
LM 5	4	1
LM 6	9	1

6.2.2.2 Dünnschichtchromatographie (DC)

Die Dünnschichtchromatographie diente der analytischen Bestimmung der Substanzen oder Substanzgemische.

Stationäre Phase: TLC SILICA GEL 60 F₂₅₄ der Firma MERCK KGaA: Kieselgel 60 auf Aluminiumblätter mit Fluoreszenzindikator, der bei 254 nm eine Lumineszenz zeigte.

Proben: wurden in Aceton oder Methanol gelöst und punktuell, konzentriert auf die stationäre Phase aufgetragen.

Mobile Phase: jeweils 20 mL der Laufmittelgemische wurden verwendet und die Kammer erst nach dessen Sättigung verwendet. Die Zusammensetzungen der mobilen Phasen sind der Tabelle 14: Relative Laufmittelgemische Teil 1 (V/V) in Abschnitt 6.2.2.1 oder der Tabelle 15: Relative Laufmittelgemische Teil 2 (V/V) zu entnehmen.

Die Laufmittelstrecke betrug min. 7 cm.

Detektion: UV-Licht bei 254 nm und 365 nm, gegebenenfalls mit Jodkammer.

In den jeweiligen Verbindungsmonografien sind die R_f-Werte mit Nummern der Laufmittelsysteme vermerkt.

Tabelle 15: Relative Laufmittelgemische Teil 2 (V/V).

LM 7	Isopropanol	Methanol
	4	1
LM 8	Chloroform	Ethylacetat
	3	2
LM 9	Ethylacetat	Isopropanol
	4	1

6.2.2.3 Middle Pressure Liquid Chromatography (MPLC)

Substanzgemische, die mittels Schwerkraftsäulenchromatographie nicht aufgetrennt werden konnten, wurden durch ein MPLC-Verfahren fraktioniert. Dafür stand die ISOLERA ONE von BIOTAGE zur Verfügung.

Technische Daten:

Binäres Pumpsystem, Flussrate 1-200 mL/min, Betriebsdruck: 0-10 bar (0-1000 kPa).

Lösungsmittelzufuhr: Vierschlauchsystem, aus rostfreiem Stahl und Kunststoffen, wie PEEK, PP, FEP.

Lösungsmittelgradient: Genauigkeit: $\pm 2\%$.

Fraktionssammlung: mittels Autosampler.

Detektion: 200-400 nm (Deuteriumlampe, 25 W) oder 200-800 nm (Wolframlampe, 10 W),

Amplitudenbereich 0-6,4 AU, Genauigkeit von $\pm 0,04$ AU,

Software: ISOLERA ONE 3.2.2.^[322]

Säulen:

BIOTAGE® SNAP ULTRA, 10 g (Partikelgröße 40-63 μm), BIOTAGE® SNAP Catridge KPSil, 50 g (Partikelgröße 63-200 μm).

Methoden:

Die Probe wurde vorab auf Kieselgel aufgebracht (siehe 6.2.2.1) und in eine Leerkartusche, die als Vorsäule dient, überführt. Die BIOTAGE®-Säulen wurden mit den jeweiligen Lösungsmittelsystemen äquilibriert. Nach der Äquilibrierung verband man die Vorsäule mit der BIOTAGE®-Säule und begann das Trennverfahren, mittels vorher programmierten Elutionsgradienten. In Tabelle 16 sind die verbrauchten Volumina der Eluenten, die zum Erreichen der bestimmten Eluentenverhältnisse (V/V) oder zum Halten dieser notwendig waren, vermerkt. Begonnen wurde mit einem hohen Konzentrationsverhältnis an lipophilen Laufmittel (*n*-Hexan), dem fortwährend ein hydrophileres (Ethylacetat; EtAc) zugesetzt worden ist. Weiterhin sind der Säulentyp, die Flussrate sowie der zu detektierende Schwellenwert zur Sammlung der einzelnen Fraktionen erfasst worden.

Tabelle 16: MPLC-Methoden.

Säulentyp, Flussrate, Elutionsgradient (Komponente A: *n*-Hexan (*n*-H); Komponente B: Ethylacetat, EtAc).

Methode	A			B		
	BIOTAGE® SNAP ULTRA			BIOTAGE® SNAP		
Säulentyp						
Flussrate	15 mL/min			30 mL/min		
Schwellenwert zur Sammlung	40 mAU			100 mAU		
Elutionsgradient	Verbrauch	<i>n</i> -H	EtAc	Verbrauch	<i>n</i> -H	EtAc
	0-300 mL	100 %	0 %	0-500 mL	95 %	5 %
	301-550 mL	98 %	2 %	501-700 mL		-
	551-610 mL		-	701-1100 mL	90 %	10 %
	611-1210 mL	86 %	14%	1101-1300 mL		-
	1211-1410 mL		-	1301-1700 mL	85 %	15 %
	1411-1660 mL	84 %	16 %	1701-1900 mL		-
	1661-1860 mL		-			

- Verhältnis des Elutionsgradienten blieb konstant

6.2.2.4 High Pressure Liquid Chromatography (HPLC)

Zur qualitativen Bestimmung der Reinheit (analytisch) sowie zur Aufreinigung der Endverbindungen (präparativ) wurde die Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC) eingesetzt.

Analytische HPLC:

Die Reinheiten der einzelnen Verbindungen sind in den Verbindungsmonographien (7.2, ab Seite 127) vermerkt und in Prozent mit der zugehörigen Retentionzeit (t_R) angegeben. Erfolgte die Messung mit dem HPLC-Gerät 1, so wurde dies in den Monografien mit * und beim Gerät 2 mit ** gekennzeichnet.

Probenvorbereitung: man löste 0,5 mg Substanz in 1 mL Methanol. Dieser Stammlösung entnahm man 10 μ L und ergänzte 90 μ L Methanol bzw. addierte zur Lösungsvermittlung 40 μ L DMSO. Diese Lösung überführte man in ein HPLC-Probengläschen mit eingehangenen Verjüngungskorpus.

HPLC-Gerät 1:

SHIMADZU; LC-10AD, SIL-HAT auto sampler.

Säule: XTERRA RP-18 Säule (3,5 μ M, 3,9 \times 100 mm) von WATERS.

Detektor: UV-Vis-Detektor SPD-M10A VP PDA, bei 254 nm gemessen.

Injektionsvolumen: 10 μ L.

Flussrate: 0,5 mL/min.

Laufmittel: Elutionsgradient; Beginnend mit 100 % dest. Wasser. Der Anteil an Methanol wurde innerhalb von 15 min auf 100 % erhöht. Zur Verbesserung der Trennung setzte man den Eluenten 0,1 % Trifluoressigsäure hinzu.

Laufzeit: 50 min.

Software: LAB SOLUTIONS 5.54. SP2.

HPLC-Gerät 2:

JASCO, PU-980, 851 AS.

Säule: LICHROSPHER® 100 RP-18 Säule von MERCK KGaA.

Detektor: UV-Vis-Detektor UV-970, bei 254 nm gemessen.

Injektionsvolumen: 20 μ L.

Flussrate: 1,0 mL/min.

Laufmittel: isokratisch, siehe Tabelle 17, in Volumen-Volumen-Verhältnis (V/V) angegeben.

Laufzeit: 60 min.

Software: BORWIN 1.50, für die Auswertung der Rohdaten und Verarbeitung der Graphiken wurde OriginLab 8.0 genutzt.

Tabelle 17: Isokratische relative Laufmittelzusammensetzung (V/V) am HPLC-Gerät 2.

	Methanol	Dest. Wasser
A	7	3
B	4	1

Präparative HPLC

Siehe Analytische HPLC, HPLC-Gerät 1:

Säule: gepackte 7,8 \times 300 mm XTerra RP-18 Säule (7 μ M) von WATERS.

Probenvorbereitung: man löste maximal 100 mg des Substanzgemisches in 1,1 mL Methanol bzw. addierte zur Lösungsvermittlung maximal 500 μ L DMSO.

Die produkthaltigen Fraktionen wurden gesammelt und mittels analytischer HPLC auf Reinheit untersucht.

6.2.3 Infrarotspektroskopie (IR)

FT-IR-Spektrometer: IFS 28 von BRUKER, mit KBr-Strahlenteiler (Einstrahlwinkel 45°, mit 1 Reflexion) und pyroelektrischen DTGS-Detektor.

Spektralmessung: mit 32 Scans bei einer 2 cm^{-1} Auflösung, mit einer PIKE TECHNOLOGIES-Messeinheit, auf einem 1,3 mm Zinkselenid-Kristall.

Software: OPUS 4.2.

Die Auswertung erfolgte in den Verbindungsmonographien (7.2, ab Seite 127) nach sich anschließender Syntax: Wellenzahl (Signalintensität, Zuordnung der Schwingungsarten und charakteristischen Gruppen). Die Signalintensitäten unterteilte man, nach Einteilung des Spektrums in 3 gleiche Abschnitte, in *strong* (*s*), *medium* (*m*) oder *weak* (*w*). Als Schwingungsarten wurden Valenz- (ν) sowie Deformationsschwingungen (δ) betrachtet. Berücksichtigt wurden nur Wellenzahlen oberhalb des Fingerprintbereiches ($\geq 1500\text{ cm}^{-1}$).

6.2.4 Massenspektrometrie (MS)

Zur Bestimmung der Masse einer Verbindung wurde die Massenspektrometrie herangezogen.

1. Elektronen-Spray-Ionisation (ESI):

Gerät: LCQ-CLASSIC von THERMO FINNIGAN, Kapillartemperatur: 220 °C, positive und negative Ionisierung: Elektronenspray-Methode mit 5,0 kV, Messbereich: 50-2000 u/z, Messgenauigkeit: $\pm 0,1$ u/z, Injektion der Probe: kontinuierlich 20 $\mu\text{L}/\text{min}$ mittels Spritzenpumpe.

2. Atmospheric Pressure Chemical Ionization (APCI):

Gerät: EXPRESSION S von ADVION, Kapillartemperatur: 220 °C, positive Ionisierung: Chemische Ionisation bei Atmosphärendruck, Messbereich: 10-2000 u/z, Messgenauigkeit: $\pm 0,1$ u/z, Zufuhr der Probe: über einen erhitzten Kapillarstab.^[323]

Die Auswertung erfolgte in den Verbindungsmonographien (7.2, ab Seite 127) nach sich anschließender Syntax: Massenzahl (m/z) (relative Peakintensität in Bezug zum Basispeak, [Ionenzuordnung]). Wurde die Probe nach Methode 1 vermessen, kennzeichnete man diese in den Monographien mit * und bei Methode 2 mit **.

3. Hochauflösende Massenspektrometrie (HR-MS):

Gerät: BRUKER Apex III 70 e Fouriertransformations-Ionenzyklonresonanz-Massenspektrometer. Abweichungen bis zum 5 ppm wurden toleriert.

Die Auswertung erfolgte in den Verbindungsmonographien (7.2, ab Seite 127) nach sich anschließender Syntax: gefunden für [Ionenzuordnung]: Massenzahl (m/z), (relative Peakintensität in Bezug zum Basispeak), berechnet für [Summenformel + Wasserstoffsymbol]: Molekülmasse mit vier Dezimalstellen.

6.2.5 Nuclear Magnetic Resonance Spektroskopie (NMR)

Zur Identifizierung der Zielstrukturen wurden ^1H - sowie vereinzelt ^{13}C -, NOESY-, ^1H , ^1H -COSY-, HSQC-, HMBC-Spektren angefertigt.

NMR-Messgeräte: 400 MHz VNMRS oder 500 MHz DD2 von AGILENT TECHNOLOGIES.

Probenvorbereitung: 2-7 mg (^1H -NMR, NOESY, ^1H , ^1H -COSY) oder 15-25 mg (^{13}C , HSQC, HMBC) der Substanz wurden in DMSO- d_6 gelöst und in einem NMR-Probenröhrchen überführt.

Software: Die Rohdatenauswertung erfolgte mit MESTRENOVA-Versionen 8.0.2 oder 11.0.4 von MESTRELAB RESEARCH S.L..

^1H -NMR: Die Proben wurden bei einer Arbeitsfrequenz von 400 MHz (27 °C) vermessen. Die chemische Verschiebung (δ) der Signale ist in *parts per million* (ppm) angegeben.

Die Auswertung erfolgte nach sich anschließender Syntax: Chemische Signalverschiebung (Signalmultiplizität, Anzahl der ^1H -Atome, Zuordnung, gegebenenfalls Kopplungskonstante J (Hz)). Die Multiplizitäten weisen die nachstehenden Abkürzungen auf: Singulett (s), Dublett (d), Triplett (t), Quartett (q) sowie die Kombinationen derer. Bei nicht vollständig aufgelösten oder sich überlagernden Signalen wurden diese als Multipllett (m) definiert und keine Kopplungskonstante angegeben. Kollabierte Dreifachdubletts (ddd), mit der Form eines Triplets, definierte man als Pseudotriplett („t“) ohne Angabe jeglicher Kopplungskonstanten. Breite Signalverläufe wurden mit „br“ gekennzeichnet.

^{13}C -NMR: Die Proben wurden bei einer Arbeitsfrequenz von 100 MHz (27 °C) und von ^1H -Atomen entkoppelt vermessen. δ wurde in ppm angegeben. Die Syntax reduzierte sich somit auf: Chemische Signalverschiebung, (Zuordnung).

Die Auswertungen der ^1H -, sowie vereinzelt der ^{13}C -NMR-Spektren sind in den Verbindungsmographien (7.2, ab Seite 127) hinterlegt.

Zur weiteren Strukturaufklärung wurden NOESY-, ^1H , ^1H -COSY-, HSQC-, HMBC-Spektren herangezogen, die bei einer Arbeitsfrequenz von 400 MHz (27 °C) vermessen wurden.

6.2.6 Schmelzbereichbestimmung (Schmb)

Gerät: BOETIUS PHMK 05 Heiztischmikroskop von VEB WÄGETECHNIK RAPIDO RADEBEUL.

Maximale Heiztemperatur: 360 °C.

Die experimentell ermittelten Ergebnisse wurden mit literaturbekannten Werten (soweit vorhanden) verglichen und das Fällungsmittel angegeben.

6.2.7 Mikrowellenunterstützte Synthese

Gerät: MONOWAVE 450 von ANTON PAAR, maximale Leistung: 850 W; maximaler Betriebsdruck: 30 bar; maximale Betriebstemperatur: 300 °C; 24-Positionen-Autosampler.

Gefäße: Mineralglas mit PEEK-Verschlusskappen (umrandet mit teflonbeschichtetem Silikon), maximales Volumen: 20 mL.^[324]

Zur mikrowellenunterstützten Synthese wurde der Ansatz vollständig in die dafür vorgesehenen Gefäße überführt, mit einer Verschlusskappe abgedichtet und in den Mikrowellenreaktor gebracht.

Methode: Aufheiz und Abkühlzeit: 5 min; Synthesetemperatur: 120 °C; Synthesezeit: 30-60 min.

Nach Abschluss der Reaktion konnte der Ansatz, wie in Allgemeine Methoden zur Synthese (6.2.1, Seite 115) beschrieben, aufgereinigt werden.

6.2.8 Sonstiges

Waagen

Zum Abwägen der jeweiligen Komponenten wurden die nachstehenden elektronischen Handel-, Präzisions- und Feinwaagen genutzt.

Tabelle 18: Genutzte Handels-, Präzisions-, Feinwaagen^[325-327]

	SCALTEC SPA 62	SARTORIUS BASIC BA210S	METTLER TOLEDO XA105 DUAL RANGE
Wägebereich	4200 g	200 g	120 g/ 41 g*
Ablesbarkeit	0,1 g	0,1 mg	0,1 mg/ 0,01 mg*
Standardabweichung	$\leq \pm 0,2$ g	$\leq \pm 0,1$ mg	0,05-0,1 mg/ 0,02 mg*
Richtigkeit	$\leq \pm 0,1$ g	$\leq \pm 0,2$ mg	0,2 mg

* Werte im Feinbereich

Vakuumrotationsverdampfer und Wasserbad

Zum Entfernen der Lösungsmittel wurde ein HEIDOLPH VV 2011 Vakuumrotationsverdampfer, ein HEIDOLPH WB 2001 Wasserbad, mit einem Temperaturregler bis 100 °C sowie eine nachstehend aufgeführte Membranvakuumpumpe genutzt.

Membranvakuumpumpe

Firma: VACUUBRAND, Model: MZ 2C.

Magnetrührplatten

Die folgenden Magnetrührplatten wurden zur Umsetzung der Verbindungen herangezogen.

Tabelle 19: Magnetrührplatten zur Synthese

	IKAMAG RET	IKAMAG RH	IKAMAG RH BASIC 2	HEIDOLPH MR 3001	HEIDOLPH MR 3001 K
Maximaltemp.(°C)	300	320	320	300	300
Motorleistung (min ⁻¹)	0-1100	20-2000	100-2000	1000-1250	1000-1250

6.2.9 *In silico* Untersuchungen

Die computergestützten Ergebnisse wurden durch die Kooperation mit dem Arbeitskreis SIPPL - in Person von DR. DINA ROBAA - erhalten.

Konformationsuntersuchung

Die Untersuchungen dienten zur Bestimmung der Konformationen der jeweiligen Verbindungen, mit der geringsten potentiellen Energie. Zur Anwendung kam dabei das Softwareprogramm MOE 2018. Zunächst wurde eine zufällige Startkonformation der Verbindungen erzeugt und anschließend mit einem MMFF94x-Kraftfeld ein Energieminimierungsschritt unterzogen. Schließlich wurde eine Konformationssuche für die Start-Ligandenkonformation mit einer *Low Mode* MD-Suche mit folgenden Parametern durchgeführt: Abstoßungsgrenze = 100, RMS-Gradient = 0,005 Å, Wiederholungsgrenze = 10000 und maximale Anzahl an Energieminimierungsschritten, die für jede Konformer-Energieminimierung durchgeführt wurde (MM-Wiederholungsgrenze) = 500. Bei der Suche sollen Konformere unter Verwendung eines kurzen MD-Laufs von ~ 1 ps bei einer konstanten Temperatur von 300 K, gefolgt von einer Energieminimierung, die alle Atome umfasst, ermittelt werden.

Nur die Konformationen mit der niedrigsten berechneten potentiellen Energie sind in den Abbildungen im theoretischen Teil dargestellt.

Docking-Experimente an JNK3

Clustering verfügbarer Kristallstrukturen: insgesamt wurden 51 verfügbare Kristallstrukturen der JNK3 aus der Proteindatenbank (PDB) heruntergeladen und nur Kette A beibehalten. Die Strukturen wurden dann in MOE Version 2019.1 (CHEMICAL COMPUTING GROUP; Montreal, Kanada) geladen und gemäß den Bindungsstellenresten überlagert. Die Überlagerung zeigte signifikante Konformationsunterschiede an der Bindungsstelle, die für alle C α -Atome an der Bindungsstelle bis zu 2,5 Å betragen. Daher führte man anschließend einen Durchschnittsverknüpfungscluster (SCHRÖDINGER Version 2019.1) durch die Bindungsstellenreste durch, um schließlich insgesamt neun repräsentative Strukturen des Proteins zu erhalten (PDB-IDs: 1PMV, 2O2U, 3G9L, 3KVX, 3TTI, 3Z9L, 4X21, 6EKD und 6EMH), die für weitere *Docking*-Studien verwendet wurden.

Proteinpräparation: Die Proteinpräparation wurde mit SCHRÖDINGERS PROTEIN PREPARATION durchgeführt (Schrödinger Suite 2019-1: Proteinpräparationsassistent; Epik, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2016; Impact, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2016; *Prime*, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2019). Dabei wurden Wasserstoffatome ergänzt, Protonierungszustände zugewiesen und das Protein in der Konformation minimiert. Lösungsmittelmoleküle wurden entfernt, mit Ausnahme eines Wassermoleküls, das HOH1134 (1PMV-Nummerierung) und HOH2152. Wasserstoffbrückenbindungsnetzwerke, Protonierungszustände von Aminosäureresten und Tautomere wurden optimiert und die Komplexe final, unter Verwendung des OPLS3e-Kraftfelds und der Standardeinstellungen einer Energieminimierung, unterzogen. Rezeptorgitter wurden unter Verwendung von Standardeinstellungen erzeugt, indem der kokristallisierte Ligand als Zentrum der Gitter und das Amidstickstoff von Met149 der *Hinge*-Region als Wasserstoffbrückenbeschränkung zugewiesen wurden.

Ligandenpräparation: Die Liganden wurden unter Verwendung von LIGPREP (Schrödinger Release 2019-1: LigPrep, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2019) hergestellt, wobei der Protonierungszustand bei pH 7 \pm 1 berechnet und die Strukturen anschließend unter Verwendung des OPLS23e-Kraftfelds energieminiert wurden. Final wurden 20 Konformere für jeden Liganden

unter Verwendung von CONFGEN (Schrödinger Release 2019-1: ConfGen, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2019) erzeugt.

Docking: Das molekulare *Docking* wurde unter Verwendung von GLIDE (Schrödinger Release 2019-1: Glide, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2019) im Standard-Präzisionsmodus durchgeführt. Das *Docking* erfolgte an die erzeugten Gitter unter Verwendung der oben erwähnten Wasserstoffbrückenbeschränkung an dem *Hinge*-Rest Met149. Die Anzahl der *Docking*-Positionen für die Minimierung nach dem *Docking* wurde pro Ligand auf 20 erhöht und die maximale Anzahl der Ausgangsstellungen pro Ligand auf eins gesetzt.

Docking-Experimente an Fyn

Die einzig verfügbare Kristallstruktur der Fyn-Kinase (PDB ID: 2DQ7) wurde vom PAB heruntergeladen und für das weitere *Docking* verwendet. Die Proteinpräparation wurde, wie für JNK3 beschrieben, durchgeführt, wobei alle Wassermoleküle entfernt wurden und das Amidstickstoff von Met85 in der *Hinge*-Region als Wasserstoffbrückenbeschränkung zugewiesen. Die Ligandenpräparation und weitere *Docking*-Studien wurden, wie für JNK3 beschrieben, durchgeführt.

7 SYNTHESE DER VERBINDUNGEN

7.1 Allgemeine Arbeitsvorschriften (AAV)

AAV 1: Darstellung von Nicotinsäureamiden

In einem Zweihalsrundkolben wurde 6,16 g Nicotinsäure (50,0 mmol, 1,0 eq) in 36,3 mL Thionylchlorid (59,5 g, 0,5 mol, 10,0 eq; **stark rauchend, ätzend**) suspendiert und 3 h unter Rückfluss erhitzt. Die anfangs gelbe Suspension ging in Lösung. Das überschüssige Thionylchlorid wurde am Rotationsverdampfer entfernt (**unter dem Abzug; Vorsicht! Sehr geruchsintensiv**), mit 2 × 50 mL trockenem Toluol versetzt und wiederum eingeeengt. Der Rückstand wurde in 30 mL trockenem Dioxan aufgenommen und ein Gemisch aus 4,5 mL wasserfreiem Pyridin (4,4 g, 55,0 mmol, 1,1 eq), 55,0 mmol des jeweiligen Amins oder Anilins (1,1 eq) und 30 mL trockenem Dioxan tropfenweise ergänzt. Die erhaltene Suspension ruhte bis zum vollständigen Umsatz bei RT. Anschließend erfolgten eine Chloroform-Wasser-Extraktion, das Vereinen der organischen Phase, sowie eine Waschung gegen *Brine*. Nach dem Abdampfen des Lösungsmittels und ggf. der finalen Säulenchromatographie konnte das Produkt als Feststoff gewonnen werden, das 48-72 h im Exsikkator getrocknet wurde.

AAV 2: Darstellung von N-Acetyl-1,4-dihydropyridin-Derivaten

In einem Mehrhalsrundkolben wurden 1,0 eq des 3-substituierten Pyridins, 0,1 eq Kupfer(I)-jodid und 0,2 eq trockenes Lithiumchlorid (**stark hygroskopisch**) in absolutem THF gelöst bzw. suspendiert. Der Ansatz wurde unter Argonatmosphäre auf -15 bis -40 °C (3:1 Eis und Natriumchlorid bzw. fein verteiltes Trockeneis in einer 1:1: Isopropanol-Methanol-Lösung) gebracht. Im Anschluss ergänzte man 1,2 eq Acetylchlorid (frisch destilliert; **rauchend mit stark reizendem Geruch**) und wartete 15 min. Eine Farbveränderung (siehe 7.2 Verbindungsmonographien, ab Seite 127) wies auf eine positive N-Acetylierung hin. Danach fügte man 1,1 eq Phenylmagnesiumchlorid (2 M in THF) tropfenweise hinzu. Den Ansatz ließ man weitere 15 min bei der oben genannten Temperatur und folglich 30 min bei RT ruhen. Zum Abbruch der Reaktion wurden 100 mL einer 20 %-igen Ammoniumchlorid-Lösung ergänzt und mit Chloroform (3 × 100 mL) extrahiert. Folglich extrahierte man die organische Phase mit jeweils 100 mL eines 1:1 Gemisches aus Ammoniak (25 %) und Ammoniumchlorid-Lösung (20 %), solange bis die wässrige Phase keine blaue Färbung mehr zeigte. Anschließend wusch man den Ansatz gegen 100 mL einer 10 %-igen Salzsäurelösung und gegen *Brine*. Nach Entfernen des halogenhaltigen Lösungsmittels wurde der ölig viskose Rückstand säulenchromatographisch aufgereinigt. Die eingeengte Produktfraktion ließ man aus kaltem Methanol (bei 2-8 °C) ausfallen und final trocknen. Die resultierenden Verbindungen wurden unterhalb von -20 °C unter Argonatmosphäre gelagert.

AAV 3: Darstellung von 1-Aza-9-oxafluoren- oder 10-Aza-11-oxabenzofluoren-Derivaten

In einem Mehrhalsrundkolben wurden 1,0 eq des jeweiligen *N*-Acetyl-1,4-dihydropyridin-Derivats und 1,2 eq des gewünschten 1,4-Chinons in wenig trockenem Dioxan bei RT unter Argonatmosphäre gelöst bzw. suspendiert. Über einen Tropftrichter ergänzte man ein Gemisch aus 10 eq Perchlorsäure (70 %) und trockenem Dioxan (Menge siehe 7.2 Verbindungsmonographien, ab Seite 127). Es zeigte sich ein Farbumschlag. Unter dünnschichtchromatographischer sowie massenspektrometrischer Kontrolle wurden der Verbrauch der 1,4-Chinone, aber auch der Reaktionsumsatz überwacht und gegebenenfalls nach 24 h sowie alle 7 d 0,4 eq des 1,4-Chinons hinzugefügt. Sobald kein Edukt mehr nachweisbar war, addierte man 20 bis 50 mL dest. Wasser, stellte den pH-Wert des Gemisches mittels 1 M Natriumhydroxidlösung auf 8-9 ein und extrahierte den Ansatz mit Chloroform (3 × 100 mL). Die organische Phase wurde gegen *Brine* gewaschen und folglich eingengt. Das resultierende Gemisch trennte man säulenchromatographisch auf, die gewünschten Fraktionen vereinigte man, engte diese wiederum ein, ließ den hervorgehenden festen bzw. öligen Rückstand aus einem Lösungsmittel (siehe 7.2 Verbindungsmonographien) ausfallen (bei 2-8 °C oder -20 °C) und wusch ihn. Final trocknete man den Feststoff für 48-96 h im Exsikkator.

AAV 4: Darstellung von O-Benzylisoindolin-1,3-dion-Derivaten

In einem Rundkolben wurden 1,0 eq *N*-Hydroxyphthalimid und 1,0-3,0 eq Alkylans (**Verätzungsgefahr!**) mittels 1,0 eq TEA in DMF bei 90 °C umgesetzt. Eine positive Reaktion konnte durch eine Farbveränderung der Lösung wahrgenommen werden. Nach vollständigem Produktumsatz wurden dem Ansatz DMF-äquivalente Mengen dest. Wasser, unter Bildung eines Präzipitats, zugeetzt. Die nachfolgend 2 h ruhende Suspension filtrierte man durch eine G3-Fritte. Den Niederschlag wusch man gegebenenfalls mit einer mit Wasser verdünnten Acetonlösung und trocknete ihn 24-36 h im Exsikkator.

AAV 5: Hydrazinolyse: Darstellung von O-Benzylhydroxylaminhydrochlorid-Derivaten

In einem Rundkolben wurde 1,0 eq des jeweiligen *O*-Benzylisoindolin-1,3-dion-Derivats in DCM gelöst. Man ergänzte 2,0 eq Hydrazinhydrat (100 %, **giftig!**) und ließ den Ansatz 48-96 h bei Raumtemperatur ruhen. Das sich bildende farblose Präzipitat (2,3-Dihydrophthalazin-1,4-dion) wies auf einen positiven Umsatz hin. Die Suspension wurde anschließend durch einen Papierfilter gegeben und das Filtrat vollständig eingengt. Das erhaltene Öl löste man in wenig Isopropanol und ergänzte 1,0 eq Salzsäure (37 %). Zu dem resultierenden Niederschlag wurde gegebenenfalls Diethylether gegeben, der final 12 h bei 2-8 °C gelagert wurde. Den Feststoff trennte man vom Filtrat ab und trocknete ihn 24-72 h im Exsikkator.

AAV 6a: Darstellung von Nicotinaldehyd-O-oximethern

In einem eisgekühlten Rundkolben wurde 1,0 eq Natrium sukzessive in Ethanol, unter Wasserstoffentwicklung, gelöst. Man ergänzte 1,0 eq Nicotinaldehydoxim (**65**) und ließ den Ansatz 30 min ruhen. Zur hellgelb gefärbten Suspension fügte man 1,5-3,0 eq des jeweiligen Alkylans (**Verätzungsgefahr!**) hinzu, die daraufhin eine orange bis braune Farbveränderung zeigte. Nach 24-96 h konnten aus den Ansätzen, durch eine Wasser-Chloroform-Extraktion und anschließendem Entfernen des organischen Lösungsmittels, Öle gewonnen werden, die säulenchromatographisch aufgereinigt, bis zum öligen Rückstand eingeeengt und final 72 h im Exsikkator getrocknet wurden.

AAV 6b: Darstellung von Nicotinaldehyd-O-oximethern

In einem Rundkolben wurden 1,0 eq Nicotinaldehyd, 1,0 eq Essigsäure und 1,0 eq frisch destilliertes Pyrrolidin (**rauchend mit unangenehmen Geruch!**) in THF gelöst und 30 min ruhen gelassen. Die anfänglich hellgelbe Lösung erfährt eine Farbvertiefung. Anschließend wurde 1,2-1,5 eq des jeweiligen O-Benzylhydroxylaminhydrochlorid-Derivats ergänzt. Die gelbe Lösung färbte sich orange bis rot. Nach 24-96 h konnten aus den Ansätzen, durch eine Salzsäure (5 %)-Chloroform-Extraktion und anschließendem Entfernen des organischen Lösungsmittels, Öle gewonnen werden, die säulenchromatographisch aufgereinigt, bis zum öligen Rückstand eingeeengt und final 72 h im Exsikkator getrocknet wurden.

AAV 7: Darstellung von 1-Aza-9-oxafluoren-3-carbaldehyd-O-oximethern oder 10-Aza-11-oxabenzofluoren-8-carbaldehyd-O-oximethern

In einem Rundkolben wurden 1,0 eq 6-Hydroxy-4-phenylbenzofuro[2,3-*b*]pyridin-3-carbaldehyd bzw. 5-Hydroxy-7-phenylnaphtho[2',1':4,5]furo[2,3-*b*]pyridin-8-carbaldehyd mit 2,0 eq Essigsäure und 3,0 eq frisch destilliertes Pyrrolidin (**rauchend mit unangenehmen Geruch!**) in THF gelöst und 30 min ruhen gelassen. Die anfänglich hellgelbe Lösung erfährt eine Farbvertiefung. Anschließend wurden 3,0 eq des jeweiligen O-Benzylhydroxylaminhydrochlorid-Derivats ergänzt. Die gelbe Lösung färbte sich orange. Nach 4 d konnten aus den Ansätzen, durch eine Salzsäure (5 %)-Chloroform-Extraktion und anschließendem Entfernen des organischen Lösungsmittels, Öle gewonnen werden, die säulenchromatographisch aufgereinigt und bis zum festen oder öligen Rückstand eingeeengt wurden. Man suspendierte den Ansatz mit den jeweiligen Lösungsmitteln (siehe 7.2 Verbindungsmonographien, ab Seite 127), erwärmte ihn bis zum vollständigen Lösen und ließ ihn bei 2-8 °C ruhen. Das entstandene Präzipitat wurde gegebenenfalls gewaschen und 72 h im Exsikkator getrocknet.

7.2 Verbindungsmonographien

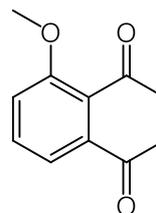
7.2.1 Kommerziell nicht verfügbare Syntheseeedukte

Die nachstehenden Verbindungen waren für die Folgeschritte notwendig, kommerziell aber nicht erhältlich. Ihre Charakterisierung beschränkt sich auf das Wesentliche.

5-Methoxy-1,4-naphthochinon

Summenformel: $C_{11}H_8O_3$

Relative Molmasse $[M_r]$: 188,1



Darstellung: Alternative WILLIAMSON-Ethersynthese.

In einem Rundkolben wurde 2,0 g 5-Hydroxy-1,4-naphthochinon (11,5 mmol, 1,0 eq) in 50 mL DCM gelöst, 2,0 g Silber-(I)-oxid (14,2 mmol, 1,2 eq) suspendiert, anteilig 20 mL Iodmethan (45,6 g, 320,0 mmol, 28,0 eq) addiert und für 4 h unter Rückfluss erhitzt. Nachdem kein weiterer Umsatz festgestellt werden konnte, beendete man die Reaktion. Man befreite den Ansatz von suspendiertem Silber-(I)-oxid, entfernte das organische Lösungsmittel und trocknete ihn 3 d lang im Exsikkator.

Orangebraun gefärbter Feststoff.

Schmb.: 186,0-186,5 °C; Literatur: 186 °C^[328].

Ausbeute: 75,8 %.

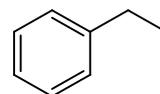
DC-Kontrolle: LM 1: $R_f = 0,49$; LM 3: $R_f = 0,25$ (siehe 6.2.2.2).

MS (m/z (%))**: 189,0 (100, $[M + H]^+$), (siehe 6.2.4).

Benzyljodid

Summenformel: C_7H_7I

Relative Molmasse $[M_r]$: 218,0



Darstellung nach FINKELSTEIN:

In einem Rundkolben wurde 20,0 mL Benzylchlorid (22 g, 174,0 mmol, 1,0 eq) in 150 mL Aceton gelöst und 38,3 g Natriumjodid (255,0 mmol, 1,5 eq) zugesetzt. Eine positive Reaktion zeigte sich durch eine gelb gefärbte Präzipitatbildung. Nach drei Stunden wurde der Ansatz mit einer Chloroform-Wasser-Extraktion aufgereinigt und die halogenhaltige Phase am Rotationsverdampfer eingeeengt.

Farbloser kristalliner Feststoff bis braun gefärbte Flüssigkeit.

Schmb.: 25-27 °C.

Ausbeute: 99,0 %.

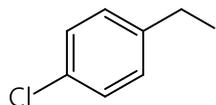
Gefahrenhinweis: **stark rauchend, stechend riechend, Verätzungsgefahr!**

Synthese der Verbindungen

4-Chlorobenzyljodid

Summenformel: C_7H_6ClI

Relative Molmasse [M_r]: 252,0



Darstellung nach FINKELSTEIN:

In einem Rundkolben wurde 10,0 g 4-Chlorobenzylchlorid (62,5 mmol, 1,0 eq) in 100 mL Aceton gelöst und 14,1 g Natriumjodid (93,8 mmol, 1,5 eq) zugesetzt. Eine positive Reaktion zeigte sich durch eine gelb gefärbte Präzipitatbildung. Nach drei Stunden wurde der Ansatz mit einer Chloroform-Wasser-Extraktion aufgereinigt und die halogenhaltige Phase am Rotationsverdampfer eingengt.

Farblos kristalliner Feststoff bis braun gefärbte Flüssigkeit.

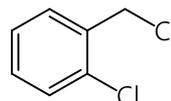
Ausbeute: 90,5 %.

Gefahrenhinweis: **stark rauchend, stechend riechend, Verätzungsgefahr!**

2-Chlorobenzylchlorid

Summenformel: $C_7H_6Cl_2$

Relative Molmasse [M_r]: 160,0



Darstellung:

In einem Rundkolben wurde 9,5 g 2-Chlorobenzylalkohol (55,0 mmol, 1,00 eq) in 70 mL Diethylether gelöst und 0,2 mL Pyridin (0,24 g, 3,1 mmol, 0,05 eq) zugesetzt. Vorsichtig ergänzte man tropfenweise 8,5 mL Thionylchlorid (14,0 g, 117,3 mmol, 2,10 eq) und erhitzte den Ansatz unter Rückfluss. Nach zwei Stunden wurde das Gemisch mit einer Diethylether-Wasser-Extraktion aufgereinigt und die organische Phase am Rotationsverdampfer eingengt.^[289]

Hellgelb gefärbte Flüssigkeit.

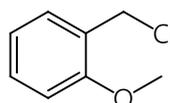
Ausbeute: 77,0 %.

DC-Kontrolle: LM 1: $R_f = 0,66$ (siehe 6.2.2.2).

2-Methoxybenzylchlorid

Summenformel: C_8H_9ClO

Relative Molmasse [M_r]: 156,0



Darstellung:

In einem Rundkolben wurde 10,0 mL 2-Methoxybenzylalkohol (11,2 g, 71,8 mmol, 1,00 eq) in 80 mL Diethylether gelöst und 0,3 mL Pyridin (0,4 g, 4,6 mmol, 0,05 eq) zugesetzt. Vorsichtig ergänzte man tropfenweise 10,0 mL Thionylchlorid (16,5 g, 138,2 mmol, 1,90 eq) und erhitzte den Ansatz unter Rückfluss. Nach zwei Stunden wurde das Gemisch mit einer Diethylether-Wasser-Extraktion aufgereinigt und die organische Phase am Rotationsverdampfer eingengt.^[289]

Hellgelb gefärbte Flüssigkeit.

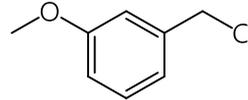
Ausbeute: 99,0 %.

DC-Kontrolle: LM 1: $R_f = 0,64$ (siehe 6.2.2.2).

3-Methoxybenzylchlorid

Summenformel: C_8H_9ClO

Relative Molmasse [M_r]: 156,0



Darstellung:

In einem Rundkolben wurde 7,5 mL 3-Methoxybenzylalkohol (8,4 g, 53,8 mmol, 1,00 eq) in 60 mL Diethylether gelöst und 0,2 mL Pyridin (0,2 g, 3,1 mmol, 0,06 eq) zugesetzt. Vorsichtig ergänzte man tropfenweise 8,0 mL Thionylchlorid (13,2 g, 110,6 mmol, 2,1 eq) und erhitze den Ansatz unter Rückfluss. Nach zwei Stunden wurde das Gemisch mit einer Diethylether-Wasser-Extraktion aufgereinigt und die organische Phase am Rotationsverdampfer eingeeengt.^[289]

Hellgelb gefärbte Flüssigkeit.

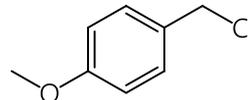
Ausbeute: 99,8 %.

DC-Kontrolle: LM 1: $R_f = 0,63$ (siehe 6.2.2.2).

4-Methoxybenzylchlorid

Summenformel: C_8H_9ClO

Relative Molmasse [M_r]: 156,0



Darstellung:

In einem Rundkolben wurde 20,0 mL 4-Methoxybenzylalkohol (22,6 g, 164,0 mmol, 1,00 eq) in 160 mL Diethylether gelöst und 0,6 mL Pyridin (0,6 g, 7,5 mmol, 0,05 eq) zugesetzt. Vorsichtig ergänzte man tropfenweise 20,0 mL Thionylchlorid (32,8 g, 276,0 mmol, 1,70 eq) und erhitze den Ansatz unter Rückfluss. Nach zwei Stunden wurde das Gemisch mit einer Diethylether-Wasser-Extraktion aufgereinigt und die organische Phase am Rotationsverdampfer eingeeengt.^[289]

Hellgelb gefärbte Flüssigkeit.

Ausbeute: 95,0 %.

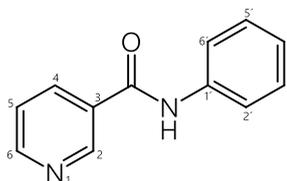
DC-Kontrolle: LM 1: $R_f = 0,60$ (siehe 6.2.2.2).

7.2.2 Synthesereihe der 1-Aza-9-oxafluoren- sowie 10-Aza-11-oxabenz[o]fluoren-Derivate des Carbamidtyps

7.2.2.1 Nicotinsäureamide und -anilide

N-Phenylnicotinamid

Verbindung: **1**
 Summenformel: $C_{12}H_{10}N_2O$
 Relative Molmasse $[M_r]$: 198,1



Darstellung nach AAV 1 (siehe 7.1):

In einem Zweihalsrundkolben wurde 6,16 g Nicotinsäure (50,0 mmol, 1,0 eq) gemäß AAV 1 mit 5,02 mL Anilin (5,12 g, 55,0 mmol, 1,1 eq) umgesetzt und aufgereinigt. Nach 6 d konnte die entstandene, ocker gefärbte Suspension erfolgreich zum gewünschten Produkt aufgereinigt werden.

Hellbraun gefärbter Feststoff.

Schmb.: 110-111 °C; Literatur: 110 °C.^[329]

Ausbeute: 50,4 %.

DC-Kontrolle: LM 1: $R_f = 0,18$; LM 7: $R_f = 0,51$ (siehe 6.2.2.2).

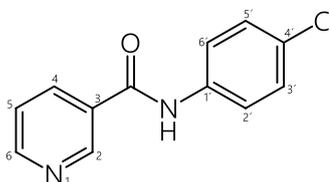
1H -NMR (DMSO- d_6): $\delta = 10,42$ (s, 1H, 3-CONH-), 9,10 (dd, 1H, **H-2**, $^4J_{2/4} = 2,3$ Hz, $^5J_{2/5} = 0,9$ Hz), 8,77 (dd, 1H, **H-6**, $^3J_{5/6} = 4,8$ Hz, $^4J_{4/6} = 1,7$ Hz), 8,29 (dt, 1H, **H-4**, $^3J_{4/5} = 7,9$ Hz, $^4J_{2/4} = 2,3$ Hz, $^4J_{4/6} = 1,7$ Hz), 7,80-7,73 (m, 2H, **H-2'**, **H-6'**), 7,58 (ddd, 1H, **H-5**, $^3J_{4/5} = 7,9$ Hz, $^3J_{5/6} = 4,8$ Hz, $^5J_{2/5} = 0,9$ Hz), 7,41-7,33 (m, 2H, **H-3'**, **H-5'**), 7,12 (tt, 1H, **H-4'**, $^3J_{3'/4'} = 7,4$ Hz, $^4J_{2'/4'} = 1,2$ Hz).

IR ($\bar{\nu}$): 1536, 1586 (m, $\nu_{C=C \text{ arom.}}$), 1599 (w, $\delta_{N-H, 3-CONH}$), 1653 (s, $\nu_{C=O, 3-CONH}$), 3054-3133 (w, $\nu_{C-H \text{ arom.}}$), 3346 (m, $\nu_{N-H, 3-CONH}$) cm^{-1} .

MS (m/z (%))^{**}: 199,1 (100, $[M+H]^+$), (siehe 6.2.4).

N-(4-Chlorophenyl)nicotinamid

Verbindung: **2**
 Summenformel: $C_{12}H_9ClN_2O$
 Relative Molmasse $[M_r]$: 232,0



Darstellung nach AAV 1 (siehe 7.1):

In einem Zweihalsrundkolben wurde 6,16 g Nicotinsäure (50,0 mmol, 1,0 eq) gemäß AAV 1 mit 7,02 g 4-Chloranilin (55,0 mmol, 1,1 eq) umgesetzt und aufgereinigt. Nach 48 h konnte die entstandene, hellbraun gefärbte Suspension erfolgreich zum gewünschten Produkt aufgereinigt werden.

Rosa gefärbter Feststoff.

Schmb.: 168-170 °C; Literatur: 171-172 °C.^[330]

Ausbeute: 71,2 %.

DC-Kontrolle: LM 8: $R_f = 0,13$, LM 7: $R_f = 0,44$ (siehe 6.2.2.2).

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6): $\delta = 10,54$ (s, 1H, 3-CONH-), 9,09 (dd, 1H, **H-2**, $^4J_{2/4} = 2,3$ Hz, $^5J_{2/5} = 0,9$ Hz), 8,76 (dd, 1H, **H-6**, $^3J_{5/6} = 4,8$ Hz, $^4J_{4/6} = 1,7$ Hz), 8,27 (dt, 1H, **H-4**, $^3J_{4/5} = 7,9$ Hz, $^4J_{2/4} = 2,3$ Hz, $^4J_{4/6} = 1,7$ Hz), 7,79 ($\underline{\text{AA}}'\underline{\text{BB}}'$, 2H, **H-2'**, **H-6'**), 7,57 (ddd, 1H, **H-5**, $^3J_{4/5} = 7,9$ Hz, $^3J_{5/6} = 4,8$ Hz, $^5J_{2/5} = 0,9$ Hz), 7,41 ($\underline{\text{AA}}'\underline{\text{BB}}'$, 2H, **H-3'**, **H-5'**).

IR ($\tilde{\nu}$): 1531, 1596 (s, m, $\nu_{\text{C}=\text{C}}$ arom.), 1654 (m, $\nu_{\text{C}=\text{O}}$, 3-CONH), 3046-3188 (w, $\nu_{\text{C}-\text{H}}$ arom.), 3296 (w, $\nu_{\text{N}-\text{H}}$, 3-CONH) cm^{-1} .

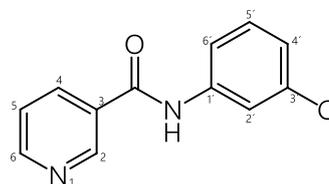
MS (m/z (%))**: 233,0 (100, $[\text{M}+\text{H}]^+$), 235,0 (70, $[\text{M}+\text{H}]^+$), (siehe 6.2.4).

N-(3-Chlorophenyl)nicotinamid

Verbindung: **3**

Summenformel: $\text{C}_{12}\text{H}_9\text{ClN}_2\text{O}$

Relative Molmasse $[\text{M}_r]$: 232,0



Darstellung nach AAV 1 (siehe 7.1):

In einem Zweihalsrundkolben wurde 6,16 g Nicotinsäure (50,0 mmol, 1,0 eq) gemäß AAV 1 mit 5,80 mL 3-Chloranilin (7,02 g, 55,0 mmol, 1,1 eq) umgesetzt. Nach 12 h konnte die entstandene, hellbraun gefärbte Suspension erfolgreich zum gewünschten Produkt aufgereinigt werden.

Rosa gefärbter Feststoff.

Schmb.: 133-135 °C.

Ausbeute: 66,4 %.

DC-Kontrolle: LM 8: $R_f = 0,14$, LM 7: $R_f = 0,46$ (siehe 6.2.2.2).

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6): $\delta = 10,57$ (s, 1H, 3-CONH-), 9,09 (dd, 1H, **H-2**, $^4J_{2/4} = 2,3$ Hz, $^5J_{2/5} = 0,9$ Hz), 8,76 (dd, 1H, **H-6**, $^3J_{5/6} = 4,8$ Hz, $^4J_{4/6} = 1,7$ Hz), 8,27 (dt, 1H, **H-4**, $^3J_{4/5} = 7,9$ Hz, $^4J_{2/4} = 2,3$ Hz, $^4J_{4/6} = 1,7$ Hz), 7,94 (t, 1H, **H-2'**, $^4J_{2'/4'} = 2,1$ Hz, $^4J_{2'/6'} = 2,1$ Hz), 7,68 (ddd, 1H, **H-6'**, $^3J_{5'/6'} = 8,1$ Hz, $^4J_{2'/6'} = 2,1$ Hz, $^4J_{4'/6'} = 1,0$ Hz), 7,57 (ddd, 1H, **H-5**, $^3J_{4/5} = 7,9$ Hz, $^3J_{5/6} = 4,8$ Hz, $^5J_{2/5} = 0,9$ Hz), 7,39 (t, 1H, **H-5'**, $^3J_{5'/6'} = 8,1$ Hz, $^4J_{4'/5'} = 8,1$ Hz), 7,17 (ddd, 1H, **H-4'**, $^3J_{4'/5'} = 8,1$ Hz, $^4J_{2'/4'} = 2,1$ Hz, $^4J_{4'/6'} = 1,0$ Hz).

IR ($\tilde{\nu}$): 1533, 1593 (m, $\nu_{\text{C}=\text{C}}$ arom.), 1657 (m, $\delta_{\text{N}-\text{H}}$, 3-CONH), 1678 (w, $\nu_{\text{C}=\text{O}}$, 3-CONH), 2854-2926 (w, $\nu_{\text{C}-\text{H}}$ aliph.), 3060-3184 (w, $\nu_{\text{C}-\text{H}}$ arom.), 3294 (w, $\nu_{\text{N}-\text{H}}$, 3-CONH) cm^{-1} .

MS (m/z (%))**: 234,0 (100, $[\text{M}+\text{H}]^+$), 236,0 (70, $[\text{M}+\text{H}]^+$), (siehe 6.2.4).

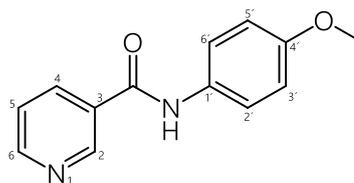
Synthese der Verbindungen

N-(4-Methoxyphenyl)nicotinamid

Verbindung: **4**

Summenformel: C₁₃H₁₂N₂O₂

Relative Molmasse [M_r]: 228,1



Darstellung nach AAV 1 (siehe 7.1):

In einem Zweihalsrundkolben wurde 6,16 g Nicotinsäure (50,0 mmol, 1,0 eq) gemäß AAV 1 mit 6,80 g 4-Methoxyanilin (55,0 mmol, 1,1 eq) umgesetzt und aufgereinigt. Nach 45 h konnte die entstandene, dunkelbraun gefärbte Suspension erfolgreich zum gewünschten Produkt aufgereinigt werden.

Gelb bis braun gefärbter Feststoff.

Schmb.: 143-145 °C.

Ausbeute: 62,6 %.

DC-Kontrolle: LM 9: R_f = 0,54, LM 1: R_f = 0,16 (siehe 6.2.2.2).

¹H-NMR (DMSO-*d*₆): δ = 10,28 (s, 1H, 3-CONH-), 9,07 (dd, 1H, **H-2**, ⁴J_{2/4} = 2,3 Hz, ⁵J_{2/5} = 0,9 Hz), 8,73 (dd, 1H, **H-6**, ³J_{5/6} = 4,8 Hz, ⁴J_{4/6} = 1,7 Hz), 8,26 (dt, 1H, **H-4**, ³J_{4/5} = 7,9 Hz, ⁴J_{2/4} = 2,3 Hz, ⁴J_{4/6} = 1,7 Hz), 7,65 (AA'BB', 2H, **H-2'**, **H-6'**), 7,54 (ddd, 1H, **H-5**, ³J_{4/5} = 7,9 Hz, ³J_{5/6} = 4,8 Hz, ⁵J_{2/5} = 0,9 Hz), 6,93 (AA'BB', 2H, **H-3'**, **H-5'**), 3,73 (s, 3H, 4'-OCH₃).

IR (ν̄): 1508, 1544 (m, s, ν_{C=C arom.}), 1607 (m, δ_{N-H, 3-CONH}), 1665 (m, ν_{C=O, 3-CONH}), 2953 (w, ν_{C-H aliph.}), 3010-3196 (w, ν_{C-H arom.}), 3287 (w, ν_{N-H, 3-CONH}) cm⁻¹.

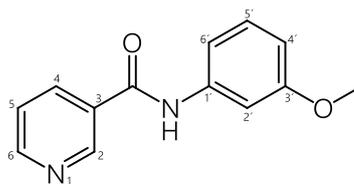
MS (m/z (%))^{**}: 229,2 (50, [M+H]⁺), 203,2 (100, [M+H-C₂H₂]⁺⁺), (siehe 6.2.4).

N-(3-Methoxyphenyl)nicotinamid

Verbindung: **5**

Summenformel: C₁₃H₁₂N₂O₂

Relative Molmasse [M_r]: 228,1



Darstellung nach AAV 1 (siehe 7.1):

In einem Zweihalsrundkolben wurde 6,16 g Nicotinsäure (50,0 mmol, 1,0 eq) gemäß AAV 1 mit 6,80 g 3-Methoxyanilin (55,0 mmol, 1,1 eq) umgesetzt und aufgereinigt. Nach 96 h konnte die entstandene, orange gefärbte Suspension erfolgreich zum gewünschten Produkt aufgereinigt werden.

Hellbraun gefärbter Feststoff.

Schmb.: 80-82 °C.

Ausbeute: 61,3 %.

DC-Kontrolle: LM 9: R_f = 0,56; LM 1: R_f = 0,15 (siehe 6.2.2.2).

¹H-NMR (DMSO-*d*₆): δ = 10,38 (s, 1H, 3-CONH-), 9,08 (dd, 1H, **H-2**, ⁴J_{2/4} = 2,3 Hz, ⁵J_{2/5} = 0,9 Hz), 8,74 (dd, 1H, **H-6**, ³J_{5/6} = 4,8 Hz, ⁴J_{4/6} = 1,7 Hz), 8,27 (dt, 1H, **H-4**, ³J_{4/5} = 7,9 Hz, ⁴J_{2/4} = 2,3 Hz, ⁴J_{4/6} = 1,7 Hz), 7,55 (ddd, 1H, **H-5**, ³J_{4/5} = 7,9 Hz, ³J_{5/6} = 4,8 Hz, ⁵J_{2/5} = 0,9 Hz), 7,45 (t, 1H, **H-2'**,

$^4J_{2'/4', 2'/6'} = 2,2$ Hz), 7,34 (ddt, 1H, **H-6'**, $^3J_{5'/6'} = 8,0$ Hz, $^4J_{2'/6'} = 2,2$ Hz), 7,25 (t, 1H, **H-5'**, $^3J_{4'/5', 5'/6'} = 8,0$ Hz), 6,71-6,68 (m, 1H, **H-4'**), 3,74 (s, 3H, 3'-OCH₃).

IR ($\tilde{\nu}$): 1544, 1597 (s, $\nu_{C=C \text{ arom.}}$), 1617 (s, $\delta_{N-H, 3-CONH}$), 1658 (m, $\nu_{C=O, 3-CONH}$), 2844-2974 (w, $\nu_{C-H \text{ aliph.}}$), 3002-3139 (m, $\nu_{C-H \text{ arom.}}$), 3466-3503 (m, $\nu_{N-H, 3-CONH}$) cm^{-1} .

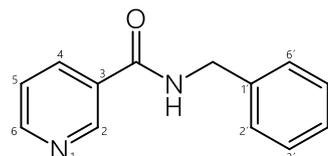
MS (m/z (%))**: 229,3 (60, [M+H]⁺), 203,2 (40, [M+H-C₂H₂]⁺), (siehe 6.2.4).

N-Benzylnicotinamid

Verbindung: **6**

Summenformel: C₁₃H₁₂N₂O

Relative Molmasse [M_r]:212,1



Darstellung nach AAV 1 (siehe 7.1):

In einem Zweihalsrundkolben wurde 6,16 g Nicotinsäure (50,0 mmol, 1,0 eq) gemäß AAV 1 mit 6,00 mL Benzylamin (5,88 g, 55,0 mmol, 1,1 eq) umgesetzt und aufgereinigt. Nach 68 h konnte die hellbraun gefärbte Suspension erfolgreich zum gewünschten Produkt aufgereinigt werden.

Hellbraun gefärbter Feststoff.

Schmb.: 70-72 °C; Literatur: 72-73 °C.^[331]

Ausbeute: 34,8 %.

DC-Kontrolle: LM 7: R_f = 0,47 (siehe 6.2.2.2).

¹H-NMR (DMSO-*d*₆): δ = 9,21 (t, 1H, 3-CONH-, $^3J_{NHCH_2} = 6,0$ Hz), 9,03 (dd, 1H, **H-2**, $^4J_{2/4} = 2,3$ Hz, $^5J_{2/5} = 0,9$ Hz), 8,70 (dd, 1H, **H-6**, $^3J_{5/6} = 4,8$ Hz, $^4J_{4/6} = 1,7$ Hz), 8,22 (dt, 1H, **H-4**, $^3J_{4/5} = 7,9$ Hz, $^4J_{2/4} = 2,3$ Hz, $^4J_{4/6} = 1,7$ Hz), 7,50 (ddd, 1H, **H-5**, $^3J_{4/5} = 7,9$ Hz, $^3J_{5/6} = 4,8$ Hz, $^5J_{2/5} = 0,9$ Hz), 7,33-7,28 (m, 4H, **H-2'**, **H-3'**, **H-5'**, **H-6'**), 7,27-7,20 (m, 1H, **H-4'**), 4,49 (d, 2H, -CH₂-, $^3J_{NHCH_2} = 6,0$ Hz).

IR ($\tilde{\nu}$): 1541, 1592 (m, s, $\nu_{C=C \text{ arom.}}$), 1642 (s, $\nu_{C=O, 3-CONH}$), 2923 (w, $\nu_{C-H \text{ aliph.}}$), 3030-3062 (w, $\nu_{C-H \text{ arom.}}$), 3287 (m, $\nu_{N-H, 3-CONH}$) cm^{-1} .

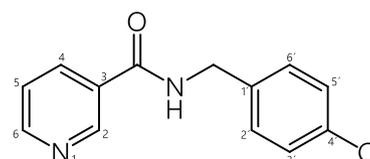
MS (m/z (%))**: 213,1 (100, [M+H]⁺), (siehe 6.2.4).

N-(4-Chlorobenzyl)nicotinamid

Verbindung: **7**

Summenformel: C₁₃H₁₁ClN₂O

Relative Molmasse [M_r]:246,1



Darstellung nach AAV 1 (siehe 7.1):

In einem Zweihalsrundkolben wurde 6,16 g Nicotinsäure (50,0 mmol, 1,0 eq) gemäß AAV 1 mit 6,70 mL 4-Chlorobenzylamin (7,79 g, 55,0 mmol, 1,1 eq) umgesetzt und aufgereinigt. Nach 7 d konnte die hellbraun gefärbte Suspension erfolgreich zum gewünschten Produkt aufgereinigt werden.

Synthese der Verbindungen

Farbloser Feststoff.

Schmb.: 71-74 °C.

Ausbeute: 49,4 %.

DC-Kontrolle: LM 7: $R_f = 0,45$ (siehe 6.2.2.2).

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6): $\delta = 9,23$ (t, 1H, 3-CONH-, $^3J_{\text{NHCH}_2} = 5,9$ Hz), 9,03 (dd, 1H, **H-2**, $^4J_{2/4} = 2,3$ Hz, $^5J_{2/5} = 0,9$ Hz), 8,70 (dd, 1H, **H-6**, $^3J_{5/6} = 4,8$ Hz, $^4J_{4/6} = 1,7$ Hz), 8,20 (dt, 1H, **H-4**, $^3J_{4/5} = 7,9$ Hz, $^4J_{2/4} = 2,3$ Hz, $^4J_{4/6} = 1,7$ Hz), 7,50 (ddd, 1H, **H-5**, $^3J_{4/5} = 7,9$ Hz, $^3J_{5/6} = 4,8$ Hz, $^5J_{2/5} = 0,9$ Hz), 7,36 (AA'BB', 4H, **H-2'**, **H-3'**, **H-5'**, **H-6'**), 4,47 (d, 2H, -CH₂-, $^3J_{\text{NHCH}_2} = 5,9$ Hz).

IR ($\tilde{\nu}$): 1540, 1591 (*m, s*, $\nu_{\text{C}=\text{C arom.}}$), 1642 (*s*, $\nu_{\text{C}=\text{O}, 3\text{-CONH}}$), 2926 (*w*, $\nu_{\text{C-H aliph.}}$), 3058 (*w*, $\nu_{\text{C-H arom.}}$), 3293 (*m*, $\nu_{\text{N-H}, 3\text{-CONH}}$) cm^{-1} .

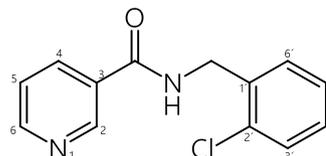
MS (m/z (%))**: 247,0 (100, [M+H]⁺), 249,0 (70, [M+H]⁺), (siehe 6.2.4).

N-(2-Chlorobenzyl)nicotinamid

Verbindung: **8**

Summenformel: C₁₃H₁₁ClN₂O

Relative Molmasse [M_r]: 246,1



Darstellung nach AAV 1 (siehe 7.1):

In einem Zweihalsrundkolben wurde 6,16 g Nicotinsäure (50,0 mmol, 1,0 eq) gemäß AAV 1 mit 6,60 mL 2-Chlorobenzylamin (7,79 g, 55,0 mmol, 1,1 eq) umgesetzt und aufgereinigt. Nach 96 h konnte die gelb gefärbte Suspension erfolgreich zum gewünschten Produkt aufgereinigt werden.

Hellgelb gefärbter Feststoff.

Schmb.: 73-75 °C.

Ausbeute: 34,9 %.

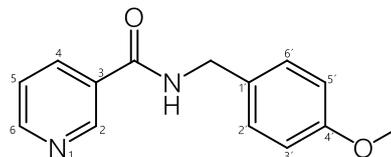
DC-Kontrolle: LM 7: $R_f = 0,57$ (siehe 6.2.2.2).

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6): $\delta = 9,21$ (t, 1H, 3-CONH-, $^3J_{\text{NHCH}_2} = 5,8$ Hz), 9,06 (dd, 1H, **H-2**, $^4J_{2/4} = 2,3$ Hz, $^5J_{2/5} = 0,9$ Hz), 8,71 (dd, 1H, **H-6**, $^3J_{5/6} = 4,8$ Hz, $^4J_{4/6} = 1,7$ Hz), 8,23 (dt, 1H, **H-4**, $^3J_{4/5} = 7,9$ Hz, $^4J_{2/4} = 2,3$ Hz, $^4J_{4/6} = 1,7$ Hz), 7,51 (ddd, 1H, **H-5**, $^3J_{4/5} = 7,9$ Hz, $^3J_{5/6} = 4,8$ Hz, $^5J_{2/5} = 0,9$ Hz), 7,45 (dd, 1H, **H-3'**, $^3J_{3'/4'} = 7,0$ Hz, $^4J_{3'/5'} = 2,0$ Hz), 7,38 (dd, 1H, **H-4'**, $^3J_{3'/4'} = 7,0$ Hz, $^4J_{4'/6'} = 2,6$ Hz), 7,34-7,26 (*m*, 2H, **H-5'**, **H-6'**), 4,55 (d, 2H, -CH₂-, $^3J_{\text{NHCH}_2} = 5,8$ Hz).

IR ($\tilde{\nu}$): 1539, 1591 (*m*, $\nu_{\text{C}=\text{C arom.}}$), 1644 (*s*, $\nu_{\text{C}=\text{O}, 3\text{-CONH}}$), 2923 (*w*, $\nu_{\text{C-H aliph.}}$), 3061 (*w*, $\nu_{\text{C-H arom.}}$), 3293 (*m*, $\nu_{\text{N-H}, 3\text{-CONH}}$) cm^{-1} .

MS (m/z (%))**: 247,1 (100, [M+H]⁺), 249,1 (70, [M+H]⁺), (siehe 6.2.4).

N-(4-Methoxybenzyl)nicotinamid

Verbindung: **9**Summenformel: C₁₄H₁₄N₂O₂Relative Molmasse [M_r]:242,1

Darstellung nach AAV 1 (siehe 7.1):

In einem Zweihalsrundkolben wurde 6,16 g Nicotinsäure (50,0 mmol, 1,0 eq) gemäß AAV 1 mit 6,80 g 4-Methoxybenzylamin (55,0 mmol, 1,1 eq) umgesetzt und aufgereinigt. Nach 45 h konnte die entstandene braun gefärbte Suspension erfolgreich zum gewünschten Produkt aufgereinigt werden.

Gelb gefärbter Feststoff.

Schmb.: 81-86 °C.

Ausbeute: 37,9 %.

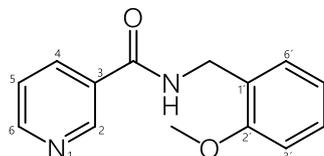
DC-Kontrolle: LM 7: R_f = 0,36 (siehe 6.2.2.2).

¹H-NMR (DMSO-*d*₆): δ = 9,13 (t, 1H, 3-CONH-, ³J_{NHCH₂} = 5,9 Hz), 9,01 (dd, 1H, **H-2**, ⁴J_{2/4} = 2,3 Hz, ⁵J_{2/5} = 0,9 Hz), 8,68 (dd, 1H, **H-6**, ³J_{5/6} = 4,8 Hz, ⁴J_{4/6} = 1,7 Hz), 8,19 (dt, 1H, **H-4**, ³J_{4/5} = 7,9 Hz, ⁴J_{2/4} = 2,3 Hz, ⁴J_{4/6} = 1,7 Hz), 7,48 (ddd, 1H, **H-5**, ³J_{4/5} = 7,9 Hz, ³J_{5/6} = 4,8 Hz, ⁵J_{2/5} = 0,9 Hz), 7,24 (AA'BB', 2H, **H-2'**, **H-6'**), 6,87 (AA'BB', 2H, **H-3'**, **H-5'**), 4,41 (d, 2H, -CH₂-, ³J_{NHCH₂} = 5,9 Hz), 3,71 (s, 3H, 4'-OCH₃).

IR (ν̄): 1509, 1544 (*m*, ν_{C=C arom.}), 1591 (*m*, δ_{N-H, 3-CONH}), 1633 (*m*, ν_{C=O, 3-CONH}), 2836-2920 (*w*, ν_{C-H aliph.}), 3035-3100 (*w*, ν_{C-H arom.}), 3290 (*m*, ν_{N-H, 3-CONH}) cm⁻¹.

MS (*m/z* (%))^{**}: 243,1 (100, [M+H]⁺), (siehe 6.2.4).

N-(2-Methoxybenzyl)nicotinamid

Verbindung: **10**Summenformel: C₁₄H₁₄N₂O₂Relative Molmasse [M_r]:242,1

Darstellung nach AAV 1 (siehe 7.1):

In einem Zweihalsrundkolben wurde 6,16 g Nicotinsäure (50,0 mmol, 1,0 eq) gemäß AAV 1 mit 7,18 mL 2-Methoxybenzylamin (7,54 g, 55,0 mmol, 1,1 eq) umgesetzt und aufgereinigt. Nach 96 h konnte die gelb gefärbte Suspension erfolgreich zum gewünschten Produkt aufgereinigt werden.

Gelb gefärbte, ölige Flüssigkeit.

Ausbeute: 31,9 %.

DC-Kontrolle: LM 7: R_f = 0,57 (siehe 6.2.2.2).

¹H-NMR (DMSO-*d*₆): δ = 9,07-8,99 (*m*, 2H, **H-2**, 3-CONH-), 8,70 (dd, 1H, **H-6**, ³J_{5/6} = 4,8 Hz, ⁴J_{4/6} = 1,7 Hz), 8,23 (dt, 1H, **H-4**, ³J_{4/5} = 7,9 Hz, ⁴J_{2/4} = 2,3 Hz, ⁴J_{4/6} = 1,7 Hz), 7,50 (ddd, 1H, **H-5**, ³J_{4/5} = 7,9 Hz, ³J_{5/6} = 4,8 Hz, ⁵J_{2/5} = 0,9 Hz), 7,28-7,16 (*m*, 2H, **H-3'**, **H-5'**), 6,98 (dd, 1H, **H-6'**,

Synthese der Verbindungen

$^3J_{5'/6'} = 8,1$ Hz, $^4J_{4'/6'} = 1,0$ Hz), 6,89 (td, 1H, **H-4'**, $^3J_{3'/4'} = 7,4$ Hz, $^4J_{4'/6'} = 1,0$ Hz), 4,45 (d, 2H, **-CH₂-**, $^3J_{\text{NHCH}_2} = 5,8$ Hz), 3,81 (s, 3H, **2'-OCH₃**).

IR ($\tilde{\nu}$): 1539, 1590 (*m*, $\nu_{\text{C}=\text{C}}$ arom.), 1642 (*s*, $\nu_{\text{C}=\text{O}}$, 3-CONH), 2836, 2938 (*w*, $\nu_{\text{C}-\text{H}}$ aliph.), 3064 (*w*, $\nu_{\text{C}-\text{H}}$ arom.), 3295 (*m*, $\nu_{\text{N}-\text{H}}$, 3-CONH) cm^{-1} .

MS (*m/z* (%))^{**}: 243,1 (100, [M+H]⁺), (siehe 6.2.4).

7.2.2.2 N-Acetyl-1,4-dihydropyridine des Amid- und des Ethylestertyps

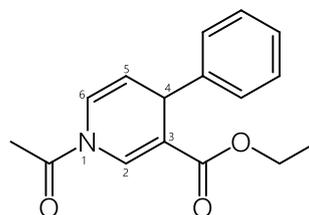
Die abgebildeten Verbindungen in den Monographien zeigen eine allgemeine Darstellung ohne Berücksichtigung von Rotameren- bzw. Enantiomereffekten.

(E,Z,RS)-Ethyl-1-Acetyl-4-phenyl-1,4-dihydropyridin-3-carboxylat

Verbindung: **11**

Summenformel: C₁₆H₁₇NO₃

Relative Molmasse [M_r]: 271,1



Darstellung nach AAV 2 (siehe 7.1):

In einem Zweihalsrundkolben wurden 2,7 mL Nicotinsäureethylester (3,0 g, 19,9 mmol, 1,0 eq), 379,0 mg Kupfer-(I)-jodid (1,9 mmol, 0,1 eq) und 168,7 mg trockenes Lithiumchlorid (3,8 mmol, 0,2 eq) in 130 mL trockenem THF suspendiert und der Ansatz auf -40 °C gebracht. Es wurde 1,4 mL Acetylchlorid (1,6 g, 19,9 mmol, 1,0 eq, Farbumschlag von zitronengelb nach rotbraun) sowie 10,9 mL Phenylmagnesiumchlorid (2 M in THF; 11,4 g, 21,8 mmol, 1,1 eq, Farbumschlag von rotbraun nach zitronengelb) gemäß AAV 2 hinzugefügt, umgesetzt und aufgearbeitet. Das Rohprodukt reinigte man säulenchromatographisch (LM 3, siehe 6.2.2.1) auf und fällte es aus kaltem Methanol.

Farblos bis hellgelb gefärbter, plättchenartig geformter Feststoff.

Schmb.: 73-75 °C (aus MeOH).

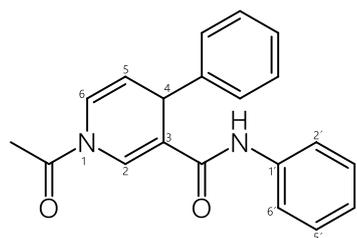
Ausbeute: 62,8 %.

DC-Kontrolle: LM 3: R_f = 0,40 (siehe 6.2.2.2).

¹H-NMR (DMSO-*d*₆): δ = 8,13 (s, 1H, **H-2 [E]**), 7,84 (s, 1H, **H-2 [Z]**), 7,32-7,15 (m, 11H, **H-6 [Z]**, 4-C₆H₅ **[E/Z]**), 6,97 („s“ br, 1H, **H-6 [E]**), 5,22 („s“ br, 2H, **H-5 [E/Z]**), 4,41 (d, 2H, **H-4 [E/Z]**), 4,01 (ABX₃, 3-COOCH₂CH₃), 2,34 („s“ br, 6H, -NCOCH₃ **[E/Z]**), 1,07 (ABX₃; 6H, 3-COOCH₂CH₃).

IR ($\tilde{\nu}$): 1599, 1617 (*m*, $\nu_{\text{C}=\text{C}}$ arom.), 1659 (*m*, $\nu_{\text{C}=\text{O}}$, NCOCH₃), 1700 (*s*, $\nu_{\text{C}=\text{O}}$, 3-COOCH₂CH₃), 2870-2990 (*w*, $\nu_{\text{C}-\text{H}}$ aliph.), 3100-3000 (*w*, $\nu_{\text{C}-\text{H}}$ arom.) cm^{-1} .

MS (*m/z* (%))^{**} : 272,2 (60, [M+H]⁺), 228,2 (40, [M-COCH₃]⁺), 226,2 (60, [M-OCH₂CH₃]⁺), 152,2 (100, [M-COCH₃-C₅H₅]⁺), (siehe 6.2.4).

*(E,Z,RS)-1-Acetyl-N-phenyl-4-phenyl-1,4-dihydropyridin-3-carbamid*Verbindung: **12**Summenformel: C₂₀H₁₈N₂O₂Relative Molmasse [M_r]: 318,1

Darstellung nach AAV 2 (siehe 7.1):

In einem Zweihalsrundkolben wurden 4,9 g **1** (25,0 mmol, 1,0 eq), 475,5 mg Kupfer-(I)-jodid (2,6 mmol, 0,1 eq) und 212,4 mg trockenes Lithiumchlorid (5,0 mmol, 0,2 eq) in 140 mL trockenem THF suspendiert und der Ansatz auf -18 °C gebracht. Es wurde 1,8 mL Acetylchlorid (1,9 g, 25,0 mmol, 1,0 eq, Farbumschlag von hellbraun nach rotbraun) sowie 13,8 mL Phenylmagnesiumchlorid (2 M in THF, 14,4 g, 27,6 mmol, 1,1 eq, Farbumschlag von rotbraun nach rot) gemäß AAV 2 hinzugefügt, umgesetzt und aufgearbeitet. Das Rohprodukt reinigte man säulenchromatographisch (LM 1, siehe 6.2.2.1) auf und fällte es aus kaltem Methanol.

Farblos bis hellgelb gefärbter, feinkörniger Feststoff.

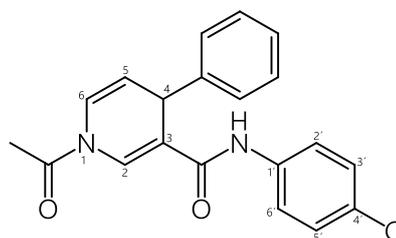
Schmb.: 186-188 °C (aus MeOH).

Ausbeute: 14,9 %.

DC-Kontrolle: LM 1: R_f = 0,41 (siehe 6.2.2.2).

¹H-NMR (DMSO-*d*₆): δ = 9,74 („s“ br, 2H, -CONH- [E/Z]), 8,03 („s“ br, 1H, H-2 [E]), 7,69 („s“ br, 1H, H-2 [Z]), 7,58-7,48 (m, 4H, H-2', H-6'), 7,31-7,17 (m, 15H, H-6 [Z], 4-C₆H₅ [E/Z], H-3', H-5'), 7,04-6,95 (m, 3H, H-6 [E], H-4'), 5,25 („s“ br, 2H, H-5 [E/Z]), 4,71-4,69 (m, 2H, H-4 [E/Z]), 2,38 („s“ br, 6H, -NCOCH₃ [E/Z]).

IR (ν̄): 1531, 1597 (m, ν_{C=C arom.}), 1671 (s, ν_{C=O, NCOCH₃}), 1700 (w, ν_{C=O, 3-CONH}), 3025-3060 (w, ν_{C-H arom.}), 3312 (w, ν_{N-H, 3-CONH}) cm⁻¹.

MS (*m/z* (%))^{**}: 319,1 (100, [M+H]⁺), (siehe 6.2.4).*(E,Z,RS)-1-Acetyl-N-(4-chlorophenyl)-4-phenyl-1,4-dihydropyridin-3-carbamid*Verbindung: **13**Summenformel: C₂₀H₁₇ClN₂O₂Relative Molmasse [M_r]: 352,1

Darstellung nach AAV 2 (siehe 7.1):

In einem Zweihalsrundkolben wurden 4,5 g **2** (19,3 mmol, 1,0 eq), 360,4 mg Kupfer-(I)-jodid (1,9 mmol, 0,1 eq) und 163,6 mg trockenes Lithiumchlorid (3,9 mmol, 0,2 eq) in 100 mL trockenem THF suspendiert und der Ansatz auf -40 °C gebracht. Es wurde 1,4 mL Acetylchlorid (1,5 g, 19,3 mmol, 1,0 eq, Farbumschlag von hellbraun nach braun) sowie 10,6 mL Phenylmagnesiumchlorid (2 M in THF, 11,1 g, 21,2 mmol, 1,1 eq, Farbumschlag von braun nach dunkelgelb) gemäß AAV 2 hinzugefügt, umgesetzt und aufgearbeitet. Das Rohprodukt reinigte man säulenchromatographisch (LM 1, siehe 6.2.2.1) auf und fällte es aus kaltem Methanol.

Gelb gefärbter Feststoff.

Schmb.: 172-176 °C (aus MeOH).

Synthese der Verbindungen

Ausbeute: 11,4 %.

DC-Kontrolle: LM 4: $R_f = 0,41$, LM 2: $R_f = 0,50$ (siehe 6.2.2.2).

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6): $\delta = 9,97$ („s“ br, 2H, -CONH- [E/Z]), 8,10 („s“ br, 1H, H-2 [E]), 7,71 („s“ br, 1H, H-2 [Z]), 7,47 (AA'BB', 4H, H-2', H-6'), 7,30-7,23 (m, 11H, 6-H [Z], 4-C₆H₅ [E/Z]), 7,04 (AA'BB', 4H, H-3', H-5'), 6,94 („s“ br, 1H, H-6 [E]), 5,22 („s“ br, 2H, H-5 [E/Z]), 4,71-4,67 (m, 2H, H-4 [E/Z]), 2,37 („s“ br, 6H, -NCOCH₃ [E/Z]).

IR ($\tilde{\nu}$): 1522, 1592 (s, $\nu_{\text{C}=\text{C}}$ arom.), 1612 (m, $\delta_{\text{N-H}, 3\text{-CONH}}$), 1652 (m, $\nu_{\text{C}=\text{O}}$, NCOCH₃), 1673 (m, $\nu_{\text{C}=\text{O}}$, 3-CONH), 2830-2970 (w, $\nu_{\text{C-H}}$ aliph.), 3140-3103 (w, $\nu_{\text{C-H}}$ arom.), 3329 (w, $\nu_{\text{N-H}, 3\text{-CONH}}$) cm^{-1} .

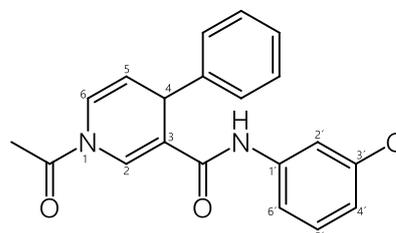
MS (m/z (%))**: 353,2 (100, [M+H]⁺), (siehe 6.2.4).

(E,Z,RS)-1-Acetyl-N-(3-chlorophenyl)-4-phenyl-1,4-dihydropyridin-3-carbamid

Verbindung: **14**

Summenformel: C₂₀H₁₇ClN₂O₂

Relative Molmasse [M_r]: 352,1



Darstellung nach AAV 2 (siehe 7.1):

In einem Zweihalsrundkolben wurden 7,7 g **3** (32,9 mmol, 1,0 eq), 605,6 mg Kupfer(I)-jodid (3,3 mmol, 0,1 eq) und 279,1 mg trockenes Lithiumchlorid (6,6 mmol, 0,2 eq) in 150 mL trockenem THF suspendiert und der Ansatz auf -40 °C gebracht. Es wurde 2,3 mL Acetylchlorid (2,7 g, 33,0 mmol, 1,0 eq, Farbumschlag von gelb nach weinrot) sowie 18,0 mL Phenylmagnesiumchlorid (2 M in THF, 18,8 g, 36,2 mmol, 1,1 eq, Farbumschlag von weinrot nach gelborange) gemäß AAV 2 hinzugefügt, umgesetzt und aufgearbeitet. Das Rohprodukt reinigte man säulenchromatographisch (LM 1, siehe 6.2.2.1) auf und fällte es aus kaltem Methanol.

Zitronengelb gefärbter, feinkörniger Feststoff.

Schmb.: 155-159 °C (aus MeOH).

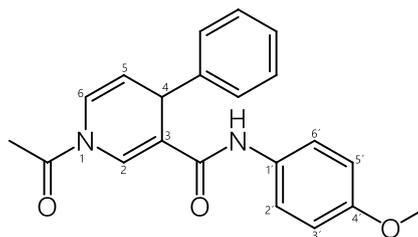
Ausbeute: 16,2 %.

DC-Kontrolle: LM 1: $R_f = 0,46$ (siehe 6.2.2.2).

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6): $\delta = 9,94$ („s“ br, 2H, -CONH- [E/Z]), 8,10 („s“ br, 1H, H-2 [E]), 7,76-7,70 (m, 3H, H-2 [Z], H-2'), 7,46 (d, 2H, H-6', $^3J_{5'/6'} = 8,3$ Hz), 7,31-7,22 (m, 10H, 4-C₆H₅ [E/Z]), 7,16 (dt, 2H, H-5', $^3J_{5'/6'} = 8,3$ Hz, $^3J_{4'/5'} = 6,5$ Hz), 7,10 („s“ br, 1H, H-6 [Z]), 7,07-7,02 (m, 2H, H-4'), 6,94 („s“ br, 1H, H-6 [E]), 5,23 („s“ br, 2H, H-5 [E/Z]), 4,69 (m, 2H, H-4 [E/Z]), 2,38 („s“ br, 6H, -NCOCH₃ [E/Z]).

IR ($\tilde{\nu}$): 1525, 1590 (m, s, $\nu_{\text{C}=\text{C}}$ arom.), 1671 (s, $\nu_{\text{C}=\text{O}}$, NCOCH₃), 1680 (w, $\nu_{\text{C}=\text{O}}$, 3-CONH), 3025-3082 (w, $\nu_{\text{C-H}}$ arom.), 3304 (w, $\nu_{\text{N-H}, 3\text{-CONH}}$) cm^{-1} .

MS (m/z (%))**: 353,1 (100, [M+H]⁺), 233,0 (70, [M-COCH₃-C₅H₅]⁺), (siehe 6.2.4).

*(E,Z,RS)-1-Acetyl-N-(4-methoxyphenyl)-4-phenyl-1,4-dihydropyridin-3-carbamid*Verbindung: **15**Summenformel: C₂₁H₂₀N₂O₃Relative Molmasse [M_r]: 348,1

Darstellung nach AAV 2 (siehe 7.1):

In einem Zweihalsrundkolben wurden 3,0 g **4** (13,1 mmol, 1,0 eq), 250,3 mg Kupfer(I)-jodid (1,3 mmol, 0,1 eq) und 111,4 mg trockenes Lithiumchlorid (2,6 mmol, 0,2 eq) in 85 mL trockenem THF suspendiert und der Ansatz auf -40 °C gebracht. Es wurde 0,9 mL Acetylchlorid (1,0 g, 13,1 mmol, 1,0 eq, Farbumschlag von hellgrau nach rotbraun) sowie 7,2 mL Phenylmagnesiumchlorid (2 M in THF, 7,5 g, 14,5 mmol, 1,1 eq, Farbumschlag von rotbraun nach hellbraun) gemäß AAV 2 hinzugefügt, umgesetzt und aufgearbeitet. Das Rohprodukt reinigte man säulenchromatographisch (LM 3, siehe 6.2.2.1) auf und fällte es aus kaltem Methanol.

Beige bis gelb gefärbter, feinkörniger Feststoff.

Schmb.: 155-160 °C (aus Methanol).

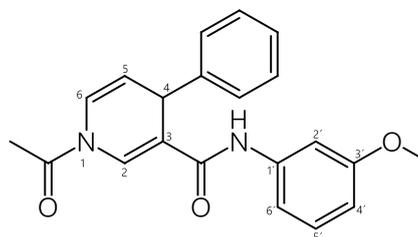
Ausbeute: 15,9 %.

DC-Kontrolle: LM 1: R_f = 0,40 (siehe 6.2.2.2).

¹H-NMR (DMSO-*d*₆): δ = 9,67 („s“ br, 1H, -CONH- [E]), 9,60 („s“ br, 1H, -CONH- [Z]), 8,03 („s“ br, 1H, H-2 [E]), 7,66 („s“ br, 1H, H-2 [Z]), 7,41 (AA'BB', 4H, H-2', H-6'), 7,29-7,11 (m, 11H, H-6 [Z], 4-C₆H₅ [E/Z]), 6,91 („s“ br, 1H, H-6 [E]), 6,80 (AA'BB', 4H, H-3', H-5'), 5,24 („s“ br, 1H, H-5 [Z]), 5,17 („s“ br, 1H, H-5 [E]), 4,69 (d, 2H, H-4 [E/Z]), 3,67 (s, 6H, 4'-OCH₃), 2,31 („s“ br, 6H, -NCOCH₃ [E/Z]).

IR (ν̄): 1510, 1598 (s, m, ν_{C=C arom.}), 1636 (m, δ_{N-H, 3-CONH}), 1674 (s, ν_{C=O, NCOCH₃}), 1705 (w, ν_{C=O, 3-CONH}), 2850-2970 (w, ν_{C-H aliph.}), 3000-3080 (w, ν_{C-H arom.}), 3312 (m, ν_{N-H, 3-CONH}) cm⁻¹.

MS (m/z (%))**: 349,4 (100, [M+H]⁺), 229,3 (10, [M-COCH₃-C₅H₅]⁺), (siehe 6.2.4).

*(E,Z,RS)-1-Acetyl-N-(3-methoxyphenyl)-4-phenyl-1,4-dihydropyridin-3-carbamid*Verbindung: **16**Summenformel: C₂₁H₂₀N₂O₃Relative Molmasse [M_r]: 348,1

Darstellung nach AAV 2 (siehe 7.1):

In einem Zweihalsrundkolben wurden 4,0 g **5** (17,5 mmol, 1,0 eq), 333,3 mg Kupfer(I)-jodid (1,8 mmol, 0,1 eq) und 148,4 mg trockenes Lithiumchlorid (3,5 mmol, 0,2 eq) in 80 mL trockenem THF suspendiert und der Ansatz auf -40 °C gebracht. Es wurde 1,3 mL Acetylchlorid (1,4 g, 17,5 mmol, 1,0 eq, Farbumschlag von gelb nach dunkelrot) sowie 9,6 mL Phenylmagnesiumchlorid (2 M in THF, 10,0 g, 19,2 mmol, 1,1 eq, Farbumschlag von dunkelrot nach orange) gemäß AAV 2 hinzugefügt, umgesetzt und aufgearbeitet. Das Rohprodukt reinigte man säulenchromatographisch (LM 1, siehe 6.2.2.1) auf und fällte es aus kaltem Methanol.

Hellgelb gefärbter, feinkörniger Feststoff.

Synthese der Verbindungen

Schmb.: 150-153 °C (aus MeOH).

Ausbeute: 12,1 %.

DC-Kontrolle: LM 1: $R_f = 0,42$ (siehe 6.2.2.2).

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6): $\delta = 9,79$ („s“ br, 1H, -CONH- [E]), $9,72$ („s“ br, 1H, -CONH- [Z]), $8,06$ („s“ br, 1H, H-2 [E]), $7,68$ („s“ br, 1H, H-2 [Z]), $7,31-7,12$ (m, 17H, H-6 [Z], 4-C₆H₅ [E/Z], H-2', H-5', H-6'), $6,91$ („s“ br, 1H, H-6 [E]), $6,61-6,54$ (m, 2H, H-4'), $5,24$ („s“ br, 2H, H-5 [E/Z]), $4,74-4,67$ (m, 2H, H-4 [E/Z]), $3,68$ (s, 6H, 3'-OCH₃), $2,38$ („s“ br, 6H, -NCOCH₃ [E/Z]).

IR (ν): $1491, 1581$ (m, $\nu_{C=C \text{ arom.}}$), 1631 (s, $\delta_{N-H, 3-CONH}$), 1673 (s, $\nu_{C=O, NCOCH_3}$), 1732 (m, $\nu_{C=O, 3-CONH}$), $2873, 2958$ (w, $\nu_{C-H \text{ aliph.}}$), $3060-3110$ (w, $\nu_{C-H \text{ arom.}}$), 3337 (w, $\nu_{N-H, 3-CONH}$) cm^{-1} .

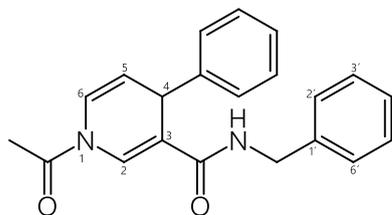
MS (m/z (%))^{**}: $349,2$ (100, [M+H]⁺), $305,2$ (10, [M-COCH₃]⁺), $229,2$ (10, [M-COCH₃-C₅H₅]⁺), (siehe 6.2.4).

(E,Z,RS)-1-Acetyl-N-benzyl-4-phenyl-1,4-dihydropyridin-3-carbamid

Verbindung: **17**

Summenformel: C₂₁H₂₀N₂O₂

Relative Molmasse [M_r]: 332,2



Darstellung nach AAV 2 (siehe 7.1):

In einem Zweihalsrundkolben wurden 7,5 g **6** (35,4 mmol, 1,0 eq), 673,1 mg Kupfer(I)-jodid (3,7 mmol, 0,1 eq) und 300,0 mg trockenes Lithiumchlorid (7,1 mmol, 0,2 eq) in 190 mL trockenem THF suspendiert und der Ansatz auf -18 °C gebracht. Es wurde 2,5 mL Acetylchlorid (2,8 g, 35,4 mmol, 1,0 eq, Farbumschlag von gelb nach braun), sowie 19,5 mL Phenylmagnesiumchlorid (2 M in THF, 20,3 g, 38,9 mmol, 1,1 eq, Farbumschlag von braun nach rotbraun) gemäß AAV 2 hinzugefügt, umgesetzt und aufgearbeitet. Das Rohprodukt reinigte man säulenchromatographisch (LM 1, siehe 6.2.2.1) auf.

Gelb gefärbte, hoch viskose Flüssigkeit.

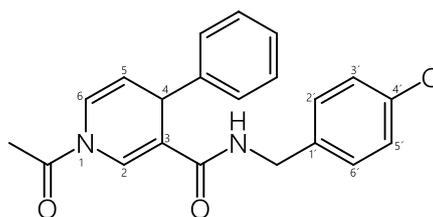
Ausbeute: 21,8 %.

DC-Kontrolle: LM 1: $R_f = 0,30$ (siehe 6.2.2.2).

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6): $\delta = 8,41$ („s“ br, 2H, -CONH- [E/Z]), $7,96$ („s“ br, 1H, H-2 [E]), $7,60$ („s“ br, 1H, H-2 [Z]), $7,34-7,05$ (m, 15H, H-6 [Z], 4-C₆H₅ [E/Z], H-2'-H-6'), $6,90$ („s“ br, 1H, H-6 [E]), $5,31-5,06$ (m, 2H, H-5 [E/Z]), $4,66-4,59$ (m, 2H, H-4), $4,38-4,19$ (m, 4H, -CH₂-), $2,30$ („s“ br, 6H, -NCOCH₃ [E/Z]).

IR (ν): $1531, 1597$ (m, $\nu_{C=C \text{ arom.}}$), 1673 (s, $\nu_{C=O, NCOCH_3}$), 1700 (w, $\nu_{C=O, 3-CONH}$), $2927-2972$ (w, $\nu_{C-H \text{ aliph.}}$), $3028-3061$ (w, $\nu_{C-H \text{ arom.}}$), 3320 (w, $\nu_{N-H, 3-CONH}$) cm^{-1} .

MS (m/z (%))^{**}: $333,2$ (100, [M+H]⁺), (siehe 6.2.4).

(E,Z,RS)-1-Acetyl-N-(4-chlorobenzyl)-4-phenyl-1,4-dihydropyridin-3-carbamidVerbindung: **18**Summenformel: C₂₁H₁₉ClN₂O₂Relative Molmasse [M_r]:366,1

Darstellung nach AAV 2 (siehe 7.1):

In einem Zweihalsrundkolben wurden 7,6 g **7** (30,7 mmol, 1,0 eq), 564,8 mg Kupfer(I)-jodid (3,1 mmol, 0,1 eq) und 286,2 mg trockenes Lithiumchlorid (6,13 mmol, 0,2 eq) in 170 mL trockenem THF suspendiert und der Ansatz auf -14 °C gebracht. Es wurde 2,2 mL Acetylchlorid (2,4 g, 30,7 mmol, 1,0 eq, Farbumschlag von gelb nach dunkelgelb), sowie 16,8 mL Phenylmagnesiumchlorid (2 M in THF, 17,5 g, 33,6 mmol, 1,1 eq, Farbumschlag von dunkelgelb nach weinrot) gemäß AAV 2 hinzugefügt, umgesetzt und aufgearbeitet. Das Rohprodukt reinigte man säulenchromatographisch (LM 1, siehe 6.2.2.1) auf.

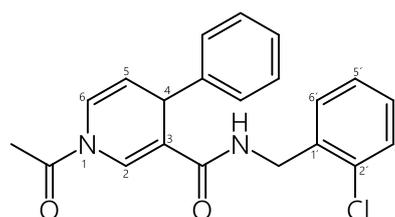
Gelb gefärbte, hoch viskose Flüssigkeit.

Ausbeute: 11,1 %.

DC-Kontrolle: LM 1: R_f = 0,28 (siehe 6.2.2.2).

¹H-NMR (DMSO-*d*₆): δ = 8,41 („s“ br, 2H, -CONH- [E/Z]), 7,96 („s“ br, 1H, H-2 [E]), 7,60 („s“ br, 1H, H-2 [Z]), 7,42-7,14 (m, 19H, H-6 [Z], 4-C₆H₅ [E/Z], H-2', H-3', H-5', H-6'), 6,90 („s“ br, 1H, H-6 [E]), 5,31-5,06 (m, 2H, H-5 [E/Z]), 4,64-4,58 (m, 2H, H-4 [E/Z]), 4,38-4,19 (m, 4H, -CH₂-), 2,30 („s“ br, 6H, -NCOCH₃ [E/Z]).

IR (ν̄): 1531, 1597 (m, ν_{C=C arom.}), 1674 (s, ν_{C=O, NCOCH₃}), 1681 (w, ν_{C=O, 3-CONH}), 2926-2972 (w, ν_{C-H aliph.}), 3027-3061 (w, ν_{C-H arom.}), 3323 (w, ν_{N-H, 3-CONH}) cm⁻¹.

MS (*m/z* (%))^{**}: 367,0 (40, [M+H]⁺), (siehe 6.2.4).*(E,Z,RS)*-1-Acetyl-N-(2-chlorobenzyl)-4-phenyl-1,4-dihydropyridin-3-carbamidVerbindung: **19**Summenformel: C₂₁H₁₉ClN₂O₂Relative Molmasse [M_r]:366,1

Darstellung nach AAV 2 (siehe 7.1):

In einem Zweihalsrundkolben wurden 4,7 g **8** (19,1 mmol, 1,0 eq), 351,4 mg Kupfer(I)-jodid (1,9 mmol, 0,1 eq) und 286,2 mg trockenes Lithiumchlorid (3,5 mmol, 0,2 eq) in 90 mL trockenem THF suspendiert und der Ansatz auf -14 °C gebracht. Es wurde 1,4 mL Acetylchlorid (1,5 g, 19,1 mmol, 1,0 eq, Farbumschlag von gelb nach dunkelgelb), sowie 10,5 mL Phenylmagnesiumchlorid (2 M in THF, 10,9 g, 21,0 mmol, 1,1 eq, Farbumschlag von dunkelgelb nach weinrot) gemäß AAV 2 hinzugefügt, umgesetzt und aufgearbeitet. Das Rohprodukt reinigte man säulenchromatographisch (LM 1, siehe 6.2.2.1) auf und fällte es aus kaltem Methanol.

Gelb gefärbter Feststoff.

Schmb.: 118-120 °C (aus MeOH).

Ausbeute: 15,4 %.

Synthese der Verbindungen

DC-Kontrolle: LM 1: $R_f = 0,25$ (siehe 6.2.2.2).

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6): $\delta = 8,39$ („s“ br, 2H, -CONH- [E/Z]), $8,01$ („s“ br, 1H, H-2 [E]), $7,65$ („s“ br, 1H, H-2 [Z]), $7,38-7,14$ (m, 14H, 4-C₆H₅ [E/Z], H-3', H-4'), $7,10$ („s“ br, 1H, H-6 [Z]), $7,06-7,00$ (m, 2H, H-5'), $6,89$ („s“ br, 1H, H-6 [E]), $6,68-6,58$ (m, 2H, H-6'), $5,30-5,10$ (m, 2H, H-5 [E/Z]), $4,65-4,60$ (m, 2H, H-4 [E/Z]), $4,38-4,19$ (m, 4H, -CH₂-), $2,34$ („s“ br, 6H, -NCOCH₃ [E/Z]).

IR ($\bar{\nu}$): $1531, 1600$ (m, w, $\nu_{\text{C}=\text{C arom.}}$), 1629 (m, $\delta_{\text{N-H, 3-CONH}}$), 1675 (s, $\nu_{\text{C}=\text{O, NCOCH}_3}$), 1701 (w, $\nu_{\text{C}=\text{O, 3-CONH}}$), $2926-2972$ (w, $\nu_{\text{C-H aliph.}}$), $3026-3061$ (w, $\nu_{\text{C-H arom.}}$), 3319 (w, $\nu_{\text{N-H, 3-CONH}}$) cm^{-1} .

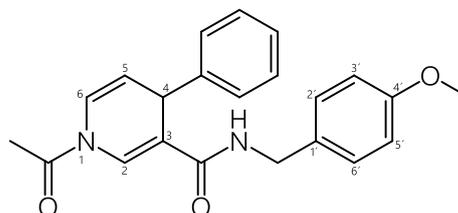
MS (m/z (%))**: $367,3$ (100, [M+H]⁺), $369,3$ (70, [M+H]⁺), (siehe 6.2.4).

(E,Z,RS)-1-Acetyl-N-(4-methoxybenzyl)-4-phenyl-1,4-dihydropyridin-3-carbamid

Verbindung: **20**

Summenformel: C₂₂H₂₂N₂O₃

Relative Molmasse [M_r]: 362,2



Darstellung nach AAV 2 (siehe 7.1):

In einem Zweihalsrundkolben wurden $3,4$ g **9** ($14,0$ mmol, $1,0$ eq), $266,0$ mg Kupfer(I)-jodid ($1,4$ mmol, $0,1$ eq) und $122,6$ mg trockenes Lithiumchlorid ($2,9$ mmol, $0,2$ eq) in 66 mL trockenem THF suspendiert und der Ansatz auf -40 °C gebracht. Es wurde $1,0$ mL Acetylchlorid ($1,1$ g, $14,0$ mmol, $1,0$ eq, Farbumschlag von gelb nach dunkelgelb), sowie $7,9$ mL Phenylmagnesiumchlorid (2 M in THF, $8,2$ g, $15,9$ mmol, $1,1$ eq, Farbumschlag von dunkelgelb nach ocker) gemäß AAV 2 hinzugefügt, umgesetzt und aufgearbeitet. Das Rohprodukt reinigte man säulenchromatographisch (LM 1, siehe 6.2.2.1) auf und fällte es aus kaltem Methanol.

Gelb gefärbter Feststoff.

Schmb.: $59-61$ °C (aus MeOH).

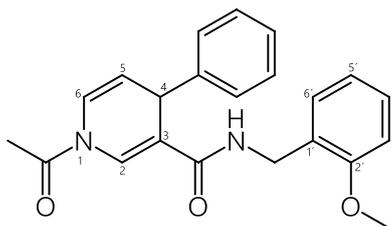
Ausbeute: $20,4$ %.

DC-Kontrolle: LM 1: $R_f = 0,32$ (siehe 6.2.2.2).

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6): $\delta = 8,64$ („s“ br, 2H, -CONH- [E/Z]), $7,94$ („s“ br, 1H, H-2 [E]), $7,58$ („s“ br, 1H, H-2 [Z]), $7,31-7,19$ (m, 11H, H-6 [Z], 4-C₆H₅ [E/Z]), $7,11-7,06$ (m, 4H, H-2', H-6'), $6,83-6,81$ (m, 5H, H-6 [E], H-3', H-5'), $5,24$ („s“ br, 1H, H-5 [Z]), $5,14$ („s“ br, 1H, H-5 [E]), $4,64-4,68$ (m, 2H, H-4 [E/Z]), $4,30-4,18$ (m, 4H, -CH₂-), $3,69$ (s, 6H, 4'-OCH₃), $2,30$ („s“ br, 6H, -NCOCH₃ [E/Z]).

IR ($\bar{\nu}$): $1511, 1531, 1584$ (s, m, $\nu_{\text{C}=\text{C arom.}}$), 1611 (m, $\delta_{\text{N-H, 3-CONH}}$), 1653 (m, $\nu_{\text{C}=\text{O, NCOCH}_3}$), 1675 (w, $\nu_{\text{C}=\text{O, 3-CONH}}$), $2835-2954$ (w, $\nu_{\text{C-H aliph.}}$), $3005-3061$ (w, $\nu_{\text{C-H arom.}}$), 3326 (w, $\nu_{\text{N-H, 3-CONH}}$) cm^{-1} .

MS (m/z (%))**: $363,2$ (100, [M+H]⁺), (siehe 6.2.4).

*(E,Z,RS)-1-Acetyl-N-(2-methoxybenzyl)-4-phenyl-1,4-dihydropyridin-3-carbamid*Verbindung: **21**Summenformel: $C_{22}H_{22}N_2O_3$ Relative Molmasse [M_r]: 362,2

Darstellung nach AAV 2 (siehe 7.1):

In einem Zweihalsrundkolben wurden 4,4 g **10** (18,2 mmol, 1,0 eq), 334,3 mg Kupfer(I)-jodid (1,8 mmol, 0,1 eq) und 122,6 mg trockenes Lithiumchlorid (3,6 mmol, 0,2 eq) in 140 mL trockenem THF suspendiert und der Ansatz auf -14 °C gebracht. Es wurde 1,6 mL Acetylchlorid (1,4 g, 18,2 mmol, 1,0 eq, Farbumschlag von gelb nach orange), sowie 10,0 mL Phenylmagnesiumchlorid (2 M in THF, 10,4 g, 20,1 mmol, 1,1 eq, Farbumschlag von orange nach weinrot) gemäß AAV 2 hinzugefügt, umgesetzt und aufgearbeitet. Das Rohprodukt reinigte man säulenchromatographisch (LM 1, siehe 6.2.2.1) auf.

Gelb gefärbte, hoch viskose Flüssigkeit.

Ausbeute: 25,2 %.

DC-Kontrolle: LM 1: $R_f = 0,34$ (siehe 6.2.2.2).

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6): $\delta = 8,15$ (t, 2H, -CONH- [E/Z]), 7,99 („s“ br, 1H, H-2 [E]), 7,62 („s“ br, 1H, H-2 [Z]), 7,35-7,05 (m, 15H, H-6 [Z], 4-C₆H₅ [E/Z], H-3', H-5'), 6,99-6,75 (m, 5H, H-6 [E], H-4', H-6'), 5,29-5,10 (m, 2H, H-5 [E/Z]), 4,65-4,59 (m, 2H, H-4 [E/Z]), 4,31-4,19 (m, 4H, -CH₂-), 3,72 (s, 6H, 2'-OCH₃), 2,33 („s“ br, 6H, -NCOCH₃ [E/Z]).

IR (ν): 1529, 1602 (m, $\nu_{C=C}$ arom.), 1626 (m, $\delta_{N-H, 3-CONH}$), 1675 (s, $\nu_{C=O, NCOCH_3}$), 2836-2964 (w, ν_{C-H} aliph.), 3027, 3061 (w, ν_{C-H} arom.), 3332 (w, $\nu_{N-H, 3-CONH}$) cm^{-1} .

MS (m/z (%))^{**}: 363,3 (30, [M+H]⁺), (siehe 6.2.4).

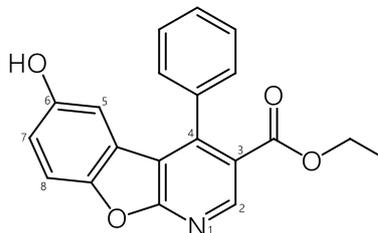
7.2.2.3 1-Aza-9-oxafluoren- sowie 10-Aza-11-oxabenzofluoren-Derivate des Carbamid- und des Ethylestertyps

Ethyl-6-hydroxy-4-phenylbenzofuro[2,3-b]pyridin-3-carboxylat

Verbindung: **22**

Summenformel: $C_{20}H_{15}NO_4$

Relative Molmasse $[M_r]$: 333,1



Darstellung nach AAV 3 (siehe 7.1):

In einem Dreihalsrundkolben wurden 600,0 mg **11** (2,20 mmol, 1,00 eq) und 289,7 mg 1,4-Benzochinon (2,70 mmol, 1,22 eq) in wenig trockenem Dioxan suspendiert. Über einen Tropftrichter fügte man 60 mL einer Mischung aus 55,7 mL trockenem Dioxan und 4,3 mL Perchlorsäure (70 %) hinzu. Es zeigte sich ein Farbumschlag von braun nach weinrot. Nach 24 h sowie alle 7 d wurde jeweils 100 mg 1,4-Benzochinon zum Reaktionsansatz ergänzt und schließlich nach 21 d, wie in AAV 3 beschrieben, aufgereinigt. Das ölige Rohprodukt wurde säulenchromatographisch (LM 3, siehe 6.2.2.1) aufgetrennt und die produktthaltige Fraktion, nach Entfernen des Lösungsmittels, aus Diethylether (bei 2-8 °C) zur Titelverbindung ausfallen gelassen.

Farbloser bis beige gefärbter Feststoff.

Schmb.: 203-205 °C (aus Et_2O); Literatur: 200-203 °C (aus Et_2O).^[132]

Ausbeute: 18,7 %.

DC-Kontrolle: LM 3: $R_f = 0,64$, LM 5: $R_f = 0,41$ (siehe 6.2.2.2).

1H -NMR (DMSO- d_6): $\delta = 9,45$ (s, 1H, 6-OH), 8,85 (s, 1H, H-2), 7,62-7,53 (m, 4H, H-8, 4-C₆H₅), 7,45-7,36 (m, 2H, 4-C₆H₅), 6,95 (dd, 1H, H-7, $^3J_{7/8} = 8,8$ Hz, $^4J_{5/7} = 2,6$ Hz), 6,26 (d, 1H, H-5, $^4J_{5/7} = 2,6$ Hz), 4,02 (q, 2H, 3-COOCH₂CH₃, $^3J_{CH_2/CH_3} = 7,1$ Hz), 0,91 (t, 3H, 3-COOCH₂CH₃, $^3J_{CH_2/CH_3} = 7,1$ Hz).

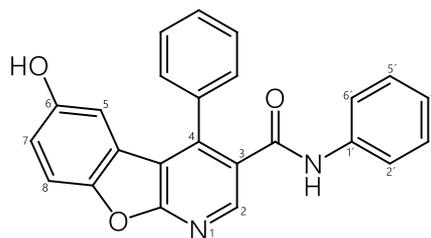
HPLC*: 99,75 % (t_R : 12,786 min), (siehe 6.2.2.4).

IR ($\tilde{\nu}$): 1592-1622 (w, $\nu_{C=C}$ arom.), 1700 (s, $\nu_{C=O}$, -COOCH₂CH₃), 2850-2977 (m, w, ν_{C-H} aliph.), 3060 (m, ν_{C-H} arom.), 3143 (m, ν_{O-H}) cm^{-1} .

MS (m/z (%))**: 334,4 (100, $[M+H]^+$), (siehe 6.2.4).

HRMS/ESI (m/z (%)): gefunden für $[M+H]^+$: 334,1076 (100), berechnet für $[C_{20}H_{16}NO_4]^+$: 334,1074.

6-Hydroxy-N,4-diphenylbenzofuro[2,3-b]pyridin-3-carboxamid

Verbindung: **23**Summenformel: $C_{24}H_{16}N_2O_3$ Relative Molmasse $[M_r]$: 380,1

Darstellung nach AAV 3 (siehe 7.1):

In einem Dreihalsrundkolben wurden 1,82 g **12** (5,72 mmol, 1,00 eq) und 739,2 mg 1,4-Benzochinon (6,98 mmol, 1,22 eq) in wenig trockenem Dioxan suspendiert. Über einen Tropftrichter fügte man 90 mL einer Mischung aus 78,6 mL trockenem Dioxan und 11,4 mL Perchlorsäure (70 %) hinzu. Es zeigte sich ein Farbumschlag von hellgelb nach weinrot. Nach 7 d wurde 100 mg 1,4-Benzochinon zum Reaktionsansatz ergänzt und schließlich nach 33 d, wie in AAV 3 beschrieben, aufgereinigt. Das ölige Rohprodukt wurde säulenchromatographisch (LM 1, siehe 6.2.2.1) aufgetrennt und die produktthaltige Fraktion, nach Entfernen des Lösungsmittels, aus Ethylacetat ausfallen gelassen (bei 2-8 °C).

Hellbeige gefärbter Feststoff.

Schmb.: 290-293°C (aus EtOAc).

Ausbeute: 3,0 %.

DC-Kontrolle: LM 3: $R_f = 0,29$, LM 1: $R_f = 0,49$ (siehe 6.2.2.2).

1H -NMR (DMSO- d_6): $\delta = 10,35$ (s, 1H, -CONH-), 9,45 (s, 1H, 6-OH), 8,62 (s, 1H, **H-2**), 7,58 (d, 1H, **H-8**, $^3J_{7/8} = 8,9$ Hz), 7,56-7,51 (m, 5H, 4- C_6H_5), 7,49-7,45 (m, 2H, **H-2'**, **H-6'**), 7,30-7,20 (m, 2H, **H-3'**, **H-5'**), 7,06-7,01 (m, 1H, **H-4'**), 6,98 (dd, 1H, **H-7**, $^3J_{7/8} = 8,9$ Hz, $^4J_{5/7} = 2,5$ Hz), 6,51 (d, 1H, **H-5**, $^4J_{5/7} = 2,5$ Hz).

HPLC*: 99,84 % (t_R : 12,130 min), (siehe 6.2.2.4).

IR (ν): 1490, 1597 (w, m, $\nu_{C=C}$ arom.), 1533 (s, $\delta_{N-H, 3-CONH}$), 1673 (m, $\nu_{C=O, 3-CONH}$), 3060 (m, ν_{C-H} arom.), 3351 (w, $\nu_{N-H, 3-CONH}$) cm^{-1} .

MS (m/z (%))*: 783,18 (90, $[2 \times M + Na]^+$), 381,72 (55, $[M + H]^+$), 759,07 (20, $[2 \times M]^-$), 379,54 (100, $[M]^-$), (siehe 6.2.4).

HRMS/ESI (m/z (%)): gefunden für $[M + H]^+$: 381,1232 (100), berechnet für $[C_{24}H_{17}N_2O_3]^+$: 381,1234.

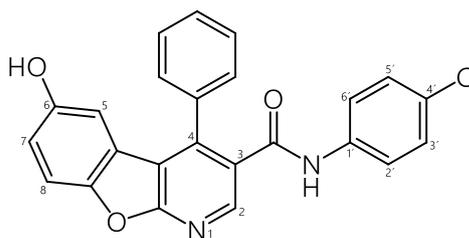
Synthese der Verbindungen

N-(4-Chlorphenyl)-6-hydroxy-4-phenylbenzofuro[2,3-b]pyridin-3-carboxamid

Verbindung: **24**

Summenformel: $C_{24}H_{15}ClN_2O_3$

Relative Molmasse $[M_r]$: 414,1



Darstellung nach AAV 3 (siehe 7.1):

In einem Dreihalsrundkolben wurden 300,0 mg **13** (0,85 mmol, 1,00 eq) und 112,1 mg 1,4-Benzochinon (1,04 mmol, 1,22 eq) in wenig trockenem Dioxan suspendiert. Über einen Tropftrichter fügte man 23 mL einer Mischung aus 21,3 mL trockenem Dioxan und 1,7 mL Perchlorsäure (70 %) hinzu. Es zeigte sich ein Farbumschlag von braun nach weinrot. Nach 24 h sowie alle 7 d wurde jeweils 100 mg 1,4-Benzochinon zum Reaktionsansatz ergänzt und schließlich nach 22 d, wie in AAV 3 beschrieben, aufgereinigt. Das ölige Rohprodukt wurde säulenchromatographisch (LM 1, siehe 6.2.2.1) aufgetrennt und die produktthaltige Fraktion, nach Entfernen des Lösungsmittels, aus Methanol (bei -20 °C) zur Titelverbindung ausfallen gelassen.

Beige gefärbter Feststoff.

Schmb.: 270-272 °C (aus MeOH).

Ausbeute: 15,0 %.

DC-Kontrolle: LM 1: $R_f = 0,45$, LM 3: $R_f = 0,23$ (siehe 6.2.2.2).

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6): $\delta = 10,49$ (s, 1H, -CONH-), 9,43 (s, 1H, 6-OH), 8,63 (s, 1H, **H-2**), 7,58 (d, 1H, **H-8**, $^3J_{7/8} = 8,9$ Hz), 7,55-7,48 (m, 7H, 4-C₆H₅, **H-2'**, **H-6'**), 7,31 (AA'BB', 2H, **H-3'**, **H-5'**), 6,96 (dd, 1H, **H-7**, $^3J_{7/8} = 8,9$ Hz, $^4J_{5/7} = 2,6$ Hz), 6,48 (d, 1H, **H-5**, $^4J_{5/7} = 2,6$ Hz).

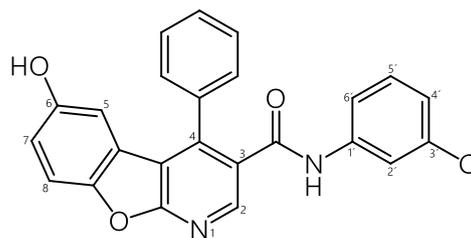
HPLC*: 96,60 % (t_R : 13,013 min), (siehe 6.2.2.4).

IR ($\tilde{\nu}$): 1527, 1593 (m, $\nu_{C=C \text{ arom.}}$), 1623 (m, $\delta_{N-H, 3-CONH}$), 1684 (w, $\nu_{C=O, 3-CONH}$), 3066 (w, $\nu_{C-H \text{ arom.}}$), 3324 (w, ν_{O-H}), 3380 (w, $\nu_{N-H, 3-CONH}$) cm^{-1} .

MS (m/z (%))*: 850,92 (28, $[2 \times M + Na]^+$), 413,33 (100, $[M]^+$), 415,28 (35, $[M]^+$), (siehe 6.2.4).

HRMS/ESI (m/z (%)): gefunden für $[M+H]^+$: 415,0845 (100), berechnet für $[C_{24}H_{16}ClN_2O_3]^+$: 415,0844.

N-(3-Chlorphenyl)-6-hydroxy-4-phenylbenzofuro[2,3-b]pyridin-3-carboxamid

Verbindung: **25**Summenformel: C₂₄H₁₅ClN₂O₃Relative Molmasse [M_r]: 414,1

Darstellung nach AAV 3 (siehe 7.1):

In einem Dreihalsrundkolben wurden 300,0 mg **14** (0,85 mmol, 1,00 eq) und 112,1 mg 1,4-Benzochinon (1,04 mmol, 1,22 eq) in wenig trockenem Dioxan suspendiert. Über einen Tropftrichter fügte man 23 mL einer Mischung aus 21,3 mL trockenem Dioxan und 1,7 mL Perchlorsäure (70 %) hinzu. Es zeigte sich ein Farbumschlag von braun nach weinrot. Nach 24 h sowie alle 7 d wurde 100 mg 1,4-Benzochinon zum Reaktionsansatz ergänzt und schließlich nach 22 d, wie in AAV 3 beschrieben, aufgereinigt. Das ölige Rohprodukt wurde säulenchromatographisch (LM 1, siehe 6.2.2.1) aufgetrennt und die produktthaltige Fraktion, nach Entfernen des Lösungsmittels, aus Ethylacetat (bei 2-8 °C) zur Titelverbindung ausfallen gelassen.

Beige gefärbter Feststoff.

Schmb.: 249-252 °C (aus EtOAc).

Ausbeute: 8,8 %.

DC-Kontrolle: LM 3: R_f = 0,52, LM 8: R_f = 0,46 (siehe 6.2.2.2).

¹H-NMR (DMSO-*d*₆): δ = 10,58 (s, 1H, -CONH-), 9,45 (s, 1H, 6-OH), 8,66 (s, 1H, **H-2**), 7,67 (d, 1H, **H-2'**, ⁴J_{2'/4', 2'/6'} = 2,0 Hz), 7,61-7,51 (m, 6H, **H-8**, 4-C₆H₅), 7,40-7,34 (m, 1H, **H-6'**), 7,29 (t, 1H, **H-5'**, ³J_{5'/6', 4'/5'} = 8,0 Hz), 7,10 (ddd, 1H, **H-4'**, ³J_{4'/5'} = 8,0 Hz, ⁴J_{2'/4'} = 2,0 Hz, ⁴J_{4'/6'} = 1,0 Hz), 6,97 (dd, 1H, **H-7**, ³J_{7/8} = 7,2 Hz, ⁴J_{5/7} = 2,0 Hz), 6,50 (d, 1H, **H-5**, ⁴J_{5/7} = 2,0 Hz).

HPLC*: 99,65 % (t_R: 12,906 min), (siehe 6.2.2.4).

IR (ν̄): 1482, 1591 (*m, s*, ν_{C=C arom.}), 1532 (*w*, δ_{N-H, 3-CONH}), 1683 (*w*, ν_{C=O, 3-CONH}), 3064 (*w*, ν_{C-H arom.}), 3315 (*m*, ν_{N-H, 3-CONH}) cm⁻¹.

MS (*m/z* (%))*: 851,04 (100, [2×M+Na]⁺), 828,16 (15, [2×M]⁻), 413,57 (100, [M]⁻), (siehe 6.2.4).

HRMS/ESI (*m/z* (%)): gefunden für [M+H]⁺: 415,0844 (100), berechnet für [C₂₄H₁₆ClN₂O₃]⁺: 415,0844.

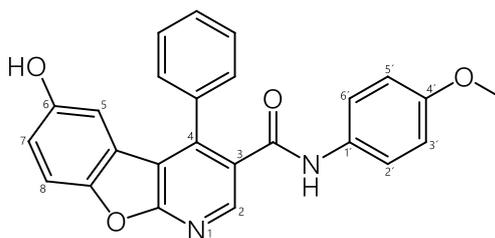
Synthese der Verbindungen

6-Hydroxy-N-(4-methoxyphenyl)-4-phenylbenzofuro[2,3-b]pyridin-3-carboxamid

Verbindung: **26**

Summenformel: $C_{25}H_{18}N_2O_4$

Relative Molmasse $[M_r]$: 410,1



Darstellung nach AAV 3 (siehe 7.1):

In einem Dreihalsrundkolben wurden 473,0 mg **15** (1,15 mmol, 1,00 eq) und 149,1 mg 1,4-Benzochinon (1,38 mmol, 1,22 eq) in wenig trockenem Dioxan suspendiert. Über einen Tropftrichter fügte man 31 mL einer Mischung aus 28,8 mL trockenem Dioxan und 2,2 mL Perchlorsäure (70 %) hinzu. Es zeigte sich ein Farbumschlag von gelb nach weinrot. Nach 24 h sowie alle 7 d wurde jeweils 100 mg 1,4-Benzochinon zum Reaktionsansatz ergänzt und schließlich nach 21 d, wie in AAV 3 beschrieben, aufgereinigt. Das ölige Rohprodukt wurde säulenchromatographisch (LM 1, siehe 6.2.2.1) aufgetrennt und die produktthaltige Fraktion, nach Entfernen des Lösungsmittels, aus Methanol (bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$) zur Titelverbindung ausfallen gelassen.

Beige gefärbter Feststoff.

Schmb.: $251\text{--}253\text{ }^{\circ}\text{C}$ (aus MeOH).

Ausbeute: 2,7 %.

DC-Kontrolle: LM 1: $R_f = 0,37$; LM 8: $R_f = 0,65$ (siehe 6.2.2.2).

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6): $\delta = 10,33$ (s, 1H, -CONH-), 9,45 (s, 1H, 6-OH), 8,62 (s, 1H, **H-2**), 7,60-7,50 (m, 6H, **H-8**, 4- C_6H_5), 7,36 (AA'BB', 2H, **H-2'**, **H-6'**), 6,97 (dd, 1H, **H-7**, $^3J_{7/8} = 7,2\text{ Hz}$, $^4J_{5/7} = 2,0\text{ Hz}$), 6,82 (AA'BB', 2H, **H-3'**, **H-5'**), 6,49 (d, 1H, **H-5**, $^4J_{5/7} = 2,0\text{ Hz}$), 3,68 (s, 3H, 4'-OCH₃).

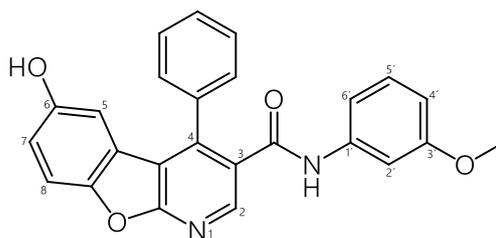
HPLC*: 99,74 % (t_R : 12,310 min), (siehe 6.2.2.4).

IR ($\tilde{\nu}$): 1511, 1531, 1598 (s, w, $\nu_{\text{C}=\text{C}} \text{ arom.}$), 1655 (m, $\delta_{\text{N-H}, 3\text{-CONH}}$), 1676 (s, $\nu_{\text{C}=\text{O}, 3\text{-CONH}}$), 2836, 2957 (w, $\nu_{\text{C-H}} \text{ aliph.}$), 3066 (w, $\nu_{\text{C-H}} \text{ arom.}$), 3360 (w, $\nu_{\text{O-H}}$) cm^{-1} .

MS (m/z (%))*: 843,15 (100, $[2 \times \text{M} + \text{Na}]^+$), 819,17 (20, $[2 \times \text{M}]^+$), 409,63 (100, $[\text{M}]^+$), (siehe 6.2.4).

HRMS/ESI (m/z (%)): gefunden für $[\text{M} + \text{H}]^+$: 411,1339 (100), berechnet für $[\text{C}_{25}\text{H}_{19}\text{N}_2\text{O}_4]^+$: 411,1339.

6-Hydroxy-N-(3-methoxyphenyl)-4-phenylbenzofuro[2,3-b]pyridin-3-carboxamid

Verbindung: **27**Summenformel: $C_{25}H_{18}N_2O_4$ Relative Molmasse $[M_r]$: 410,1

Darstellung nach AAV 3 (siehe 7.1):

In einem Dreihalsrundkolben wurden 473,0 mg **16** (1,15 mmol, 1,00 eq) und 149,1 mg 1,4-Benzochinon (1,38 mmol, 1,22 eq) in wenig trockenem Dioxan suspendiert. Über einen Tropftrichter fügte man 31 mL einer Mischung aus 28,8 mL trockenem Dioxan und 2,2 mL Perchlorsäure (70 %) hinzu. Es zeigte sich ein Farbumschlag von gelb nach weinrot. Nach 24 h sowie alle 7 d wurde jeweils 100 mg 1,4-Benzochinon zum Reaktionsansatz ergänzt und schließlich nach 21 d, wie in AAV 3 beschrieben, aufgereinigt. Das ölige Rohprodukt wurde säulenchromatographisch (LM 1, siehe 6.2.2.1) aufgetrennt und die produktthaltige Fraktion, nach Entfernen des Lösungsmittels, aus Diethylether (bei 2-8 °C) zur Titelverbindung ausfallen gelassen.

Beige gefärbter Feststoff.

Schmb.: 291-294 °C (aus Et_2O).

Ausbeute: 2,8 %.

DC-Kontrolle: LM 8: $R_f = 0,37$, LM 6: $R_f = 0,65$ (siehe 6.2.2.2).

1H -NMR (DMSO- d_6): $\delta = 10,33$ (s, 1H, -CONH-), 9,45 (s, 1H, 6-OH), 8,62 (s, 1H, **H-2**), 7,64-7,48 (m, 6H, **H-8**, 4- C_6H_5), 7,20-7,11 (m, 2H, **H-2'**, **H-6'**), 7,03 (d, 1H, **H-5'**, $^3J_{5'/6'} = 8,2$ Hz), 6,97 (dd, 1H, **H-7**, $^3J_{7/8} = 8,9$ Hz, $^4J_{5/7} = 2,6$ Hz), 6,66-6,58 (m, 1H, **H-4'**), 6,49 (d, 1H, **H-5**, $^4J_{5/7} = 2,6$ Hz), 3,68 (s, 3H, 3'-OCH₃).

IR (ν): 1492, 1609 (m, s, $\nu_{C=C arom.}$), 1541 (w, $\delta_{N-H, 3-CONH}$), 1681 (w, $\nu_{C=O, 3-CONH}$), 3060 (w, $\nu_{C-H arom.}$), 3351 (w, $\nu_{N-H, 3-CONH}$), 3445 (w, ν_{OH}) cm^{-1} .

HPLC*: 99,51 % (t_R : 12,150 min), (siehe 6.2.2.4).MS (m/z (%))*: 843,15 (100, $[2 \times M + Na]^+$), 819,23 (30, $[2 \times M]^-$), 409,65 (100, $[M]^-$), (siehe 6.2.4).HRMS/ESI (m/z (%)): gefunden für $[M+H]^+$: 411,1338 (100), berechnet für $[C_{25}H_{19}N_2O_4]^+$: 411,1339.

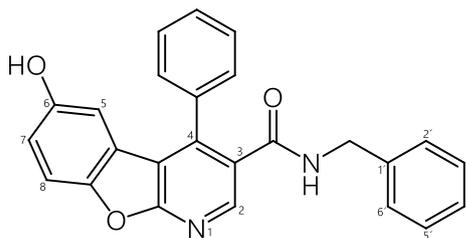
Synthese der Verbindungen

N-Benzyl-6-hydroxy-4-phenylbenzofuro[2,3-b]pyridin-3-carboxamid

Verbindung: **28**

Summenformel: C₂₅H₁₈N₂O₃

Relative Molmasse [M_r]: 394,1



Darstellung nach AAV 3 (siehe 7.1):

In einem Dreihalsrundkolben wurden 1,40 g **17** (4,21 mmol, 1,00 eq) und 547,0 mg 1,4-Benzochinon (5,06 mmol, 1,22 eq) in wenig trockenem Dioxan suspendiert. Über einen Tropftrichter fügte man 80 mL einer Mischung aus 71,8 mL trockenem Dioxan und 8,2 mL Perchlorsäure (70 %) hinzu. Es zeigte sich ein Farbumschlag von gelb nach rot. Nach 39 d konnte der Ansatz, wie in AAV 3 beschrieben, aufgereinigt werden. Das ölige Rohprodukt wurde säulenchromatographisch (LM 3, siehe 6.2.2.1) aufgetrennt und die produktthaltige Fraktion, nach Entfernen des Lösungsmittels, aus Ethylacetat zur Titelverbindung (bei 2-8 °C) innerhalb von 14 d ausfallen gelassen.

Braun gefärbter, plättchenartiger Feststoff.

Schmb.: 210-212 °C (aus EtOAc).

Ausbeute: 3,7 %.

DC-Kontrolle: LM 1: R_f = 0,37 (siehe 6.2.2.2).

¹H-NMR (DMSO-*d*₆): δ = 9,42 (s, 1H, 6-OH), 8,81 (t, 1H, -CONH-, ³J_{NH/CH₂} = 5,9 Hz), 8,49 (s, 1H, **H-2**), 7,64-7,51 (m, 4H, **H-8**, 4-C₆H₅), 7,51-7,43 (m, 2H, **H-3'**, **H-5'**), 7,26-7,14 (m, 3H, **H-2'**, **H-4'**, **H-6'**), 7,00-6,91 (m, 3H, **H-7**, 4-C₆H₅), 6,45 (d, 1H, **H-5**, ⁴J_{5/7} = 2,6 Hz), 4,29 (d, 2H, -CH₂-, ³J_{NH/CH₂} = 5,9 Hz).

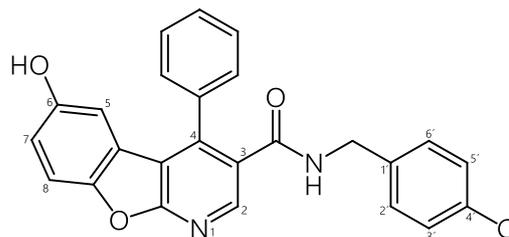
HPLC*: 99,26 % (t_R: 13,551 min), (siehe 6.2.2.4).

IR (ν̄): 1529, 1578, 1591 (m, ν_{C=C arom.}), 1629 (s, ν_{C=O, 3-CONH}), 2880, 2932, 3036 (w, ν_{C-H aliph.}), 3198 (m, ν_{C-H arom.}), 3405 (m, ν_{O-H}) cm⁻¹.

MS (m/z (%))*: 811,28 (100, [2×M+Na]⁺), 417,75 (55, [M+Na]⁺), 787,13 (15, [2×M]⁺), 393,45 (100, [M]⁺), (siehe 6.2.4).

HRMS/ESI (m/z (%)): gefunden für [M+H]⁺: 395,1383 (100), berechnet für [C₂₅H₁₉N₂O₃]⁺: 395,1390.

N-(4-Chlorobenzyl)-6-hydroxy-4-phenylbenzofuro[2,3-b]pyridin-3-carboxamid

Verbindung: **29**Summenformel: $C_{25}H_{17}ClN_2O_3$ Relative Molmasse $[M_r]$: 428,1

Darstellung:

In einem Rundkolben wurden 50,0 mg **22** (0,15 mmol, 1,00 eq) in wenig Methanol gelöst. Über einen Tropftrichter fügte man 20 mL einer 40 %-igen (V/V) methanolischen 4-Chlorobenzylamin-Lösung (8,00 mL, 9,28 g, 21,70 mmol, 144,50 eq) hinzu und ließ den Ansatz, unter sporadischem Umschwenken, im Kühlschrank für 1,25 y ruhen.

Anschließend erfolgte eine basisch wässrige Extraktion mit Chloroform. Das Rohprodukt wurde folglich säulenchromatographisch mit LM 3 (siehe 6.2.2.1) aufgereinigt und als transparentes Öl gewonnen. Man ergänzte in gleicher Menge wenige Tropfen Ethylacetat und Cyclohexan. Es fiel über Nacht (bei 2-8 °C) ein farbloses Pulver aus, das, nach zweimaligem Waschen mit Ethylacetat, im Exsikkator getrocknet wurde.

Farbloser Feststoff.

Schmb.: 218-220 °C (aus EtOAc).

Ausbeute: 10,1 %.

DC-Kontrolle: LM 3: $R_f = 0,30$, LM 1: $R_f = 0,28$ (siehe 6.2.2.2).

1H -NMR (DMSO- d_6): $\delta = 9,42$ (s, 1H, 6-OH), 8,83 (t, 1H, -CONH-, $^3J_{NH/CH_2} = 5,9$ Hz), 8,49 (s, 1H, **H-2**), 7,65-7,51 (m, 4H, **H-8**, 4- C_6H_5), 7,48-7,43 (m, 2H, 4- C_6H_5), 7,25 (AA'BB', 2H, **H-3'**, **H-5'**), 6,99-6,90 (m, 3H, **H-7**, **H-2'**, **H-6'**), 6,44 (d, 1H, **H-5**, $^4J_{5/7} = 2,6$ Hz), 4,27 (d, 2H, -CH₂-, $^3J_{NH/CH_2} = 5,9$ Hz).

HPLC**: 99,99 % (t_R : 3,258 min), (Methode A, siehe 6.2.2.4).

IR (ν): 1529, 1591 (m, $\nu_{C=C arom.}$), 1607 (m, $\delta_{N-H, 3-CONH}$), 1666 (s, $\nu_{C=O, 3-CONH}$), 2925 (w, $\nu_{C-H aliph.}$), 3057 (m, $\nu_{C-H arom.}$), 3330 (m, ν_{O-H}) cm^{-1} .

MS (m/z (%))*: 855,24 (30, $[2 \times M]^+$), 427,49 (100, $[M]^+$), (siehe 6.2.4).

HRMS/ESI (m/z (%)): gefunden für $[M+H]^+$: 429,0999 (100), berechnet für $[C_{25}H_{18}ClN_2O_3]^+$: 429,1000.

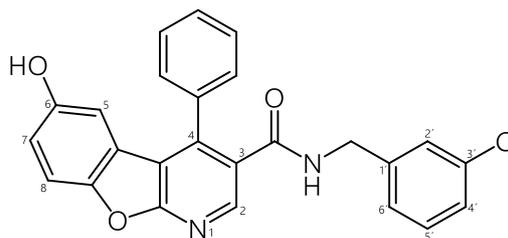
Synthese der Verbindungen

N-(3-Chlorobenzyl)-6-hydroxy-4-phenylbenzofuro[2,3-b]pyridin-3-carboxamid

Verbindung: **30**

Summenformel: $C_{25}H_{17}ClN_2O_3$

Relative Molmasse $[M_r]: 428,1$



Darstellung:

In einem Rundkolben wurden 50,0 mg **22** (0,15 mmol, 1,00 eq) in wenig Methanol gelöst. Über einen Tropftrichter fügte man 20 mL einer 40%-igen (V/V) methanolischen 3-Chlorobenzylamin-Lösung (8,00 mL, 9,28 g, 21,70 mmol, 144,50 eq) hinzu und ließ den Ansatz, unter sporadischem Umschwenken, im Kühlschrank für 1,25 y ruhen.

Anschließend erfolgte eine basisch wässrige Extraktion mit Chloroform. Das Rohprodukt wurde folglich säulenchromatographisch mit LM 3 (siehe 6.2.2.1) aufgereinigt und als transparentes Öl gewonnen. Man ergänzte in gleicher Menge wenige Tropfen Ethylacetat und Cyclohexan. Es fiel über Nacht (bei 2-8 °C) ein farbloses Pulver aus, das, nach zweimaligem Waschen mit Ethylacetat, im Exsikkator getrocknet wurde.

Farblos bis hellbraun gefärbter Feststoff.

Schmb.: 177-178 °C (aus EtOAc).

Ausbeute: 10,9 %.

DC-Kontrolle: LM 3: $R_f = 0,30$, LM 1: $R_f = 0,28$ (siehe 6.2.2.2).

1H -NMR (DMSO- d_6): $\delta = 9,42$ (s, 1H, 6-OH), 8,85 (t, 1H, -CONH-, $^3J_{NH/CH_2} = 6,0$ Hz), 8,50 (s, 1H, **H-2**), 7,61-7,41 (m, 6H, **H-8**, 4- C_6H_5), 7,31-7,20 (m, 2H, **H-4'**, **H-5'**), 7,11 (d, 1H, **H-2'**, $^3J_{2'/4'}, 2'/6'} = 2,1$ Hz), 6,99-6,87 (m, 2H, **H-7**, **H-6'**), 6,44 (d, 1H, **H-5**, $^4J_{5/7} = 2,6$ Hz), 4,29 (d, 2H, - CH_2 -, $^3J_{NH/CH_2} = 6,0$ Hz).

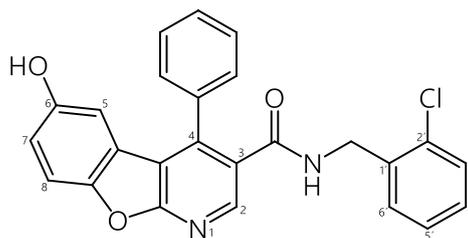
HPLC**: 99,80 % (t_R : 3,300 min), (Methode A, siehe 6.2.2.4).

IR (ν): 1520, 1575, 1591 (s, m, $\nu_{C=C arom.}$), 1627 (m, $\delta_{N-H, 3-CONH}$), 1668 (s, $\nu_{C=O, 3-CONH}$), 2926 (w, $\nu_{C-H aliph.}$), 3057 (w, $\nu_{C-H arom.}$), 3352 (w, ν_{O-H}) cm^{-1} .

MS (m/z (%))*: 879,11 (100, $[2 \times M + Na]^+$), 881,09 (70, $[2 \times M + Na]^+$), 451,32 (30, $[M + Na]^+$), 855,04 (25, $[2 \times M]^+$), 857,03 (15, $[2 \times M]^+$), 427,38 (100, $[M]^+$), 429,35 (35, $[M]^+$), (siehe 6.2.4).

HRMS/ESI (m/z (%)): gefunden für $[M+H]^+$: 429,0997 (100), berechnet für $[C_{25}H_{18}ClN_2O_3]^+$: 429,1000.

N-(2-Chlorobenzyl)-6-hydroxy-4-phenylbenzofuro[2,3-b]pyridin-3-carboxamid

Verbindung: **31**Summenformel: $C_{25}H_{17}ClN_2O_3$ Relative Molmasse $[M_r]$: 428,1

Darstellung nach AAV 3 (siehe 7.1):

In einem Dreihalsrundkolben wurden 1,06 g **19** (2,90 mmol, 1,00 eq) und 375,3 mg 1,4-Benzochinon (3,47 mmol, 1,22 eq) in wenig trockenem Dioxan suspendiert. Über einen Tropftrichter fügte man 80 mL einer Mischung aus 74,2 mL trockenem Dioxan und 5,8 mL Perchlorsäure (70 %) hinzu. Es zeigte sich ein Farbumschlag von gelb nach weinrot. Nach 7 d wurde 100 mg 1,4-Benzochinon zum Reaktionsansatz ergänzt und schließlich nach 25 d, wie in AAV 3 beschrieben, aufgereinigt. Das ölige Rohprodukt wurde säulenchromatographisch (LM 1, siehe 6.2.2.1) aufgetrennt und die produktthaltige Fraktion, nach Entfernen des Lösungsmittels, aus Ethylacetat (bei 2-8 °C) zur Titelverbindung ausfallen gelassen.

Farbloser Feststoff.

Schmb.: 230-233 °C (aus EtOAc).

Ausbeute: 6,1 %.

DC-Kontrolle: LM 3: $R_f = 0,16$, LM 1: $R_f = 0,38$ (siehe 6.2.2.2).

1H -NMR (DMSO- d_6): $\delta = 9,43$ (s, 1H, 6-OH), 8,85 (t, 1H, -CONH-, $^3J_{NH/CH_2} = 5,8$ Hz), 8,54 (s, 1H, **H-2**), 7,64-7,45 (m, 6H, **H-8**, 4- C_6H_5), 7,38 (dd, 1H, **H-3'**, $^3J_{3'/4'} = 7,7$ Hz, $^4J_{3'/5'} = 1,3$ Hz), 7,24 (td, 1H, **H-4'**, $^3J_{3'/4'} = 7,7$ Hz, $^4J_{4'/6'} = 1,7$ Hz), 7,15 (td, 1H, **H-5'**, $^3J_{4'/5'} = 7,7$ Hz, $^4J_{3'/5'} = 1,3$ Hz), 6,96 (dd, 1H, **H-7**, $^3J_{7/8} = 8,9$ Hz, $^4J_{5/7} = 2,5$ Hz), 6,78 (dd, 1H, **H-6'**, $^3J_{5'/6'} = 7,7$ Hz, $^4J_{4'/6'} = 1,7$ Hz), 6,44 (d, 1H, **H-5**, $^4J_{5/7} = 2,5$ Hz), 4,35 (d, 2H, -CH $_2$ -, $^3J_{NH/CH_2} = 5,8$ Hz).

HPLC*: 100,00 % (t_R : 12,885 min), (siehe 6.2.2.4).

IR (ν): 1504, 1588 (s, w, $\nu_{C=C arom.}$), 1661 (s, $\nu_{C=O, 3-CONH}$), 3060 (w, $\nu_{C-H arom.}$), 3437 (m, $\nu_{N-H, 3-CONH}$) cm^{-1} .

MS (m/z (%))*: 878,98 (100, $[2 \times M + Na]^+$), 451,54 (32, $[M + Na]^+$), 855,19 (45, $[2 \times M]^-$), 427,65 (100, $[M]^-$), (siehe 6.2.4).

HRMS/ESI (m/z (%)): gefunden für $[M+H]^+$: 429,0990 (100), berechnet für $[C_{25}H_{18}ClN_2O_3]^+$: 429,1000; gefunden für $[M+H]^+$: 431,0961 (35), berechnet für $[C_{25}H_{18}ClN_2O_3]^+$: 431,0971.

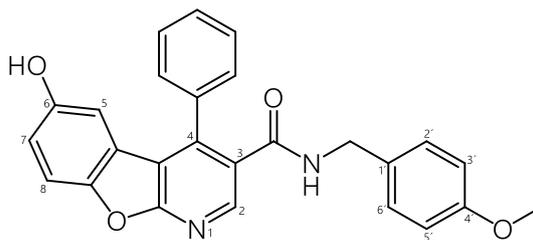
Synthese der Verbindungen

6-Hydroxy-N-(4-methoxybenzyl)-4-phenylbenzofuro[2,3-b]pyridin-3-carboxamid

Verbindung: **32**

Summenformel: $C_{26}H_{20}N_2O_4$

Relative Molmasse $[M_r]: 424,1$



Darstellung AAV 3 (siehe 7.1):

In einem Dreihalsrundkolben wurden 1,06 g **20** (2,93 mmol, 1,00 eq) und 386,8 mg 1,4-Benzochinon (3,58 mmol, 1,22 eq) in wenig trockenem Dioxan suspendiert. Über einen Tropftrichter fügte man 79 mL einer Mischung aus 73,2 mL trockenem Dioxan und 5,8 mL Perchlorsäure (70 %) hinzu. Es zeigte sich ein Farbumschlag von gelb nach weinrot. Nach 24 h sowie alle 7 d wurde jeweils 100 mg 1,4-Benzochinon zum Reaktionsansatz ergänzt und schließlich nach 50 d, wie in AAV 3 beschrieben, aufgereinigt. Das ölige Rohprodukt wurde säulenchromatographisch (LM 2, siehe 6.2.2.1) aufgetrennt und die produktthaltige Fraktion, nach Entfernen des Lösungsmittels, aus Methanol (bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$) zur Titelverbindung ausfallen gelassen.

Hellbraun gefärbter Feststoff.

Schmb.: $310\text{--}313\text{ }^{\circ}\text{C}$ (aus MeOH).

Ausbeute: 2,0 %.

DC-Kontrolle: LM 2: $R_f = 0,20$, LM 1: $R_f = 0,36$ (siehe 6.2.2.2).

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6): $\delta = 9,41$ (s, 1H, 6-OH), $8,72$ (t, 1H, -CONH-, $^3J_{\text{NH}/\text{CH}_2} = 5,8$ Hz), $8,46$ (s, 1H, H-2), $7,62\text{--}7,53$ (m, 4H, H-8, 4-C₆H₅), $7,50\text{--}7,42$ (m, 2H, 4-C₆H₅), $6,96$ (dd, 1H, H-7, $^3J_{7/8} = 8,9$ Hz, $^4J_{5/7} = 2,5$ Hz), $6,88$ (AA'BB', 2H, H-2', H-6'), $6,78$ (AA'BB', 2H, H-3', H-5'), $6,45$ (d, 1H, H-5, $^4J_{5/7} = 2,5$ Hz), $4,21$ (d, 2H, -CH₂-, $^3J_{\text{NH}/\text{CH}_2} = 5,8$ Hz), $3,72$ (s, 3H, 4'-OCH₃).

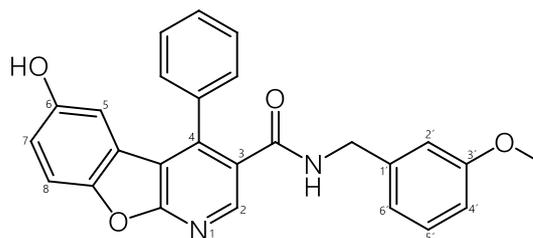
HPLC*: 98,07 % (t_R : 12,363 min), (siehe 6.2.2.4).

IR (ν): 1512, 1586 (m, s, $\nu_{\text{C}=\text{C}}$ arom.), 1548 (w, $\delta_{\text{N-H}, 3\text{-CONH}}$), 1638 (w, $\nu_{\text{C}=\text{O}, 3\text{-CONH}}$), 2835-2954 (w, m, $\nu_{\text{C-H}}$ aliph.), 3058 (w, $\nu_{\text{C-H}}$ arom.), 3257 (m, $\nu_{\text{N-H}, 3\text{-CONH}}$) cm^{-1} .

MS (m/z (%))*: 871,11 (100, $[2 \times \text{M} + \text{Na}]^+$), 447,77 (45, $[\text{M} + \text{Na}]^+$), 847,33 (30, $[2 \times \text{M}]^+$), 423,68 (100, $[\text{M}]^+$), (siehe 6.2.4).

HRMS/ESI (m/z (%)): gefunden für $[\text{M} + \text{H}]^+$: 425,1489 (100), berechnet für $[\text{C}_{26}\text{H}_{21}\text{N}_2\text{O}_4]^+$: 425,1496.

6-Hydroxy-N-(3-methoxybenzyl)-4-phenylbenzofuro[2,3-b]pyridin-3-carboxamid

Verbindung: **33**Summenformel: $C_{26}H_{20}N_2O_4$ Relative Molmasse $[M_r]$: 424,1

Darstellung:

In einem Rundkolben wurden 50,0 mg **22** (0,15 mmol, 1,00 eq) in wenig Methanol gelöst. Über einen Tropftrichter fügte man 20 mL einer 40%-igen (V/V) methanolischen 3-Methoxybenzylamin-Lösung (8,00 mL, 8,58 g, 20,3 mmol, 135,30 eq) hinzu und ließ den Ansatz, unter sporadischem Umschwenken, im Kühlschrank für 1,25 y ruhen.

Anschließend erfolgte eine basisch wässrige Extraktion mit Chloroform. Das Rohprodukt wurde folglich säulenchromatographisch mit LM 3 (siehe 6.2.2.1) aufgereinigt und als transparentes Öl gewonnen. Man ergänzte in gleicher Menge wenige Tropfen Ethylacetat und Cyclohexan. Es fiel über Nacht, bei 2-8 °C, ein farbloses Pulver aus, das nach zweimaligem Waschen mit Ethylacetat im Exsikkator getrocknet wurde.

Farbloser Feststoff.

Schmb.: 198-201 °C (aus EtOAc).

Ausbeute: 19,0 %.

DC-Kontrolle: LM 3: $R_f = 0,30$ (siehe 6.2.2.2).

1H -NMR (DMSO- d_6): $\delta = 9,42$ (s, 1H, 6-OH), 8,81 (t, 1H, -CONH-, $^3J_{NH/CH_2} = 6,0$ Hz), 8,49 (s, 1H, **H-2**), 7,60-7,42 (m, 6H, **H-8**, 4- C_6H_5), 7,13 (t, 1H, **H-5'**, $^3J_{4'/5', 4'/6'} = 7,9$ Hz), 6,95 (dd, 1H, **H-7**, $^3J_{7/8} = 8,9$ Hz, $^4J_{5/7} = 2,6$ Hz), 6,77 (ddd, 1H, **H-6'**, $^3J_{5'/6'} = 7,9$ Hz, $^4J_{4'/6'} = 2,5$ Hz, $^4J_{2'/6'} = 1,0$ Hz), 6,71 (t, 1H, **H-2'**, $^3J_{2'/4'} = 2,5$ Hz), 6,52 (dt, 1H, **H-4'**, $^3J_{4'/5'} = 7,9$ Hz, $^4J_{2'/4', 4'/6'} = 2,5$ Hz), 6,45 (d, 1H, **H-5**, $^4J_{5/7} = 2,5$ Hz), 4,26 (d, 2H, - CH_2 -, $^3J_{NH/CH_2} = 6,0$ Hz), 3,71 (s, 3H, 3'- OCH_3).

HPLC**: 99,80 % (t_R : 1,892 min), (Methode A, siehe 6.2.2.4).

IR (ν): 1536, 1586, 1594 (s, $\nu_{C=C \text{ arom.}}$), 1603 (m, $\delta_{N-H, 3-CONH}$), 1636 (s, $\nu_{C=O, 3-CONH}$), 2966, 3003 (m, $\nu_{C-H \text{ aliph.}}$), 3072 (m, $\nu_{C-H \text{ arom.}}$), 3390 (m, ν_{O-H}) cm^{-1} .

MS (m/z (%))*: 871,20 (100, $[2 \times M + Na]^+$), 447,48 (35, $[M + Na]^+$), 847,15 (20, $[2 \times M]^-$), 423,45 (100, $[M]^-$), (siehe 6.2.4).

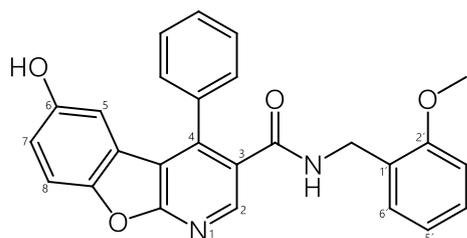
HRMS/ESI (m/z (%)): gefunden für $[M+H]^+$: 425,1489 (100), berechnet für $[C_{26}H_{21}N_2O_4]^+$: 425,1496.

6-Hydroxy-N-(2-methoxybenzyl)-4-phenylbenzofuro[2,3-b]pyridin-3-carboxamid

Verbindung: **34**

Summenformel: $C_{26}H_{20}N_2O_4$

Relative Molmasse $[M_r]: 424,1$



Darstellung nach AAV 3 (siehe 7.1):

In einem Dreihalsrundkolben wurden 1,03 g **21** (2,84 mmol, 1,00 eq) und 367,3 mg 1,4-Benzochinon (3,40 mmol, 1,22 eq) in wenig trockenem Dioxan suspendiert. Über einen Tropftrichter fügte man 80 mL einer Mischung aus 74,3 mL trockenem Dioxan und 5,7 mL Perchlorsäure (70 %) hinzu. Es zeigte sich ein Farbumschlag von gelb nach braunrot. Nach 7 d wurde 100 mg 1,4-Benzochinon zum Reaktionsansatz ergänzt und schließlich nach 48 d, wie in AAV 3 beschrieben, aufgereinigt. Das ölige Rohprodukt wurde säulenchromatographisch (LM 4, nach 101 Tubes Wechsel zu LM 2, siehe 6.2.2.1) aufgetrennt sowie die produktthaltige Fraktion, nach Entfernen des Lösungsmittels, in Ethylacetat gelöst und mit Cyclohexan versetzt. Die Titelverbindung fiel bei 2-8 °C aus und wurde final zweimal mit Aceton, Ethylacetat, Methanol und DCM gewaschen.

Farbloser Feststoff.

Schmb.: 253-255 °C (aus EtOAc).

Ausbeute: 5,2 %.

DC-Kontrolle: LM 3: $R_f = 0,28$, LM 4: $R_f = 0,20$, LM 1: $R_f = 0,46$ (siehe 6.2.2.2).

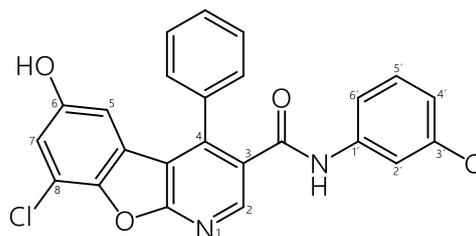
1H -NMR (DMSO- d_6): $\delta = 9,42$ (s, 1H, 6-OH), 8,60 (t, 1H, -CONH-, $^3J_{NH/CH_2} = 5,8$ Hz), 8,50 (s, 1H, **H-2**), 7,63-7,44 (m, 6H, **H-8**, 4-C₆H₅), 7,18 (td, 1H, **H-5'**, $^3J_{5'/6'} = 8,4$ Hz, $^4J_{3'/5'} = 1,8$ Hz), 6,95 (dd, 1H, **H-7**, $^3J_{7/8} = 8,9$ Hz, $^4J_{5/7} = 2,5$ Hz), 6,91 (dd, 1H, **H-6'**, $^3J_{5'/6'} = 8,4$ Hz, $^4J_{4'/6'} = 1,1$ Hz), 6,75 (td, 1H, **H-4'**, $^3J_{3'/4'} = 7,4$ Hz, $^4J_{4'/6'} = 1,1$ Hz), 6,65 (dd, 1H, **H-3'**, $^3J_{3'/4'} = 7,4$ Hz, $^4J_{3'/5'} = 1,8$ Hz), 6,44 (d, 1H, **H-5**, $^4J_{5/7} = 2,5$ Hz), 4,24 (d, 2H, -CH₂-, $^3J_{NH/CH_2} = 5,8$ Hz), 3,75 (s, 3H, 2'-OCH₃).

HPLC*: 99,64 % (t_R : 12,751 min), (siehe 6.2.2.4).

IR ($\tilde{\nu}$): 1504, 1579, 1592 (m, $\nu_{C=C arom.}$), 1631 (s, $\nu_{C=O, 3-CONH}$), 3202 (w, ν_{O-H}), 3414 (m, $\nu_{N-H, 3-CONH}$) cm^{-1} .

MS (m/z (%))*: 871,34 (100, $[2 \times M + Na]^+$), 447,92 (12, $[M + Na]^+$), 1270,65 (12, $[3 \times M]^+$), 847,30 (100, $[2 \times M]^+$), 423,64 (90, $[M]^+$), (siehe 6.2.4).

HRMS/ESI (m/z (%)): gefunden für $[M+H]^+$: 425,1489 (100), berechnet für $[C_{26}H_{21}N_2O_4]^+$: 425,1496.

*8-Chloro-N-(3-chlorophenyl)-6-hydroxy-4-phenylbenzofuro[2,3-b]pyridin-3-carboxamid*Verbindung: **35**Summenformel: C₂₄H₁₄Cl₂N₂O₃Relative Molmasse [M_r]: 448,0

Darstellung nach AAV 3 (siehe 7.1):

In einem Dreihalsrundkolben wurden 644,0 mg **14** (1,83 mmol, 1,00 eq) und 315,6 mg 2-Chloro-1,4-benzochinon (2,23 mmol, 1,22 eq) in wenig trockenem Dioxan suspendiert. Über einen Tropftrichter fügte man 50 mL einer Mischung aus 46,4 mL trockenem Dioxan und 3,6 mL Perchlorsäure (70 %) hinzu. Es zeigte sich ein Farbumschlag von Gelb nach Dunkelrot. Nach 24 h sowie alle 7 d wurde jeweils 100 mg 2-Chloro-1,4-benzochinon zum Reaktionsansatz ergänzt und schließlich nach 40 d, wie in AAV 3 beschrieben, aufgereinigt. Das ölige Rohprodukt wurde säulenchromatographisch (LM 2, siehe 6.2.2.1) aufgetrennt und die produktthaltige Fraktion, nach Entfernen des Lösungsmittels, aus Methanol (bei -20 °C) zur Titelverbindung ausfallen gelassen.

Hellbraun gefärbter Feststoff.

Schmb.: 283-286 °C (aus MeOH).

Ausbeute: 2,2 %.

DC-Kontrolle: LM 3: R_f = 0,16, LM 2: R_f = 0,51 (siehe 6.2.2.2).

¹H-NMR (DMSO-*d*₆): δ = 10,63 (s, 1H, -CONH-), 9,88 (s, 1H, 6-OH), 8,73 (s, 1H, **H-2**), 7,67 (t, 1H, **H-2'**, ⁴J_{2'/4', 2'/6'} = 2,1 Hz), 7,61-7,48 (m, 5H, 4-C₆H₅), 7,36 (d, 1H, **H-6'**, ³J_{5'/6'} = 8,1 Hz), 7,30 (t, 1H, **H-5'**, ³J_{5'/6', 4'/5'} = 8,1 Hz), 7,13-7,09 (m, 1H, **H-4'**), 7,07 (d, 1H, **H-7**, ⁴J_{5/7} = 2,3 Hz), 6,46 (s, 1H, **H-5**, ⁴J_{5/7} = 2,3 Hz).

IR (ν̄): 1498, 1590 (*m, s*, ν_{C=C arom.}), 1532 (*m*, δ_{N-H, 3-CONH}), 1656 (*m*, ν_{C=O, 3-CONH}), 3083-3059 (*m*, ν_{C-H arom.}), 3286 (*m*, ν_{N-H, 3-CONH}), 3393 (*w*, ν_{O-H}) cm⁻¹.

HPLC^{**}: 99,70 % (t_R: 5,425 min), (Methode A, siehe 6.2.2.4).

MS (*m/z* (%))^{*}: 919,85 (70, [2×M+Na]⁺), 920,89 (100, [2×M+Na]⁺), 921,83 (65, [2×M+Na]⁺), 922,95 (55, [2×M+Na]⁺), 471,63 (50, [M+Na]⁺), 473,17 (45, [M+Na]⁺), 447,33 (100, [M]⁺), 449,28 (65, [M]⁺), (siehe 6.2.4).

HRMS/ESI (*m/z* (%)): gefunden für [M+H]⁺: 449,0462 (100), berechnet für [C₂₄H₁₅Cl₂N₂O₃]⁺: 449,0454.

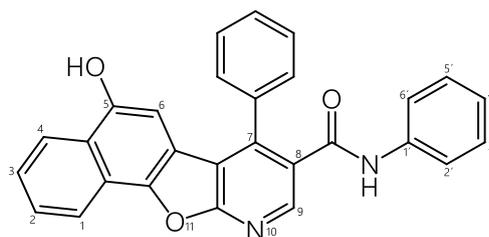
Synthese der Verbindungen

5-Hydroxy-N,7-diphenylnaphtho[2',1':4,5]furo[2,3-b]pyridin-8-carboxamid

Verbindung: **36**

Summenformel: $C_{28}H_{18}N_2O_3$

Relative Molmasse $[M_r]: 430,1$



Darstellung nach AAV 3 (siehe 7.1):

In einem Dreihalsrundkolben wurden 1,63 g **12** (5,12 mmol, 1,00 eq) und 972,0 mg 1,4-Naphthochinon (6,14 mmol, 1,22 eq) in wenig trockenem Dioxan suspendiert. Über einen Tropftrichter fügte man 90 mL einer Mischung aus 79,8 mL trockenem Dioxan und 10,2 mL Perchlorsäure (70 %) hinzu. Es zeigte sich ein Farbumschlag von gelb nach weinrot. Nach 24 h sowie nach 7 d wurde jeweils 150 mg 1,4-Naphthochinon zum Reaktionsansatz ergänzt und schließlich nach 36 d, wie in AAV 3 beschrieben, aufgereinigt. Das ölige Rohprodukt wurde säulenchromatographisch (LM 3, siehe 6.2.2.1) aufgetrennt und die produktthaltige Fraktion, nach Entfernen des

Lösungsmittels, aus Ethylacetat (bei 2-8 °C) zur Titelverbindung ausfallen gelassen. Das entstandene Präzipitat wurde zweimal mit Methanol gewaschen.

Braun gefärbter Feststoff.

Schmb.: 278-280 °C (aus EtOAc).

Ausbeute: 2,8 %.

DC-Kontrolle: LM 1: $R_f = 0,55$, LM 2: $R_f = 0,30$, LM 3: $R_f = 0,21$ (siehe 6.2.2.2).

1H -NMR (DMSO- d_6): $\delta = 10,38$ (s, 1H, -CONH-), 10,17 (s, 1H, 5-OH), 8,65 (s, 1H, **H-9**), 8,36 (d, 1H, **H-1**, $^3J_{1/2} = 8,2$ Hz), 8,24 (d, 1H, **H-4**, $^3J_{3/4} = 8,2$ Hz), 7,74 („t“, 1H, **H-2**), 7,66-7,53 (m, 6H, **H-3**, 7- C_6H_5), 7,49 (dd, 2H, **H-2'**, **H-6'**, $^3J_{2'/3', 5'/6'} = 8,0$ Hz, $^4J_{2'/4', 4'/6'} = 1,3$ Hz), 7,26 (td, 2H, **H-3'**, **H-5'**, $^3J_{2'/3', 5'/6'} = 8,0$ Hz, $^3J_{3'/4', 4'/5'} = 7,5$ Hz), 7,04 (td, 1H, **H-4'**, $^3J_{3'/4', 4'/5'} = 7,5$ Hz, $^4J_{2'/4', 4'/6'} = 1,3$ Hz), 6,62 (s, 1H, **H-6**).

^{13}C -NMR (DMSO- d_6): $\delta = 165,46$ (C=O), 162,71 (C10a), 150,23 (C5), 144,72 (C11a), 144,31 (C9), 143,86 (C7), 139,25 (C1'), 135,25 (C1_{Ph}), 130,51 (C8), 129,49 (C4_{Ph}), 129,12 (C2_{Ph}, C6_{Ph}), 129,10 (C3_{Ph}, C5_{Ph}), 128,99 (C3', C5'), 128,12 (C2), 126,76 (C3), 125,59 (C4a), 124,19 (C4'), 123,83 (C4), 121,18 (C11b), 120,93 (C1), 120,02 (C2', C6'), 117,31 (C6a), 115,76 (6b), 100,50 (C6).

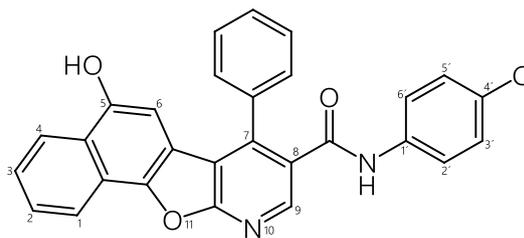
HPLC*: 99,42 % (t_R : 13,954 min), (siehe 6.2.2.4).

IR (ν): 1499, 1532 (m, $\nu_{C=C arom.}$), 1598 (m, $\delta_{N-H, 3-CONH}$), 1655 (s, $\nu_{C=O, 3-CONH}$), 3058 (w, $\nu_{C-H arom.}$), 3257 (w, ν_{O-H}), 3393 (w, $\nu_{N-H, 3-CONH}$) cm^{-1} .

MS (m/z (%))*: 883,23 (100, $[2 \times M + Na]^+$), 431,76 (25, $[M + H]^+$), 859,21 (45, $[2 \times M]^-$), 429,60 (100, $[M]^-$), (siehe 6.2.4).

HRMS/ESI (m/z (%)): gefunden für $[M + H]^+$: 431,1385 (70), berechnet für $[C_{28}H_{19}N_2O_3]^+$: 431,1390; gefunden für $[M + Na]^+$: 453,1203 (100), gefunden für $[C_{28}H_{18}N_2O_3Na]^+$: 453,1210.

N-(4-Chlorphenyl)-5-hydroxy-7-phenylnaphtho[2',1':4,5]furo[2,3-b]pyridin-8-carboxamid

Verbindung: **37**Summenformel: C₂₈H₁₇ClN₂O₃Relative Molmasse [M_r]: 464,1

Darstellung nach AAV 3 (siehe 7.1):

In einem Dreihalsrundkolben wurden 1,34 g **13** (3,74 mmol, 1,00 eq) und 711,5 mg 1,4-Naphthochinon (4,49 mmol, 1,22 eq) in wenig trockenem Dioxan suspendiert. Über einen Tropftrichter fügte man 70 mL einer Mischung aus 62,6 mL trockenem Dioxan und 7,4 mL Perchlorsäure (70 %) hinzu. Es zeigte sich ein Farbumschlag von gelb nach rotbraun. Nach 24 h sowie alle 7 d wurde jeweils 150 mg 1,4-Naphthochinon zum Reaktionsansatz ergänzt und schließlich nach 27 d, wie in AAV 3 beschrieben, aufgereinigt. Das ölige Rohprodukt wurde säulenchromatographisch (LM 5, Wechsel nach 95 Tubes zu LM 2, siehe 6.2.2.1) aufgetrennt und die produktthaltige Fraktion, nach Entfernen des Lösungsmittels, aus Ethylacetat (bei 2-8 °C) zur Titelverbindung ausfallen gelassen. Das entstandene Präzipitat wurde dreimal mit einem Gemisch aus Cyclohexan und Isopropanol (3:1) gewaschen.

Gelb gefärbter Feststoff.

Schmb.: 271-274 °C (aus EtOAc).

Ausbeute: 1,8 %.

DC-Kontrolle: LM 1: R_f = 0,55, LM 2: R_f = 0,51, LM 5: R_f = 0,35 (siehe 6.2.2.2).

¹H-NMR (DMSO-*d*₆): δ = 10,53 (s, 1H, -CONH-), 10,17 (s, 1H, 5-OH), 8,67 (s, 1H, **H-9**), 8,36 (d, 1H, **H-1**, ³J_{1/2} = 8,3 Hz), 8,24 (d, 1H, **H-4**, ³J_{3/4} = 8,3 Hz), 7,74 („t“, 1H, **H-2**), 7,67-7,49 (m, 8H, **H-3**, 7-C₆H₅, **H-2'**, **H-6'**), 7,33 (AA'BB', 2H, **H-3'**, **H-5'**), 6,62 (s, 1H, **H-6**).

HPLC*: 100,00 % (t_R: 13,867 min), (siehe 6.2.2.4).

IR (ν̄): 1520, 1593 (m, ν_{C=C arom.}), 1664 (m, ν_{C=O, 3-CONH}), 3058 (m, ν_{C-H arom.}), 3281 (m, ν_{O-H}), 3400 (m, ν_{N-H, 3-CONH}), cm⁻¹.

MS (m/z (%))*: 463,41 (100, [M]⁻), 465,37 (35, [M]⁻), (siehe 6.2.4).

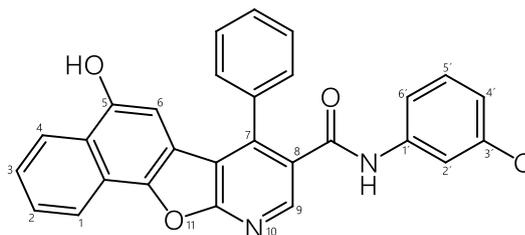
HRMS/ESI (m/z (%)): gefunden für [M+H]⁺: 465,0998 (100), berechnet für [C₂₈H₁₈ClN₂O₃]⁺: 465,1000; gefunden für [M+H]⁺: 467,0973 (32), berechnet für [C₂₈H₁₈ClN₂O₃]⁺: 467,0971.

N-(3-Chlorphenyl)-5-hydroxy-7-phenylnaphtho[2',1':4,5]furo[2,3-b]pyridin-8-carboxamid

Verbindung: **38**

Summenformel: C₂₈H₁₇ClN₂O₃

Relative Molmasse [M_r]: 464,1



Darstellung nach AAV 3 (siehe 7.1):

In einem Dreihalsrundkolben wurden 1,59 g **14** (4,49 mmol, 1,00 eq) und 868,4 mg 1,4-Naphthochinon (5,49 mmol, 1,22 eq) in wenig trockenem Dioxan suspendiert. Über einen Tropftrichter fügte man 90 mL einer Mischung aus 81,0 mL trockenem Dioxan und 9,0 mL Perchlorsäure (70 %) hinzu. Es zeigte sich ein Farbumschlag von gelb nach weinrot. Nach 24 h sowie alle 7 d wurde jeweils 150 mg 1,4-Naphthochinon zum Reaktionsansatz ergänzt und schließlich nach 27 d, wie in AAV 3 beschrieben, aufgereinigt. Das ölige Rohprodukt wurde säulenchromatographisch (LM 4, siehe 6.2.2.1) aufgetrennt und die produktthaltige Fraktion, nach Entfernen des Laufmittels, aus Ethylacetat (bei 2-8 °C) zur Titelverbindung ausfallen gelassen. Das entstandene Präzipitat wurde zweimal mit Ethylacetat, Methanol und DCM gewaschen.

Hellbraun gefärbter Feststoff.

Schmb.: 307-310 °C (aus EtOAc)

Ausbeute: 3,1 %.

DC-Kontrolle: LM 1: R_f = 0,48, LM 4: R_f = 0,31 (siehe 6.2.2.2).

¹H-NMR (DMSO-*d*₆): δ = 10,60 (s, 1H, -CONH-), 10,17 (s, 1H, 5-OH), 8,68 (s, 1H, **H-9**), 8,36 (d, 1H, **H-1**, ³J_{1/2} = 8,3 Hz), 8,24 (d, 1H, **H-4**, ³J_{3/4} = 8,3 Hz), 7,75 („t“, 1H, **H-2**), 7,68 (t, 1H, **H-2'**, ⁴J_{2'/4'}, ^{2'/6'} = 2,1 Hz), 7,65-7,51 (m, 6H, **H-3**, 7-C₆H₅), 7,40-7,34 (m, 1H, **H-6'**), 7,30 (t, 1H, **H-5'**, ³J_{5'/6'}, ^{4'/5'} = 8,0 Hz), 7,11 (ddd, 1H, **H-4'**, ³J_{4'/5'} = 8,0 Hz, ⁴J_{2'/4'} = 2,1 Hz, ⁴J_{4'/6'} = 1,0 Hz), 6,62 (s, 1H, **H-6**).

HPLC*: 99,84 % (t_R: 14,971 min), (siehe 6.2.2.4).

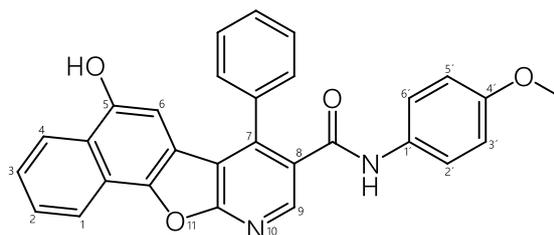
IR (ν̄): 1529, 1591 (s, m, ν_{C=C arom.}), 1650 (m, ν_{C=O, 3-CONH}), 3060 (w, ν_{C-H arom.}), 3251 (m, ν_{O-H}) cm⁻¹.

MS (*m/z* (%))*: 951,06 (100, [2×M+Na]⁺), 953,06 (75, [2×M+Na]⁺), 487,29 (30, [M+Na]⁺), 926,95 (15, [2×M]⁻), 929,00 (10, [2×M]⁻), 463,41 (100, [M]⁻), 465,33 (35, [M]⁻), (siehe 6.2.4).

HRMS/ESI (*m/z* (%)): gefunden für [M+H]⁺: 465,0993 (100), berechnet für [C₂₈H₁₈ClN₂O₃]⁺: 465,1000; gefunden für [M+H]⁺: 467,0971 (35), berechnet für [C₂₈H₁₈ClN₂O₃]⁺: 467,0971.

5-Hydroxy-N-(4-methoxyphenyl)-7-phenylnaphtho[2',1':4,5]furo[2,3-b]pyridin-8-carboxamid

Verbindung: **39**
 Summenformel: $C_{29}H_{20}N_2O_4$
 Relative Molmasse $[M_r]$: 460,1



Darstellung nach AAV 3 (siehe 7.1):

In einem Dreihalsrundkolben wurden 1,38 g **15** (3,97 mmol, 1,00 eq) und 754,0 mg 1,4-Naphthochinon (4,77 mmol, 1,22 eq) in wenig trockenem Dioxan suspendiert. Über einen Tropftrichter fügte man 90 mL einer Mischung aus 82,0 mL trockenem Dioxan und 8,0 mL Perchlorsäure (70 %) hinzu. Es zeigte sich ein Farbumschlag von hellbraun nach rotbraun. Nach 7 d wurde 150 mg 1,4-Naphthochinon zum Reaktionsansatz ergänzt und schließlich nach 34 d, wie in AAV 3 beschrieben, aufgereinigt. Das ölige Rohprodukt wurde säulenchromatographisch (LM 2, siehe 6.2.2.1) aufgetrennt und die produktthaltige Fraktion, nach Entfernen des Lösungsmittels, aus DCM (bei 2-8 °C) zur Titelverbindung ausfallen gelassen. Das entstandene Präzipitat wurde dreimal DCM gewaschen.

Grau gefärbter, ründlich geformter Feststoff.

Schmb.: 276-280 °C (aus DCM).

Ausbeute: 1,7 %.

DC-Kontrolle: LM 1: $R_f = 0,45$, LM 2: $R_f = 0,35$ (siehe 6.2.2.2).

1H -NMR (DMSO- d_6): $\delta = 10,21$ (s, 1H, -CONH-), 10,16 (s, 1H, 5-OH), 8,63 (s, 1H, **H-9**), 8,36 (d, 1H, **H-1**, $^3J_{1/2} = 8,3$ Hz), 8,24 (d, 1H, **H-4**, $^3J_{3/4} = 8,3$ Hz), 7,74 (ddd, 1H, **H-2**, $^3J_{1/2} = 8,3$ Hz, $^3J_{2/3} = 7,0$ Hz, $^4J_{2/4} = 1,2$ Hz), 7,68-7,51 (m, 6H, **H-3**, 7- C_6H_5), 7,38 (AA'BB', 2H, **H-2'**, **H-6'**), 6,84 (AA'BB', 2H, **H-3'**, **H-5'**), 6,62 (s, 1H, **H-6**), 3,70 (s, 3H, 4'-OCH₃).

HPLC*: 99,51 % (t_R : 13,401 min), (siehe 6.2.2.4).

IR ($\bar{\nu}$): 1511, 1598 (s, w, $\nu_{C=C}$ arom.), 1648 (w, δ_{N-H} , 3-CONH), 1700 (w, $\nu_{C=O}$, 3-CONH), 2834 (w, ν_{C-H} aliph.), 3061 (w, ν_{C-H} arom.), 3272 (w, ν_{O-H}) cm^{-1} .

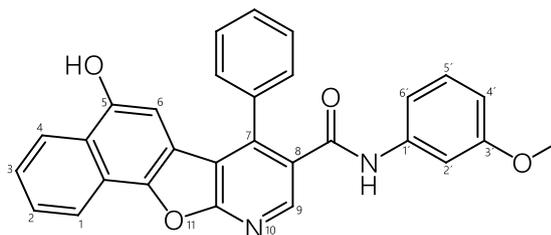
MS (m/z (%))*: 943,31 (100, $[2 \times M + Na]^+$), 483,37 (30, $[M + Na]^+$), 461,66 (35, $[M + H]^+$), 459,48 (100, $[M]^-$), (siehe 6.2.4).

HRMS/ESI (m/z (%)): gefunden für $[M + H]^+$: 461,1496 (100), berechnet für $[C_{29}H_{21}N_2O_4]^+$: 461,1496; gefunden für $[M + H]^+$: 462,1529 (32), berechnet für $[C_{29}H_{21}N_2O_4]^+$: 462,1529.

Synthese der Verbindungen

5-Hydroxy-N-(3-methoxyphenyl)-7-phenylnaphtho[2',1':4,5]furo[2,3-b]pyridin-8-carboxamid

Verbindung: **40**
Summenformel: $C_{29}H_{20}N_2O_4$
Relative Molmasse $[M_r]$: 460,1



Darstellung nach AAV 3 (siehe 7.1):

In einem Dreihalsrundkolben wurden 1,50 g **16** (4,30 mmol, 1,00 eq) und 816,8 mg 1,4-Naphthochinon (5,16 mmol, 1,22 eq) in wenig trockenem Dioxan suspendiert. Über einen Tropftrichter fügte man 90 mL einer Mischung aus 81,4 mL trockenem Dioxan und 8,6 mL Perchlorsäure (70 %) hinzu. Es zeigte sich ein Farbumschlag von gelb nach weinrot. Nach 7 d und 14 d wurde jeweils 150 mg 1,4-Naphthochinon zum Reaktionsansatz ergänzt und schließlich nach 32 d, wie in AAV 3 beschrieben, aufgereinigt. Das ölige Rohprodukt wurde säulenchromatographisch (LM 2, siehe 6.2.2.1) aufgetrennt und die produktthaltige Fraktion, nach Entfernen des Lösungsmittels, aus DCM ausfallen gelassen (bei 2-8 °C).

Den resultierenden Niederschlag (HPLC-Reinheit: 47,4 %) löste man in 1,5 mL eines Gemisches aus Methanol und DMSO (1:1, V/V) und fraktionierte ihn mittels präparativer HPLC (siehe 6.2.2.4). Nach Entfernen des Lösungsmittels durch Lyophilisierung konnte die Titelverbindung gewonnen werden.

Beige gefärbter Feststoff.

Schmb.: 150-153 °C.

Ausbeute: 0,7 %.

DC-Kontrolle: LM 1: $R_f = 0,46$, LM 2: $R_f = 0,34$ (siehe 6.2.2.2).

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6): $\delta = 10,36$ (s, 1H, -CONH-), 10,17 (s, 1H, 5-OH), 8,64 (s, 1H, **H-9**), 8,36 (d, 1H, **H-1**, $^3J_{1/2} = 8,2$ Hz), 8,24 (d, 1H, **H-4**, $^3J_{3/4} = 8,3$ Hz), 7,75 („t“, 1H, **H-2**), 7,63 („t“, 1H, **H-3**), 7,60-7,55 (m, 5H, 7- C_6H_5), 7,21-7,12 (m, 2H, **H-2'**, **H-6'**), 7,03 (d, 1H, **H-5'**, $^3J_{5'/6'} = 8,3$ Hz), 6,67-6,59 (m, 2H, **H-6**, **H-4'**), 3,69 (s, 3H, 3'-OCH₃).

HPLC*: 99,36 % (t_R : 13,467 min), (siehe 6.2.2.4).

IR ($\tilde{\nu}$): 1539, 1597 (m, $\nu_{C=C\text{ arom.}}$), 1657 (m, $\nu_{C=O, 3-CONH}$), 2854, 2925 (s, m, $\nu_{C-H\text{ aliph.}}$), 3061 (m, $\nu_{C-H\text{ arom.}}$), 3267 (m, ν_{O-H}) cm^{-1} .

MS (m/z (%))*: 959,94 (100, $[2\times M+K]^+$), 943,36 (95, $[2\times M+Na]^+$), 461,69 (50, $[M+H]^+$), 459,45 (100, $[M]$), (siehe 6.2.4).

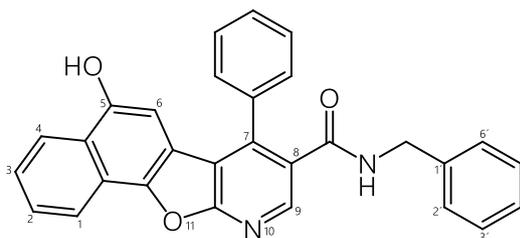
HRMS/ESI (m/z (%)): gefunden für $[M+H]^+$: 461,1497 (32), berechnet für $[C_{29}H_{21}N_2O_4]^+$: 461,1496.

N-Benzyl-5-hydroxy-7-phenylnaphtho[2',1':4,5]furo[2,3-b]pyridin-8-carboxamid

Verbindung: **41**

Summenformel: C₂₉H₂₀N₂O₃

Relative Molmasse [M_r]: 444,1



Darstellung nach AAV 3 (siehe 7.1):

In einem Dreihalsrundkolben wurden 1,48 g **17** (4,45 mmol, 1,00 eq) und 844,2 mg 1,4-Naphthochinon (5,34 mmol, 1,22 eq) in wenig trockenem Dioxan suspendiert. Über einen Tropftrichter fügte man 150 mL einer Mischung aus 140,1 mL trockenem Dioxan und 8,9 mL Perchlorsäure (70 %) hinzu. Es zeigte sich ein Farbumschlag von gelb nach weinrot. Nach 7 d wurde 150 mg 1,4-Naphthochinon zum Reaktionsansatz ergänzt und schließlich nach 33 d, wie in AAV 3 beschrieben, aufgereinigt. Das ölige Rohprodukt wurde säulenchromatographisch (LM 2, siehe 6.2.2.1) aufgetrennt und die produktthaltige Fraktion, nach Entfernen des Lösungsmittels, aus Ethylacetat ausfallen gelassen. Die Titelverbindung konnte nach zweimaligem Waschen mit Methanol, Ethylacetat, DCM und Aceton gewonnen werden.

Hellbraun gefärbter Feststoff.

Schmb.: 268-270 °C (aus EtOAc).

Ausbeute: 2,7 %.

DC-Kontrolle: LM 1: R_f = 0,43, LM 2: R_f = 0,28 (siehe 6.2.2.2).

¹H-NMR (DMSO-*d*₆): δ = 10,14 (s, 1H, 5-OH), 9,00 (t, 1H, -CONH-, ³J_{NH/CH₂} = 5,9 Hz), 8,75 (s, 1H, **H-9**), 8,37-8,28 (m, 2H, **H-1**, **H-4**), 7,78-7,70 (m, 3H, **H-2**, 7-C₆H₅), 7,66 („t“, 1H, **H-3**), 7,47-7,37 (m, 3H, 7-C₆H₅), 7,32-7,23 (m, 3H, **H-3'**-**H-5'**), 7,20-7,17 (m, 2H, **H-2'**, **H-6'**), 6,58 (s, 1H, **H-6**), 4,39 (d, 2H, -CH₂-, ³J_{NH/CH₂} = 5,9 Hz).

¹³C-NMR (DMSO-*d*₆): δ = 168,88 (C=O), 162,17 (C10a), 152,16 (C7), 150,75 (C5), 144,80 (C11a), 139,45 (C1_{Ph}), 139,19 (C1'), 131,03 (C9), 129,58 (C8), 129,26 (C2', C6'), 129,21 (C2_{Ph}, C6_{Ph}), 129,03 (C4_{Ph}), 128,68 (C3_{Ph}, C5_{Ph}), 128,56 (C3', C5'), 128,09 (C4'), 127,97 (C2', C6'), 127,25 (C3), 126,56 (C2), 125,77 (C4a), 123,95 (C4), 121,35 (C11b), 120,87 (C1), 117,57 (C6a), 115,73 (C6b), 100,11 (C6), 43,27 (CH₂).

HPLC*: 100,00 % (t_R: 13,782 min), (siehe 6.2.2.4).

IR (ν̄): 1533 (m, ν_{C=C arom.}), 1589 (w, δ_{N-H, 3-CONH}), 1632 (s, ν_{C=O, 3-CONH}), 2927 (w, ν_{C-H aliph.}), 3032, 3061 (w, ν_{C-H arom.}), 3179 (m, ν_{O-H}), 3408 (w, ν_{N-H, 3-CONH}) cm⁻¹.

MS (m/z (%))*: 911,01 (100, [2×M+Na]⁺), 467,41 (20, [M+Na]⁺), 445,53 (30, [M+H]⁺), 887,08 (85, [2×M]⁻), 443,59 (100, [M]⁻), (siehe 6.2.4).

HRMS/ESI (m/z (%)): gefunden für [M+H]⁺: 445,1537 (55), berechnet für [C₂₉H₂₁N₂O₃]⁺: 445,1547.

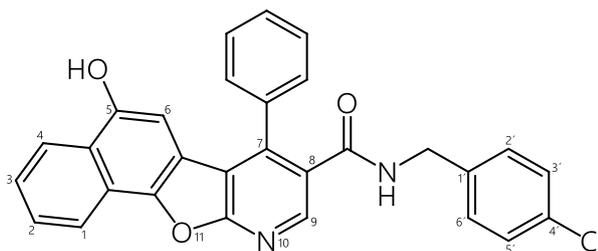
Synthese der Verbindungen

N-(4-Chlorobenzyl)-5-hydroxy-7-phenylnaphtho[2',1':4,5]furo[2,3-b]pyridin-8-carboxamid

Verbindung: **42**

Summenformel: $C_{29}H_{19}ClN_2O_3$

Relative Molmasse $[M_r]$: 478,1



Darstellung nach AAV 3 (siehe 7.1):

In einem Dreihalsrundkolben wurden 1,25 g **18** (3,40 mmol, 1,00 eq) und 645,7 mg 1,4-Naphthochinon (4,08 mmol, 1,22 eq) in wenig trockenem Dioxan suspendiert. Über einen Tropftrichter fügte man 80 mL einer Mischung aus 73,1 mL trockenem Dioxan und 6,9 mL Perchlorsäure (70 %) hinzu. Es zeigte sich ein Farbumschlag von gelb nach weinrot. Nach 25 d wurde der Ansatz, wie in AAV 3 beschrieben, aufgereinigt. Das ölige Rohprodukt wurde säulenchromatographisch (LM 2, siehe 6.2.2.1) aufgetrennt und die produktthaltige Fraktion, nach Entfernen des Lösungsmittels, aus Diethylether (bei 2-8 °C) ausfallen gelassen. Die Titelverbindung konnte nach zweimaligem Waschen mit Methanol, DCM und Diethylether gewonnen werden.

Hellbraun gefärbter Feststoff.

Schmb.: 289-292 °C (aus Et₂O).

Ausbeute: 2,3 %.

DC-Kontrolle: LM 1: R_f = 0,28, LM 2: R_f = 0,21 (siehe 6.2.2.2).

¹H-NMR (DMSO-*d*₆): δ = 10,14 (s, 1H, 5-OH), 8,99 (t, 1H, -CONH-, ³J_{NH/CH₂} = 5,9 Hz), 8,75 (s, 1H, **H-9**), 8,37-8,28 (m, 2H, **H-1**, **H-4**), 7,79-7,60 (m, 4H, **H-2**, **H-3**, 7-C₆H₅), 7,49-7,29 (m, 5H, **H-3'**, **H-5'**, 7-C₆H₅), 7,20-7,13 (AA'BB', 2H, **H-2'**, **H-6'**), 6,58 (s, 1H, **H-6**), 4,36 (d, 2H, -CH₂-, ³J_{NH/CH₂} = 5,9 Hz).

HPLC*: 95,48 % (t_R: 14,161 min), (siehe 6.2.2.4).

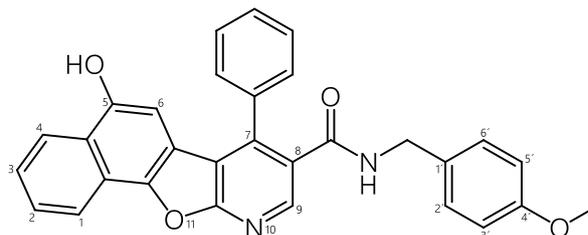
IR (ν̄): 1526, 1585 (m, ν_{C=C arom.}), 1628 (s, ν_{C=O, 3-CONH}), 2929 (w, ν_{C-H aliph.}), 3067, 3155 (m, ν_{C-H arom.}), 3415 (w, ν_{O-H}) cm⁻¹.

MS (m/z (%))*: 479,59 (100, [M+H]⁺), 955,26 (45, [2×M]⁺), 477,70 (100, [M]⁺), (siehe 6.2.4).

HRMS/ESI (m/z (%)): gefunden für [M+H]⁺: 479,1155 (100), berechnet für [C₂₉H₂₀ClN₂O₃]⁺: 479,1157; gefunden für [M+H]⁺: 481,1131 (32), berechnet für [C₂₉H₂₀ClN₂O₃]⁺: 481,1127.

5-Hydroxy-N-(4-methoxybenzyl)-7-phenylnaphtho[2',1':4,5]furo[2,3-b]pyridin-8-carboxamid

Verbindung: **43**
 Summenformel: C₃₀H₂₂N₂O₄
 Relative Molmasse [M_r]: 474,2



Darstellung nach AAV 3 (siehe 7.1):

In einem Dreihalsrundkolben wurden 2,26 g **20** (7,18 mmol, 1,00 eq) und 1,36 g 1,4-Naphthochinon (8,60 mmol, 1,22 eq) in wenig trockenem Dioxan suspendiert. Über einen Tropftrichter fügte man 90 mL einer Mischung aus 75,6 mL trockenem Dioxan und 14,4 mL Perchlorsäure (70 %) hinzu. Es zeigte sich ein Farbumschlag von gelb nach weinrot. Nach 7 d wurde 150 mg 1,4-Naphthochinon zum Reaktionsansatz ergänzt und schließlich nach 48 d, wie in AAV 3 beschrieben, aufgereinigt. Das ölige Rohprodukt wurde säulenchromatographisch (LM 2, siehe 6.2.2.1) aufgetrennt und die produktthaltige Fraktion, nach Entfernen des Lösungsmittels, aus einem Gemisch von Ethylacetat und Cyclohexan (1:1, V/V) ausfallen gelassen (bei 2-8 °C). Das entstandene Präzipitat wurde zweimal mit Methanol, einem Gemisch aus Ethylacetat und Cyclohexan (1:1, V/V), sowie einem Gemisch aus DCM und Cyclohexan (1:1, V/V) gewaschen.

Grau gefärbter Feststoff.

Schmb.: 266-269 °C (aus EtOAc).

Ausbeute: 2,1 %.

DC-Kontrolle: LM 8: R_f = 0,29, LM 10: R_f = 0,21 (siehe 6.2.2.2).

¹H-NMR (DMSO-*d*₆): δ = 10,14 (s, 1H, 5-OH), 8,91 (t, 1H, -CONH-, ³J_{NH/CH2} = 5,9 Hz), 8,72 (s, 1H, H-9), 8,36-8,28 (m, 2H, H-1, H-4), 7,79-7,59 (m, 4H, H-2, H-3, 7-C₆H₅), 7,47-7,34 (m, 3H, 7-C₆H₅), 7,10 (AA'BB', 2H, H-2', H-6'), 6,87 (AA'BB', 2H, H-3', H-5'), 6,58 (s, 1H, H-6), 4,31 (d, 2H, -CH₂-, ³J_{NH/CH2} = 5,9 Hz), 3,74 (s, 3H, 4'-OCH₃).

¹³C-NMR (DMSO-*d*₆): δ = 168,74 (C=O), 162,15 (C10a), 158,70 (C4'), 152,12 (C7), 150,73 (C5), 144,78 (C11a), 139,41 (C1_{Ph}), 131,13 (C1'), 130,99 (C9), 129,62 (C8), 129,33 (C2', C6'), 129,21 (C2_{Ph}, C6_{Ph}), 129,03 (C4_{Ph}), 128,55 (C3_{Ph}, C5_{Ph}), 128,10 (C3), 126,56 (C2), 125,75 (C4a), 123,95 (C4), 121,34 (C11b), 120,86 (C1), 117,56 (C6a), 115,69 (C6b), 114,09 (C3', C5'), 100,01 (C6), 55,55 (OCH₃), 42,72 (CH₂).

HPLC*: 100,00 % (t_R: 13,686 min), (siehe 6.2.2.4).

IR (ν̄): 1511, 1526 (s, m, ν_{C=C arom.}), 1587 (m, δ_{N-H, 3-CONH}), 1627 (s, ν_{C=O, 3-CONH}), 2935 (w, ν_{C-H aliph.}), 3050 (w, ν_{C-H arom.}), 3185 (w, ν_{O-H}), 3410 (w, ν_{N-H, 3-CONH}) cm⁻¹.

MS (m/z (%))*: 970,96 (65, [2×M+Na]⁺), 475,62 (95, [M+H]⁺), 473,49 (90, [M]⁻), (siehe 6.2.4).

HRMS/ESI (m/z (%)): gefunden für [M+H]⁺: 475,1652 (100), berechnet für [C₃₀H₂₃N₂O₄]⁺: 475,1652.

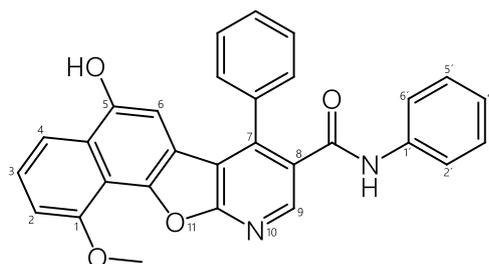
Synthese der Verbindungen

5-Hydroxy-1-methoxy-N,7-diphenylnaphtho[2',1':4,5]furo[2,3-b]pyridin-8-carboxamid

Verbindung: **44**

Summenformel: C₂₉H₂₀N₂O₄

Relative Molmasse [M_r]: 460,1



Darstellung nach AAV 3 (siehe 7.1):

In einem Dreihalsrundkolben wurden 1,29 g **12** (4,06 mmol, 1,00 eq) und 916,0 mg 5-Methoxy-1,4-naphthochinon (4,87 mmol, 1,22 eq) in wenig trockenem Dioxan suspendiert. Über einen Tropftrichter fügte man 90 mL einer Mischung aus 81,9 mL trockenem Dioxan und 8,1 mL Perchlorsäure (70 %) hinzu. Es zeigte sich ein Farbumschlag von gelb nach rotbraun. Nach 43 d wurde der Ansatz, wie in AAV 3 beschrieben, aufgereinigt. Das ölige Rohprodukt wurde säulenchromatographisch (LM 3, 6.2.2.1) aufgetrennt und die produktthaltige Fraktion, nach Entfernen des Lösungsmittels, aus DCM (bei 2-8 °C) ausfallen gelassen. Die Titelverbindung konnte final nach zweimaligem Waschen mit DCM und Diethylether erhalten werden.

Gelb gefärbter Feststoff.

Schmb.: 288-291 °C (aus DCM).

Ausbeute: 5,0 %.

DC-Kontrolle: LM 1: R_f = 0,45, LM 3: R_f = 0,23 (siehe 6.2.2.2).

¹H-NMR (DMSO-*d*₆): δ = 10,36 (s, 1H, -CONH-), 10,08 (s, 1H, 5-OH), 8,64 (s, 1H, **H-9**), 7,81 (dd, 1H, **H-4**, ³J_{3/4} = 8,4 Hz, ⁴J_{2/4} = 0,9 Hz), 7,62-7,44 (m, 8H, **H-3**, 7-C₆H₅, **H-2'**, **H-6'**), 7,30-7,16 (m, 3H, **H-2**, **H-3'**, **H-5'**), 7,04 (tt, 1H, **H-4'**, ³J_{3'/4'} = 8,6 Hz, ³J_{4'/5'} = 7,4 Hz, ⁴J_{2'/4'}, ⁴J_{6'/6''} = 1,7 Hz), 6,64 (s, 1H, **H-6**), 4,09 (s, 3H, 1-OCH₃).

HPLC*: 98,70 % (t_R: 15,089 min), (siehe 6.2.2.4).

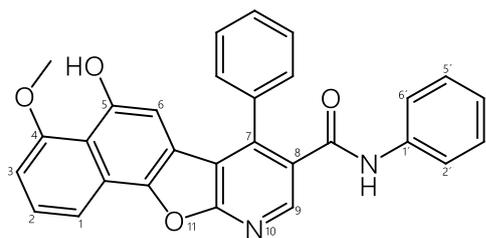
IR (ν̄): 1540 (s, ν_{C=C arom.}), 1603 (m, δ_{N-H, 3-CONH}), 1673 (s, ν_{C=O, 3-CONH}), 3055 (m, ν_{C-H arom.}), 3292 (w, ν_{O-H}), 3437 (m, ν_{N-H, 3-CONH}) cm⁻¹.

MS (m/z (%))*: 942,98 (100, [2×M+Na]⁺), 461,59 (35, [M+H]⁺), 919,06 (40, [2×M]⁻), 459,43 (100, [M]⁻), (siehe 6.2.4).

HRMS/ESI (m/z (%)): gefunden für [M+H]⁺: 461,1490 (100), berechnet für [C₂₉H₂₁N₂O₄]⁺: 461,1496.

5-Hydroxy-4-methoxy-N,7-diphenylnaphtho[2',1':4,5]furo[2,3-b]pyridin-8-carboxamid

Verbindung: **44 Iso**
 Summenformel: $C_{29}H_{20}N_2O_4$
 Relative Molmasse $[M_r]$: 460,1



Darstellung nach AAV 3 (siehe 7.1):

Das Stellungsisomer konnte bei der Umsetzung von **44** isoliert werden.

Nach Fällung von **44** wurde das abgetrennte Filtrat vom Lösungsmittel befreit. Das erhaltene Harz löste man in Aceton und ließ es bei 2-8 °C ruhen. Das resultierende Präzipitat wurde zweimal mit Aceton, Ethylacetat und Diethylether gewaschen.

Ocker gefärbter Feststoff.

Schmb.: 290-293 °C (aus Aceton).

Ausbeute: 0,9 %.

DC-Kontrolle: LM 1: $R_f = 0,45$, LM 3: $R_f = 0,23$ (siehe 6.2.2.2).

1H -NMR (DMSO- d_6): $\delta = 10,40$ (s, 1H, -CONH-), 9,31 (s, 1H, 5-OH), 8,69 (s, 1H, **H-9**), 7,97 (dd, 1H, **H-1**, $^3J_{1/2} = 8,3$ Hz, $^4J_{1/3} = 0,9$ Hz), 7,66 („t“, 1H, **H-2**, $^3J_{2/3} = 8,1$ Hz), 7,62-7,52 (m, 5H, 7- C_6H_5), 7,51-7,46 (m, 2H, **H-2'**, **H-6'**), 7,26 (tt, 2H, **H-3'**, **H-5'**, $^3J_{2'/3'} = 7,8$ Hz, $^3J_{3'/4'} = 7,4$ Hz), 7,18 (dd, 1H, **H-3**, $^3J_{2/3} = 8,1$ Hz, $^4J_{1/3} = 0,9$ Hz), 7,04 (t, 1H, **H-4'**, $^3J_{3'/4'} = 7,4$ Hz), 6,35 (s, 1H, **H-6**), 4,04 (s, 3H, 4-OCH₃).

HPLC*: 96,65 % (t_R : 15,930 min), (siehe 6.2.2.4).

IR (ν): 1526, 1578 (s, m, $\nu_{C=C \text{ arom.}}$), 1597 (m, $\delta_{N-H, 3-CONH}$), 1658 (s, $\nu_{C=O, 3-CONH}$), 2937, 2967 (w, $\nu_{C-H \text{ aliph.}}$), 3061 (m, $\nu_{C-H \text{ arom.}}$), 3279 (s, ν_{O-H}) cm^{-1} .

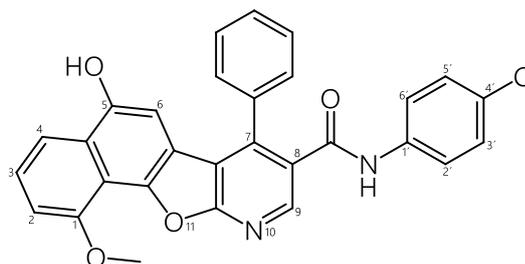
MS (m/z (%))*: 942,98 (100, $[2 \times M + Na]^+$), 461,59 (35, $[M + H]^+$), 919,06 (40, $[2 \times M]^-$), 459,43 (100, $[M]^-$), (siehe 6.2.4).

HRMS/ESI (m/z (%)): gefunden für $[M + H]^+$: 461,1491 (100), berechnet für $[C_{29}H_{21}N_2O_4]^+$: 461,1496.

Synthese der Verbindungen

N-(4-Chlorphenyl)-5-hydroxy-1-methoxy-7-phenylnaphtho[2',1':4,5]furo[2,3-b]pyridin-8-carboxamid

Verbindung: **45**
Summenformel: $C_{29}H_{19}ClN_2O_4$
Relative Molmasse $[M_r]$: 494,1



Darstellung nach AAV 3 (siehe 7.1):

In einem Dreihalsrundkolben wurden 968,8 mg **13** (2,7 mmol, 1,00 eq) und 609,1 mg 5-Methoxy-1,4-naphthochinon (3,24 mmol, 1,22 eq) in wenig trockenem Dioxan suspendiert. Über einen Tropftrichter fügte man 74 mL einer Mischung aus 68,7 mL trockenem Dioxan und 5,3 mL Perchlorsäure (70 %) hinzu. Es zeigte sich ein Farbumschlag von gelb nach braun. Nach 24 h wurde 150 mg 5-Methoxy-1,4-naphthochinon zum Reaktionsansatz ergänzt und schließlich nach 30 d, wie in AAV 3 beschrieben, aufgereinigt. Das ölige Rohprodukt wurde säulenchromatographisch (LM 2, siehe 6.2.2.1) aufgetrennt und die produktthaltige Fraktion, nach Entfernen des Lösungsmittels, aus Methanol (bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$) zur Titelverbindung ausfallen gelassen.

Gelb gefärbter Feststoff.

Schmb.: $270\text{--}272\text{ }^{\circ}\text{C}$ (aus MeOH).

Ausbeute: 2,0 %.

DC-Kontrolle: LM 1: $R_f = 0,55$, LM 2: $R_f = 0,16$ (siehe 6.2.2.2).

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6): $\delta = 10,51$ (s, 1H, -CONH-), $10,09$ (s, 1H, 5-OH), $8,65$ (s, 1H, **H-9**), $7,81$ (d, 1H, **H-4**, $^3J_{3/4} = 8,3$ Hz), $7,62\text{--}7,47$ (m, 8H, **H-3**, 7- C_6H_5 , **H-2'**, **H-6'**), $7,37\text{--}7,28$ (AA'BB', 2H, **H-3'**, **H-5'**), $7,22$ (d, 1H, **H-2**, $^3J_{2/3} = 7,8$ Hz), $6,64$ (s, 1H, **H-6**), $4,09$ (s, 3H, 1-OCH $_3$).

HPLC*: 98,83 % (t_R : 13,756 min), (siehe 6.2.2.4).

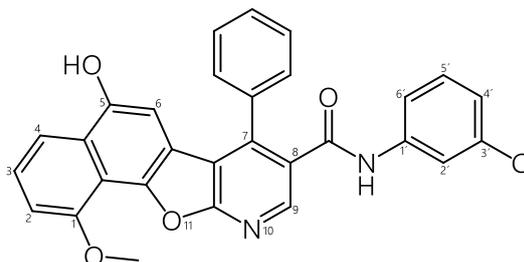
IR ($\tilde{\nu}$): 1526 , 1587 (s, m, $\nu_{\text{C}=\text{C}}$ arom.), 1627 (s, $\nu_{\text{C}=\text{O}}$, 3-CONH), 3161 (m, $\nu_{\text{C}-\text{H}}$ arom.), 3409 (w, $\nu_{\text{N}-\text{H}}$, 3-CONH) cm^{-1} .

MS (m/z (%))*: $1011,00$ (100, $[2\times\text{M}+\text{Na}]^+$), $1013,10$ (70, $[2\times\text{M}+\text{Na}]^+$), $493,39$ (100, $[\text{M}]^+$), $495,34$ (35, $[\text{M}]^+$), (siehe 6.2.4).

HRMS/ESI (m/z (%)): gefunden für $[\text{M}+\text{H}]^+$: $495,1094$ (100), berechnet für $[\text{C}_{29}\text{H}_{20}\text{ClN}_2\text{O}_4]^+$: $495,1106$; gefunden für $[\text{M}+\text{H}]^+$: $497,1066$ (30), berechnet für $[\text{C}_{29}\text{H}_{20}\text{ClN}_2\text{O}_4]^+$: $497,1077$.

N-(3-Chlorphenyl)-5-hydroxy-1-methoxy-7-phenylnaphtho[2',1':4,5]furo[2,3-b]pyridin-8-carboxamid

Verbindung: **46**
 Summenformel: C₂₉H₁₉ClN₂O₄
 Relative Molmasse [M_r]: 494,1



Darstellung: nach AAV 3 (siehe 7.1):

In einem Dreihalsrundkolben wurden 1,67 g **14** (4,74 mmol, 1,00 eq) und 1,07 g 5-Methoxy-1,4-naphthochinon (5,69 mmol, 1,22 eq) in wenig trockenem Dioxan suspendiert. Über einen Tropftrichter fügte man 89 mL einer Mischung aus 79,6 mL trockenem Dioxan und 9,4 mL Perchlorsäure (70 %) hinzu. Es zeigte sich ein Farbumschlag von gelb nach braun. Nach 24 h sowie alle 7 d wurde jeweils 150 mg 5-Methoxy-1,4-naphthochinon zum Reaktionsansatz ergänzt und schließlich nach 20 d, wie in AAV 3 beschrieben, aufgereinigt. Das ölige Rohprodukt wurde säulenchromatographisch (LM 4, Wechsel nach 140 Tubes zu LM 3, siehe 6.2.2.1) aufgetrennt und die produktthaltige Fraktion, nach Entfernen des Lösungsmittels, in Ethylacetat gelöst und mit gleicher Menge Cyclohexan versetzt. Daraufhin zeigte sich eine gelartige Konsistenz. Nach nochmaligem Erwärmen entsteht eine gelbe Lösung, aus der ein feinpulvriges Präzipitat fiel (bei 2-8 °C). Die Titelverbindung konnte final nach zweimaligem Waschen mit DCM und Diethylether erhalten werden.

Gelb gefärbter Feststoff.

Schmb.: 287-290 °C (aus EtOAc).

Ausbeute: 1,1 %.

DC-Kontrolle: LM 1: R_f = 0,52, LM 4: R_f = 0,14 (siehe 6.2.2.2).

¹H-NMR (DMSO-*d*₆): δ = 10,59 (s, 1H, -CONH-), 10,09 (s, 1H, 5-OH), 8,66 (s, 1H, **H-9**), 7,81 (dd, 1H, **H-4**, ³J_{3/4} = 8,4 Hz, ⁴J_{2/4} = 0,9 Hz), 7,68 (t, 1H, **H-2'**, ⁴J_{2'/4', 2'/6'} = 2,0 Hz), 7,60-7,50 (m, 6H, **H-3**, 7-C₆**H**₅), 7,37 (ddd, 1H, **H-6'**, ³J_{5'/6'} = 8,0 Hz, ⁴J_{2'/6'} = 2,0 Hz, ⁴J_{4'/6'} = 1,0 Hz), 7,29 (t, 1H, **H-5'**, ³J_{5'/6', 4'/5'} = 8,0 Hz), 7,21 (dd, 1H, **H-2**, ³J_{2/3} = 8,0 Hz, ⁴J_{2/4} = 0,9 Hz), 7,10 (ddd, 1H, **H-4'**, ³J_{4'/5'} = 8,0 Hz, ⁴J_{2'/4'} = 2,0 Hz, ⁴J_{4'/6'} = 1,0 Hz), 6,64 (s, 1H, **H-6**), 4,09 (s, 3H, 1-OCH₃).

HPLC^{**}: 98,81 % (t_R: 6,392 min), (Methode A, siehe 6.2.2.4).

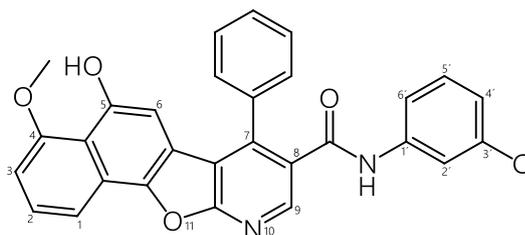
IR (ν̄): 1481, 1590 (s, ν_{C=C arom.}), 1527 (s, δ_{N-H, 3-CONH}), 1649 (m, ν_{C=O, 3-CONH}), 2840-2931 (w, m, ν_{C-H aliph.}), 3058 (m, ν_{C-H arom.}), 3279 (m, ν_{N-H, 3-CONH}), 3391 (w, ν_{O-H}) cm⁻¹.

MS (m/z (%))^{*}: 1011,32 (65, [2×M+Na]⁺), 1013,09 (55, [2×M+Na]⁺), 496,77 (60, [M+H]⁺), 493,36 (100, [M]⁻), 495,35 (40, [M]⁻), (siehe 6.2.4).

HRMS/ESI (m/z (%)): gefunden für [M+H]⁺: 495,1094 (100), berechnet für [C₂₉H₂₀ClN₂O₄]⁺: 495,1106.

N-(3-Chlorphenyl)-5-hydroxy-4-methoxy-7-phenylnaphtho[2',1':4,5]furo[2,3-b]pyridin-8-carboxamid

Verbindung: **46 Iso**
 Summenformel: C₂₉H₁₉ClN₂O₄
 Relative Molmasse [M_r]: 494,1



Darstellung nach AAV 3 (siehe 7.1):

Das Stellungsisomer konnte bei der Umsetzung von **46** isoliert werden.

Die produktthaltige Fraktion der Säulenchromatographie wurde, nach Entfernen des Lösungsmittels, in Ethylacetat gelöst und mit gleicher Menge Cyclohexan versetzt, woraufhin das Produkt ausfiel (bei 2-8 °C). Die Titelverbindung konnte final nach zweimaligem Waschen mit Ethylacetat, Methanol, DCM und Diethylether erhalten werden.

Hellbraun gefärbter Feststoff.

Schmb.: 263-266 °C (aus EtOAc).

Ausbeute: 0,8 %.

DC-Kontrolle: LM 1: R_f = 0,52, LM 4: R_f = 0,14 (siehe 6.2.2.2).

¹H-NMR (DMSO-*d*₆): δ = 10,62 (s, 1H, -CONH-), 9,32 (s, 1H, 5-OH), 8,71 (s, 1H, **H-9**), 7,97 (dd, 1H, **H-1**, ³J_{1/2} = 8,3 Hz, ⁴J_{1/3} = 0,9 Hz), 7,71-7,63 (m, 2H, **H-2**, **H-2'**), 7,61-7,55 (m, 5H, 7-C₆H₅), 7,38 (ddd, 1H, **H-6'**, ³J_{5'/6'} = 8,1 Hz, ⁴J_{2'/6'} = 2,1 Hz, ⁴J_{4'/6'} = 1,0 Hz), 7,30 (t, 1H, **H-5'**, ³J_{5'/6'}, ⁴J_{1/3} = 8,1 Hz), 7,17 (dd, 1H, **H-3**, ³J_{2/3} = 8,1 Hz, ⁴J_{1/3} = 0,9 Hz), 7,12 (ddd, 1H, **H-4'**, ³J_{4'/5'} = 8,1 Hz, ⁴J_{2'/4'} = 2,1 Hz, ⁴J_{4'/6'} = 1,0 Hz), 6,35 (s, 1H, **H-6**), 4,04 (s, 3H, 4-OCH₃).

HPLC**: 91,60 % (t_R: 11,058 min), (Methode A, siehe 6.2.2.4).

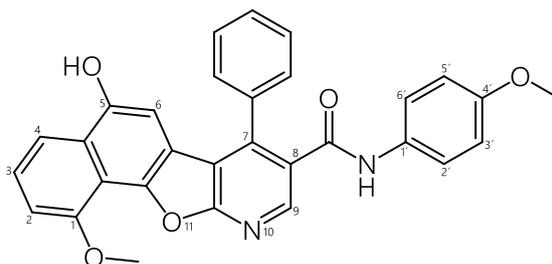
IR (ν̄): 1481, 1590 (s, ν_{C=C arom.}), 1527 (s, δ_{N-H, 3-CONH}), 1649 (m, ν_{C=O, 3-CONH}), 2840-2931 (w, m, ν_{C-H aliph.}), 3058 (m, ν_{C-H arom.}), 3279 (m, ν_{N-H, 3-CONH}), 3391 (w, ν_{O-H}) cm⁻¹.

MS (*m/z* (%))*: 1011,04 (100, [2×M+Na]⁺), 1013,20 (80, [2×M+Na]⁺), 495,93 (100, [M+H]⁺), 497,81 (60, [M+H]⁺), 499,75 (45, [M+H]⁺), 493,35 (100, [M]⁻), 495,35 (40, [M]⁻), (siehe 6.2.4).

HRMS/ESI (*m/z* (%)): gefunden für [M+H]⁺: 495,1097 (100), berechnet für [C₂₉H₂₀ClN₂O₄]⁺: 495,1106; gefunden für [M+H]⁺: 497,1075 (35), berechnet für [C₂₉H₂₀ClN₂O₄]⁺: 497,1077.

5-Hydroxy-1-methoxy-N-(4-methoxyphenyl)-7-phenylnaphtho[2',1':4,5]furo[2,3-b]pyridin-8-carboxamid

Verbindung: **47**
 Summenformel: $C_{30}H_{22}N_2O_5$
 Relative Molmasse $[M_r]$: 490,2



Darstellung nach AAV 3 (siehe 7.1):

In einem Dreihalsrundkolben wurden 1,15 g **15** (3,30 mmol, 1,00 eq) und 745,7 mg 5-Methoxy-1,4-naphthochinon (3,97 mmol, 1,22 eq) in wenig trockenem Dioxan suspendiert. Über einen Tropftrichter fügte man 89 mL einer Mischung aus 82,4 mL trockenem Dioxan und 6,6 mL Perchlorsäure (70 %) hinzu. Es zeigte sich ein Farbumschlag von orange zu grünbraun. Nach 24 h sowie alle 7 d wurde jeweils 150 mg 5-Methoxy-1,4-naphthochinon zum Reaktionsansatz ergänzt und schließlich nach 20 d, wie in AAV 3 beschrieben, aufgereinigt. Das ölige Rohprodukt wurde säulenchromatographisch (LM 3, siehe 6.2.2.1) aufgetrennt und die produktthaltige Fraktion, nach Entfernen des Lösungsmittels, aus Ethylacetat ausfallen gelassen (bei 2-8 °C). Die Titelverbindung konnte final nach zweimaligem Waschen mit Ethylacetat, Methanol, DCM und Diethylether erhalten werden.

Gelb gefärbter Feststoff.

Schmb.: 305-308 °C (aus EtOAc).

Ausbeute: 2,3 %.

DC-Kontrolle: LM 1: $R_f = 0,40$, LM 3: $R_f = 0,17$ (siehe 6.2.2.2).

1H -NMR (DMSO- d_6): $\delta = 10,19$ (s, 1H, -CONH-), 10,08 (s, 1H, 5-OH), 8,61 (s, 1H, **H-9**), 7,81 (dd, 1H, **H-4**, $^3J_{3/4} = 8,4$ Hz, $^4J_{2/4} = 0,9$ Hz), 7,61-7,48 (m, 6H, **H-3**, 7- C_6H_5), 7,37 (AA'BB', 2H, **H-2'**, **H-6'**), 7,21 (dd, 1H, **H-2**, $^3J_{2/3} = 8,0$ Hz, $^4J_{2/4} = 0,9$ Hz), 6,83 (AA'BB', 2H, **H-3'**, **H-5'**), 6,65 (s, 1H, **H-6**), 4,09 (s, 3H, 1-OCH₃), 3,69 (s, 3H, 4'-OCH₃).

^{13}C -NMR (DMSO- d_6): $\delta = 165,13$ (C=O), 162,68 (C10a), 156,02 (C4'), 155,22 (C1), 149,71 (C5), 144,18 (C9), 144,08 (C11a), 143,38 (C7), 135,33 (C1_{Ph}), 132,41 (C1'), 130,41 (C8), 129,39 (C4_{Ph}), 129,07 (C2_{Ph}, C6_{Ph}), 129,00 (C3_{Ph}, C5_{Ph}), 127,38 (C3), 127,12 (C4a), 121,59 (C2', C6'), 117,72 (C6a), 115,54 (C4), 114,66 (6b), 114,21 (C3', C5'), 113,55 (C11b), 107,71 (C2), 101,33 (C6), 56,44 (1-OCH₃), 55,63 (4'-OCH₃).

HPLC**: 99,06 % (t_R : 3,817 min), (Methode A, siehe 6.2.2.4).

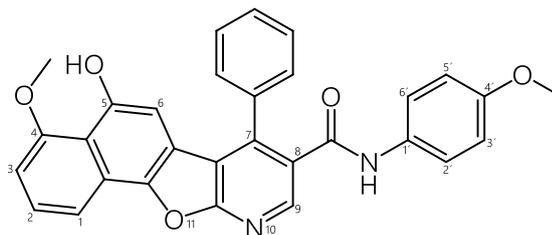
IR (ν): 1511, 1584, 1606 (s, w, $\nu_{C=C}$ arom.), 1525 (s, $\delta_{N-H, 3-CONH}$), 1645 (w, $\nu_{C=O, 3-CONH}$), 2836-2953 (w, m, ν_{C-H} aliph.), 3060 (m, ν_{C-H} arom.), 3295 (w, $\nu_{N-H, 3-CONH}$), 3398 (w, ν_{O-H}) cm^{-1} .

MS (m/z (%))*: 1003,17 (100, $[2 \times M + Na]^+$), 491,47 (25, $[M + H]^+$), 979,03 (25, $[2 \times M]^-$), 489,54 (100, $[M]^-$), (siehe 6.2.4).

HRMS/ESI (m/z (%)): gefunden für $[M + H]^+$: 491,1602 (100), berechnet für $[C_{30}H_{23}N_2O_5]^+$: 491,1601.

5-Hydroxy-4-methoxy-N-(4-methoxyphenyl)-7-phenylnaphtho[2',1':4,5]furo[2,3-b]pyridin-8-carboxamid

Verbindung: **47 Iso**
 Summenformel: C₃₀H₂₂N₂O₅
 Relative Molmasse [M_r]: 490,2



Darstellung nach AAV 3 (siehe 7.1):

Das Stellungsisomer konnte bei der Umsetzung von **47**, unter den gleichen Bedingungen, isoliert werden.

Grün gefärbter, faserartiger Feststoff.

Schmb.: 293-296 °C (aus EtOAc).

Ausbeute: 1,9 %.

DC-Kontrolle: LM 1: R_f = 0,42, LM 3: R_f = 0,16 (siehe 6.2.2.2).

¹H-NMR (DMSO-*d*₆): δ = 10,23 (s, 1H, -CONH-), 9,30 (s, 1H, 5-OH), 8,66 (s, 1H, **H-9**), 7,95 (dd, 1H, **H-1**, ³J_{1/2} = 8,4 Hz, ⁴J_{1/3} = 0,9 Hz), 7,64 („t“, 1H, **H-2**, ³J_{2/3} = 8,1 Hz), 7,59-7,53 (m, 5H, 7-C₆H₅), 7,38 (AA'BB', 2H, **H-2'**, **H-6'**), 7,16 (dd, 1H, **H-3**, ³J_{2/3} = 8,1 Hz, ⁴J_{1/3} = 0,9 Hz), 6,84 (AA'BB', 2H, **H-3'**, **H-5'**), 6,34 (s, 1H, **H-6**), 4,04 (s, 3H, 4-OCH₃), 3,69 (s, 3H, 4'-OCH₃).

¹³C-NMR (DMSO-*d*₆): δ = 164,84 (C=O), 162,77 (C10a), 157,01 (C4), 156,06 (C4'), 151,10 (C5), 144,90 (C9), 144,51 (C11a), 144,21 (C7), 135,24 (C1_{Ph}), 132,35 (C1), 130,50 (C8), 129,54 (C4_{Ph}), 129,02 (C2_{Ph}, C6_{Ph}), 129,00 (C3_{Ph}, C5_{Ph}), 128,87 (C2), 122,69 (C11b), 121,63 (C2', C6'), 118,28 (C6a), 115,37 (C4a), 114,76 (C6b), 114,24 (C3', C5'), 114,15 (C1), 107,37 (C3), 101,91 (C6), 57,01 (4-OCH₃), 55,63 (4'-OCH₃).

HPLC**: 99,60 % (t_R: 6,392 min), (Methode A, siehe 6.2.2.4).

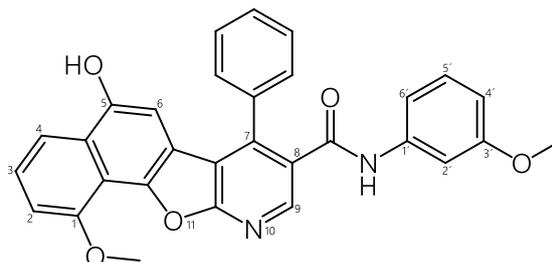
IR (ν̄): 1511, 1584, 1606 (s, w, ν_{C=C arom.}), 1525 (s, δ_{N-H, 3-CONH}), 1645 (w, ν_{C=O, 3-CONH}), 2836-2953 (w, m, ν_{C-H aliph.}), 3060 (m, ν_{C-H arom.}), 3295 (w, ν_{N-H, 3-CONH}), 3398 (w, ν_{O-H}) cm⁻¹.

MS (m/z (%))*: 1003,17 (100, [2×M+Na]⁺), 491,47 (25, [M+H]⁺), 979,03 (25, [2×M]⁻), 489,54 (100, [M]⁻), (siehe 6.2.4).

HRMS/ESI (m/z (%)): gefunden für [M+H]⁺: 491,1588 (100), berechnet für [C₃₀H₂₃N₂O₅]⁺: 491,1601.

5-Hydroxy-1-methoxy-N-(3-methoxyphenyl)-7-phenylnaphtho[2',1':4,5]furo[2,3-b]pyridin-8-carboxamid

Verbindung: **48**
 Summenformel: $C_{30}H_{22}N_2O_5$
 Relative Molmasse $[M_r]$: 490,2



Darstellung nach AAV 3 (siehe 7.1):

In einem Dreihalsrundkolben wurden 1,24 g **16** (3,56 mmol, 1,00 eq) und 803,7 mg 5-Methoxy-1,4-naphthochinon (4,34 mmol, 1,22 eq) in wenig trockenem Dioxan suspendiert. Über einen Tropftrichter fügte man 70 mL einer Mischung aus 62,9 mL trockenem Dioxan und 7,1 mL Perchlorsäure (70 %) hinzu. Es zeigte sich ein Farbumschlag von gelb nach rotbraun. Nach 21 d wurde der Ansatz, wie in AAV 3 beschrieben, aufgereinigt. Das ölige Rohprodukt wurde säulenchromatographisch (LM 3, siehe 6.2.2.1) aufgetrennt, die produktthaltige Fraktion, nach Entfernen des Lösungsmittels, in Ethylacetat gelöst und durch tropfenweises Ergänzen von Cyclohexan zur Fällung gebracht (bei 2-8 °C). Die Titelverbindung konnte final nach zweimaligem Waschen mit einer Lösung aus Cyclohexan und Ethylacetat (2:1, V/V) und Isopropanol erhalten werden.

Beige gefärbter Feststoff.

Schmb.: 278-280 °C (aus EtOAc).

Ausbeute: 2,0 %.

DC-Kontrolle: LM 1: $R_f = 0,41$, LM 2: $R_f = 0,28$ (siehe 6.2.2.2).

1H -NMR (DMSO- d_6): $\delta = 10,34$ (s, 1H, -CONH-), 10,08 (s, 1H, 5-OH), 8,63 (s, 1H, **H-9**), 7,81 (dd, 1H, **H-4**, $^3J_{3/4} = 8,5$ Hz, $^4J_{2/4} = 0,8$ Hz), 7,60-7,48 (m, 6H, **H-3**, 7- C_6H_5), 7,22 (dd, 1H, **H-2**, $^3J_{2/3} = 8,2$ Hz, $^4J_{2/4} = 0,8$ Hz), 7,24-7,20 (m, 1H, **H-2'**), 7,19-7,13 (m, 1H, **H-6'**), 7,05-7,01 (m, 1H, **H-5'**), 6,67-6,58 (m, 2H, **H-6**, **H-4'**), 4,09 (s, 3H, 1-OCH₃), 3,69 (s, 3H, 3'-OCH₃).

HPLC*: 97,75 % (t_R : 13,611 min), (siehe 6.2.2.4).

IR ($\tilde{\nu}$): 1542, 1597 (m, $\nu_{C=C}$ arom.), 1638 (m, $\nu_{C=O}$, 3-CONH), 2836 (w, ν_{C-H} aliph.), 3029 (m, ν_{C-H} arom.), 3070 (m, ν_{O-H}) cm^{-1} .

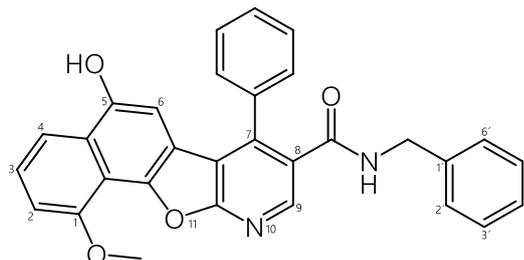
MS (m/z (%))*: 1003,19 (100, $[2 \times M + Na]^+$), 491,67 (25, $[M + H]^+$), 979,25 (40, $[2 \times M]^+$), 489,55 (100, $[M]^+$), (siehe 6.2.4).

HRMS/ESI (m/z (%)): gefunden für $[M + H]^+$: 491,1610 (35), berechnet für $[C_{30}H_{23}N_2O_5]^+$: 491,1601.

Synthese der Verbindungen

N-Benzyl-5-Hydroxy-1-methoxy-7-phenylnaphtho[2',1':4,5]furo[2,3-b]pyridin-8-carboxamid

Verbindung: **49**
Summenformel: $C_{30}H_{22}N_2O_4$
Relative Molmasse $[M_r]$: 474,2



Darstellung nach AAV 3 (siehe 7.1):

In einem Dreihalsrundkolben wurden 1,50 g **17** (4,50 mmol, 1,00 eq) und 1,02 g 5-Methoxy-1,4-naphthochinon (5,40 mmol, 1,22 eq) in wenig trockenem Dioxan suspendiert. Über einen Tropftrichter fügte man 60 mL einer Mischung aus 51,0 mL trockenem Dioxan und 9,0 mL Perchlorsäure (70 %) hinzu. Es zeigte sich ein Farbumschlag von rot nach braun. Nach 34 d wurde der Ansatz, wie in AAV 3 beschrieben, aufgereinigt. Das ölige Rohprodukt wurde säulenchromatographisch (LM 2, siehe 6.2.2.1) aufgetrennt und die produktthaltige Fraktion, nach Entfernen des Lösungsmittels, aus Aceton ausfallen gelassen (bei 2-8 °C). Die Titelverbindung konnte final nach zweimaligem Waschen mit Aceton und Ethylacetat erhalten werden.

Hellbraun gefärbter Feststoff.

Schmb.: 274-277 °C (aus Aceton).

Ausbeute: 1,2 %.

DC-Kontrolle: LM 1: $R_f = 0,28$, LM 2: $R_f = 0,16$ (siehe 6.2.2.2).

1H -NMR (DMSO- d_6): $\delta = 10,06$ (s, 1H, 5-OH), 8,83 (t, 1H, -CONH-, $^3J_{NH/CH_2} = 5,9$ Hz), 8,49 (s, 1H, H-9), 7,79 (dd, 1H, H-4, $^3J_{3/4} = 8,5$ Hz, $^4J_{2/4} = 0,9$ Hz), 7,67-7,46 (m, 6H, H-3, 7-C₆H₅), 7,27-7,15 (m, 4H, H-2, H-3'-H-5'), 7,00-6,93 (m, 2H, H-2', H-6'), 6,59 (s, 1H, H-6), 4,29 (d, 2H, -CH₂-, $^3J_{NH/CH_2} = 5,9$ Hz), 4,08 (s, 3H, 1-OCH₃).

HPLC*: 98,36 % (t_R : 13,782 min), (siehe 6.2.2.4).

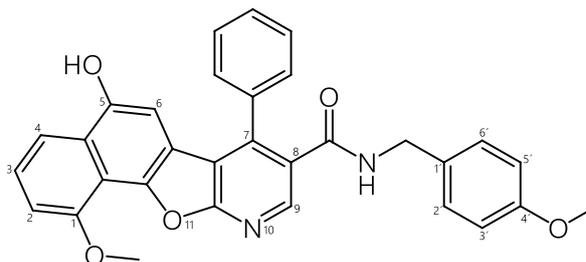
IR ($\tilde{\nu}$): 1534, 1580 (s, $\nu_{C=C arom.}$), 1636 (m, $\nu_{C=O, 3-CONH}$), 2937, 2962 (w, $\nu_{C-H aliph.}$), 3055 (w, $\nu_{C-H arom.}$), 3430 (m, $\nu_{N-H, 3-CONH}$) cm^{-1} .

MS (m/z (%))*: 971,13 (100, $[2 \times M + Na]^+$), 949,17 (15, $[2 \times M + Na]^+$), 475,73 (45, $[M + H]^+$), 947,24 (55, $[2 \times M]^+$), 473,56 (100, $[M]^+$), (siehe 6.2.4).

HRMS/ESI (m/z (%)): gefunden für $[M + H]^+$: 475,1647 (100), berechnet für $[C_{30}H_{23}N_2O_4]^+$: 475,1652.

5-Hydroxy-1-methoxy-N-(4-methoxybenzyl)-7-phenylnaphtho[2',1':4,5]furo[2,3-b]pyridin-8-carboxamid

Verbindung: **50**
 Summenformel: $C_{31}H_{24}N_2O_5$
 Relative Molmasse $[M_r]$: 504,2



Darstellung nach AAV 3 (siehe 7.1):

In einem Dreihalsrundkolben wurden 1,28 g **20** (3,50 mmol, 1,00 eq) und 797,5 mg 5-Methoxy-1,4-naphthochinon (4,20 mmol, 1,22 eq) in wenig trockenem Dioxan suspendiert. Über einen Tropftrichter fügte man 80 mL einer Mischung aus 73,0 mL trockenem Dioxan und 7,0 mL Perchlorsäure (70 %) hinzu. Es zeigte sich ein Farbumschlag von hellbraun nach rotbraun. Nach 7 d sowie 14 d wurde jeweils 150 mg 5-Methoxy-1,4-naphthochinon zum Reaktionsansatz ergänzt und schließlich nach 41 d, wie in AAV 3 beschrieben, aufgereinigt. Das ölige Rohprodukt wurde säulenchromatographisch (LM 1, siehe 6.2.2.1) aufgetrennt und die produktthaltige Fraktion, nach Entfernen des Lösungsmittels, aus Ethylacetat ausfallen gelassen (bei 2-8 °C). Den erhaltenen amorphen, hellbraunen Niederschlag (HPLC-Reinheit: 42,6 %) löste man in 1,5 mL eines Gemisches aus Methanol und DMSO (1:1) und führte eine präparative HPLC (siehe 6.2.2.4) durch. Nach Vereinen der produktreichen Fraktionen wurde das Lösungsmittel durch Lyophilisierung entfernt und der Rückstand, aus Aceton, ausfallen gelassen.

Orange gefärbter Feststoff.

Schmb.: 272-277 °C (aus Aceton).

Ausbeute: 0,8 %.

DC-Kontrolle: LM 1: $R_f = 0,34$ (siehe 6.2.2.2).

1H -NMR (DMSO- d_6): $\delta = 10,05$ (s, 1H, 5-OH), 8,75 (t, 1H, -CONH-, $^3J_{NH/CH_2} = 5,9$ Hz), 8,47 (s, 1H, **H-9**), 7,79 (dd, 1H, **H-4**, $^3J_{3/4} = 8,4$ Hz, $^4J_{2/4} = 0,9$ Hz), 7,67-7,46 (m, 6H, **H-3**, 7-C₆H₅), 7,23-7,16 (m, 1H, **H-2**), 6,90 (AA'BB', 2H, **H-2'**, **H-6'**), 6,79 (AA'BB', 2H, **H-3'**, **H-5'**), 6,59 (s, 1H, **H-6**), 4,22 (d, 2H, -CH₂-, $^3J_{NH/CH_2} = 5,9$ Hz), 4,08 (s, 3H, 1-OCH₃), 3,73 (s, 3H, 4'-OCH₃).

HPLC*: 93,21 % (t_R : 13,287 min), (siehe 6.2.2.4).

IR (ν): 1511 (w, $\nu_{C=C arom.}$), 1618 (w, $\delta_{N-H, 3-CONH}$), 2853, 2924 (s, m, $\nu_{C-H aliph.}$), 3407 (w, $\nu_{N-H, 3-CONH}$) cm^{-1} .

MS (m/z (%))*: 1031,18 (100, $[2 \times M + Na]^+$), 527,61 (35, $[M + Na]^+$), 1007,30 (55, $[2 \times M]^-$), 503,60 (100, $[M]^-$), (siehe 6.2.4).

HRMS/ESI (m/z (%)): gefunden für $[M+H]^+$: 505,1751 (100), berechnet für $[C_{31}H_{25}N_2O_5]^+$: 505,1758.

7.2.3 Syntheseriehe der 1-Aza-9-oxafluoren- sowie 10-Aza-11-oxabenz[o]fluoren-Derivate des Oximether- und Carbaldehydtyps

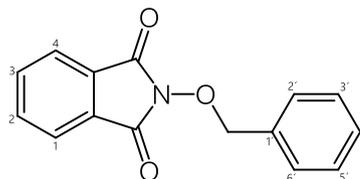
7.2.3.1 2-(Benzyloxy)isoindolin-1,3-dion-Derivate

2-(Benzyloxy)isoindolin-1,3-dion

Verbindung: **51**

Summenformel: $C_{15}H_{11}NO_3$

Relative Molmasse $[M_r]$: 253,1



Darstellung nach AAV 4 (siehe 7.1):

In einem Rundkolben wurden 3,3 g *N*-Hydroxyphthalimid (20,0 mmol, 1,0 eq) und 4,6 mL Benzylchlorid (5,0 g, 40,0 mmol, 2,0 eq) mittels 4,2 mL TEA (3,1 g, 20,0 mmol, 1,0 eq) in 35 mL DMF bei 90 °C zur Titelverbindung umgesetzt.

Farbloser Feststoff.

Schmb.: 135-138 °C (aus H_2O); Literatur: 146-148 °C (aus EtOH).^[332]

Ausbeute: 98,3 %.

DC-Kontrolle: LM 1: $R_f = 0,60$ (siehe 6.2.2.2).

1H -NMR (DMSO- d_6): $\delta = 7,84$ (s, 4H, **H-1-H-4**), 7,55-7,45 (m, 2H, **H-2'**, **H-6'**), 7,44-7,34 (m, 3H, **H-3'-H-5'**), 5,15 (s, 2H, $-CH_2-$).

IR ($\tilde{\nu}$): 1588, 1606 (*w*, $\nu_{C=C \text{ arom.}}$), 1726 (*s*, $\nu_{C=O}$), 1788 (*w*, ν_{N-O}), 2887, 2955 (*w*, $\nu_{C-H \text{ aliph.}}$), 3030, 3078 (*w*, $\nu_{C-H \text{ arom.}}$) cm^{-1} .

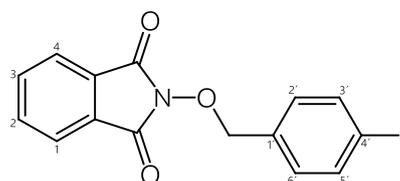
MS (m/z (%))*: 276,30 (100, $[M+Na]^+$), (siehe 6.2.4).

2-((4-Fluorobenzyl)oxy)isoindolin-1,3-dion

Verbindung: **52**

Summenformel: $C_{15}H_{10}FNO_3$

Relative Molmasse $[M_r]$: 271,1



Darstellung AAV 4 (siehe 7.1):

In einem Rundkolben wurden 2,0 g *N*-Hydroxyphthalimid (12,3 mmol, 1,0 eq) und 2,2 mL 4-Fluorobenzylchlorid (2,7 g, 18,4 mmol, 1,5 eq) mittels 2,6 mL TEA (1,9 g, 12,3 mmol, 1,0 eq) in 35 mL DMF bei 90 °C zur Titelverbindung umgesetzt.

Farbloser Feststoff.

Schmb.: 141-144 °C (aus H_2O); Literatur: 148-150 °C.^[333]

Ausbeute: 89,8 %.

DC-Kontrolle: LM 1: $R_f = 0,63$ (siehe 6.2.2.2).

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6): $\delta = 7,84$ (s, 4H, **H-1-H-4**), 7,55 (AA'BB', 2H, **H-2'**, **H-6'**), 7,21 (AA'BB', 2H, **H-3'**, **H-5'**), 5,14 (s, 2H, $-\text{CH}_2-$).

IR ($\tilde{\nu}$): 1513, 1603 (w, $\nu_{\text{C}=\text{C arom.}}$), 1722 (s, $\nu_{\text{C}=\text{O}}$), 1775 (w, $\nu_{\text{N-O}}$), 2903, 2961 (w, $\nu_{\text{C-H aliph.}}$), 3038-3096 (w, $\nu_{\text{C-H arom.}}$) cm^{-1} .

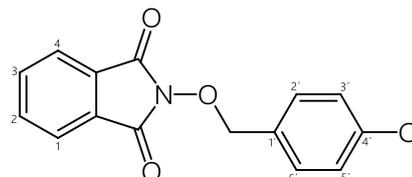
MS (m/z (%))*: 294,15 (40, $[\text{M}+\text{Na}]^+$), (siehe 6.2.4).

2-((4-Chlorobenzyl)oxy)isoindolin-1,3-dion

Verbindung: **53**

Summenformel: $\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{ClNO}_3$

Relative Molmasse [M_r]: 287,1



Darstellung nach AAV 4 (siehe 7.1):

In einem Rundkolben wurden 3,3 g *N*-Hydroxyphthalimid (20,0 mmol, 1,0 eq) und 6,4 g 4-Chlorobenzylchlorid (40,0 mmol, 2,0 eq) mittels 4,2 mL TEA (3,1 g, 20,0 mmol, 1,0 eq) in 35 mL DMF bei 90 °C zur Titelverbindung umgesetzt.

Farblos bis hellgelb gefärbter Feststoff.

Schmb.: 123-124 °C (aus H_2O) °C; Literatur: 137-138 °C (aus EtOH).^[334]

Ausbeute: 88,9 %.

DC-Kontrolle: LM 1: $R_f = 0,64$ (siehe 6.2.2.2).

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6): $\delta = 7,84$ (s, 4H, **H-1-H-4**), 7,49 (AA'BB', 4H, **H-2'**, **H-3'**, **H-5'**, **H-6'**), 5,15 (s, 2H, $-\text{CH}_2-$).

IR ($\tilde{\nu}$): 1597 (w, $\nu_{\text{C}=\text{C arom.}}$), 1718 (s, $\nu_{\text{C}=\text{O}}$), 1787 (w, $\nu_{\text{N-O}}$), 2865-2961 (w, $\nu_{\text{C-H aliph.}}$), 3020-3096 (w, $\nu_{\text{C-H arom.}}$) cm^{-1} .

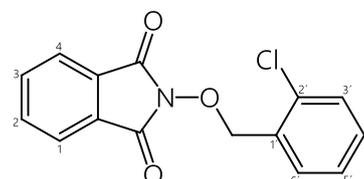
MS (m/z (%))*: 597,38 (100, $[2 \times \text{M}+\text{Na}]^+$), 310,43 (93, $[\text{M}+\text{Na}]^+$), (siehe 6.2.4).

2-((2-Chlorobenzyl)oxy)isoindolin-1,3-dion

Verbindung: **54**

Summenformel: $\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{ClNO}_3$

Relative Molmasse [M_r]: 287,1



Darstellung (siehe 7.1):

A) nach AAV 4: In einem Rundkolben wurden 3,3 g *N*-Hydroxyphthalimid (20,0 mmol, 1,0 eq) und 5,0 mL 2-Chlorobenzylchlorid (6,3 g, 22,0 mmol, 1,1 eq) mittels 4,2 mL TEA (3,1 g, 20,0 mmol, 1,0 eq) in 35 mL DMF bei 90 °C zur Titelverbindung umgesetzt.

B) MITSUNOBU-Reaktion:

In einem Rundkolben wurde 1,63 g *N*-Hydroxyphthalimid (10,0 mmol, 1,0 eq) mit 2,62 g Triphenylphosphin (10,0 mmol, 1,0 eq) in 30 mL THF gelöst und auf 0 °C gebracht. Unter Verfärbung der Lösung von farblos zu dunkelrot fügte man 1,9 mL DIAD (2,0 g, 10,0 mmol, 1,0 eq) hinzu. Für

Synthese der Verbindungen

weitere 20 min unter Argonbegasung bei 0 °C sowie anschließende zwei Stunden bei derselben Temperatur ließ man den Ansatz ruhen, der eine gelbe Suspension bildete. Nachfolgend wurde 1,42 g 2-Chlorobenzylalkohol (10,0 mmol, 1,0 eq) addiert. Nach 5 bis 10 min ging der suspendierte Niederschlag bei RT wieder in Lösung. Das Gemisch wurde folglich 24 h bei RT weiter umgesetzt. Die resultierende farblos bis hellgelb gefärbte Lösung wurde nach einer Wasser-Chloroform-Extraktion und anschließendem Einengen der organischen Phase säulenchromatographisch aufgereinigt (LM 1, siehe 6.2.2.1). Die Produktfraktion engte man zum öligen Rückstand ein und trocknete den entstandenen Niederschlag 24-36 h im Exsikkator.

Farbloser bis hellgrau gefärbter Feststoff.

Schmb.: 140-144 °C (aus H₂O); Literatur: 154-156 °C.^[333]

Ausbeute: A) 86,0 %, B) 74,0 %.

DC-Kontrolle: LM 1: R_f = 0,61 (siehe 6.2.2.2).

¹H-NMR (DMSO-*d*₆): δ = 7,83 (s, 4H, **H-1-H-4**), 7,57-7,21 (m, 4H, **H-3'-H-6'**), 5,27 (s, 2H, -CH₂-).

IR (ν̄): 1597, 1610 (w, ν_{C=C arom.}), 1721 (s, ν_{C=O}), 1784 (w, ν_{N-O}), 2960-2990 (w, ν_{C-H aliph.}), 3018-3096 (w, ν_{C-H arom.}) cm⁻¹.

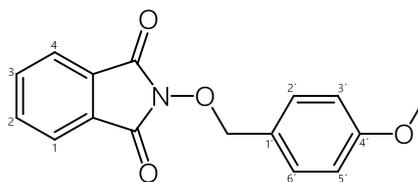
MS (*m/z* (%))*: 597,36 (30, [2×M+Na]⁺), 310,46 (100, [M+Na]⁺), (siehe 6.2.4).

2-((4-Methoxybenzyl)oxy)isoindolin-1,3-dion

Verbindung: **55**

Summenformel: C₁₆H₁₃NO₄

Relative Molmasse [M_r]: 283,1



Darstellung (siehe 7.1):

A) nach AAV 4: In einem Rundkolben wurden 6,5 g *N*-Hydroxyphthalimid (40,0 mmol, 1,0 eq) und 5,4 mL 4-Methoxybenzylchlorid (6,3 g, 40,0 mmol, 1,0 eq) mittels 8,4 mL TEA (6,1 g, 40,0 mmol, 1,0 eq) in 60 mL DMF bei 90 °C zur Titelverbindung umgesetzt.

B) MITSUNOBU-Reaktion: In einem Rundkolben wurde 3,26 g *N*-Hydroxyphthalimid (20,0 mmol, 1,0 eq) mit 5,24 g Triphenylphosphin (20,0 mmol, 1,0 eq) in 80 mL THF gelöst und auf 0 °C gebracht. Unter Verfärbung der Lösung von farblos zu dunkelrot fügte man 3,90 mL DIAD (4,04 g, 20,0 mmol, 1,0 eq) hinzu. Für weitere 20 min unter Argonbegasung bei 0 °C sowie anschließende zwei Stunden bei derselben Temperatur ließ man den Ansatz ruhen, der eine gelbe Suspension bildete. Nachfolgend wurde 2,66 mL 4-Methoxybenzylalkohol (2,76 g, 20,0 mmol, 1,0 eq) addiert. Nach 5 bis 10 min ging der suspendierte Niederschlag bei RT wieder in Lösung. Das Gemisch wurde folglich 24 h bei RT weiter umgesetzt. Die resultierende farblos bis hellgelb gefärbte Lösung wurde nach einer Wasser-Chloroform-Extraktion und anschließendem Einengen der organischen Phase säulenchromatographisch aufgereinigt (LM 1 siehe 6.2.2.1). Die Produktfraktion engte man zum öligen Rückstand ein, verdünnte sie mit Aceton und gab anteilig destilliertes Wasser bis zur Präzipitatbildung hinzu. Der entstandene Niederschlag war mit einer G3-Fritte filtriert und 24-36 h im Exsikkator getrocknet worden.

Farbloser Feststoff.

Schmb.: 132-135 °C (aus H₂O), Literatur: 138-140 °C.^[335]

Ausbeute: A) 94,5 %, B) 99,1 %.

DC-Kontrolle: LM 1: $R_f = 0,58$ (siehe 6.2.2.2).

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6): $\delta = 7,88\text{-}7,77$ (m, 4H, **H-1-H-4**), 7,40 (AA'BB', 2H, **H-2'**, **H-6'**), 6,93 (AA'BB', 2H, **H-3'**, **H-5'**), 5,07 (s, 2H, **-CH₂-**), 3,64 (s, 3H, 4'-**OCH₃**).

IR (ν): 1585, 1610 (*w, m*, $\nu_{\text{C}=\text{C arom.}}$), 1731 (*s*, $\nu_{\text{C}=\text{O}}$), 1785 (*w*, $\nu_{\text{N-O}}$), 2837-2962 (*w*, $\nu_{\text{C-H aliph.}}$), 3017-3096 (*w*, $\nu_{\text{C-H arom.}}$) cm^{-1} .

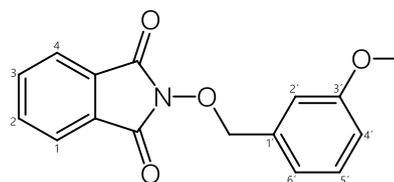
MS (m/z (%))*: 590,21 (80, $[2 \times \text{M} + \text{Na}]^+$), 306,04 (100, $[\text{M} + \text{Na}]^+$), (siehe 6.2.4).

2-((3-Methoxybenzyl)oxy)isoindolin-1,3-dion

Verbindung: **56**

Summenformel: $\text{C}_{16}\text{H}_{13}\text{NO}_4$

Relative Molmasse [M_r]: 283,1



Darstellung nach AAV 4 (siehe 7.1):

In einem Rundkolben wurden 3,0 g *N*-Hydroxyphthalimid (18,4 mmol, 1,0 eq) und 4,3 g 3-Methoxybenzylchlorid (27,6 mmol, 1,5 eq) mittels 3,9 mL TEA (2,8 g, 18,4 mmol, 1,0 eq) in 50 mL DMF bei 90 °C zur Titelverbindung umgesetzt.

Hellgelb gefärbter Feststoff.

Schmb.: 100-104 °C (aus H_2O); Literatur: 121 °C.^[336]

Ausbeute: 73,0 %.

DC-Kontrolle: LM 1: $R_f = 0,70$ (siehe 6.2.2.2).

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6): $\delta = 7,84$ (s, 4H, **H-1-H-4**), 7,29 (dd, 1H, **H-5'**, $^3J_{4'/5'} = 8,3$ Hz, $^3J_{5'/6'} = 7,5$ Hz), 7,08 (dd, 1H, **H-2'**, $^4J_{2'/4'} = 2,6$ Hz, $^4J_{2'/6'} = 1,2$ Hz), 7,05 (dt, 1H, **H-6'**, $^3J_{5'/6'} = 7,5$ Hz, $^4J_{4'/6'} = 1,2$ Hz), 6,93 (ddd, 1H, **H-4'**, $^3J_{4'/5'} = 8,3$ Hz, $^4J_{2'/4'} = 2,6$ Hz, $^4J_{4'/6'} = 1,2$ Hz), 5,13 (s, 2H, **-CH₂-**), 3,74 (s, 3H, 3'-**OCH₃**).

IR (ν): 1587, 1603 (*m*, $\nu_{\text{C}=\text{C arom.}}$), 1733 (*s*, $\nu_{\text{C}=\text{O}}$), 1785 (*w*, $\nu_{\text{N-O}}$), 2805-2960 (*w*, $\nu_{\text{C-H aliph.}}$), 3005-3077 (*w*, $\nu_{\text{C-H arom.}}$) cm^{-1} .

MS (m/z (%))*: 306,22 (85, $[\text{M} + \text{Na}]^+$), (siehe 6.2.4).

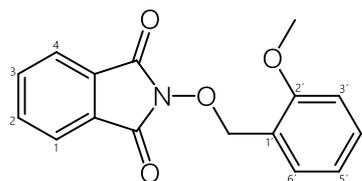
Synthese der Verbindungen

2-((2-Methoxybenzyl)oxy)isoindolin-1,3-dion

Verbindung: **57**

Summenformel: $C_{16}H_{13}NO_4$

Relative Molmasse $[M_r]$: 283,1



Darstellung (siehe 7.1):

A) nach AAV 4: In einem Rundkolben wurden 3,3 g *N*-Hydroxyphthalimid (20,0 mmol, 1,0 eq) und 6,4 g 2-Methoxybenzylchlorid (40,0 mmol, 2,0 eq) mittels 4,2 mL TEA (3,1 g, 20,0 mmol, 1,0 eq) in 35 mL DMF bei 90 °C zur Titelverbindung umgesetzt.

B) MITSUNOBU-Reaktion:

In einem Rundkolben wurde 3,26 g *N*-Hydroxyphthalimid (20,0 mmol, 1,0 eq) mit 5,24 g Triphenylphosphin (20,0 mmol, 1,0 eq) in 80 mL THF gelöst und auf 0 °C gebracht. Unter Verfärbung der Lösung von farblos zu dunkelrot fügte man 3,90 mL DIAD (4,04 g, 20,0 mmol, 1,0 eq) hinzu. Für weitere 20 min unter Argonbegasung bei 0 °C sowie anschließende zwei Stunden bei derselben Temperatur ließ man den Ansatz ruhen, der eine gelbe Suspension bildete. Nachfolgend wurde 2,66 mL 2-Methoxybenzylalkohol (2,76 g, 20,0 mmol, 1,0 eq) addiert. Nach 5 bis 10 min ging der suspendierte Niederschlag bei RT wieder in Lösung. Das Gemisch wurde folglich 24 h bei RT weiter umgesetzt. Die resultierende farblos bis hellgelb gefärbte Lösung wurde nach einer Wasser-Chloroform-Extraktion und anschließendem Einengen der organischen Phase säulenchromatographisch aufgereinigt (LM 1 siehe 6.2.2.1). Die Produktfraktion engte man zum öligen Rückstand ein, verdünnte sie mit Aceton und gab anteilig destilliertes Wasser bis zur Präzipitatbildung hinzu. Der entstandene Niederschlag ist mit einer G3-Fritte filtriert und 24-36 h im Exsikkator getrocknet worden.

Farbloser Feststoff.

Schmb.: 72-75 °C (aus H_2O).

Ausbeute: A) 92,0 %, B) 98,4 %.

DC-Kontrolle: LM 1: $R_f = 0,58$ (siehe 6.2.2.2).

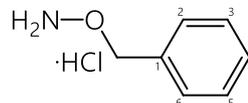
1H -NMR (DMSO- d_6): $\delta = 7,88-7,77$ (m, 4H, **H-1-H-4**), $7,44-7,28$ (m, 2H, **H-5'**, **H-6'**), $7,00-6,89$ (m, 2H, **H-3'**, **H-4'**), $5,16$ (s, 2H, $-CH_2-$), $3,64$ (s, 3H, $2'-OCH_3$).

IR (ν): 1524, 1602 (m, w, $\nu_{C=C arom.}$), 1686 (s, $\nu_{C=O}$), 1733 (m, ν_{N-O}), 2827-2979 (w, $\nu_{C-H aliph.}$), 3033 (w, $\nu_{C-H arom.}$) cm^{-1} .

MS (m/z (%))*: 306,07 (100, $[M+Na]^+$), (siehe 6.2.4).

7.2.3.2 O-Benzylhydroxylaminhydrochlorid-Derivate

O-Benzylhydroxylaminhydrochlorid

Verbindung: **58**Summenformel: $C_7H_{10}ClNO$ Relative Molmasse $[M_r]$: 159,1

Darstellung nach AAV 5 (siehe 7.1):

In einem Rundkolben wurde 3,18 g **51** (20,0 mmol, 1,0 eq) in 70 mL DCM gelöst und wie in AAV 5 beschrieben, mit 2,1 mL Hydrazin Hydrat 98 % (**giftig!**, 2,0 g, 40,0 mmol, 2,0 eq) zum O-Benzylhydroxylamin umgesetzt. Zur Salzbildung benötigte man 1,7 mL Salzsäure (37 %; 1,9 g, 20,0 mmol, 1,0eq).

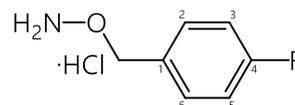
Farbloser Feststoff.

Schmb.: 160-164 °C (aus *i*-PrOH).

Ausbeute: 15,0 %.

DC-Kontrolle: LM 1: $R_f = 0,66$ (siehe 6.2.2.2). 1H -NMR (DMSO- d_6): $\delta = 11,18$ (s, 3H, H_3N^+-OBn), 7,40 (s, 5H, **H-2-H-6**), 5,04 (s, 2H, $-CH_2-$).MS (m/z (%)) der freien Base*: 124,16 (55, $[M+H]^+$), (siehe 6.2.4).

O-(4-Fluorobenzyl)hydroxylaminhydrochlorid

Verbindung: **59**Summenformel: C_7H_9ClFNO Relative Molmasse $[M_r]$: 177,1

Darstellung nach AAV 5 (siehe 7.1):

In einem Rundkolben wurde 2,90 g **52** (10,8 mmol, 1,0 eq) in 50 mL DCM gelöst und wie in AAV 5 beschrieben, mit 1,1 mL Hydrazin Hydrat 98 % (**giftig!**, 1,1 g, 21,7 mmol, 2,0 eq) zum O-(4-Fluorobenzyl)hydroxylamin umgesetzt. Zur Salzbildung benötigte man 0,9 mL Salzsäure (37 %; 1,0 g, 10,8 mmol, 1,0eq).

Farbloser Feststoff.

Schmb.: 200-203 °C (aus *i*-PrOH).

Ausbeute: 77,5 %.

DC-Kontrolle: LM 1: $R_f = 0,66$ (siehe 6.2.2.2). 1H -NMR (DMSO- d_6): $\delta = 11,14$ (s, 3H, H_3N^+-OBn), 7,46 (AA'BB', 2H, **H-2, H-6**), 7,24 (AA'BB', 2H, **H-3, H-5**), 5,02 (s, 2H, $-CH_2-$).MS (m/z (%)) der freien Base*: 283,00 (50, $[2 \times M]^+$), (siehe 6.2.4).

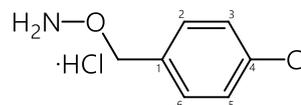
Synthese der Verbindungen

O-(4-Chlorobenzyl)hydroxylaminhydrochlorid

Verbindung: **60**

Summenformel: $C_7H_9Cl_2NO$

Relative Molmasse [M_r]: 193,0



Darstellung nach AAV 5 (siehe 7.1):

In einem Rundkolben wurde 3,86 g **53** (20,0 mmol, 1,0 eq) in 70 mL DCM gelöst und wie in AAV 5 beschrieben, mit 2,1 mL Hydrazin Hydrat 98 % (**giftig!**, 2,0 g, 40,0 mmol, 2,0 eq) zum O-(4-Chlorobenzyl)hydroxylamin umgesetzt. Zur Salzbildung benötigte man 1,7 mL Salzsäure (37 %; 1,9 g, 20,0 mmol, 1,0eq).

Farbloser Feststoff.

Schmb.: 112-116 °C (aus *i*-PrOH).

Ausbeute: 36,9 %.

DC-Kontrolle: LM 1: $R_f = 0,60$ (siehe 6.2.2.2).

1H -NMR (DMSO- d_6): $\delta = 11,05$ (s, 3H, H_3N^+-OBn), 7,52-7,36 (AA'BB' 4H, **H-2**, **H-3**, **H-5**, **H-6**), 5,02 (s, 2H, $-CH_2-$).

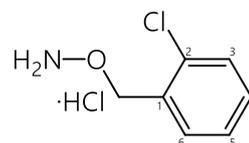
MS (m/z (%)) der freien Base*: 353,88 (45, $[2 \times M + K]^+$), (siehe 6.2.4).

O-(2-Chlorobenzyl)hydroxylaminhydrochlorid

Verbindung: **61**

Summenformel: $C_7H_9Cl_2NO$

Relative Molmasse [M_r]: 193,0



Darstellung nach AAV 5 (siehe 7.1):

In einem Rundkolben wurde 5,74 g **54** (29,7 mmol, 1,0 eq) in 70 mL DCM gelöst und wie in AAV 5 beschrieben, mit 3,1 mL Hydrazin Hydrat 98 % (**giftig!**, 3,0 g, 59,5 mmol, 2,0 eq) zum O-(2-Chlorobenzyl)hydroxylamin umgesetzt. Zur Salzbildung benötigte man 2,5 mL Salzsäure (37 %; 2,9 g, 29,7 mmol, 1,0eq).

Orange gefärbter Feststoff.

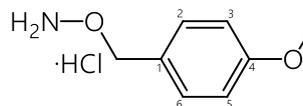
Ausbeute: 13,0 %.

DC-Kontrolle: LM 1: $R_f = 0,59$ (siehe 6.2.2.2).

1H -NMR (DMSO- d_6): $\delta = 11,03$ (s, 3H, H_3N^+-OBn), 7,49-7,35 (m 4H, **H-3-H-6**), 5,02 (s, 2H, $-CH_2-$).

MS (m/z (%)) der freien Base*: 198,13 (15, $[M + K]^+$), (siehe 6.2.4).

O-(4-Methoxybenzyl)hydroxylaminhydrochlorid

Verbindung: **62**Summenformel: $C_8H_{12}ClNO_2$ Relative Molmasse $[M_r]$: 189,1

Darstellung nach AAV 5 (siehe 7.1):

In einem Rundkolben wurde 3,78 g **55** (20,0 mmol, 1,0 eq) in 70 mL DCM gelöst und wie in AAV 5 beschrieben, mit 2,1 mL Hydrazin Hydrat 98 % (**giftig!**, 2,0 g, 40,0 mmol, 2,0 eq) zum O-(4-Methoxybenzyl)hydroxylamin umgesetzt. Zur Salzbildung benötigte man 1,7 mL Salzsäure (37 %; 1,9 g, 20,0 mmol, 1,0eq).

Hellgelb gefärbter Feststoff.

Schmb.: 123-125 °C (aus *i*-PrOH).

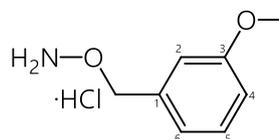
Ausbeute: 32,5 %.

DC-Kontrolle: LM 1: $R_f = 0,63$ (siehe 6.2.2.2).

1H -NMR (DMSO- d_6): $\delta = 10,97$ (s, 3H, H_3N^+ -OBn), 7,37-7,30 (AA'BB', 2H, **H-2**, **H-6**), 6,99-6,90 (AA'BB', 2H, **H-3**, **H-5**), 4,93 (s, 2H, -CH₂-), 3,75 (s, 3H, 4-OCH₃).

MS (m/z (%)) der freien Base*: 459,35 (60, [3×M]⁺), (siehe 6.2.4).

O-(3-Methoxybenzyl)hydroxylaminhydrochlorid

Verbindung: **63**Summenformel: $C_8H_{12}ClNO_2$ Relative Molmasse $[M_r]$: 189,1

Darstellung nach AAV 5 (siehe 7.1)

In einem Rundkolben wurde 3,66 g **56** (12,7 mmol, 1,0 eq) in 80 mL DCM gelöst und wie in AAV 5 beschrieben, mit 1,2 mL Hydrazin Hydrat 98 % (**giftig!**, 1,3 g, 25,4 mmol, 2,0 eq) zum O-(3-Methoxybenzyl)hydroxylamin umgesetzt. Zur Salzbildung benötigte man 1,5 mL Salzsäure (37 %; 1,7 g, 12,7 mmol, 1,0eq).

Hellbraun gefärbter Feststoff.

Schmb.: 91-96 °C (aus *i*-PrOH).

Ausbeute: 55,0 %.

DC-Kontrolle: LM 1: $R_f = 0,66$ (siehe 6.2.2.2).

1H -NMR (DMSO- d_6): $\delta = 11,04$ (s, 3H, H_3N^+ -OBn), 7,45-7,27 (m, 2H, **H-5**, **H-6**), 7,02-6,92 (m, 2H, **H-2**, **H-4**), 4,99 (s, 2H, -CH₂-), 3,75 (s, 3H, 3-OCH₃).

MS (m/z (%)) der freien Base**: 177,17 (30, [M+Na]⁺), (siehe 6.2.4).

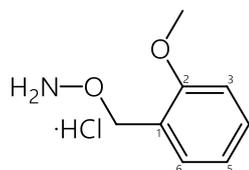
Synthese der Verbindungen

O-(2-Methoxybenzyl)hydroxylaminhydrochlorid

Verbindung: **64**

Summenformel: $C_8H_{12}ClNO_2$

Relative Molmasse [M_r]: 189,1



Darstellung nach AAV 5 (siehe 7.1):

In einem Rundkolben wurden 7,70 g **57** (27,4 mmol, 1,0 eq) in 100 mL DCM gelöst und wie in AAV 5 beschrieben, mit 2,7 mL Hydrazin Hydrat 98 % (**giftig!**, 2,7 g, 54,8 mmol, 2,0 eq) zum O-(2-Methoxybenzyl)hydroxylamin umgesetzt. Zur Salzbildung benötigte man 2,3 mL Salzsäure (37 %; 2,7 g, 27,4 mmol, 1,0eq).

Orange gefärbter Feststoff.

Ausbeute: 37,0 %.

DC-Kontrolle: LM 1: $R_f = 0,66$ (siehe 6.2.2.2).

1H -NMR (DMSO- d_6): $\delta = 11,03$ (s, 3H, H_3N^+-OBn), 7,55-7,28 (m, 4H, **H-2-H-6**), 4,99 (s, 2H, $-CH_2-$), 3,72 (s, 3H, 2-OCH $_3$).

MS (m/z (%)) der freien Base*: 154,12 (20, $[M+H]^+$), (siehe 6.2.4).

7.2.3.3 Nicotinaldehyd-O-alkyloxime und -O-benzyloxime

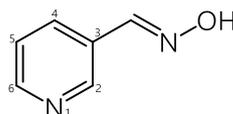
Die Ermittlung der E/Z-Isomeren-Verhältnisse erfolgte durch die Auswertung der 1H -NMR-Spektren.

(E)-Nicotinaldehydoxim

Verbindung: **65**

Summenformel: $C_6H_6N_2O$

Relative Molmasse [M_r]: 122,1



Darstellung:

In einem Rundkolben wurden 3,2 mL Nicotinaldehyd (5,0 g, 46,8 mmol, 1,0 eq) und 5,9 g Hydroxylaminhydrochlorid (85,4 mmol, 1,8 eq) mittels 7,7 g Natriumacetat (93,6 mmol, 2,0 eq) in 100 mL Ethanol bei RT umgesetzt. Die anfangs farblose Lösung zeigte nach 24 h eine farblose Suspension, die nachfolgend mit Ethylacetat gegen Brine extrahiert wurde. Nach Einengen der organischen Phase trocknete man den daraus resultierenden Niederschlag 48 h lang im Exsikkator.

Farblos bis hellgelb gefärbter Feststoff.

Schmb.: 141-145 °C; Literatur: 150-151 °C (aus H_2O).^[337]

Ausbeute: 99,5 %.

DC-Kontrolle: LM 1: $R_f = 0,16$, LM 7: $R_f = 0,61$ (siehe 6.2.2.2).

1H -NMR (DMSO- d_6): $\delta = 11,41$ („s“ br, 1H, $-HC=N-OH$), 8,73 (dd, 1H, **H-2**, $^4J_{2/4} = 2,3$ Hz, $^5J_{2/5} = 0,9$ Hz), 8,54 (dd, 1H, **H-6**, $^3J_{5/6} = 4,8$ Hz, $^4J_{4/6} = 1,7$ Hz), 8,18 (d, 1H, $-HC=N-OH$,

$^3J_{\text{-HC, =N-OH}} = 0,6 \text{ Hz}$, 7,96 (dt, 1H, **H-4**, $^3J_{4/5} = 7,9 \text{ Hz}$, $^4J_{2/4} = 2,3 \text{ Hz}$, $^4J_{4/6} = 1,7 \text{ Hz}$), 7,40 (ddd, 1H, **H-5**, $^3J_{4/5} = 7,9 \text{ Hz}$, $^3J_{5/6} = 4,8 \text{ Hz}$, $^5J_{2/5} = 0,9 \text{ Hz}$).

IR ($\tilde{\nu}$): 1520, 1583 (*m, w*, $\nu_{\text{C=C arom.}}$), 1709 (*s*, $\nu_{\text{N-O, 3-CH=N-OH}}$), 2609-2946 (*s*, $\nu_{\text{C-H aliph.}}$), 3054, 3163 (*m*, $\nu_{\text{C-H arom.}}$) cm^{-1} .

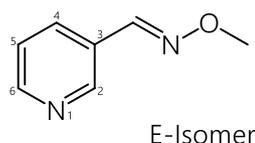
MS (*m/z* (%))^{**}: 123,1 (100, $[\text{M}+\text{H}]^+$), 106,1 (100, $[\text{M}-\text{OH}]^+$), (siehe 6.2.4).

(E/Z)-Nicotinaldehyd-O-methyloxim

Verbindung: **66**

Summenformel: $\text{C}_7\text{H}_8\text{N}_2\text{O}$

Relative Molmasse [M_r]:136,1



Darstellung nach AAV 6a (siehe 7.1):

Zu einer Natriummethanolatlösung wurden 4,1 g **65** (33,9 mmol, 1,0 eq) und 3,2 mL Methyljodid (7,2 g, 50,8 mmol, 1,5 eq) gegeben. Nach 4 d wurde der Ansatz, wie in AAV 6a beschrieben, aufgereinigt. Die Titelverbindung konnte nach säulenchromatographischer Auftrennung (LM 1, siehe 6.2.2.1) gewonnen werden.

Braun gefärbte Flüssigkeit.

Ausbeute: 42,1 %; E/Z-Verhältnis: 94:6.

DC-Kontrolle: LM 1: $R_f = 0,23$ (siehe 6.2.2.2).

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO-*d*₆), E-Isomer: $\delta = 8,74$ (dd, 1H, **H-2**, $^4J_{2/4} = 2,3 \text{ Hz}$, $^5J_{2/5} = 0,9 \text{ Hz}$), 8,57 (dd, 1H, **H-6**, $^3J_{5/6} = 4,8 \text{ Hz}$, $^4J_{4/6} = 1,7 \text{ Hz}$), 8,28 (*s*, 1H, $-\text{HC}=\text{N}-\text{OR}$), 7,98 (dt, 1H, **H-4**, $^3J_{4/5} = 7,9 \text{ Hz}$, $^4J_{2/4} = 2,3 \text{ Hz}$, $^4J_{4/6} = 1,7 \text{ Hz}$), 7,43 (ddd, 1H, **H-5**, $^3J_{4/5} = 7,9 \text{ Hz}$, $^3J_{5/6} = 4,8 \text{ Hz}$, $^5J_{2/5} = 0,9 \text{ Hz}$), 3,90 (*s*, 3H, $-\text{CH}_3$).

IR ($\tilde{\nu}$): 1563, 1590 (*s*, $\nu_{\text{C=C arom.}}$), 1665 (*s*, $\nu_{\text{C=N, 3-CH=N-OR}}$), 2938 (*m*, $\nu_{\text{C-H aliph.}}$), 3053 (*m*, $\nu_{\text{C-H arom.}}$) cm^{-1} .

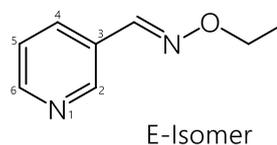
MS (*m/z* (%))^{**}: 137,1 (100, $[\text{M}+\text{H}]^+$), 106,2 (20, $[\text{M}-\text{C}_1\text{H}_3\text{O}]^+$), (siehe 6.2.4).

(E/Z)-Nicotinaldehyd-O-ethyloxim

Verbindung: **67**

Summenformel: $\text{C}_8\text{H}_{10}\text{N}_2\text{O}$

Relative Molmasse [M_r]:150,1



Darstellung nach AAV 6a (siehe 7.1):

Zu einer Natriummethanolatlösung wurden 5,0 g **65** (41,0 mmol, 1,0 eq) und 5,0 mL Ethyljodid (9,6 g, 61,5 mmol, 1,5 eq) gegeben. Nach 72 h wurde der Ansatz, wie in AAV 6a beschrieben, aufgereinigt. Die Titelverbindung konnte nach säulenchromatographischer Auftrennung (LM 1, siehe 6.2.2.1) gewonnen werden.

Orange gefärbte Flüssigkeit.

Ausbeute: 46,1 %; E/Z-Verhältnis: 95:5.

Synthese der Verbindungen

DC-Kontrolle: LM 1: $R_f = 0,35$ (siehe 6.2.2.2).

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6), E-Isomer: $\delta = 8,74$ (dd, 1H, **H-2**, $^4J_{2/4} = 2,3$ Hz, $^5J_{2/5} = 0,9$ Hz), $8,57$ (dd, 1H, **H-6**, $^3J_{5/6} = 4,8$ Hz, $^4J_{4/6} = 1,7$ Hz), $8,27$ (s, 1H, **-HC=N-OR**), $7,99$ (dt, 1H, **H-4**, $^3J_{4/5} = 7,9$ Hz, $^4J_{2/4} = 2,3$ Hz, $^4J_{4/6} = 1,7$ Hz), $7,42$ (ddd, 1H, **H-5**, $^3J_{4/5} = 7,9$ Hz, $^3J_{5/6} = 4,8$ Hz, $^5J_{2/5} = 0,9$ Hz), $4,17$ (q, 2H, **-CH₂-**, $^3J_{\text{-CH}_2\text{-}, \text{-CH}_3} = 7,0$ Hz), $1,24$ (t, 2H, **-CH₃**, $^3J_{\text{-CH}_2\text{-}, \text{-CH}_3} = 7,0$ Hz).

IR ($\tilde{\nu}$): $1563, 1590$ (s, $\nu_{\text{C}=\text{C arom.}}$), 1660 (w, $\nu_{\text{C}=\text{N}, 3\text{-CH}=\text{N-OR}}$), $2854\text{-}2954$ (m, s, $\nu_{\text{C-H aliph.}}$) cm^{-1} .

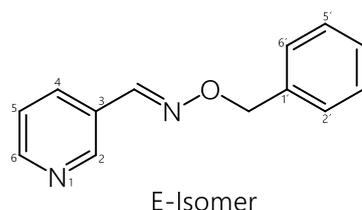
MS (m/z (%))^{**}: $151,1$ (100, $[\text{M}+\text{H}]^+$), $106,2$ (10, $[\text{M}-\text{C}_2\text{H}_5\text{O}]^+$), (siehe 6.2.4).

(E/Z)-Nicotinaldehyd-O-benzyloxim

Verbindung: **68**

Summenformel: $\text{C}_{13}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}$

Relative Molmasse $[\text{M}_r]$: 212,1



Darstellung (siehe 7.1):

A) nach AAV 6a: Zu einer Natriummethanolatlösung wurden $5,6$ g **65** ($46,0$ mmol, $1,0$ eq) und $8,7$ mL Benzyljodid ($15,0$ g, $69,0$ mmol, $1,5$ eq, **stark rauchend, Verätzungsgefahr!**) gegeben. Nach 24 h wurde der Ansatz, wie in AAV 6a beschrieben, aufgereinigt und die Titelverbindung gewonnen.

B) nach AAV 6b: In einem Rundkolben wurden 746 μL Nicotinaldehyd ($1,16$ g, $10,8$ mmol, $1,0$ eq), 615 μL Essigsäure (99 %; $646,0$ mg, $10,8$ mmol, $1,0$ eq) und 874 μL frisch destilliertes Pyrrolidin ($757,0$ mg, $10,8$ mmol, $1,0$ eq, **rauchend mit unangenehmen Geruch!**) in 30 mL THF gelöst. Anschließend ergänzte man $2,0$ g **58** ($13,0$ mmol, $1,2$ eq). Nach 24 h wurde der orange bis rot gefärbte Ansatz, wie in AAV 6b beschrieben, aufgereinigt. Die Titelverbindung konnte nach säulenchromatographischer Auftrennung (LM 1, siehe 6.2.2.1) gewonnen werden.

Gelb gefärbte Flüssigkeit.

Ausbeute: A) $45,9$ %, E/Z-Verhältnis: $98:2$; B) $90,0$ %, E/Z-Verhältnis: $95:5$.

DC-Kontrolle: LM 1: $R_f = 0,42$ (siehe 6.2.2.2).

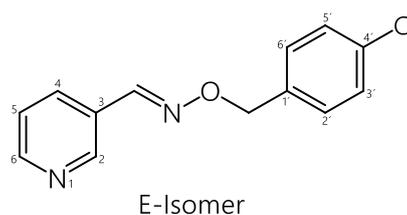
$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6), E-Isomer: $\delta = 8,74$ (dd, 1H, **H-2**, $^4J_{2/4} = 2,3$ Hz, $^5J_{2/5} = 0,9$ Hz), $8,57$ (dd, 1H, **H-6**, $^3J_{5/6} = 4,8$ Hz, $^4J_{4/6} = 1,7$ Hz), $8,36$ (s, 1H, **-HC=N-OR**), $7,98$ (dt, 1H, **H-4**, $^3J_{4/5} = 7,9$ Hz, $^4J_{2/4} = 2,3$ Hz, $^4J_{4/6} = 1,7$ Hz), $7,46\text{-}7,26$ (m, 6H, **H-5**, **H-2'-H-6'**), $5,18$ (s, 2H, **-CH₂-**).

IR ($\tilde{\nu}$): $1564, 1589$ (w, $\nu_{\text{C}=\text{C arom.}}$), 1608 (m, $\nu_{\text{N-O}, 3\text{-CH}=\text{N-OR}}$), $2877, 2929$ (w, $\nu_{\text{C-H aliph.}}$), $3030\text{-}3098$ (w, $\nu_{\text{C-H arom.}}$) cm^{-1} .

MS (m/z (%))^{**}: $213,1$ (60, $[\text{M}+\text{H}]^+$), $122,1$ (100, $[\text{M}-\text{C}_7\text{H}_7]^+$), $106,2$ (20, $[\text{M}-\text{C}_7\text{H}_7\text{O}]^+$), $91,1$ (100, $[\text{C}_7\text{H}_7]^+$), (siehe 6.2.4).

(E/Z)-Nicotinaldehyd-O-(4-chlorobenzyl)oxim

Verbindung: **69**
 Summenformel: $C_{13}H_{11}ClN_2O$
 Relative Molmasse $[M_r]$: 246,1



Darstellung (siehe 7.1):

A) nach AAV 6a: Zu einer Natriummethanolatlösung wurden 1,0 g **65** (8,2 mmol, 1,0 eq) und 3,1 g 4-Chlorobenzyljodid (12,3 mmol, 1,5 eq, **stechend riechend, Verätzungsgefahr!**) gegeben. Nach 24 h wurde der Ansatz, wie in AAV 6a beschrieben, aufgereinigt. Die Titelverbindung konnte nach säulenchromatographischer Auftrennung (LM 1, siehe 6.2.2.1) gewonnen werden.

B) nach AAV 6b: In einem Rundkolben wurden 760 μ L Nicotinaldehyd (1,18 g, 11,0 mmol, 1,0 eq), 626 μ L Essigsäure (99 %; 657,0 mg, 11,0 mmol, 1,0 eq) und 890 μ L frisch destilliertes Pyrrolidin (771,0 mg, 11,0 mmol, 1,0 eq, **rauchend mit unangenehmen Geruch!**) in 35 mL THF gelöst und 30 min ruhen gelassen. Anschließend ergänzte man 2,56 g **60** (13,2 mmol, 1,2 eq). Nach 3 d wurde der orange gefärbte Ansatz, wie in AAV 6b beschrieben, aufgereinigt. Die Titelverbindung konnte nach säulenchromatographischer Auftrennung (LM 1, siehe 6.2.2.1) gewonnen werden.

Farblos bis hellgelb gefärbte Flüssigkeit.

Ausbeute: A) 24,2 %, E/Z-Verhältnis: 96:4; B) 91,0 %, E/Z-Verhältnis: 92:8.

DC-Kontrolle: LM 1: $R_f = 0,39$ (siehe 6.2.2.2).

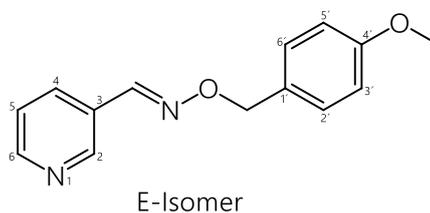
1H -NMR (DMSO- d_6), E-Isomer: $\delta = 8,74$ (dd, 1H, **H-2**, $^4J_{2/4} = 2,3$ Hz, $^5J_{2/5} = 0,9$ Hz), $8,58$ (dd, 1H, **H-6**, $^3J_{5/6} = 4,8$ Hz, $^4J_{4/6} = 1,7$ Hz), $8,36$ (s, 1H, -HC=N-OR), $7,97$ (dt, 1H, **H-4**, $^3J_{4/5} = 7,9$ Hz, $^4J_{2/4} = 2,3$ Hz, $^4J_{4/6} = 1,7$ Hz), $7,46$ - $7,39$ (m, 5H, **H-5**, **H-2'**, **H-3'**, **H-5'**, **H-6'**), $5,17$ (s, 2H, -CH $_2$ -).

IR (ν): 1569, 1592 (w, $\nu_{C=C}$ arom.), 1608 (m, $\nu_{N-O, 3-CH=N-OR}$), 1721 (w, $\nu_{C=N, 3-CH=N-OR}$), 2845-2996 (w, ν_{C-H} aliph.), 3003-3115 (w, ν_{C-H} arom.) cm^{-1} .

MS (m/z (%))^{**}: 247,1 (100, $[M+H]^+$), 122,1 (100, $[M-C_7H_6Cl]^+$), (siehe 6.2.4).

(E/Z)-Nicotinaldehyd-O-(4-methoxybenzyl)oxim

Verbindung: **70**
 Summenformel: $C_{14}H_{14}N_2O_2$
 Relative Molmasse $[M_r]$: 242,1



Darstellung nach AAV 6b (siehe 7.1):

In einem Rundkolben wurden 367 μ L Nicotinaldehyd (570,0 mg, 5,3 mmol, 1,0 eq), 300 μ L Essigsäure (99 %; 314,0 mg, 5,3 mmol, 1,0 eq) und 430 μ L frisch destilliertes Pyrrolidin (373,0 mg, 5,3 mmol, 1,0 eq, **rauchend mit unangenehmen Geruch!**) in 15 mL THF gelöst und 30 min ruhen gelassen. Anschließend ergänzte man 1,22 g **62** (6,4 mmol, 1,2 eq). Nach 3 d wurde der orange gefärbte Ansatz, wie in AAV 6b beschrieben, aufgereinigt. Die Titelverbindung konnte nach säulenchromatographischer Auftrennung (LM 1, siehe 6.2.2.1) gewonnen werden.

Farblos bis hellgelb gefärbte Flüssigkeit.

Ausbeute: 80,0 %, E/Z-Verhältnis: 90:10.

Synthese der Verbindungen

DC-Kontrolle: LM 1: $R_f = 0,30$ (siehe 6.2.2.2).

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6), E-Isomer: $\delta = 8,74$ (dd, 1H, **H-2**, $^4J_{2/4} = 2,3$ Hz, $^5J_{2/5} = 0,9$ Hz), $8,57$ (dd, 1H, **H-6**, $^3J_{5/6} = 4,8$ Hz, $^4J_{4/6} = 1,7$ Hz), $8,31$ (s, 1H, $-\text{HC}=\text{N-OR}$), $7,98$ (dt, 1H, **H-4**, $^3J_{4/5} = 7,9$ Hz, $^4J_{2/4} = 2,3$ Hz, $^4J_{4/6} = 1,7$ Hz), $7,43$ (ddd, 1H, **H-5**, $^3J_{4/5} = 7,9$ Hz, $^3J_{5/6} = 4,8$ Hz, $^5J_{2/5} = 0,9$ Hz), $7,37$ - $7,29$ (AA'BB', 2H, **H-2'**, **H-6'**), $6,95$ - $6,88$ (AA'BB', 2H, **H-3'**, **H-5'**), $5,10$ (s, 2H, $-\text{CH}_2-$), $3,73$ (s, 3H, $4'-\text{OCH}_3$).

IR ($\tilde{\nu}$): 1512 , 1586 (s, w, $\nu_{\text{C}=\text{C arom.}}$), 1612 (m, $\nu_{\text{N-O, 3-CH=N-OR}}$), 2836 - 2950 (w, $\nu_{\text{C-H aliph.}}$), 3010 - 3093 (w, $\nu_{\text{C-H arom.}}$) cm^{-1} .

MS (m/z (%))**: $243,1$ (30, $[\text{M}+\text{H}]^+$), (siehe 6.2.4).

7.2.3.4 N-Acetyl-1,4-dihydropyridine des Oximethertyps

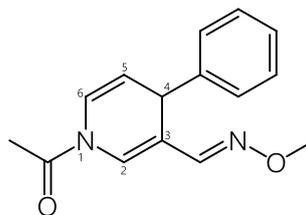
Die abgebildeten Verbindungen in den Monographien zeigen eine allgemeine Darstellung ohne Berücksichtigung von Rotameren-, Enantiomeren- sowie Stellungsisomereffekten.

(E,Z,RS,EZ)-1-Acetyl-4-phenyl-1,4-dihydropyridin-3-carbaldehyd-O-methyloxim

Verbindung: **71**

Summenformel: $\text{C}_{15}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_2$

Relative Molmasse $[\text{M}_r]$: 256,1



Darstellung nach AAV 2 (siehe 7.1):

In einem Zweihalsrundkolben wurden $1,9$ g **66** ($13,7$ mmol, $1,0$ eq), $252,0$ mg Kupfer-(I)-jodid ($1,4$ mmol, $0,1$ eq) und $116,0$ mg trockenes Lithiumchlorid ($2,8$ mmol, $0,2$ eq) in 50 mL trockenem THF gelöst/suspendiert und der Ansatz auf -15 bis -20 °C gebracht. Es wurde $1,1$ mL Acetylchlorid ($1,2$ g, $13,7$ mmol, $1,0$ eq, Farbumschlag von gelb nach braun), sowie $7,5$ mL Phenylmagnesiumchlorid (2 M in THF, $7,9$ g, $14,9$ mmol, $1,1$ eq, Farbumschlag von braun nach hellbraun) gemäß AAV 2 hinzugefügt, umgesetzt und aufgearbeitet. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch (LM 3, siehe 6.2.2.1) aufgereinigt und war aus kaltem Methanol ausgefallen.

Hellgelb gefärbter, feiner Feststoff.

Schmb.: 130 - 131 °C (aus MeOH).

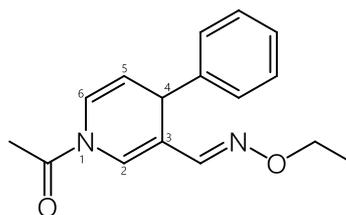
Ausbeute: $49,0$ %.

DC-Kontrolle: LM 1: $R_f = 0,45$, LM 3: $R_f = 0,35$ (siehe 6.2.2.2).

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6): $\delta = 7,80$ („s“ br, 2H, $-\text{HC}=\text{N-OCH}_3$), $7,63$ („s“ br, 1H, **H-2 [E]**), $7,48$ („s“ br, 1H, **H-2 [Z]**), $7,30$ - $7,06$ (m, 11H, **H-6 [Z]**, $4-\text{C}_6\text{H}_5$), $6,91$ („s“ br, 1H, **H-6 [E]**), $5,30$ - $5,12$ (m, 2H, **H-5 [E/Z]**), $4,44$ - $4,38$ (m, 2H, **H-4 [E/Z]**), $3,61$ (s, 6H, $-\text{HC}=\text{N-OCH}_3$), $2,30$ (s, 6H, $-\text{NCOCH}_3$ [E/Z]).

IR ($\tilde{\nu}$): 1621 (m, $\nu_{\text{C}=\text{C arom.}}$), 1663 (s, $\nu_{\text{C}=\text{N, 3-CH=N-OR}}$), 1697 (m, $\nu_{\text{C}=\text{O, -NCOCH}_3}$), 2869 , 2927 (w, $\nu_{\text{C-H aliph.}}$), 3030 (w, $\nu_{\text{C-H arom.}}$) cm^{-1} .

MS (m/z (%))**: $257,2$ (25, $[\text{M}+\text{H}]^+$), $215,1$ (15, $[\text{M-COCH}_3]^+$), (siehe 6.2.4).

(E,Z,RS,EZ)-1-Acetyl-4-phenyl-1,4-dihydropyridin-3-carbaldehyd-O-ethyloximVerbindung: **72**Summenformel: C₁₆H₁₈N₂O₂Relative Molmasse [M_r]:270,1

Darstellung nach AAV 2 (siehe 7.1):

In einem Zweihalsrundkolben wurden 2,7 g **67** (18,0 mmol, 1,0 eq), 330,4 mg Kupfer-(I)-jodid (1,8 mmol, 0,1 eq) und 152,3 mg trockenes Lithiumchlorid (3,6 mmol, 0,2 eq) in 100 mL trockenem THF gelöst/suspendiert und der Ansatz auf -15 bis -20 °C gebracht. Es wurde 1,4 mL Acetylchlorid (1,4 g, 18,0 mmol, 1,0 eq, Farbumschlag von gelb nach rotbraun), sowie 9,8 mL Phenylmagnesiumchlorid (2 M in THF, 10,3 g, 19,8 mmol, 1,1 eq, Farbumschlag von rotbraun nach gelb) gemäß AAV 2 hinzugefügt, umgesetzt und aufgearbeitet. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch (LM 3, siehe 6.2.2.1) aufgereinigt und war aus kaltem Methanol ausgefallen.

Hellgelb gefärbter, feiner Feststoff.

Schmb.: 108-110 °C (aus MeOH).

Ausbeute: 48,0 %.

DC-Kontrolle: LM 1: R_f = 0,58, LM 3: R_f = 0,45 (siehe 6.2.2.2).

¹H-NMR (DMSO-*d*₆): δ = 7,78 („s“ br, 2H, -HC=N-OCH₃), 7,62 („s“ br, 1H, **H-2 [E]**), 7,45 („s“ br, 1H, **H-2 [Z]**), 7,35-7,09 (m, 11H, **H-6 [Z]**, 4-C₆H₅), 6,91 („s“ br, 1H, **H-6 [E]**), 5,30-5,10 (m, 2H, **H-5 [E/Z]**), 4,45-4,39 (m, 2H, **H-4 [E/Z]**), 3,85 (q, 4H, -HC=N-OCH₂CH₃, ³J_{-CH₂-}, -CH₃ = 7,1 Hz), 2,30 (s, 6H, -NCOCH₃ [**E/Z**]), 0,99 (t, 6H, -HC=N-OCH₂CH₃, ³J_{-CH₂-}, -CH₃ = 7,1 Hz).

IR (ν̄): 1622 (w, m, ν_{C=C arom.}), 1663 (s, ν_{C=N}, 3-CH=N-OR), 1694 (s, ν_{C=O}, -NCOCH₃), 2874-2987 (w, ν_{C-H aliph.}), 3010, 3030 (w, ν_{C-H arom.}) cm⁻¹.

MS (*m/z* (%))^{**}: 271,1 (20, [M+H]⁺), 229,2 (20, [M-COCH₃]⁺), 183,0 (85, [M-COCH₃-OC₂H₅]⁺), (siehe 6.2.4).

(E,Z,RS,EZ)-1-Acetyl-4-phenyl-1,4-dihydropyridin-3-carbaldehyd-O-benzyloximVerbindung: **73**Summenformel: C₂₁H₂₀N₂O₂Relative Molmasse [M_r]:332,2

Darstellung nach AAV 2 (siehe 7.1):

In einem Zweihalsrundkolben wurden 3,0 g **68** (14,3 mmol, 1,0 eq), 263,0 mg Kupfer-(I)-jodid (1,4 mmol, 0,1 eq) und 135,0 mg trockenes Lithiumchlorid (2,9 mmol, 0,2 eq) in 80 mL trockenem THF gelöst/suspendiert und der Ansatz auf -15 bis -20 °C gebracht. Es wurde 1,1 mL Acetylchlorid (1,2 g, 14,5 mmol, 1,0 eq, Farbumschlag von gelb nach braun), sowie 7,9 mL Phenylmagnesiumchlorid (2 M in THF, 8,3 g, 15,7 mmol, 1,1 eq, Farbumschlag von braun nach gelbbraun) gemäß AAV 2 hinzugefügt, umgesetzt und aufgearbeitet. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch (LM 1, siehe 6.2.2.1) aufgereinigt und war aus kaltem Methanol ausgefallen.

Hellgelb gefärbter Feststoff.

Synthese der Verbindungen

Schmb.: 115-116 °C (aus MeOH).

Ausbeute: 59,7 %.

DC-Kontrolle: LM 1: $R_f = 0,57$, LM 3: $R_f = 0,42$ (siehe 6.2.2.2).

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6): $\delta = 7,85$ („s“ br, 2H, $-\text{HC}=\text{N-OR}$), $7,63$ („s“ br, 1H, **H-2 [E]**), $7,47$ („s“ br, 1H, **H-2 [Z]**), $7,30$ - $7,09$ (m, 15H, **H-6 [Z]**, 4- C_6H_5 , **H-2'-H-6'**), $6,91$ („s“ br, 1H, **H-6 [E]**), $5,28$ - $5,13$ (m, 2H, **H-5 [E/Z]**), $4,86$ (s, 4H, $-\text{CH}_2-$), $4,44$ - $4,37$ (m, 2H, **H-4 [E/Z]**), $2,30$ (s, 6H, $-\text{NCOCH}_3$ **[E/Z]**).

IR ($\tilde{\nu}$): 1599 , 1622 (w, m, $\nu_{\text{C}=\text{C arom.}}$), 1663 (s, $\nu_{\text{C}=\text{N}}$, $3-\text{CH}=\text{N-OR}$), 1691 (s, $\nu_{\text{C}=\text{O}}$, $-\text{NCOCH}_3$), 2855 , 2930 (w, $\nu_{\text{C-H aliph.}}$), 3027 (w, $\nu_{\text{C-H arom.}}$) cm^{-1} .

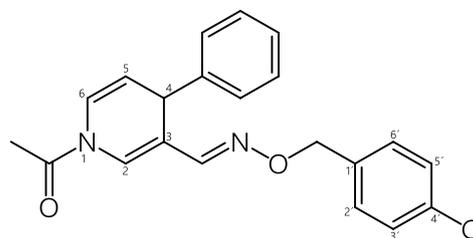
MS (m/z (%))^{**}: $333,2$ (100, $[\text{M}+\text{H}]^+$), $291,1$ (40, $[\text{M}-\text{COCH}_3]^+$), $233,0$ (70, $[\text{M}-\text{COCH}_3-\text{C}_5\text{H}_5]^+$), (siehe 6.2.4).

(E,Z,RS,EZ)-1-Acetyl-4-phenyl-1,4-dihydropyridin-3-carbaldehyd-O-(4-chlorobenzyl)oxim

Verbindung: **74**

Summenformel: $\text{C}_{21}\text{H}_{19}\text{ClN}_2\text{O}_2$

Relative Molmasse $[\text{M}_r]$: 366,1



Darstellung nach AAV 2 (siehe 7.1):

In einem Zweihalsrundkolben wurden 4,4 g **69** (17,9 mmol, 1,0 eq), 330,4 mg Kupfer-(I)-jodid (1,8 mmol, 0,1 eq) und 152,3 mg trockenes Lithiumchlorid (3,6 mmol, 0,2 eq) in 100 mL trockenem THF gelöst/ suspendiert und der Ansatz auf -15 bis -20 °C gebracht. Es wurde 1,4 mL Acetylchlorid (1,4 g, 18,0 mmol, 1,0 eq, Farbumschlag von gelb nach rotorange), sowie 9,8 mL Phenylmagnesiumchlorid (2 M in THF, 10,3 g, 19,8 mmol, 1,1 eq, Farbumschlag von rotorange nach zitronengelb) gemäß AAV 2 hinzugefügt, umgesetzt und aufgearbeitet. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch (LM 3, siehe 6.2.2.1) aufgereinigt und war aus kaltem Methanol ausgefallen.

Hellgelb gefärbter, feiner Feststoff.

Schmb.: 90-93 °C (aus MeOH).

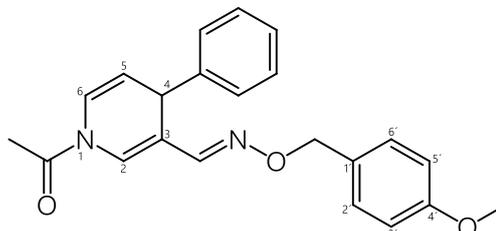
Ausbeute: 56,7 %.

DC-Kontrolle: LM 1: $R_f = 0,55$ (siehe 6.2.2.2).

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6): $\delta = 7,85$ („s“ br, 2H, $-\text{HC}=\text{N-OR}$), $7,62$ („s“ br, 1H, **H-2 [E]**), $7,51$ („s“ br, 1H, **2-H [Z]**), $7,44$ - $7,04$ (m, 19H, **H-6 [Z]**, 4- C_6H_5 , **H-2', H-3', H-5', H-6'**), $6,90$ („s“ br, 1H, **H-6 [E]**), $5,27$ - $5,10$ (m, 2H, **H-5 [E/Z]**), $4,85$ (s, 4H, $-\text{CH}_2-$), $4,40$ - $4,35$ (m, 2H, **H-4 [E/Z]**), $2,30$ (s, 6H, $-\text{NCOCH}_3$ **[E/Z]**).

IR ($\tilde{\nu}$): 1597 , 1622 (w, $\nu_{\text{C}=\text{C arom.}}$), 1663 (s, $\nu_{\text{C}=\text{N}}$, $3-\text{C}=\text{N-OR}$), 1689 (m, $\nu_{\text{C}=\text{O}}$, $-\text{NCOCH}_3$), 2925 (w, $\nu_{\text{C-H aliph.}}$), 3002 , 3095 (w, $\nu_{\text{C-H arom.}}$) cm^{-1} .

MS (m/z (%))^{**}: $367,1$ (100, $[\text{M}+\text{H}]^+$), (siehe 6.2.4).

(E,Z,RS,EZ)-1-Acetyl-4-phenyl-1,4-dihydropyridin-3-carbaldehyd-O-(4-methoxybenzyl)oximVerbindung: **75**Summenformel: $C_{22}H_{22}N_2O_3$ Relative Molmasse $[M_r]$: 362,2

Darstellung nach AAV 2 (siehe 7.1):

In einem Zweihalsrundkolben wurden 2,2 g **70** (8,9 mmol, 1,0 eq), 163,7 mg Kupfer(I)-jodid (0,9 mmol, 0,1 eq) und 83,0 mg trockenes Lithiumchlorid (1,8 mmol, 0,2 eq) in 100 mL trockenem THF gelöst/suspendiert und der Ansatz auf -15 bis -20 °C gebracht. Es wurde 0,8 mL Acetylchlorid (0,8 g, 8,9 mmol, 1,0 eq, Farbgebung der Lösung während des gesamten Zeitraumes gelbgrün), sowie 4,9 mL Phenylmagnesiumchlorid (2 M in THF, 5,2 g, 9,8 mmol, 1,1 eq) gemäß AAV 2 hinzugefügt, umgesetzt und aufgearbeitet. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch (LM 3, siehe 6.2.2.1) aufgereinigt und war aus kaltem Methanol ausgefallen.

Hellgelb gefärbter Feststoff.

Schmb.: 85-87 °C (aus MeOH).

Ausbeute: 27,6 %.

DC-Kontrolle: LM 3: $R_f = 0,38$, LM 1: $R_f = 0,53$ (siehe 6.2.2.2).

1H -NMR (DMSO- d_6): $\delta = 7,81$ („s“ br, 2H, -HC=N-OR), 7,62 („s“ br, 1H, **H-2 [E]**), 7,47 („s“ br, 1H, **2-H [Z]**), 7,32-7,12 (m, 11H, **H-6 [Z]**, 4-C₆H₅), 7,05 (AA'BB', 4H, **H-2'**, **H-6'**), 6,89 („s“ br, 1H, **6-H [E]**), 6,77 (AA'BB', 4H, **H-3'**, **H-5'**), 5,27-5,13 (m, 2H, **H-5 [E/Z]**), 4,87 (s, 4H, -CH₂-), 4,44-4,37 (m, 2H, **H-5 [E/Z]**), 3,71 (s, 6H, 4'-OCH₃), 2,29 (s, 6H, -NCOCH₃ [**E/Z**]).

IR (ν): 1513, 1586, 1611 (w, m, $\nu_{C=C}$ arom.), 1663 (s, $\nu_{C=N}$, 3-CH=N-OR), 1689 (w, $\nu_{C=O}$, -NCOCH₃), 2825, 2925 (w, ν_{C-H} aliph.), 3003, 3095 (w, ν_{C-H} arom.) cm^{-1} .

MS (m/z (%))**: 363,1 (50, [M+H]⁺), (siehe 6.2.4).

7.2.3.5 1-Aza-9-oxafluoren- sowie 10-Aza-11-oxabenzofuro[2,3-b]pyridin-Derivate des Oximether- und des Carbaldehydtyps

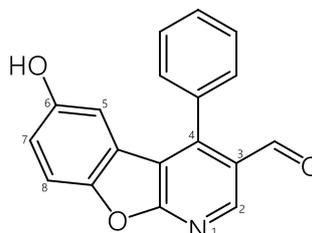
Die Ermittlung der E/Z-Isomeren-Verhältnisse erfolgte durch die Auswertung der HPLC-Ergebnisse (siehe 6.2.2.4).

6-Hydroxy-4-phenylbenzofuro[2,3-b]pyridin-3-carbaldehyd

Verbindung: **76**

Summenformel: $C_{18}H_{11}NO_3$

Relative Molmasse $[M_r]$: 289,1



Darstellung:

In einem Rundkolben wurde 340,5 mg **79** (1,03 mmol, 1,00 eq) in 10 mL THF gelöst. Anschließend fügte man 2 mL destilliertes Wasser, 354,5 mg 4-Toluensulfonsäure (2,06 mmol, 2,00 eq), sowie 309,0 mg Paraformaldehyd (20,60 mmol, 10,00 eq, berechnet als Formaldehyd-Äquivalente) hinzu. Der Ansatz wurde 60 min bei 120 °C in einer Mikrowellenapparatur (siehe 6.2.7) umgesetzt. Nach anschließender Wasser-Chloroform-Extraktion und Einengen der halogenhaltigen Phase trennte man das ölige Rohprodukt säulenchromatographisch (LM 4, siehe 6.2.2.1) auf. Nach Entfernen des Lösungsmittels von der produkthaltigen Fraktion, resultierte die Titelverbindung, die 3 d lang im Exsikkator trocknete.

Gelb gefärbter Feststoff.

Schmb.: 257-260 °C.

Ausbeute: 75,1 %.

DC-Kontrolle: LM 8: $R_f = 0,52$, LM 13: $R_f = 0,23$ (siehe 6.2.2.2).

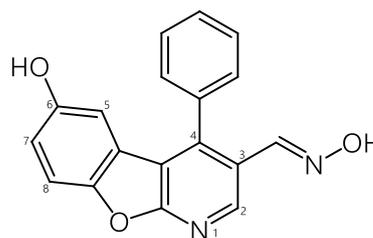
1H -NMR (DMSO- d_6): $\delta = 9,88$ (s, 1H, **H-3**), 9,51 (s, 1H, **6-OH**), 8,91 (s, 1H, **H-2**), 7,71-7,56 (m, 6H, **H-8**, 4- C_6H_5), 6,98 (dd, 1H, **H-7**, $^3J_{7/8} = 8,9$ Hz, $^4J_{5/7} = 2,6$ Hz), 6,41 (d, 1H, **H-5**, $^4J_{5/7} = 2,6$ Hz).

IR (ν): 1560, 1589 (m, $\nu_{C=C arom.}$), 1690 (s, $\nu_{C=O}$), 2760-2880 (w, $\nu_{C-H aliph.}$), 3058-3230 (m, $\nu_{C-H arom.}$) cm^{-1} .

HPLC*: 99,56 % (t_R : 11,068 min), (siehe 6.2.2.4).

MS (m/z (%))*: 290,50 (100, $[M+H]^+$), 288,34 (100, $[M]^+$), (siehe 6.2.4).

HRMS/ESI (m/z (%)): gefunden für $[M+H]^+$: 290,0810 (100), berechnet für $[C_{18}H_{12}NO_3]^+$: 290,0812.

(E)-6-Hydroxy-4-phenylbenzofuro[2,3-b]pyridin-3-carbaldehydoximVerbindung: **77**Summenformel: C₁₈H₁₂N₂O₃Relative Molmasse [M_r]: 304,1

Darstellung:

In einem Mehrhalsrundkolben wurden 200,0 mg **80** (0,51 mmol, 1,00 eq) in 25 mL einer Lösung aus THF und Methanol (1:1, V/V) gelöst. Anschließend fügte man 266,0 mg Palladium auf Kohle (10 %; 0,25 mmol, 0,50 eq, berechnet als Palladiumanteil) hinzu und begaste den schüttelnden Ansatz 12 h mit 1 atm Wasserstoff. Nach anschließender Wasser-Chloroform-Extraktion und Einengen der halogenhaltigen Phase trennte man das ölige Rohprodukt säulenchromatographisch (LM 4, siehe 6.2.2.1) auf. Nach Entfernen des Lösungsmittels von der produkthaltigen Fraktion, resultierte die Titelverbindung, die 3 d lang im Exsikkator trocknete.

Farbloser Feststoff.

Schmb.: 272-274 °C.

Ausbeute: 29,0 %.

DC-Kontrolle: LM 3: R_f = 0,52, LM 4: R_f = 0,19 (siehe 6.2.2.2).

¹H-NMR (DMSO-*d*₆): δ = 11,45 (s, 1H, -HC=N-OH), 9,40 (s, 1H, 6-OH), 8,82 (s, 1H, **H-2**), 7,81 (s, 1H, -HC=N-OH), 7,71-7,59 (m, 3H, 4-C₆H₅), 7,55 (d, 1H, **H-8**, ³J_{7/8} = 8,9 Hz), 7,51-7,44 (m, 2H, 4-C₆H₅), 6,94 (dd, 1H, **H-7**, ³J_{7/8} = 8,9 Hz, ⁴J_{5/7} = 2,6 Hz), 6,33 (d, 1H, **H-5**, ⁴J_{5/7} = 2,6 Hz).

IR (ν̄): 1557, 1586 (w, m, ν_{C=C arom.}), 1611 (w, ν_{N-O, 3-CH=N-OH}), 1691 (s, ν_{C=N, 3-CH=N-OH}), 2686, 2996 (w, m, ν_{C-H aliph.}), 3025-3228 (m, s, ν_{C-H arom.}) cm⁻¹.

HPLC*: 98,39 % (t_R: 11,109 min), (siehe 6.2.2.4).MS (*m/z* (%))*: 327,24 (25, [M+Na]⁺), 305,24 (100, [M+H]⁺), 303,26 (45, [M]⁻), (siehe 6.2.4).HRMS/ESI (*m/z* (%)): gefunden für [M+H]⁺: 305,0922 (100), berechnet für [C₁₈H₁₃N₂O₃]⁺: 305,0921.

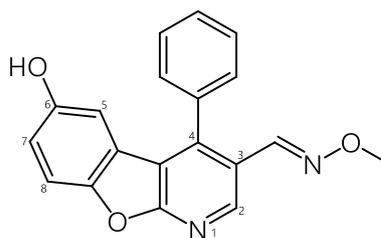
Synthese der Verbindungen

(E)-6-Hydroxy-4-phenylbenzofuro[2,3-b]pyridin-3-carbaldehyd-O-methyloxim

Verbindung: **78**

Summenformel: C₁₉H₁₄N₂O₃

Relative Molmasse [M_r]: 318,1



Darstellung nach AAV 3 (siehe 7.1):

In einem Dreihalsrundkolben wurden 607,8 mg **71** (2,37 mmol, 1,00 eq) und 312,6 mg 1,4-Benzochinon (2,89 mmol, 1,22 eq) in wenig trockenem Dioxan gelöst. Über einen Tropftrichter fügte man 55 mL einer Mischung aus 50,3 mL trockenem Dioxan und 4,7 mL Perchlorsäure (70 %) hinzu. Es zeigte sich ein Farbumschlag von braun nach weinrot. Nach 5 d wurde der Ansatz, wie in AAV 3 beschrieben, aufgereinigt. Das ölige Rohprodukt wurde säulenchromatographisch (LM 4, siehe 6.2.2.1) aufgetrennt und die produktthaltige Fraktion, nach Entfernen des Lösungsmittels, aus Methanol (bei -20 °C) zur Titelverbindung ausfallen gelassen.

Hellbraun gefärbter, feiner Feststoff.

Schmb.: 220-223 °C (aus MeOH).

Ausbeute: 2,1 %.

DC-Kontrolle: LM 1: R_f = 0,55, LM 4: R_f = 0,24 (siehe 6.2.2.2).

¹H-NMR (DMSO-*d*₆): δ = 9,42 (s, 1H, 6-OH), 8,80 (s, 1H, **H-2**), 7,86 (s, 1H, -HC=N-OCH₃), 7,71-7,61 (m, 3H, 4-C₆H₅), 7,57 (d, 1H, **H-8**, ³J_{7/8} = 8,9 Hz), 7,52-7,45 (m, 2H, 4-C₆H₅), 6,94 (dd, 1H, **H-7**, ³J_{7/8} = 8,9 Hz, ⁴J_{5/7} = 2,6 Hz), 6,35 (d, 1H, **H-5**, ⁴J_{5/7} = 2,6 Hz), 3,86 (s, 3H, -HC=N-OCH₃).

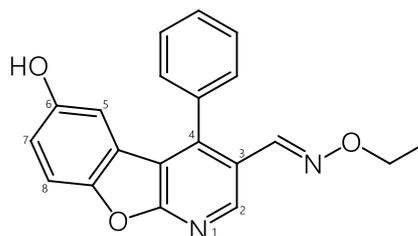
IR (ν̄): 1587 (w, ν_{C=C arom.}), 1611 (w, ν_{N-O, 3-CH=N-OR}), 1623 (w, ν_{C=N, 3-CH=N-OR}), 2816-2991 (w, ν_{C-H aliph.}), 3060-3164 (m, ν_{C-H arom.}) cm⁻¹.

HPLC^{**}: 96,80 %, (t_R: 5,383 min), (Methode A, siehe 6.2.2.4).

MS (*m/z* (%))^{*}: 659,11 (40, [2×M+Na]⁺), 319,76 (100, [M+H]⁺), 635,22 (10, [2×M]⁻), 317,45 (100, [M]⁻), (siehe 6.2.4).

HRMS/ESI (*m/z* (%)): gefunden für [M+H]⁺: 319,1075 (100), berechnet für [C₁₉H₁₅N₂O₃]⁺: 319,1077.

(E)-6-Hydroxy-4-phenylbenzofuro[2,3-b]pyridin-3-carbaldehyd-O-ethylxim

Verbindung: **79**Summenformel: C₂₀H₁₆N₂O₃Relative Molmasse [M_r]: 332,1

Darstellung nach AAV 3 (siehe 7.1):

In einem Dreihalsrundkolben wurden 1,80 g **72** (6,65 mmol, 1,00 eq) und 877,3 mg 1,4-Benzochinon (8,11 mmol, 1,22 eq) in wenig trockenem Dioxan gelöst. Über einen Tropftrichter fügte man 100 mL einer Mischung aus 86,7 mL trockenem Dioxan und 13,3 mL Perchlorsäure (70 %) hinzu. Es zeigte sich ein Farbumschlag von braun nach weinrot. Nach 8 d wurde der Ansatz, wie in AAV 3 beschrieben, aufarbeitet. Das ölige Rohprodukt wurde säulenchromatographisch (LM 4, siehe 6.2.2.1) aufgereinigt und die produktthaltige Fraktion, nach Entfernen des Lösungsmittels, weiter mit MPLC (Methode B, siehe 6.2.2.3), aufgetrennt. Die Titelverbindung konnte, nach dem Einengen des Lösungsmittels, aus Methanol (bei -20 °C) zur Fällung gebracht werden.

Graubraun gefärbter Feststoff.

Schmb.: 200-202 °C (aus MeOH).

Ausbeute: 8,8 %.

DC-Kontrolle: LM 1: R_f = 0,60, LM 4: R_f = 0,25 (siehe 6.2.2.2).

¹H-NMR (DMSO-*d*₆): δ = 9,42 (s, 1H, 6-OH), 8,80 (d, 1H, **H-2**, ⁴J_{2/HC=N-OR} = 0,6 Hz), 7,86 (d, 1H, -HC=N-OCH₂CH₃, ⁴J_{2/HC=N-OR} = 0,6 Hz), 7,69-7,60 (m, 3H, 4-C₆H₅), 7,56 (d, 1H, **H-8**, ³J_{7/8} = 8,8 Hz), 7,52-7,44 (m, 2H, 4-C₆H₅), 6,94 (dd, 1H, **H-7**, ³J_{7/8} = 8,8 Hz, ⁴J_{5/7} = 2,6 Hz), 6,33 (d, 1H, **H-5**, ⁴J_{5/7} = 2,6 Hz), 4,11 (q, 2H, -HC=N-OCH₂CH₃, ³J_{-CH₂-/CH₃} = 7,0 Hz), 1,19 (t, 3H, -HC=N-OCH₂CH₃, ³J_{-CH₂-/CH₃} = 7,0 Hz).

IR (ν̄): 1578 (*m*, ν_{C=C arom.}), 1608 (*w*, ν_{N-O, 3-CH=N-OR}), 1625 (*w*, ν_{C=N, 3-CH=N-OR}), 2881-2983 (*m*, ν_{C-H aliph.}), 3025-3205 (*m*, ν_{C-H arom.}) cm⁻¹.

HPLC*: 99,22 % (t_R: 12,756 min), (siehe 6.2.2.4).MS (*m/z* (%))*: 333,26 (100, [M+H]⁺), 331,23 (38, [M]⁻), (siehe 6.2.4).HRMS/ESI (*m/z* (%)): gefunden für [M+H]⁺: 333,1235 (100), berechnet für [C₂₀H₁₇N₂O₃]⁺: 333,1234.

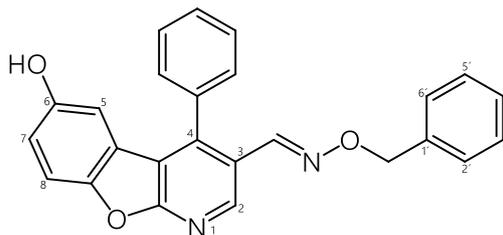
Synthese der Verbindungen

(E)-6-Hydroxy-4-phenylbenzofuro[2,3-b]pyridin-3-carbaldehyd-O-benzyloxim

Verbindung: **80**

Summenformel: $C_{25}H_{18}N_2O_3$

Relative Molmasse $[M_r]$: 394,1



Darstellung nach AAV 3 (siehe 7.1):

In einem Dreihalsrundkolben wurden 2,16 g **73** (5,48 mmol, 1,00 eq) und 720,0 mg 1,4-Benzochinon (6,68 mmol, 1,22 eq) in wenig trockenem Dioxan gelöst. Über einen Tropftrichter fügte man 100 mL einer Mischung aus 88,8 mL trockenem Dioxan und 11,2 mL Perchlorsäure (70 %) hinzu. Es zeigte sich ein Farbumschlag von braun nach weinrot. Nach 7 d wurde der Ansatz, wie in AAV 3 beschrieben, aufgearbeitet. Das ölige Rohprodukt wurde säulenchromatographisch (LM 4, siehe 6.2.2.1) getrennt und die produktthaltige Fraktion, nach Entfernen des Lösungsmittels, weiter mit MPLC (Methode B, siehe 6.2.2.3), aufgereinigt. Die Titelverbindung konnte, nach dem Einengen des Lösungsmittels, aus Methanol (bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$) zur Fällung gebracht werden.

Hellgelb gefärbter Feststoff.

Schmb.: $185\text{-}187\text{ }^{\circ}\text{C}$ (aus MeOH).

Ausbeute: 4,9 %.

DC-Kontrolle: LM 1: $R_f = 0,60$, LM 2: $R_f = 0,55$, LM 5: $R_f = 0,16$ (siehe 6.2.2.2).

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6): $\delta = 9,42$ (s, 1H, 6-OH), 8,79 (s, 1H, **H-2**), 7,93 (s, 1H, -HC=N-OR), 7,70-7,60 (m, 3H, 4-C₆H₅), 7,56 (d, 1H, **H-8**, $^3J_{7/8} = 8,9$ Hz), 7,51-7,42 (m, 2H, 4-C₆H₅), 7,40-7,25 (m, 5H, **H-2'-H-6'**), 6,94 (dd, 1H, **H-7**, $^3J_{7/8} = 8,9$ Hz, $^4J_{5/7} = 2,6$ Hz), 6,33 (d, 1H, **H-5**, $^4J_{5/7} = 2,6$ Hz), 5,13 (s, 2H, -CH₂-).

IR ($\tilde{\nu}$): 1561, 1579 (w, $\nu_{C=C}$ arom.), 1605 (w, ν_{N-O} , 3-CH=N-OR), 1624 (w, $\nu_{C=N}$, 3-CH=N-OR), 2859, 2923 (w, ν_{C-H} aliph.), 3064 (m, ν_{C-H} arom.) cm^{-1} .

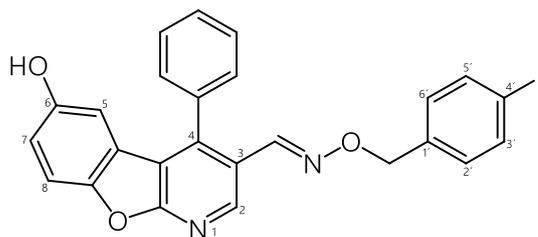
HPLC**: 99,39 % (t_R : 20,417 min), (Methode A, siehe 6.2.2.4).

MS (m/z (%))*: 393,20 (100, [M]⁺), (siehe 6.2.4).

HRMS/ESI (m/z (%)): gefunden für $[M+H]^+$: 395,1385 (100), berechnet für $[C_{25}H_{19}N_2O_3]^+$: 395,1390.

(E)-6-Hydroxy-4-phenylbenzofuro[2,3-b]pyridin-3-carbaldehyd-O-(4-fluorobenzyl)oxim

Verbindung: **81**
 Summenformel: C₂₅H₁₇FN₂O₃
 Relative Molmasse [M_r]: 412,1



Darstellung nach AAV 7 (siehe 7.1):

In einem Rundkolben wurde 50,0 mg **76** (0,17 mmol, 1,00 eq) in 14 mL THF gelöst. Anschließend fügte man 20 µL absolute Essigsäure (20,4 mg, 0,34 mmol, 2,00 eq) und 43 µL frisch destilliertes Pyrrolidin (37,0 mg, 0,52 mmol, 3,00 eq, **rauchend mit unangenehmen Geruch!**) hinzu. Der Ansatz wurde 30 min ruhen gelassen und folglich 92,1 mg **59** (0,52 mmol, 3,00 eq) ergänzt. Nach 4 d konnte die Reaktion beendet und wie in AAV 7 beschrieben, aufgereinigt werden. Das ölige Rohprodukt wurde säulenchromatographisch (LM 6, siehe 6.2.2.1) aufgetrennt und die produkt-haltige Fraktion, nach Entfernen des Lösungsmittels, aus Methanol (bei -20 °C) ausfallen gelassen.

Farbloser Feststoff.

Schmb.: 174-177 °C (aus MeOH).

Ausbeute: 85,7 %.

DC-Kontrolle: LM 4: R_f = 0,29 (siehe 6.2.2.2).

¹H-NMR (DMSO-*d*₆): δ = 9,42 (s, 1H, 6-OH), 8,78 (d, 1H, **H-2**, ⁴J_{2/-HC=N-OR} = 0,6 Hz), 7,92 (d, 1H, -HC=N-OR, ⁴J_{2/-HC=N-OR} = 0,6 Hz), 7,68-7,60 (m, 3H, 4-C₆H₅), 7,56 (d, 1H, **H-8**, ³J_{7/8} = 8,9 Hz), 7,49-7,44 (m, 2H, 4-C₆H₅), 7,43-7,37 (AA'BB', 2H, **H-2'**, **H-6'**), 7,21-7,12 (AA'BB', 2H, **H-3'**, **H-5'**), 6,94 (dd, 1H, **H-7**, ³J_{7/8} = 8,9 Hz, ⁴J_{5/7} = 2,6 Hz), 6,33 (d, 1H, **H-5**, ⁴J_{5/7} = 2,6 Hz), 5,10 (s, 2H, -CH₂-).

IR (ν̄): 1511, 1579 (s, m, ν_{C=C arom.}), 1604 (m, ν_{N-O, 3-CH=N-OR}), 1630 (w, ν_{C=N, 3-CH=N-OR}), 2853, 2924 (m, ν_{C-H aliph.}), 3082 (m, ν_{C-H arom.}) cm⁻¹.

HPLC**: 98,80 % (t_R: 18,200 min), (Methode A, siehe 6.2.2.4)

MS (*m/z* (%))*: 846,91 (40, [2×M+Na]⁺), 425,40 (55, [M+Na]⁺), 413,24 (100, [M+H]⁺), 411,20 (100, [M]⁻), (siehe 6.2.4).

HRMS/ESI (*m/z* (%)): gefunden für [M+H]⁺: 413,1290 (100), berechnet für [C₂₅H₁₈FN₂O₃]⁺: 413,1296.

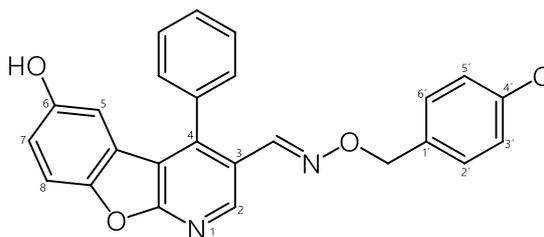
Synthese der Verbindungen

(E)-6-Hydroxy-4-phenylbenzofuro[2,3-b]pyridin-3-carbaldehyd-O-(4-chlorobenzyl)oxim

Verbindung: **82**

Summenformel: $C_{25}H_{17}ClN_2O_3$

Relative Molmasse $[M_r]: 428,1$



Darstellung nach AAV 3 (siehe 7.1):

In einem Dreihalsrundkolben wurden 1,45 g **74** (3,96 mmol, 1,00 eq) und 522,3 mg 1,4-Benzochinon (4,83 mmol, 1,22 eq) in wenig trockenem Dioxan gelöst. Über einen Tropftrichter fügte man 80 mL einer Mischung aus 72,1 mL trockenem Dioxan und 7,9 mL Perchlorsäure (70 %) hinzu. Es zeigte sich ein Farbumschlag von braun nach weinrot. Nach 4 d wurde der Ansatz, wie in AAV 3 beschrieben, aufgereinigt. Das ölige Rohprodukt wurde säulenchromatographisch (LM 4, siehe 6.2.2.1) aufgetrennt und die produktthaltige Fraktion, nach Entfernen des Lösungsmittels, aus Methanol (bei -20 °C) zur Titelverbindung ausfallen gelassen.

Orangebraun gefärbter Feststoff.

Schmb.: 187-190 °C (aus MeOH).

Ausbeute: 0,9 %.

DC-Kontrolle: LM 1: $R_f = 0,57$, LM 3: $R_f = 0,41$, LM 4: $R_f = 0,35$ (siehe 6.2.2.2).

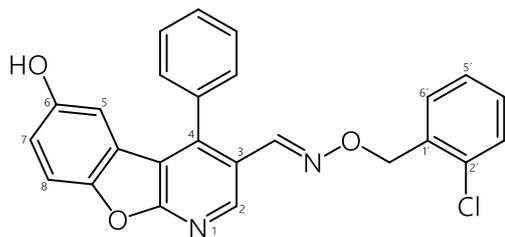
1H -NMR (DMSO- d_6): $\delta = 9,43$ (s, 1H, 6-OH), 8,77 (s, 1H, **H-2**), 7,94 (s, 1H, -HC=N-OR), 7,69-7,60 (m, 3H, 4-C₆H₅), 7,56 (d, 1H, **H-8**, $^3J_{7/8} = 8,9$ Hz), 7,49-7,44 (m, 2H, 4-C₆H₅), 7,43-7,35 (AA'BB', 4H, **H-2'**, **H-3'**, **H-5'**, **H-6'**), 6,94 (dd, 1H, **H-7**, $^3J_{7/8} = 8,9$ Hz, $^4J_{5/7} = 2,6$ Hz), 6,33 (d, 1H, **H-5**, $^4J_{5/7} = 2,6$ Hz), 5,11 (s, 2H, -CH₂-).

IR (ν): 1579 (w, $\nu_{C=C}$ arom.), 1605 (w, $\nu_{N-O, 3-CH=N-OR}$), 1623 (w, $\nu_{C=N, 3-CH=N-OR}$), 2871-2933 (w, ν_{C-H} aliph.), 3061-3201 (m, ν_{C-H} arom.) cm^{-1} .

HPLC**: 98,36 % (t_R : 39,900 min), (Methode A, siehe 6.2.2.4).

MS (m/z (%))*: 429,32 (100, [M+H]⁺), 431,31 (40, [M+H]⁺), 427,20 (100, [M]⁺), 429,22 (35, [M]⁺), (siehe 6.2.4).

HRMS/ESI (m/z (%)): gefunden für [M+H]⁺: 429,0998 (40), berechnet für [C₂₅H₁₈ClN₂O₃]⁺: 429,1000.

*(E)-6-Hydroxy-4-phenylbenzofuro[2,3-b]pyridin-3-carbaldehyd-O-(2-chlorobenzyl)oxim*Verbindung: **83**Summenformel: C₂₅H₁₇ClN₂O₃Relative Molmasse [M_r]: 428,1

Darstellung nach AAV 7 (siehe 7.1):

In einem Rundkolben wurde 50,0 mg **76** (0,17 mmol, 1,00 eq) in 14 mL THF gelöst. Anschließend fügte man 20 µL absolute Essigsäure (20,4 mg, 0,34 mmol, 2,00 eq) und 43 µL frisch destilliertes Pyrrolidin (37,0 mg, 0,52 mmol, 3,00 eq, **rauchend mit unangenehmen Geruch!**) hinzu. Der Ansatz wurde 30 min ruhen gelassen und folglich 100,7 mg **61** (0,52 mmol, 3,00 eq) ergänzt. Nach 4 d konnte die Reaktion beendet und wie in AAV 7 beschrieben, aufgereinigt werden. Das ölige Rohprodukt wurde säulenchromatographisch (LM 5, siehe 6.2.2.1) getrennt und die produktthaltige Fraktion, nach Entfernen des Lösungsmittels, aus Methanol (bei -20 °C) ausfallen gelassen.

Farbloser Feststoff.

Schmb.: 196-200 °C (aus MeOH).

Ausbeute: 76,4 %.

DC-Kontrolle: LM 1: R_f = 0,61, LM 4: R_f = 0,32, LM 5: R_f = 0,18 (siehe 6.2.2.2).

¹H-NMR (DMSO-*d*₆): δ = 9,42 (s, 1H, 6-OH), 8,77 (s, 1H, **H-2**), 7,96 (s, 1H, -HC=N-OR), 7,70-7,60 (m, 3H, 4-C₆H₅), 7,56 (d, 1H, **H-8**, ³J_{7/8} = 8,9 Hz), 7,49-7,43 (m, 4H, 4-C₆H₅, **H-3'**, **H-4'**), 7,39-7,30 (m, 2H, **H-5'**, **H-6'**), 6,94 (dd, 1H, **H-7**, ³J_{7/8} = 8,9 Hz, ⁴J_{5/7} = 2,6 Hz), 6,34 (d, 1H, **H-5**, ⁴J_{5/7} = 2,6 Hz), 5,22 (s, 2H, -CH₂-).

IR (ν̄): 1589 (w, ν_{C=C arom.}), 1605 (w, ν_{N-O, 3-CH=N-OR}), 1625 (w, ν_{C=N, 3-CH=N-OR}), 2860, 2912 (w, ν_{C-H aliph.}), 3057-3157 (m, ν_{C-H arom.}) cm⁻¹.

HPLC^{**}: 95,40 % (t_R: 31,275 min), (Methode A, siehe 6.2.2.4).

MS (*m/z* (%))^{*}: 878,91 (90, [2×M+Na]⁺), 880,88 (75, [2×M+Na]⁺), 451,24 (58, [M+Na]⁺), 429,33 (77, [M+H]⁺), 855,13 (55, [2×M]⁻), 427,20 (100, [M]⁻), 429,20 (35, [M]⁻), (siehe 6.2.4).

HRMS/ESI (*m/z* (%)): gefunden für [M+H]⁺: 429,1000 (100), berechnet für [C₂₅H₁₈ClN₂O₃]⁺: 429,1000; gefunden für [M+H]⁺: 431,0975 (35), berechnet für [C₂₅H₁₈ClN₂O₃]⁺: 431,0971

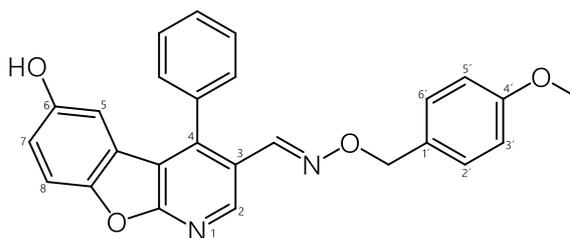
Synthese der Verbindungen

(E)-6-Hydroxy-4-phenylbenzofuro[2,3-b]pyridin-3-carbaldehyd-O-(4-methoxybenzyl)oxim

Verbindung: **84**

Summenformel: C₂₆H₂₀N₂O₄

Relative Molmasse [M_r]: 424,1



Darstellung nach AAV 7 (siehe 7.1):

In einem Rundkolben wurden 17,8 mg **76** (0,06 mmol, 1,00 eq) in 5 mL THF gelöst. Anschließend fügte man 7 μ L absolute Essigsäure (7,2 mg, 0,12 mmol, 2,00 eq) und 15 μ L frisch destilliertes Pyrrolidin (12,8 mg, 0,18 mmol, 3,00 eq, **rauchend mit unangenehmen Geruch!**) hinzu. Der Ansatz wurde 30 min ruhen gelassen und folglich 34,2 mg **62** (0,18 mmol, 3,00 eq) ergänzt. Nach 4 d konnte die Reaktion beendet und wie in AAV 7 beschrieben, aufgereinigt werden. Das ölige Rohprodukt wurde säulenchromatographisch (LM 4, siehe 6.2.2.1) aufgetrennt und die produkt-haltige Fraktion, nach Entfernen des Lösungsmittels, aus Methanol (bei -20 °C) ausfallen gelassen.

Hellgelb gefärbter Feststoff.

Schmb.: 141-144 °C (aus MeOH).

Ausbeute: 81,0 %.

DC-Kontrolle: LM 1: R_f = 0,57, LM 4: R_f = 0,25 (siehe 6.2.2.2).

¹H-NMR (DMSO-*d*₆): δ = 9,42 (s, 1H, 6-OH), 8,80 (s, 1H, **H-2**), 7,89 (s, 1H, -HC=N-OR), 7,69-7,60 (m, 3H, 4-C₆H₅), 7,56 (d, 1H, **H-8**, ³J_{7/8} = 8,9 Hz), 7,51-7,40 (m, 2H, 4-C₆H₅), 7,35-7,22 (AA'BB', 2H, **H-2'**, **H-6'**), 7,00-6,85 (m, 3H, **H-7**, **H-3'**, **H-5'**), 6,32 (d, 1H, **H-5**, ⁴J_{5/7} = 2,6 Hz), 5,04 (s, 2H, -CH₂-), 3,72 (s, 3H, 4'-OCH₃).

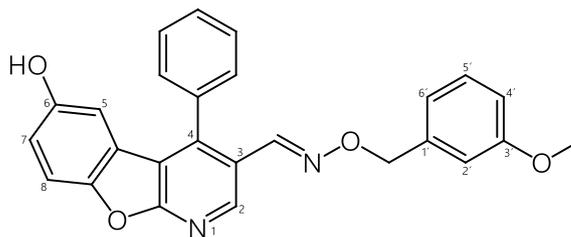
IR (ν): 1512, 1579 (s, w, $\nu_{C=C arom.}$), 1609 (m, $\nu_{N-O, 3-CH=N-OR}$), 2834-2929 (w, $\nu_{C-H aliph.}$), 3055-3130 (m, $\nu_{C-H arom.}$) cm⁻¹.

HPLC**: 98,28 % (t_R: 16,908 min), (Methode A, siehe 6.2.2.4).

MS (*m/z* (%))*: 447,20 (72, [M+Na]⁺), 425,21 (100, [M+H]⁺), 423,22 (100, [M]⁻), (siehe 6.2.4).

HRMS/ESI (*m/z* (%)): gefunden für [M+H]⁺: 425,1495 (65), berechnet für [C₂₆H₂₁N₂O₄]⁺: 425,1496.

(E)-6-Hydroxy-4-phenylbenzofuro[2,3-b]pyridin-3-carbaldehyd-O-(3-methoxybenzyl)oxim

Verbindung: **85**Summenformel: C₂₆H₂₀N₂O₄Relative Molmasse [M_r]: 424,1

Darstellung nach AAV 7 (siehe 7.1):

In einem Rundkolben wurde 50,0 mg **76** (0,17 mmol, 1,00 eq) in 14 mL THF gelöst. Anschließend fügte man 20 µL absolute Essigsäure (20,4 mg, 0,34 mmol, 2,00 eq) und 43 µL frisch destilliertes Pyrrolidin (37,0 mg, 0,52 mmol, 3,00 eq, **rauchend mit unangenehmen Geruch!**) hinzu. Der Ansatz wurde 30 min ruhen gelassen und folglich 99,0 mg **63** (0,52 mmol, 3,00 eq) ergänzt. Nach 4 d konnte die Reaktion beendet und wie in AAV 7 beschrieben, aufgearbeitet werden. Das ölige Rohprodukt wurde säulenchromatographisch (LM 5, 6.2.2.1) aufgereinigt und die produktthaltige Fraktion, nach Entfernen des Lösungsmittels, weiter mit MPLC (Methode A, siehe 6.2.2.3) aufgetrennt. Nach Einengen der Produktfraktion zum öligen Rückstand fiel die Titelverbindung aus Methanol (bei -20 °C) aus.

Hellgelb gefärbter Feststoff.

Schmb.: 115-117 °C (aus MeOH).

Ausbeute: 71,7 %.

DC-Kontrolle: LM 1: R_f = 0,55, LM 4: R_f = 0,27, LM 5: R_f = 0,14 (siehe 6.2.2.2).

¹H-NMR (DMSO-*d*₆): δ = 9,42 (s, 1H, 6-OH), 8,78 (d, 1H, **H-2**, ⁴J_{2/-HC=N-OR} = 0,6 Hz), 7,94 (d, 1H, -HC=N-OR, ⁴J_{2/-HC=N-OR} = 0,6 Hz), 7,69-7,61 (m, 3H, 4-C₆H₅), 7,56 (d, 1H, **H-8**, ³J_{7/8} = 8,9 Hz), 7,51-7,43 (m, 2H, 4-C₆H₅), 7,26 (dd, 1H, **H-5'**, ³J_{4'/5'} = 7,4 Hz, ³J_{5'/6'} = 6,9 Hz), 6,98-6,89 (m, 3H, **H-7**, **H-2'**, **H-6'**), 6,88-6,84 (m, 1H, **H-4'**), 6,34 (d, 1H, **H-5**, ⁴J_{5/7} = 2,6 Hz), 5,10 (s, 2H, -CH₂-), 3,73 (s, 3H, 3'-OCH₃).

IR (ν̄): 1589 (w, ν_{C=C arom.}), 1605 (m, ν_{N-O, 3-CH=N-OR}), 1625 (w, ν_{C=N, 3-CH=N-OR}), 2836-2909 (w, ν_{C-H aliph.}), 3058-3145 (m, ν_{C-H arom.}) cm⁻¹.

HPLC^{**}: 98,88 % (t_R 19,400 min), (Methode A, siehe 6.2.2.4).

MS (*m/z* (%))^{*}: 870,92 (100, [2×M+Na]⁺), 447,15 (55, [M+Na]⁺), 425,40 (72, [M+H]⁺), 847,09 (15, [2×M]⁻), 423,18 (100, [M]⁻), (siehe 6.2.4).

HRMS/ESI (*m/z* (%))^{*}: gefunden für [M+H]⁺: 425,1489 (100), berechnet für [C₂₆H₂₁N₂O₄]⁺: 425,1496.

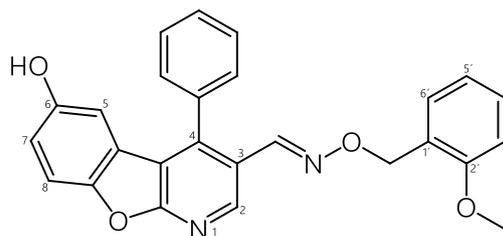
Synthese der Verbindungen

(E)-6-Hydroxy-4-phenylbenzofuro[2,3-b]pyridin-3-carbaldehyd-O-(2-methoxybenzyl)oxim

Verbindung: **86**

Summenformel: $C_{26}H_{20}N_2O_4$

Relative Molmasse $[M_r]: 424,1$



Darstellung nach AAV 7 (siehe 7.1):

In einem Rundkolben wurde 50,0 mg **76** (0,17 mmol, 1,00 eq) in 14 mL THF gelöst. Anschließend fügte man 20 μ L absolute Essigsäure (20,4 mg, 0,34 mmol, 2,00 eq) und 43 μ L frisch destilliertes Pyrrolidin (37,0 mg, 0,52 mmol, 3,00 eq, **rauchend mit unangenehmen Geruch!**) hinzu. Der Ansatz wurde 30 min ruhen gelassen und folglich 99,0 mg **64** (0,52 mmol, 3,00 eq) ergänzt. Nach 4 d konnte die Reaktion beendet und wie in AAV 7 beschrieben, aufgearbeitet werden. Das ölige Rohprodukt wurde säulenchromatographisch (LM 5, siehe 6.2.2.1) aufgereinigt und die produkt-haltige Fraktion, nach Entfernen des Lösungsmittels, weiter mit MPLC (Methode A, siehe 6.2.2.3) aufgetrennt. Nach Einengen der Produktfraktion zum öligen Rückstand fiel die Titelverbindung aus Methanol (bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$) aus.

Hellgelb gefärbter Feststoff.

Schmb.: $177\text{-}180\text{ }^{\circ}\text{C}$ (aus MeOH).

Ausbeute: 55,5 %.

DC-Kontrolle: LM 1: $R_f = 0,60$, LM 4: $R_f = 0,27$, LM 5: $R_f = 0,14$ (siehe 6.2.2.2).

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6): $\delta = 9,42$ (s, 1H, 6-OH), 8,79 (s, 1H, **H-2**), 7,91 (s, 1H, -HC=N-OR), 7,70-7,60 (m, 3H, 4-C₆H₅), 7,56 (d, 1H, **H-8**, $^3J_{7/8} = 8,9$ Hz), 7,52-7,42 (m, 2H, 4-C₆H₅), 7,43-7,24 (m, 2H, **H-5'**, **H-6'**), 7,02-6,86 (m, 3H, **H-7**, **H-3'**, **H-4'**), 6,33 (d, 1H, **H-5**, $^4J_{5/7} = 2,6$ Hz), 5,12 (s, 2H, -CH₂-), 3,77 (s, 3H, 2'-OCH₃).

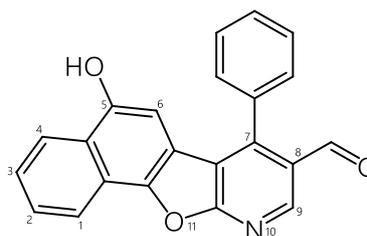
IR (ν): 1590 (w, $\nu_{C=C}$ arom.), 1605 (w, $\nu_{N-O, 3-CH=N-OR}$), 1625 (w, $\nu_{C=N, 3-CH=N-OR}$), 2850-2954 (m, ν_{C-H} aliph.), 3059-3165 (w, ν_{C-H} arom.) cm^{-1} .

HPLC**: 98,65 % (t_R : 17,875 min), (Methode A, siehe 6.2.2.4).

MS (m/z (%))*: 870,90 (100, $[2 \times M + Na]^+$), 447,14 (70, $[M + Na]^+$), 423,23 (100, $[M]^+$), (siehe 6.2.4).

HRMS/ESI (m/z (%)): gefunden für $[M+H]^+$: 425,1490 (100), berechnet für $[C_{26}H_{21}N_2O_4]^+$: 425,1496.

5-Hydroxy-7-phenylnaphtho[2',1':4,5]furo[2,3-b]pyridin-3-carbaldehyd

Verbindung: **87**Summenformel: C₂₂H₁₃NO₃Relative Molmasse [M_r]: 339,1

Darstellung:

In einem Rundkolben wurde 132,0 mg **90** (0,35 mmol, 1,00 eq) in 5 mL THF gelöst. Anschließend fügte man 1 mL destilliertes Wasser, 120,5 mg 4-Toluensulfonsäure (0,70 mmol, 2,00 eq), sowie 105,0 mg Paraformaldehyd (3,50 mmol, 10,00 eq, berechnet als Formaldehyd-Äquivalente) hinzu. Der Ansatz wurde 45 min bei 120 °C in einer Mikrowellenapparatur (siehe 6.2.7) umgesetzt. Nach folgender Wasser-Chloroform-Extraktion und Einengen der halogenhaltigen Phase trennte man das ölige Rohprodukt säulenchromatographisch (LM 4, siehe 6.2.2.1) auf. Nach Entfernen des Lösungsmittels von der produkthaltigen Fraktion resultierte die Titelverbindung, die 3 d lang im Exsikkator getrocknet wurde.

Hellbraun gefärbter Feststoff.

Schmb.: 264-268 °C.

Ausbeute: 83,7 %.

DC-Kontrolle: LM 8: R_f = 0,61, LM 13: R_f = 0,45 (siehe 6.2.2.2).

¹H-NMR (DMSO-*d*₆): δ = 10,22 (s, 1H, 5-OH), 9,90 (s, 1H, HC(=O)R), 8,93 (s, 1H, **H-9**), 8,34 (dd, 1H, **H-1**, ³J_{1/2} = 8,2 Hz, ⁴J_{1/3} = 1,2 Hz), 8,23 (dd, 1H, **H-4**, ³J_{3/4} = 8,2 Hz, ⁴J_{2/4} = 1,2 Hz), 7,79-7,58 (m, 7H, **H-2**, **H-3**, 7-C₆H₅), 6,53 (s, 1H, **H-6**).

IR (ν̄): 1557, 1586 (m, ν_{C=C arom.}), 1691 (s, ν_{C=O}), 2761-2875 (w, ν_{C-H aliph.}), 3056-3240 (m, ν_{C-H arom.}) cm⁻¹.

HPLC*: 98,84 % (t_R: 14,799 min), (siehe 6.2.2.4).MS (m/z (%))*: 340,53 (100, [M+H]⁺), 338,47 (100, [M]⁺), (siehe 6.2.4).HRMS/ESI (m/z (%)): gefunden für [M+H]⁺: 340,0968 (100), berechnet für [C₂₂H₁₄NO₃]⁺: 340,0968.

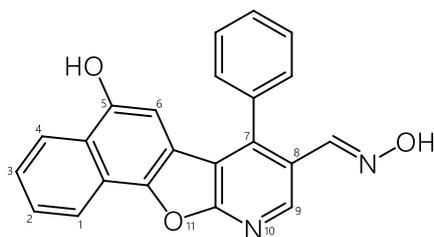
Synthese der Verbindungen

(E)-5-Hydroxy-7-phenylnaphtho[2',1':4,5]furo[2,3-b]pyridin-3-carbaldehydoxim

Verbindung: **88**

Summenformel: C₂₂H₁₄N₂O₃

Relative Molmasse [M_r]: 354,1



Darstellung:

In einem Mehrhalsrundkolben wurden 191,2 mg **93** (0,40 mmol, 1,00 eq) in 25 mL einer Lösung aus THF und Methanol (1:1, V/V) gelöst. Anschließend fügte man 213,0 mg Palladium auf Kohle (10 %, 0,20 mmol, 0,50 eq, berechnet als Palladiumanteil) hinzu und begaste den schüttelnden Ansatz 12 h mit 1 atm Wasserstoff. Nach folgender Wasser-Chloroform-Extraktion und Einengen der halogenhaltigen Phase trennte man das ölige Rohprodukt säulenchromatographisch (LM 4, siehe 6.2.2.1) auf. Nach Entfernen des Lösungsmittels von der produkthaltigen Fraktion, resultierte die Titelverbindung, die 3 d lang im Exsikkator getrocknet wurde.

Farbloser Feststoff.

Schmb.: 259-261 °C.

Ausbeute: 19,6 %.

DC-Kontrolle: LM 1: R_f = 0,59, LM 4: R_f = 0,21 (siehe 6.2.2.2).

¹H-NMR (DMSO-*d*₆): δ = 11,47 (s, 1H, -HC=N-OH), 10,11 (s, 1H, 5-OH), 8,85 (s, 1H, **H-9**), 8,32 (dd, 1H, **H-1**, ³J_{1/2} = 8,2 Hz, ⁴J_{1/3} = 1,3 Hz), 8,22 (dd, 1H, **H-4**, ³J_{3/4} = 8,2 Hz, ⁴J_{2/4} = 1,3 Hz), 7,84 (s, 1H, -HC=N-OH), 7,76-7,66 (m, 4H, **H-3**, 7-C₆H₅), 7,60 (ddd, 1H, **H-2**, ³J_{1/2} = 8,2 Hz, ³J_{2/3} = 6,9 Hz, ⁴J_{2/4} = 1,3 Hz), 7,56-7,50 (m, 2H, 7-C₆H₅), 6,45 (s, 1H, **H-6**).

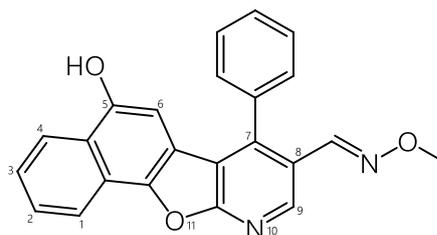
IR (ν̄): 1588, 1599 (s, m, ν_{C=C arom.}), 1605 (w, ν_{N-O, 3-CH=N-OH}), 1625 (w, ν_{C=N, 3-CH=N-OH}), 2725-2980 (s, ν_{C-H aliph.}), 3030-3096 (m, ν_{C-H arom.}), 3296 (m, ν_{O-H}) cm⁻¹.

HPLC*: 99,76 % (t_R: 12,274 min), (siehe 6.2.2.4).

MS (m/z (%))*: 355,27 (100, [M+H]⁺), 353,28 (97, [M]⁺), (siehe 6.2.4).

HRMS/ESI (m/z (%)): gefunden für [M+H]⁺: 355,1073 (100), berechnet für [C₂₂H₁₅N₂O₃]⁺: 355,1077.

(E)-5-Hydroxy-7-phenylnaphtho[2',1':4,5]furo[2,3-b]pyridin-3-carbaldehyd-O-methyloxim

Verbindung: **89**Summenformel: C₂₃H₁₆N₂O₃Relative Molmasse [M_r]: 368,1

Darstellung nach AAV 3 (siehe 7.1):

In einem Dreihalsrundkolben wurden 1,52 g **71** (5,94 mmol, 1,00 eq) und 1,03 g 1,4-Naphthochinon (6,53 mmol, 1,22 eq) in wenig trockenem Dioxan gelöst. Über einen Tropftrichter fügte man 80 mL einer Mischung aus 68,2 mL trockenem Dioxan und 11,8 mL Perchlorsäure (70 %) hinzu. Es zeigte sich ein Farbumschlag von braun nach weinrot. Nach 12 d wurde der Ansatz, wie in AAV 3 beschrieben, aufgearbeitet. Das ölige Rohprodukt wurde säulenchromatographisch (LM 5, siehe 6.2.2.1) aufgereinigt und die produktthaltige Fraktion, nach Entfernen des Lösungsmittels, aus Ethylacetat (bei 2-8 °C) zur Fällung gebracht.

Hellgelb gefärbter Feststoff.

Schmb.: 243-246 °C (aus EtOAc).

Ausbeute: 2,3 %.

DC-Kontrolle: LM 1: R_f = 0,60, LM 4: R_f = 0,40, LM 5: R_f = 0,27 (siehe 6.2.2.2).

¹H-NMR (DMSO-*d*₆): δ = 10,12 (s, 1H, 5-OH), 8,79 (s, 1H, **H-9**), 8,29 (dd, 1H, **H-1**, ³J_{1/2} = 8,2 Hz, ⁴J_{1/3} = 1,2 Hz), 8,20 (dd, 1H, **H-4**, ³J_{3/4} = 8,2 Hz, ⁴J_{2/4} = 1,2 Hz), 7,86 (s, 1H, -HC=N-OCH₃), 7,74-7,64 (m, 4H, **H-3**, 7-C₆H₅), 7,59 (ddd, 1H, **H-2**, ³J_{1/2} = 8,2 Hz, ³J_{2/3} = 6,8 Hz, ⁴J_{2/4} = 1,2 Hz), 7,55-7,49 (m, 2H, 7-C₆H₅), 6,46 (s, 1H, **H-6**), 3,86 (s, 3H, -HC=N-OCH₃).

¹³C-NMR (DMSO-*d*₆): δ = 162,88 (C10a), 150,26 (C5), 145,07 (-C=N-), 144,75 (C7), 144,51 (C11a), 143,21 (C9), 134,07 (C1_{Ph}), 129,83 (C4_{Ph}), 129,56 (C2_{Ph}, C6_{Ph}), 129,45 (C3_{Ph}, C5_{Ph}), 128,07 (C3), 126,64 (C2), 125,48 (C4a), 123,79 (C4), 122,47 (C8), 121,14 (C11b), 120,81 (C1), 117,26 (C6a), 115,83 (C6b), 100,24 (C6), 62,25 (OCH₃).

IR (ν̄): 1585, 1599 (w, m, ν_{C=C arom.}), 1605 (w, ν_{N-O, 3-CH=N-OR}), 1624 (w, ν_{C=N, 3-CH=N-OR}), 2817-2933 (m, ν_{C-H aliph.}), 3238 (m, ν_{C-H arom.}) cm⁻¹.

HPLC*: 99,81 % (t_R: 16,596 min), (siehe 6.2.2.4).MS (m/z (%))*: 759,18 (100, [2×M+Na]⁺), 369,23 (100, [M+H]⁺), 367,23 (50, [M]⁻), (siehe 6.2.4).

HRMS/ESI (m/z (%)): gefunden für [M+H]⁺: 369,1228 (100), berechnet für [C₂₃H₁₇N₂O₃]⁺: 369,1234; gefunden für [M+H]⁺: 370,1261 (25), berechnet für [C₂₃H₁₇N₂O₃]⁺: 370,1267.

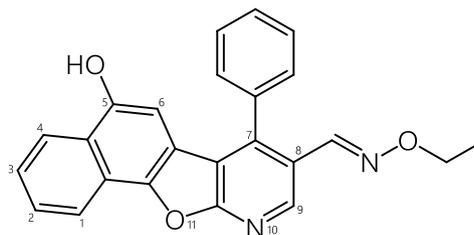
Synthese der Verbindungen

(E)-5-Hydroxy-7-phenylnaphtho[2',1':4,5]furo[2,3-b]pyridin-3-carbaldehyd-O-ethylloxim

Verbindung: **90**

Summenformel: $C_{24}H_{18}N_2O_3$

Relative Molmasse $[M_r]$: 382,1



Darstellung nach AAV 3 (siehe 7.1):

In einem Dreihalsrundkolben wurden 1,90 g **72** (7,00 mmol, 1,00 eq) und 1,35 g 1,4-Naphthochinon (8,54 mmol, 1,22 eq) in wenig trockenem Dioxan gelöst. Über einen Tropftrichter fügte man 100 mL einer Mischung aus 84,5 mL trockenem Dioxan und 15,5 mL Perchlorsäure (70 %) hinzu. Es zeigte sich ein Farbumschlag von braun nach weinrot. Nach 10 d wurde der Ansatz, wie in AAV 3 beschrieben, aufgearbeitet. Das ölige Rohprodukt wurde säulenchromatographisch (LM 5, siehe 6.2.2.1) aufgereinigt und die produktthaltige Fraktion, nach Entfernen des Lösungsmittels, aus Ethylacetat (bei 2-8 °C) zur Fällung gebracht.

Hellgelb gefärbter Feststoff.

Schmb.: 249-252 °C (aus EtOAc).

Ausbeute: 7,6 %.

DC-Kontrolle: LM 1: $R_f = 0,61$, LM 4: $R_f = 0,42$, LM 5: $R_f = 0,31$ (siehe 6.2.2.2).

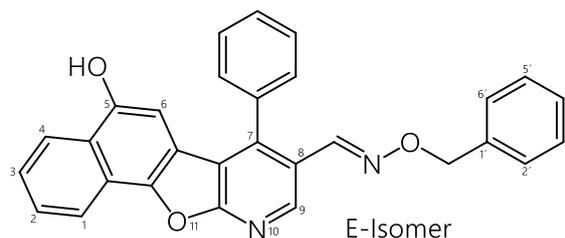
1H -NMR (DMSO- d_6): $\delta = 10,12$ (s, 1H, 5-OH), 8,81 (s, 1H, **H-9**), 8,30 (dd, 1H, **H-1**, $^3J_{1/2} = 8,2$ Hz, $^4J_{1/3} = 1,3$ Hz), 8,21 (dd, 1H, **H-4**, $^3J_{3/4} = 8,2$ Hz, $^4J_{2/4} = 1,3$ Hz), 7,87 (s, 1H, -HC=N-OCH₂CH₃), 7,75-7,65 (m, 4H, **H-3**, 7-C₆H₅), 7,59 (ddd, 1H, **H-2**, $^3J_{1/2} = 8,2$ Hz, $^3J_{2/3} = 6,9$ Hz, $^4J_{2/4} = 1,3$ Hz), 7,55-7,48 (m, 2H, 7-C₆H₅), 6,45 (s, 1H, **H-6**), 4,12 (q, 2H, -HC=N-OCH₂CH₃, $^3J_{-CH_2-/CH_3} = 7,0$ Hz), 1,20 (t, 3H, -HC=N-OCH₂CH₃, $^3J_{-CH_2-/CH_3} = 7,0$ Hz).

IR ($\tilde{\nu}$): 1596 (w, $\nu_{C=C arom.}$), 1605 (m, $\nu_{N-O, 3-CH=N-OR}$), 1639 (m, $\nu_{C=N, 3-CH=N-OR}$), 2874-2978 (m, $\nu_{C-H aliph.}$), 3058-3150 (m, $\nu_{C-H arom.}$) cm^{-1} .

HPLC*: 99,29 % (t_R : 16,886 min), (siehe 6.2.2.4).

MS (m/z (%))*: 787,16 (65, $[2 \times M + Na]^+$), 383,49 (100, $[M + H]^+$), 763,20 (25, $[2 \times M]^-$), 381,50 (100, $[M]^-$), (siehe 6.2.4).

HRMS/ESI (m/z (%)): gefunden für $[M + H]^+$: 383,1392 (100), berechnet für $[C_{24}H_{19}N_2O_3]^+$: 383,1390.

*(E/Z)-5-Hydroxy-7-phenylnaphtho[2',1':4,5]furo[2,3-b]pyridin-3-carbaldehyd-O-benzylloxim*Verbindung: **91**Summenformel: $C_{29}H_{20}N_2O_3$ Relative Molmasse $[M_r]$: 444,1

Darstellung nach AAV 3 (siehe 7.1):

In einem Dreihalsrundkolben wurden 2,26 g **73** (6,80 mmol, 1,00 eq) und 1,29 g 1,4-Naphthochinon (8,17 mmol, 1,22 eq) in wenig trockenem Dioxan gelöst. Über einen Tropftrichter fügte man 100 mL einer Mischung aus 86,4 mL trockenem Dioxan und 13,6 mL Perchlorsäure (70 %) hinzu. Es zeigte sich ein Farbumschlag von braun nach weinrot. Nach 96 h wurde der Ansatz, wie in AAV 3 beschrieben, aufgereinigt. Das ölige Rohprodukt wurde säulenchromatographisch (LM 4, siehe 6.2.2.1) aufgetrennt und die produktthaltige Fraktion, nach Entfernen des Lösungsmittels, aus Methanol (bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$) zur Fällung gebracht. Die Titelverbindung konnte nach dreimaligem Waschen mit Methanol und Diethylether gewonnen werden.

Hellgelb gefärbter Feststoff.

Schmb.: $210\text{-}215\text{ }^{\circ}\text{C}$ (aus MeOH).

Ausbeute: 2,0 %, E/Z-Verhältnis: 93:7.

DC-Kontrolle: LM 1: $R_f = 0,62$, LM 4: $R_f = 0,42$, LM 6: $R_f = 0,20$ (siehe 6.2.2.2).

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6), E-Isomer: $\delta = 10,13$ (s, 1H, 5-OH), 8,81 (s, 1H, **H-9**), 8,32 (dd, 1H, **H-1**, $^3J_{1/2} = 8,2$ Hz, $^4J_{1/3} = 1,3$ Hz), 8,22 (dd, 1H, **H-4**, $^3J_{3/4} = 8,2$ Hz, $^4J_{2/4} = 1,3$ Hz), 7,95 (s, 1H, -HC=N-OR), 7,72 (ddd, 1H, **H-3**, $^3J_{3/4} = 8,2$ Hz, $^3J_{2/3} = 6,9$ Hz, $^4J_{1/3} = 1,3$ Hz), 7,70-7,65 (m, 3H, 7-C₆H₅), 7,60 (ddd, 1H, **H-2**, $^3J_{1/2} = 8,2$ Hz, $^3J_{2/3} = 6,9$ Hz, $^4J_{2/4} = 1,3$ Hz), 7,56-7,48 (m, 2H, 7-C₆H₅), 7,40-7,32 (m, 5H, **H-2'**-**H-6'**), 6,45 (s, 1H, **H-6**), 5,14 (s, 2H, -CH₂-).

IR (ν): 1584, 1599 (m, $\nu_{C=C\text{ arom.}}$), 1605 (w, $\nu_{N-O, 3-CH=N-OR}$), 1625 (w, $\nu_{C=N, 3-CH=N-OR}$), 2880, 2938 (w, $\nu_{C-H\text{ aliph.}}$), 3035-3239 (m, $\nu_{C-H\text{ arom.}}$) cm^{-1} .

HPLC^{**}: 93,21 %, ($t_{R\text{ E-Isomer}}$: 12,683 min), (Methode B, siehe 6.2.2.4).MS (m/z (%))^{*}: 443,21 (100, [M]⁺), (siehe 6.2.4).HRMS/ESI (m/z (%)): gefunden für $[M+H]^+$: 445,1544 (100), berechnet für $[C_{29}H_{21}N_2O_3]^+$: 445,1547.

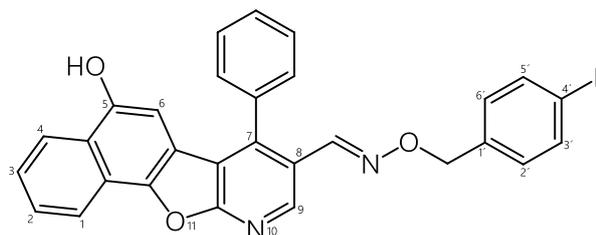
Synthese der Verbindungen

(E)-5-Hydroxy-7-phenylnaphtho[2',1':4,5]furo[2,3-b]pyridin-3-carbaldehyd-O-(4-fluorobenzyl)oxim

Verbindung: **92 E**

Summenformel: $C_{29}H_{19}FN_2O_3$

Relative Molmasse $[M_r]: 462,1$



Darstellung nach AAV 7 (siehe 7.1):

In einem Rundkolben wurde 36,0 mg **87** (0,10 mmol, 1,00 eq) in 5 mL THF gelöst. Anschließend fügte man 12 μ L absolute Essigsäure (12,1 mg, 0,20 mmol, 2,00 eq) und 26 μ L frisch destilliertes Pyrrolidin (21,8 mg, 0,30 mmol, 3,00 eq, **rauchend mit unangenehmen Geruch!**) hinzu. Der Ansatz wurde 30 min ruhen gelassen und folglich 53,1 mg **59** (0,30 mmol, 3,00 eq) ergänzt. Nach 4 d konnte die Reaktion beendet und wie in AAV 7 beschrieben, aufgearbeitet werden. Das ölige Rohprodukt wurde säulenchromatographisch (LM 6, siehe 6.2.2.1) aufgereinigt und die produkt-haltige Fraktion, nach Entfernen des Lösungsmittels, weiter mit MPLC (Methode A, siehe 6.2.2.3), aufgetrennt. Die Titelverbindung konnte, nach dem Einengen des Lösungsmittels, aus Methanol (bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$) zur Fällung gebracht werden.

Gelb gefärbter Feststoff.

Schmb.: $202\text{--}205\text{ }^{\circ}\text{C}$ (aus MeOH).

Ausbeute: 61,6 %.

DC-Kontrolle: LM 4: $R_f = 0,40$ (siehe 6.2.2.2).

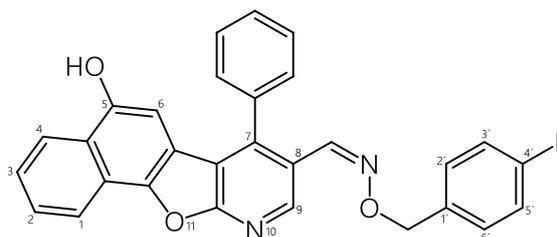
$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6): $\delta = 10,13$ (s, 1H, 5-OH), 8,81 (s, 1H, **H-9**), 8,32 (dd, 1H, **H-1**, $^3J_{1/2} = 8,2$ Hz, $^4J_{1/3} = 1,3$ Hz), 8,22 (dd, 1H, **H-4**, $^3J_{3/4} = 8,2$ Hz, $^4J_{2/4} = 1,3$ Hz), 7,95 (s, 1H, -HC=N-OR), 7,72 (ddd, 1H, **H-3**, $^3J_{3/4} = 8,2$ Hz, $^3J_{2/3} = 6,9$ Hz, $^4J_{1/3} = 1,3$ Hz), 7,69-7,65 (m, 3H, 7-C₆H₅), 7,61 (ddd, 1H, **H-2**, $^3J_{1/2} = 8,2$ Hz, $^3J_{2/3} = 6,9$ Hz, $^4J_{2/4} = 1,3$ Hz), 7,56-7,47 (m, 2H, 7-C₆H₅), 7,46-7,37 (AA'BB', 2H, **H-2'**, **H-6'**), 7,23-7,12 (AA'BB', 2H, **H-3'**, **H-5'**), 6,45 (s, 1H, **H-6**), 5,12 (s, 2H, -CH₂-).

IR (ν): 1509, 1587, 1598 (s, m, $\nu_{C=C\text{ arom.}}$), 1615 (w, $\nu_{C=N, 3-CH=N-OR}$), 2850, 2919 (s, m, $\nu_{C-H\text{ aliph.}}$), 3069 (m, $\nu_{C-H\text{ arom.}}$) cm^{-1} .

HPLC**: 96,30 %, (t_R : 13,575 min), (Methode B, siehe 6.2.2.4).

MS (m/z (%))*: 946,90 (45, $[2 \times M + Na]^+$), 461,31 (100, $[M]^+$), (siehe 6.2.4).

HRMS/ESI (m/z (%)): gefunden für $[M+H]^+$: 463,1463 (100), berechnet für $[C_{29}H_{20}FN_2O_3]^+$: 463,1452.

(Z)-5-Hydroxy-7-phenylnaphtho[2',1':4,5]furo[2,3-b]pyridin-3-carbaldehyd-O-(4-fluorobenzyl)oximVerbindung: **92 Z**Summenformel: C₂₉H₁₉FN₂O₃Relative Molmasse [M_r]: 462,1

Darstellung nach AAV 7 (siehe 7.1):

Das Stellungsisomer konnte bei der Umsetzung von **92 E** nach der MPLC-Fraktionierung isoliert und nach dem Einengen des Lösungsmittels aus Methanol (bei -20 °C) zur Fällung gebracht werden.

Hellgelb gefärbter Feststoff.

Schmb.: 215-218 °C (aus MeOH).

Ausbeute: 25,7 %.

DC-Kontrolle: LM 4: $R_f = 0,35$ (siehe 6.2.2.2).

¹H-NMR (DMSO-*d*₆): $\delta = 10,13$ (s, 1H, 5-OH), 9,06 (s, 1H, **H-9**), 8,32 (dd, 1H, **H-1**, $^3J_{1/2} = 8,2$ Hz, $^4J_{1/3} = 1,3$ Hz), 8,22 (dd, 1H, **H-4**, $^3J_{3/4} = 8,2$ Hz, $^4J_{2/4} = 1,3$ Hz), 7,72 (ddd, 1H, **H-3**, $^3J_{3/4} = 8,2$ Hz, $^3J_{2/3} = 6,9$ Hz, $^4J_{1/3} = 1,3$ Hz), 7,68-7,58 (m, 4H, **H-2**, 7-C₆H₅), 7,55-7,46 (m, 2H, 7-C₆H₅), 7,46-7,36 (AA'BB', 2H, **H-2'**, **H-6'**), 7,30 (s, 1H, -HC=N-OR), 7,24-7,11 (AA'BB', 2H, **H-3'**, **H-5'**), 6,50 (s, 1H, **H-6**), 5,14 (s, 2H, -CH₂-).

IR (ν): 1507, 1588 (s, m, $\nu_{C=C}$ arom.), 1615 (w, $\nu_{C=N}$, 3-CH=N-OR), 2851-2921 (m, ν_{C-H} aliph.), 3058-3250 (m, ν_{C-H} arom.) cm⁻¹.

HPLC**: 95,10 % (tr: 9,142 min), (Methode B, siehe 6.2.2.4).

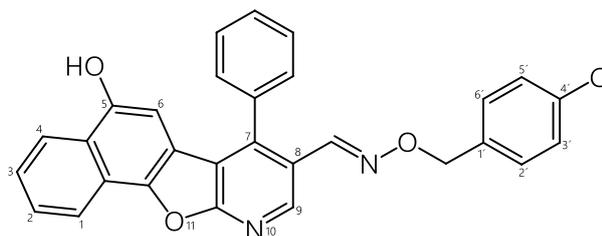
MS (m/z (%))*: 463,24 (55, [M+H]⁺), 461,22 (100, [M]⁻), (siehe 6.2.4).

HRMS/ESI (m/z (%)): gefunden für [M+H]⁺: 463,1448 (100), berechnet für [C₂₉H₂₀FN₂O₃]⁺: 463,1452.

Synthese der Verbindungen

(E)-5-Hydroxy-7-phenylnaphtho[2',1':4,5]furo[2,3-b]pyridin-3-carbaldehyd-O-(4-chlorobenzyl)oxim

Verbindung: **93**
 Summenformel: $C_{29}H_{19}ClN_2O_3$
 Relative Molmasse $[M_r]$: 478,1



Darstellung nach AAV 3 (siehe 7.1):

In einem Dreihalsrundkolben wurden 2,59 g **74** (7,07 mmol, 1,00 eq) und 1,36 g 1,4-Naphthochinon (8,63 mmol, 1,22 eq) in wenig trockenem Dioxan gelöst. Über einen Tropftrichter fügte man 150 mL einer Mischung aus 135,6 mL trockenem Dioxan und 14,4 mL Perchlorsäure (70 %) hinzu. Es zeigte sich ein Farbumschlag von braun nach weinrot. Nach 5 d wurde der Ansatz, wie in AAV 3 beschrieben, aufgearbeitet. Das ölige Rohprodukt wurde säulenchromatographisch (LM 4, siehe 6.2.2.1) aufgereinigt und die produktthaltige Fraktion, nach Entfernen des Lösungsmittels, aus Methanol (bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$) zur Fällung gebracht.

Hellbraun gefärbter, feinpulvriger Feststoff.

Schmb.: $203\text{-}205\text{ }^{\circ}\text{C}$ (aus MeOH).

Ausbeute: 9,42 %.

DC-Kontrolle: LM 1: $R_f = 0,65$, LM 4: $R_f = 0,41$ (siehe 6.2.2.2).

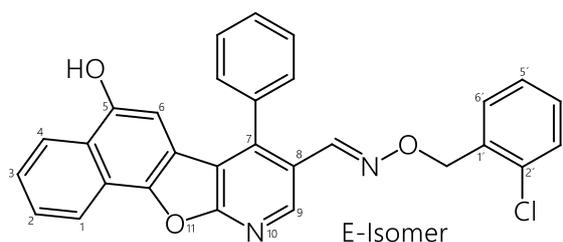
$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6): $\delta = 10,13$ (s, 1H, 5-OH), 8,80 (s, 1H, **H-9**), 8,32 (dd, 1H, **H-1**, $^3J_{1/2} = 8,2$ Hz, $^4J_{1/3} = 1,2$ Hz), 8,21 (dd, 1H, **H-4**, $^3J_{3/4} = 8,2$ Hz, $^4J_{2/4} = 1,2$ Hz), 7,96 (s, 1H, -HC=N-OR), 7,72 (ddd, 1H, **H-3**, $^3J_{3/4} = 8,2$ Hz, $^3J_{2/3} = 6,9$ Hz, $^4J_{1/3} = 1,2$ Hz), 7,70-7,65 (m, 3H, 7-C₆H₅), 7,61 (ddd, 1H, **H-2**, $^3J_{1/2} = 8,2$ Hz, $^3J_{2/3} = 6,9$ Hz, $^4J_{2/4} = 1,2$ Hz), 7,56-7,49 (m, 2H, 7-C₆H₅), 7,45-7,36 (AA'BB', 4H, **H-2'**, **H-3'**, **H-5'**, **H-6'**), 6,45 (s, 1H, **H-6**), 5,13 (s, 2H, -CH₂-).

IR ($\tilde{\nu}$): 1580, 1596 (m, $\nu_{C=C\text{ arom.}}$), 1603 (w, $\nu_{N-O, 3-CH=N-OR}$), 1630 (w, $\nu_{C=N, 3-CH=N-OR}$), 2871, 2924 (m, $\nu_{C-H\text{ aliph.}}$), 3059-3188 (s, m, $\nu_{C-H\text{ arom.}}$) cm^{-1} .

HPLC^{**}: 95,27 %, (t_R : 19,017 min), (Methode B, siehe 6.2.2.4).

MS (m/z (%))^{*}: 978,87 (55, $[2 \times M + Na]^+$), 479,28 (100, $[M + H]^+$), 481,29 (45, $[M + H]^+$), 477,21 (100, $[M]$), 479,20 (35, $[M]$), (siehe 6.2.4).

HRMS/ESI (m/z (%)): gefunden für $[M + H]^+$: 479,1145 (100), berechnet für $[C_{29}H_{20}ClN_2O_3]^+$: 479,1157; gefunden für $[M + H]^+$: 481,1116 (32), berechnet für $[C_{29}H_{20}ClN_2O_3]^+$: 481,1127.

*(E/Z)-5-Hydroxy-7-phenylnaphtho[2',1':4,5]furo[2,3-b]pyridin-3-carbaldehyd-O-(2-chlorobenzyl)oxim*Verbindung: **94**Summenformel: C₂₉H₁₉ClN₂O₃Relative Molmasse [M_r]: 478,1

Darstellung nach AAV 7 (siehe 7.1):

In einem Rundkolben wurde 59,0 mg **87** (0,18 mmol, 1,00 eq) in 8 mL THF gelöst. Anschließend fügte man 20 µL absolute Essigsäure (20,5 mg, 0,36 mmol, 2,00 eq) und 45 µL frisch destilliertes Pyrrolidin (38,4 mg, 0,54 mmol, 3,00 eq, **rauchend mit unangenehmen Geruch!**) hinzu. Der Ansatz wurde 30 min ruhen gelassen und folglich 104,8 mg **61** (0,54 mmol, 3,00 eq) ergänzt. Nach 4 d konnte die Reaktion beendet und wie in AAV 7 beschrieben, aufgereinigt werden. Das ölige Rohprodukt wurde säulenchromatographisch (LM 4, siehe 6.2.2.1) aufgetrennt und die produkt-haltige Fraktion, nach Entfernen des Laufmittels, aus Ethylacetat (bei 2-8 °C) ausfallen gelassen.

Gelb gefärbter Feststoff.

Schmb.: 232-237 °C (aus EtOAc).

Ausbeute: 62,0 %, E/Z-Verhältnis: 90:10.

DC-Kontrolle: LM 1: R_f = 0,68, LM 4: R_f = 0,38 (siehe 6.2.2.2).

¹H-NMR (DMSO-*d*₆), E-Isomer: δ = 10,13 (s, 1H, 5-OH), 8,80 (s, 1H, **H-9**), 8,32 (dd, 1H, **H-1**, ³J_{1/2} = 8,2 Hz, ⁴J_{1/3} = 1,2 Hz), 8,22 (dd, 1H, **H-4**, ³J_{3/4} = 8,2 Hz, ⁴J_{2/4} = 1,2 Hz), 7,99 (s, 1H, -HC=N-OR), 7,77-7,64 (m, 4H, **H-3**, 7-C₆H₅), 7,60 (ddd, 1H, **H-2**, ³J_{1/2} = 8,2 Hz, ³J_{2/3} = 6,9 Hz, ⁴J_{2/4} = 1,2 Hz), 7,56-7,44 (m, 4H, **H-3'**, **H-4'**, 7-C₆H₅), 7,38-7,30 (m, 2H, **H-5'**, **H-6'**), 6,45 (s, 1H, **H-6**), 5,24 (s, 2H, -CH₂-).

IR (ν̄): 1595 (m, ν_{C=C arom.}), 1611 (w, ν_{N-O, 3-CH=N-OR}), 1640 (w, ν_{C=N, 3-CH=N-OR}), 2884, 2923 (w, ν_{C-H aliph.}), 3059 (m, ν_{C-H arom.}) cm⁻¹.

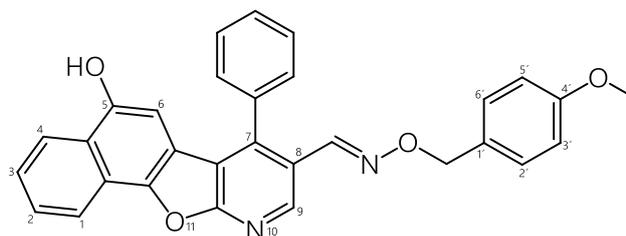
HPLC^{**}: 98,78 %, (t_R E-Isomer: 20,083 min), (Methode B, siehe 6.2.2.4).

MS (m/z (%))^{*}: 479,16 (100, [M+H]⁺), 481,28 (55, [M+H]⁺), 477,22 (100, [M]⁻), 479,20 (35, [M]⁻), (siehe 6.2.4).

HRMS/ESI (m/z (%)): gefunden für [M+H]⁺: 479,1152 (100), berechnet für [C₂₉H₂₀ClN₂O₃]⁺: 479,1157; gefunden für [M+H]⁺: 481,1130 (100), berechnet für [C₂₉H₂₀ClN₂O₃]⁺: 481,1127.

(E)-5-Hydroxy-7-phenylnaphtho[2',1':4,5]furo[2,3-b]pyridin-3-carbaldehyd-O-(4-methoxybenzyl)oxim

Verbindung: **95**
 Summenformel: C₃₀H₂₂N₂O₄
 Relative Molmasse [M_r]: 474,1



Darstellung nach AAV 7 (siehe 7.1):

In einem Rundkolben wurde 40,0 mg **87** (0,12 mmol, 1,00 eq) in 5 mL THF gelöst. Anschließend fügte man 13 µL absolute Essigsäure (13,3 mg, 0,24 mmol, 2,00 eq) und 30 µL frisch destilliertes Pyrrolidin (25,6 mg, 0,36 mmol, 3,00 eq, **rauchend mit unangenehmen Geruch!**) hinzu. Der Ansatz wurde 30 min ruhen gelassen und folglich 68,4 mg **62** (0,36 mmol, 3,00 eq) ergänzt. Nach 4 d konnte die Reaktion beendet und wie in AAV 7 beschrieben, aufgearbeitet werden. Das ölige Rohprodukt wurde säulenchromatographisch (LM 4, siehe 6.2.2.1) getrennt und die produktthaltige Fraktion, nach Entfernen des Lösungsmittels, weiter mit MPLC (Methode A, siehe 6.2.2.3), aufgereinigt. Die Titelverbindung war, nach Einengen der Fraktion, aus Ethylacetat ausgefallen (bei -20 °C).

Rotbraun gefärbter Feststoff.

Schmb.: 193-196 °C (aus EtOAc).

Ausbeute: 20,0 %.

DC-Kontrolle: LM 1: R_f = 0,65, LM 4: R_f = 0,34 (siehe 6.2.2.2).

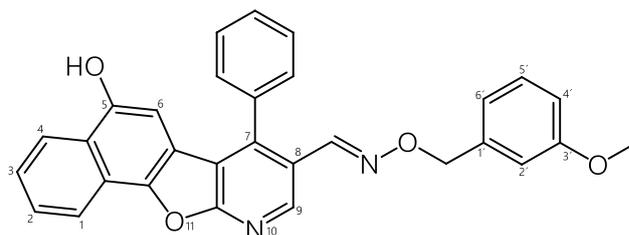
¹H-NMR (DMSO-*d*₆): δ = 10,13 (s, 1H, 5-OH), 8,82 (s, 1H, **H-9**), 8,31 (dd, 1H, **H-1**, ³J_{1/2} = 8,2 Hz, ⁴J_{1/3} = 1,2 Hz), 8,21 (dd, 1H, **H-4**, ³J_{3/4} = 8,2 Hz, ⁴J_{2/4} = 1,2 Hz), 7,91 (s, 1H, -HC=N-OR), 7,72 (ddd, 1H, **H-3**, ³J_{3/4} = 8,2 Hz, ³J_{2/3} = 6,9 Hz, ⁴J_{1/3} = 1,2 Hz), 7,69-7,64 (m, 3H, 7-C₆H₅), 7,60 (ddd, 1H, **H-2**, ³J_{1/2} = 8,2 Hz, ³J_{2/3} = 6,9 Hz, ⁴J_{2/4} = 1,2 Hz), 7,55-7,45 (m, 2H, 7-C₆H₅), 7,36-7,27 (AA'BB', 2H, **H-2'**, **H-6'**), 6,98-6,84 (AA'BB', 2H, **H-3'**, **H-5'**), 6,44 (s, 1H, **H-6**), 5,07 (s, 2H, -CH₂-), 3,73 (s, 3H, 4'-OCH₃).

IR ($\tilde{\nu}$): 1511, 1586 (s, m, $\nu_{C=C \text{ arom.}}$), 1612 (m, $\nu_{N-O, 3-CH=N-OR}$), 2807-2931 (m, $\nu_{C-H \text{ aliph.}}$), 3057 (m, $\nu_{C-H \text{ arom.}}$) cm⁻¹.

HPLC^{**}: 96,50 % (t_R: 11,483 min), (siehe Methode B, 6.2.2.4).

MS (*m/z* (%))^{*}: 970,91 (100, [2×M+Na]⁺), 497,15 (32, [M+Na]⁺), 475,17 (90, [M+H]⁺), 473,23 (100, [M]), (siehe 6.2.4).

HRMS/ESI (*m/z* (%)): gefunden für [M+H]⁺: 475,1647 (100), berechnet für [C₃₀H₂₃N₂O₄]⁺: 475,1652.

(E)-5-Hydroxy-7-phenylnaphtho[2',1':4,5]furo[2,3-b]pyridin-3-carbaldehyd-O-(3-methoxybenzyl)oximVerbindung: **96 E**Summenformel: C₃₀H₂₂N₂O₄Relative Molmasse [M_r]: 474,1

Darstellung nach AAV 7 (siehe 7.1):

In einem Rundkolben wurde 36,0 mg **87** (0,10 mmol, 1,00 eq) in 5 mL THF gelöst. Anschließend fügte man 12 µL absolute Essigsäure (12,1 mg, 0,20 mmol, 2,00 eq) und 26 µL frisch destilliertes Pyrrolidin (21,8 mg, 0,30 mmol, 3,00 eq, **rauchend mit unangenehmen Geruch!**) hinzu. Der Ansatz wurde 30 min ruhen gelassen und folglich 60,5 mg **63** (0,30 mmol, 3,00 eq) ergänzt. Nach 4 d konnte die Reaktion beendet und wie in AAV 7 beschrieben, aufgearbeitet werden. Das ölige Rohprodukt wurde säulenchromatographisch (LM 6, siehe 6.2.2.1) aufgereinigt und die produkt-haltige Fraktion, nach Entfernen des Lösungsmittels, weiter mit MPLC (Methode A, siehe 6.2.2.3) aufgetrennt. Die Titelverbindung konnte, nach Einengen des Lösungsmittels, aus Methanol (bei -20 °C) zur Fällung gebracht werden.

Gelb gefärbter Feststoff.

Schmb.: 215-218 °C (aus MeOH).

Ausbeute: 25,3 %.

DC-Kontrolle: LM 4: R_f = 0,35 (siehe 6.2.2.2).

¹H-NMR (DMSO-*d*₆): δ = 10,13 (s, 1H, 5-OH), 8,81 (s, 1H, **H-9**), 8,32 (dd, 1H, **H-1**, ³J_{1/2} = 8,2 Hz, ⁴J_{1/3} = 1,3 Hz), 8,22 (dd, 1H, **H-4**, ³J_{3/4} = 8,2 Hz, ⁴J_{2/4} = 1,3 Hz), 7,96 (s, 1H, -HC=N-OR), 7,78-7,64 (m, 4H, **H-3**, 7-C₆H₅), 7,61 (ddd, 1H, **H-2**, ³J_{1/2} = 8,2 Hz, ³J_{2/3} = 6,9 Hz, ⁴J_{2/4} = 1,3 Hz), 7,56-7,48 (m, 2H, 7-C₆H₅), 7,27 (t, 1H, **H-5'**, ³J_{4'/5'} = 8,3 Hz, ³J_{5'/6'} = 7,5 Hz), 6,95-6,91 (m, 2H, **H-2'**, **H-6'**), 6,89-6,85 (m, 1H, **H-4'**), 6,46 (s, 1H, **H-6**), 5,12 (s, 2H, -CH₂-), 3,74 (s, 3H, 3'-OCH₃).

IR (ν̄): 1587, 1595 (s, ν_{C=C arom.}), 1615 (w, ν_{C=N, 3-CH=N-OR}), 2850-2953 (s, m, ν_{C-H aliph.}), 3061 (m, ν_{C-H arom.}) cm⁻¹.

HPLC**: 97,70 % (t_R: 14,450 min), (Methode B, siehe 6.2.2.4).

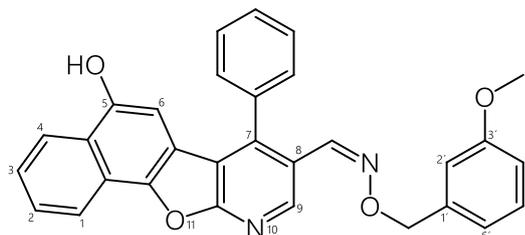
MS (*m/z* (%))*: 970,88 (100, [2×M+Na]⁺), 497,15 (47, [M+Na]⁺), 475,25 (55, [M+H]⁺), 473,25 (100, [M]⁻), (siehe 6.2.4).

HRMS/ESI (*m/z* (%)): gefunden für [M+H]⁺: 475,1648 (100), berechnet für [C₃₀H₂₃N₂O₄]⁺: 475,1652.

Synthese der Verbindungen

(Z)-5-Hydroxy-7-phenylnaphtho[2',1':4,5]furo[2,3-b]pyridin-3-carbaldehyd-O-(3-methoxybenzyl)oxim

Verbindung: **96 Z**
Summenformel: $C_{30}H_{22}N_2O_4$
Relative Molmasse $[M_r]$: 474,1



Darstellung nach AAV 7 (siehe 7.1):

Das Stellungsisomer konnte bei der Umsetzung von **96 E**, nach der MPLC-Fraktionierung, isoliert und nach Einengen des Lösungsmittels, aus Methanol (bei -20 °C) zur Fällung gebracht werden.

Gelb gefärbter Feststoff.

Schmb.: 179-181 °C (aus MeOH).

Ausbeute: 11,8 %.

DC-Kontrolle: LM 4: $R_f = 0,30$ (siehe 6.2.2.2).

1H -NMR (DMSO- d_6): $\delta = 10,14$ (s, 1H, 5-OH), 9,10 (s, 1H, **H-9**), 8,33 (dd, 1H, **H-1**, $^3J_{1/2} = 8,2$ Hz, $^4J_{1/3} = 1,3$ Hz), 8,22 (dd, 1H, **H-4**, $^3J_{3/4} = 8,2$ Hz, $^4J_{2/4} = 1,3$ Hz), 7,72 (ddd, 1H, **H-3**, $^3J_{3/4} = 8,2$ Hz, $^3J_{2/3} = 6,9$ Hz, $^4J_{1/3} = 1,3$ Hz), 7,69-7,58 (m, 4H, **H-2**, 7-C₆H₅), 7,53-7,47 (m, 2H, 7-C₆H₅), 7,32-7,25 (m, 2H, -HC=N-OR, **H-5'**), 6,97-6,92 (m, 2H, **H-2'**, **H-6'**), 6,90-6,85 (m, 1H, **H-4'**), 6,49 (s, 1H, **H-6**), 5,14 (s, 2H, -CH₂-), 3,74 (s, 3H, 3'-OCH₃).

IR (ν): 1586, 1595 (s, m, $\nu_{C=C}$ arom.), 1639 (w, $\nu_{C=N}$, 3-CH=N-OR), 2851-2940 (s, m, ν_{C-H} aliph.), 3030-3061 (m, ν_{C-H} arom.) cm^{-1} .

HPLC**: 96,40 % (t_R : 9,283 min), (Methode B, siehe 6.2.2.4).

MS (m/z (%))*: 475,16 (30, [M+H]⁺), 473,26 (100, [M]⁻), (siehe 6.2.4).

HRMS/ESI (m/z (%)): gefunden für [M+H]⁺: 475,1647 (100), berechnet für [C₃₀H₂₃N₂O₄]⁺: 475,1652.

7.2.4 Sonstige

N-(2-Chlorobenzyl)-5-(2,5-dihydroxyphenyl)-4-phenylnicotinamid

Verbindung: **31 NP**Summenformel: $C_{25}H_{19}ClN_2O_3$ Relative Molmasse $[M_r]$: 430,1

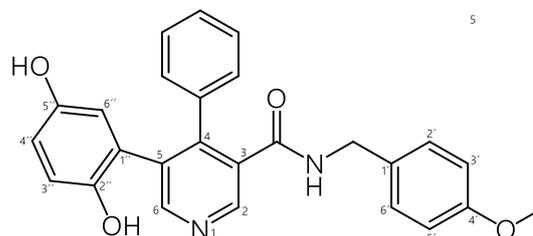
Darstellung nach AAV 3 (siehe 7.1):

Die Verbindung konnte als Nebenprodukt bei der Umsetzung von **31** isoliert werden. (siehe Darstellung **31**). Die Titelverbindung war aus Ethylacetat ausgefallen.DC-Kontrolle: LM 3: $R_f = 0,25$, LM 1: $R_f = 0,46$ (siehe 6.2.2.2).

1H -NMR (DMSO- d_6): $\delta = 9,57$ (s, 1H, 5''-OH), 9,05 (t, 1H, -CONH-, $^3J_{NH/CH_2} = 5,8$ Hz), 8,85 (s, 1H, 2''-OH), 8,55 (d, 1H, **H-6**, $^4J_{2/6} = 0,7$ Hz), 8,50 (d, 1H, **H-2**, $^4J_{2/6} = 0,7$ Hz), 7,75-7,68 (m, 2H, 4-C₆H₅), 7,59-7,50 (m, 2H, **H-3''**, **H-6''**), 7,49-7,36 (m, 4H, 4-C₆H₅, **H-3'**), 7,35-7,21 (m, 2H, **H-4'**, **H-5'**), 7,13 (dd, 1H, **H-6'**, $^3J_{5'/6'} = 7,6$ Hz, $^4J_{4'/6'} = 1,7$ Hz), 7,00 (dd, 1H, **H-4''**, $^3J_{3''/4''} = 8,9$ Hz, $^4J_{4''/6''} = 2,5$ Hz), 4,45 (d, 2H, -CH₂-, $^3J_{NH/CH_2} = 5,8$ Hz).

MS (m/z (%))*: 453,43 (40, [M+Na]⁺), 429,55 (80, [M]⁺), (siehe 6.2.4).

N-(4-Methoxybenzyl)-5-(2,5-dihydroxyphenyl)-4-phenylnicotinamid

Verbindung: **32 NP**Summenformel: $C_{26}H_{22}N_2O_4$ Relative Molmasse $[M_r]$: 426,2

Darstellung nach AAV 3 (siehe 7.1):

Die Verbindung konnte als Nebenprodukt bei der Umsetzung von **32** isoliert werden. (siehe Darstellung **32**). Die Titelverbindung war aus Methanol ausgefallen.

Hellbraun gefärbter Feststoff.

Schmb.: 205-208 °C (aus MeOH)

Ausbeute: 0,66 %.

DC-Kontrolle: LM 2: $R_f = 0,26$, LM 1: $R_f = 0,48$ (siehe 6.2.2.2).

1H -NMR (DMSO- d_6): $\delta = 9,52$ (s, 1H, 5''-OH), 8,94 (t, 1H, -CONH-, $^3J_{NH/CH_2} = 5,8$ Hz), 8,79 (s, 1H, 2''-OH), 8,53 (d, 1H, **H-6**, $^4J_{2/6} = 0,7$ Hz), 8,49 (d, 1H, **H-2**, $^4J_{2/6} = 0,7$ Hz), 7,73-7,66 (m, 2H, 4-C₆H₅), 7,57-7,51 (m, 2H, **H-3''**, **H-6''**), 7,49-7,35 (m, 3H, 4-C₆H₅), 7,11 (AA'BB', 2H, **H-2'**, **H-6'**), 7,00 (dd, 1H, **H-4''**, $^3J_{3''/4''} = 8,9$ Hz, $^4J_{4''/6''} = 2,5$ Hz), 6,85 (AA'BB', 2H, **H-3'**, **H-5'**), 6,45 (d, 1H, **H-5**, $^4J_{5/7} = 2,5$ Hz), 4,30 (d, 2H, -CH₂-, $^3J_{NH/CH_2} = 5,8$ Hz), 3,73 (s, 3H, 4'-OCH₃).

IR (ν): 1512, 1586 (m, s, $\nu_{C=C arom.}$), 1638 (w, $\nu_{C=O, 3-CONH}$), 2835-2956 (w, m, $\nu_{C-H aliph.}$), 3060 (m, $\nu_{C-H arom.}$), 3250 (m, $\nu_{N-H, 3-CONH}$) cm^{-1} .

MS (m/z (%))*: 853,79 (50, [2×M+H]⁺), 448,62 (40, [M+Na]⁺), (siehe 6.2.4).

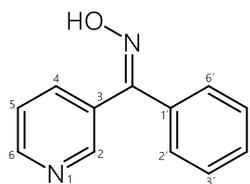
Synthese der Verbindungen

(E/Z)-Phenyl(pyridin-3-yl)methanonoxim

Verbindung: **97**

Summenformel: $C_{12}H_{10}N_2O$

Relative Molmasse [M_r]:198,1



und Isomer

Darstellung:

In einem Rundkolben wurde 5,0 mL Anilin (5,1 g, 10,0 mmol, 1,0 eq) in 10 mL 6 M Salzsäure gelöst. Anschließend kühlte man die Lösung auf 0 °C herunter. Zeitgleich wurde 3,1 g Natriumnitrit (2,3 mol) in 20 mL destilliertem Wasser gelöst. 0,9 eq dieser Natriumnitrit-Lösung fügte man tropfenweise zum erstgenannten Ansatz, unter strenger Beachtung eines Temperaturmaximums von 5 °C, hinzu. In einem separaten Rundkolben wurde 1,2 g **65** (10,0 mmol, 1,0 eq) in einer Natriumethanolat-Lösung suspendiert und die gebildete Diazoniumsalzlösung sukzessive addiert. Die anfänglich hellgelb gefärbte Suspension erfuhr eine Farbvertiefung. Nach 24 h wurde der Ansatz einer Chloroform-Wasser-Extraktion unterzogen und säulenchromatographisch aufgereinigt. Die produktthaltige Fraktion wurde am Rotationsverdampfer vom halogenhaltigen Lösungsmittel befreit und als Feststoff 72 h im Exsikkator getrocknet.

Gelbraun gefärbter Feststoff.

Schmb.: 165-168 °C.

Ausbeute: 8,3 %.

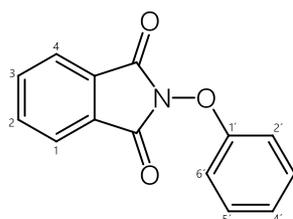
1H -NMR (DMSO- d_6): δ = 11,58 (s, 1H, =N-OH), 8,61 (dd, 1H, **H-6**, $^3J_{5/6}$ = 5,1 Hz, $^4J_{2/6}$ = 1,5 Hz), 8,49 (d, 1H, **H-2**, $^4J_{2/6}$ = 1,5 Hz), 7,72 (dt, 1H, **H-4**, $^3J_{4/5}$ = 7,8 Hz, $^4J_{4/6}$ = 1,8 Hz), 7,54-7,46 (m, 1H, **H-5**), 7,42-7,34 (m, 5H, **H-2'-H-6'**).

2-Phenoxyisoindolin-1,3-dion

Verbindung: **98**

Summenformel: $C_{14}H_9NO_3$

Relative Molmasse [M_r]:239,1



Darstellung:

In einem Rundkolben wurden 1,63 g *N*-Hydroxyphthalimid (10,0 mmol, 1,0 eq) und 2,4 g Phenylboronsäure (20,0 mmol, 2,0 eq) mittels 990,0 mg frisch hergestelltem Kupfer(I)-chlorid (10,0 mmol, 1,0 eq) und 0,9 mL trockenem Pyridin (0,9 g, 11,1 mmol, 1,1 eq) in 50 mL DCM bei RT umgesetzt. Die anfangs grüngefärbte Suspension wurde nach ungefähr 2 h braun, die sich schließlich nach 24 h grünbraun verfärbte. Nach 6 d wurde kein weiterer Umsatz festgestellt und die Reaktion abgebrochen. Man überführte den Ansatz in einem Scheidetrichter und extrahierte mit Chloroform (3×100 mL) gegen eine 20%-ige Ammoniumchlorid-Lösung. Folglich extrahierte man die organische Phase mit einem 1:1 Gemisch aus Ammoniak (25 %) und Ammoniumchlorid-Lösung (20 %) (3×50 mL), solange bis die wässrige Phase keine blaue Färbung mehr zeigte. Man wusch die organische Phase gegen eine Salzsäurelösung (10 %, 100 mL) und gegen Brine. Nach Entfernen des halogenhaltigen Lösungsmittels wurde der ölig viskose Rückstand säulenchromatographisch (LM 1, siehe 6.2.2.1) aufgereinigt. Nach Einengen des Laufmittels wurde der

ölige Rest in Aceton aufgenommen und destilliertes Wasser bis zur Fällung ergänzt. Die Titelverbindung konnte nach Filtration gewonnen werden und wurde 72 h im Exsikkator getrocknet.

Hellbraun gefärbter Feststoff.

Schmb.: 130-133 °C (aus H₂O).

Ausbeute: 29,5 %.

DC-Kontrolle: LM 1: R_f = 0,58 (siehe 6.2.2.2).

¹H-NMR (DMSO-*d*₆): δ = 7,98-7,87 (m, 4H, **H-1-H-4**), 7,41-7,33 (m, 2H, **H-2'**, **H-6'**), 7,26-7,19 (m, 2H, **H-3'**, **H-5'**), 7,16-7,12 (m, 1H, **H-4'**).

IR (ν̄): 1587 (w, ν_{C=C arom.}), 1737 (s, ν_{C=O}), 1793 (m, ν_{N-O}), 3064 (w, ν_{C-H arom.}) cm⁻¹.

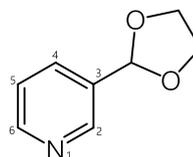
MS (*m/z* (%))*: 240,50 (22, [M+H⁺]), (siehe 6.2.4).

3-(1,3-Dioxolan-2-yl)pyridin

Verbindung: **99**

Summenformel: C₈H₉NO₂

Relative Molmasse [M_r]:151,1



Darstellung:

In einem Rundkolben wurden 2,0 mL Nicotinaldehyd (3,1 g, 28,8 mmol, 1,0 eq) und 3,2 mL Ethylenglykol (3,6 g, 57,6 mmol, 2,0 eq), mittels 1,4 mL Schwefelsäure (96 %) in 50 mL Toluol, unter Rückfluss, erhitzt. Das entstandene Wasser wurde abgetrennt. Nach 3 h wurde der Ansatz einer basisch wässrigen Ethylacetat-Extraktion unterzogen. Nach Einengung der organischen Phase trocknete man das daraus resultierende Öl 48 h lang im Exsikkator.

Gelb gefärbte Flüssigkeit.

Ausbeute: 56,0 %.

DC-Kontrolle: LM: Aceton: R_f = 0,51 (siehe 6.2.2.2).

¹H-NMR (DMSO-*d*₆): δ = 9,11 (s, 1H, **H-2**), 9,07-9,01 (m, 1H, **H-6**), 8,28 (dt, 1H, **H-4**, ³J_{4/5} = 7,9 Hz, ⁴J_{4/6} = 2,0 Hz), 7,40 (ddd, 1H, **H-5**, ³J_{4/5} = 7,9 Hz, ³J_{5/6} = 4,9 Hz, ⁵J_{2/5} = 0,9 Hz), 6,26 (s, 1H, **CH-(OR)₂**), 4,62-4,37 (m, 4H, 2×-**CH₂-**).

MS (*m/z* (%))**: 152,1 (100, [M+H⁺]), (siehe 6.2.4).

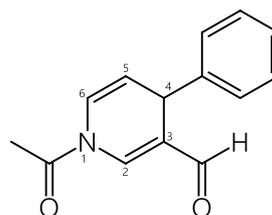
Synthese der Verbindungen

(E,Z)-1-Acetyl-4-phenyl-1,4-dihydropyridin-3-carbaldehyd

Verbindung: **100**

Summenformel: C₁₄H₁₃NO₂

Relative Molmasse [M_r]: 227,1



Darstellung nach AAV 2 (siehe 7.1):

In einem Zweihalsrundkolben wurden 2,0 g **98** (13,2 mmol, 1,0 eq), 242,9 mg Kupfer-(I)-jodid (1,3 mmol, 0,1 eq) und 112,0 mg trockenes Lithiumchlorid (2,6 mmol, 0,2 eq) in 100 mL trockenem THF gelöst/suspendiert und der Ansatz auf -15 bis -20 °C gebracht. Es wurde 1,1 mL Acetylchlorid (1,1 g, 13,2 mmol, 1,0 eq, Farbumschlag von hellgelb nach gelb) sowie 7,2 mL Phenylmagnesiumchlorid (2 M in THF, 7,6 g, 14,5 mmol, 1,1 eq, Farbumschlag von gelb nach hellgelb) gemäß AAV 2 hinzugefügt, umgesetzt und aufgearbeitet. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch (LM 3, siehe 6.2.2.1) aufgereinigt und war aus kaltem Methanol ausgefallen.

Hellgelb gefärbter, feiner Feststoff.

Schmb.: 120-123 °C (aus MeOH).

Ausbeute: 49,1 %.

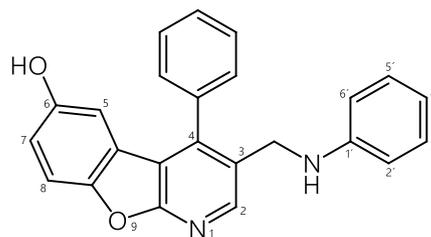
DC-Kontrolle: LM 1: R_f = 0,45 (siehe 6.2.2.2).

¹H-NMR (DMSO-*d*₆): δ = 9,41 (s, 1H, -HC=O), 8,13 („s“ br, 1H, **H-2 [E/Z]**), 7,33-7,11 (m, 5H, 4-C₆H₅), 7,10-7,00 (m, 1H, **H-6 [E/Z]**), 5,33-5,25 (m, 1H, **H-5 [E/Z]**), 4,43-4,37 (m, 1H, **H-4 [E/Z]**), 2,41 (s, 3H, -NCOCH₃ **[E/Z]**).

IR (ν̄): 1607 (s, ν_{C=C arom.}), 1656 (s, ν_{C=O, -NCOCH₃}), 1708 (s, ν_{C=O, 3-C(=O)H}), 2825-2930 (w, ν_{C-H aliph.}), 3005, 3015, 3084 (w, ν_{C-H arom.}) cm⁻¹.

MS (m/z (%))*: 250,37 (55, [M+Na]⁺), 228,38 (70, [M+H]⁺), (siehe 6.2.4).

4-Phenyl-3-((phenylamino)methyl)benzofuro[2,3-b]pyridin-6-ol

Verbindung: **101**Summenformel: $C_{24}H_{18}N_2O_2$ Relative Molmasse $[M_r]$: 366,1

Darstellung:

In einem Rundkolben wurden 61,0 mg **76** (0,21 mmol, 1,0 eq) und 20 μ L frisch destilliertes Anilin (19,6 mg, 0,21 mmol, 1,0 eq) in 25 mL Toluol unter Rückfluss erhitzt. Nach 17 h konnte ein vollständiger Umsatz zum Zwischenprodukt 4-Phenyl-3-((phenylimino)methyl)benzofuro[2,3-b]pyridin-6-ol mit einer Massenzahl von 365,4 (100, $[M+H]^+$) registriert werden. Nach Entfernen des Toluols löste man den Rückstand bei RT in 10 mL Methanol. Danach ergänzte man 635 mg Natriumborhydrid (16,79 mmol, 80 eq) bis zum vollständigen Umsatz. Die anfängliche braune Lösung färbte sich dabei orange bis orangebraun. Nach 1 h wurde der Ansatz einer Wasser-Chloroform-Extraktion unterzogen. Nach Einengung der organischen Phase wurde der Rückstand säulenchromatographisch (LM 4, siehe 6.2.2.1) aufgereinigt. Die Produktfraktion wurde vom Lösungsmittel befreit und der resultierende Feststoff 48 h lang im Exsikkator getrocknet.

Orangebraun gefärbter Feststoff.

Ausbeute: 58,5 %.

DC-Kontrolle: LM1: R_f Produkt = 0,53, R_f Zwischenprodukt = 0,56, LM4: R_f Produkt = 0,21, R_f Zwischenprodukt = 0,26 (siehe 6.2.2.2).

1H -NMR (DMSO- d_6): δ = 9,33 (s, 1H, 6-OH), 8,45 (s, 1H, **H-2**), 7,66-7,49 (m, 6H, **H-8**, 4- C_6H_5), 7,04-6,97 (m, 2H, **H-3'**, **H-5'**), 6,91 (dd, 1H, **H-7**, $^3J_{7/8}$ = 8,8 Hz, $^4J_{5/7}$ = 2,6 Hz), 6,51-6,41 (m, 3H, **H-2'**, **H-4'**, **H-6'**), 6,26 (d, 1H, **H-5**, $^4J_{5/7}$ = 2,6 Hz), 6,03 („s“ br, 1H, 3- CH_2 -NH-), 4,10 (s, 2H, 3- CH_2 -NH-).

HPLC*: 96,31 % (t_R : 10,960 min), (siehe 6.2.2.4).HRMS/ESI (m/z (%)): gefunden für $[M+H]^+$: 367,1452 (75), berechnet für $[C_{24}H_{19}N_2O_2]^+$: 367,1916.

8 BIOCHEMISCHE UND PHYSIKOCHEMISCHE UNTERSUCHUNGEN

8.1 ³³PanQinase® -Assay der ProQinase GmbH

Der Assay wurde innerhalb der ersten Testreihe in einem automatisierten Verfahren bei dem Unternehmen PROQINASE GmbH durchgeführt. Die im Assay verwendeten Kinasen wurden entweder in *E. coli* als unmarkierte, human rekombinante Proteine (ERK1, JNK3) oder in Sf9-Insektenzellen (CDK1, GSK3 β , Fyn wt) exprimiert. Durch GST-Affinitätschromatographie wurden alle Kinasen aufgereinigt. Zur Identitäts- und Reinheitsbestimmung der Kinasen nutzte man SDS-PAGE mit anschließender Coomassiefärbung und Massenspektrometrie (LC-ESI-MS-MS). Als Kinasesubstrate wurden die synthetischen Peptide RB-CTF (2,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ für CDK1), RBER-IRStide (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ für GSK3 β), RBER-CHKtide (40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ für ERK1), ATF2 (60 $\mu\text{g}/\text{mL}$ für JNK3) und Poly(Glu:Tyr)_{4:1} (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ für Fyn wt) verwendet.^[338-342]

Ausgehend von einer 10 mM Stammlösung wurden von jeder Substanz 10 Lösungen im Konzentrationsbereich von 300 nM bis 10 mM hergestellt. 5 μL dieser Lösungen wurden mit 45 μL Wasser verdünnt. Somit resultierten als Probelösungen 30 nM- bis 1 mM-haltige Lösungen, mit einem DMSO-Gehalt von 10 %.

Der Assay wurde in 96-Well-Platten mit 50 μL pro Well durchgeführt. Anfangs wurden 5 μL der Probelösung, 20 μL Standardpuffer, 20 μL Substrat-Enzym-Lösung (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ und 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$) sowie 5 μL wasserhaltige ATP-Lösung in den Wells pipettiert. In jedem Well befand sich damit HEPES-NaOH (60 nM, bei pH 7,5), Magnesiumchlorid (3 mM), Mangan(II)-chlorid (3 mM), Natriumorthovanadat (3 μM), DTT (1,2 mM), PEG₂₀₀₀₀ (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) und [γ -³³P]-ATP (1 oder 15 μM , was 7-8 $\cdot 10^5$ cpm bzw. 1,05-1,06 $\cdot 10^6$ cpm entspricht). Die Endkonzentration von DMSO betrug in jedem Well final 1 %. Zur besseren Vermischung der Bestandteile brachte man die Platte in einen Schüttler. Anschließend inkubierte man 60 min bei 30 °C. Durch Zugabe von 50 μL Phosphorsäure (2 % (V/V)) wurde die Reaktion gestoppt und die Lösungsrückstände abgesaugt. Folglich wurden die Wellvertiefungen dreimal mit 200 μL Natriumchloridlösung (0,9 % (V/V)) gewaschen und hinterher die Platte getrocknet.

Die Aufnahme von ³³P_i in das Substrat wurde mit einem *Microplate*-Szintillationszähler (MICROBETA® der Firma WALLAC) bestimmt. Alle Assays wurden in einem BECKMAN-COULTER-SAGIAN-Automatiksystem durchgeführt. Mittels der erhaltenen, prozentualen Restaktivitäten für jede Konzentration wurden die IC₅₀-Werte mit Hilfe des Programms QUATTRO WORKFLOW von QUATTRO RESEARCH GmbH berechnet.^[132]

Die Testung erfolgte als Doppelbestimmung.

Testergebnisse

Tabelle 20: Testergebnisse Teil I von der PROQINASE GmbH.
Zweifachbestimmung mit Mittelwert (MW), n.a. = nicht aktiv ($IC_{50} > 100 \mu\text{M}$).

	IC ₅₀ [μM]														
	CDK1/CycB1			ERK1			Fyn wt			GSK3 β			JNK3		
	1	2	MW	1	2	MW	1	2	MW	1	2	MW	1	2	MW
23	n.a.	n.a.		n.a.	n.a.		42,2	32,2	37,2	n.a.	n.a.		38,7	38,7	38,7
24	n.a.	n.a.		n.a.	63,5	n.a.	n.a.	n.a.		n.a.	n.a.		36,2	35,1	35,7
25	n.a.	n.a.		n.a.	n.a.		n.a.	n.a.		n.a.	n.a.		n.a.	n.a.	
26	n.a.	n.a.		n.a.	n.a.		n.a.	n.a.		n.a.	n.a.		89,7	96,9	93,3
27	n.a.	n.a.		n.a.	n.a.		n.a.	n.a.		n.a.	n.a.		n.a.	n.a.	
36	n.a.	n.a.		n.a.	n.a.		n.a.	n.a.		n.a.	n.a.		n.a.	n.a.	
37	n.a.	n.a.		n.a.	n.a.		n.a.	n.a.		n.a.	n.a.		n.a.	n.a.	
38	n.a.	n.a.		n.a.	n.a.		n.a.	n.a.		n.a.	n.a.		n.a.	n.a.	
39	n.a.	n.a.		n.a.	n.a.		n.a.	n.a.		n.a.	n.a.		n.a.	n.a.	
40	n.a.	n.a.		n.a.	n.a.		n.a.	n.a.		n.a.	n.a.		n.a.	n.a.	
41	n.a.	n.a.		85,2	n.a.	n.a.	48,9	34,7	41,8	n.a.	n.a.		n.a.	n.a.	
44	n.a.	n.a.		n.a.	n.a.		n.a.	n.a.		n.a.	n.a.		n.a.	n.a.	
45	n.a.	n.a.		n.a.	n.a.		n.a.	n.a.		n.a.	n.a.		n.a.	n.a.	
46	n.a.	n.a.		n.a.	n.a.		82,0	42,4	62,2	n.a.	n.a.		n.a.	n.a.	
47	n.a.	n.a.		n.a.	n.a.		66,4	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.		n.a.	n.a.	
48	n.a.	n.a.		n.a.	n.a.		n.a.	n.a.		n.a.	n.a.		n.a.	n.a.	

8.2 ADP-Glo™: ADP monitoring Assay

Im Arbeitskreis von P. KOCH an der EBERHARD KARLS Universität Tübingen erfolgte an den Kinasen JNK3 und GSK3 β die zweite Testreihe.

Zur Bestimmung der Inhibitionsfähigkeit der Verbindungen an GSK3 β wurde der ADP-Glo™-Kinase-Assay der Firma PROMEGA (USA) genutzt. Als Referenzinhibitor diente der GSK3 β -Hemmer SB216763 (9 μM Endkonzentration). Zur Herstellung der Testverbindungsproben wurden 2 μL einer 10 mM Lösung der Testsubstanz mit 50 μL Normalpuffer (40 mM TRIS, bei pH 7,5, 20 mM Magnesiumchlorid und 0,1 mg/mL BSA, 50 μM DTT) und 148 μL Wasser vereint (T1). 30 μL T1 wurden wiederum mit 70 μL Puffer versetzt (T2 mit 30 μM Konzentration an Testverbindung).

Nunmehr wurden auf eine 96-Well-Platte je 60 μL der T2-Lösung in die ersten, oberen 12 Wells (Reihe A) gegeben. Mittels dieser erstellte man eine 1:4-Verdünnungsreihe (Konzentrationsbereich pro Testverbindung 25 nM bis 18 μM), bei der jeweils 20 μL aus der übergeordneten Reihe (zum Beispiel Reihe A) in die nächstfolgende Wellreihe (Reihe B) gegeben und mit 60 μL Normalpuffer verdünnt wurde. Zwei weitere 96-Well-Platten wurden jeweils mit 15 μL Kinaselösung (0,5 ng/ μL) und 15 μL Substrat-ATP-Lösung (0,2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ Substrat, 12,5 $\mu\text{M}/\mu\text{L}$ ATP) pro Well vorbereitet. Die anschließende Pipettierung erfolgte mit einer INTERGRA-Pipettierapparatur. In jede Vertiefung einer vierten 96-Well-Platte wurden jeweils 10 μL aus den Wells der Platten 1 bis 3 gegeben und der Assay 60 min bei RT inkubiert. Zu diesem Zeitpunkt sollte die Phosphorylierung des Substrats abgeschlossen sein. Anschließend wurden jeweils viermal 5 μL Lösung aus jeder einzelnen Vertiefung der Platte 4 auf vier Wells einer 384 Well-Platte (Platte 5) übertragen.^[343, 344]

Zur Detektion ergänzte man in jedes der 384 Wells 5 μL ADP-Glo™-Reagenz und ließ sie für 60 min inkubieren (Abbildung 68, Seite 222). An diesem Punkt wird die Kinasereaktion unterbrochen und nicht abreagiertes ATP entfernt. Als Nächstes wurden 10 μL des Kinase-Detektionsrea-

genz in jedes Well ergänzt und 30 min inkubiert. Dieses Reagenz wandelt ADP in ATP um und reagiert final über eine Luciferasereaktion, unter Abgabe von Photonen, ab. Diese Lichtenergie wird vermessen und über dessen Intensität die Restaktivität der Kinasen bestimmt.^[343, 344]

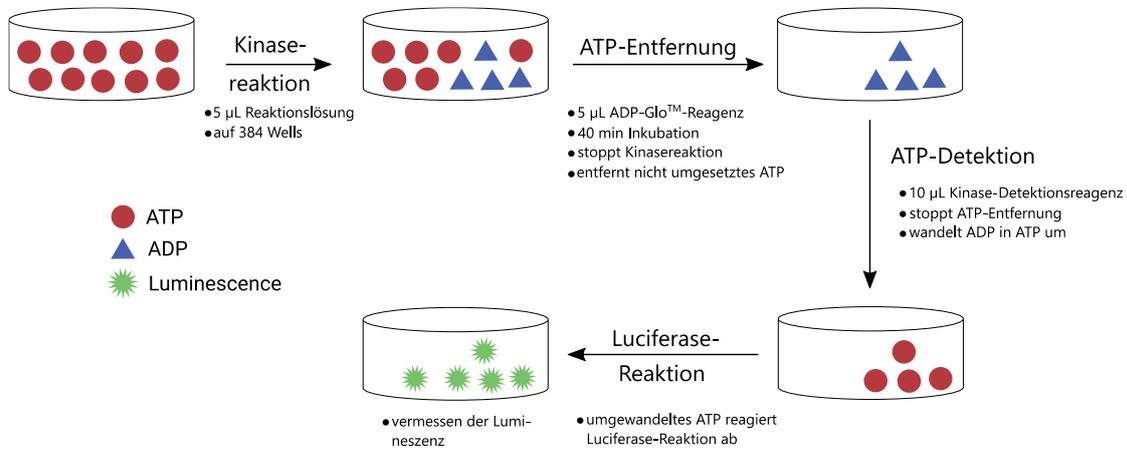


Abbildung 68: Darstellung der Detektion durch ADP-Glo™ (adaptiert nach der PROMEGA Internetseite).^[345]
Mit freundlicher Genehmigung der Promega Corp./Courtesy of Promega Corp.

Die Testreihen erfolgten mittels Dreifachbestimmung. Die Restaktivitäten wurden bei einer Konzentration von 10 µM der Testverbindung angegeben.

Die exakten IC₅₀-Werte wurden nur bei prozentualen Restaktivitäten unter 55 Prozent bestimmt. Bei höheren Restaktivitäten wurden die IC₅₀-Werte als größer (> 10 µM) oder deutlich größer (>> 10 µM) deklariert.

Testergebnisse

Tabelle 21: Testergebnisse Teil II an der GSK3β.
n.b. = nicht bestimmt

GSK3β					
	Restaktivität [%]	IC ₅₀ [µM]		Restaktivität [%]	IC ₅₀ [µM]
28	54	20,25	82	89	>> 10
30	73	>> 10	83	93	>> 10
31	52	22,50	84	81	>> 10
32	61	> 10	85	91	>> 10
33	55	10,23	86	93	>> 10
34	59	> 10	88	79	>> 10
35	75	>> 10	89	91	>> 10
42	90	>> 10	90	88	>> 10
43	92	>> 10	91	92	>> 10
49	88	>> 10	92E	95	>> 10
50	80	>> 10	92Z	99	>> 10
77	43	4,8	93	91	>> 10
78	73	>> 10	94	83	>> 10
79	59	> 10	95	90	>> 10
80	87	>> 10	96E	97	>> 10
81	90	>> 10	96Z	97	>> 10

8.3 ELISA zum Nachweis der JNK3-Inhibition

Diese Arbeiten wurden ebenfalls von der Arbeitsgruppe um P. KOCH realisiert. Zur Bestimmung der Inhibitionsfähigkeit der Verbindungen an JNK3 wurde ein *Enzyme-linked Immunosorbant Assay* (ELISA) genutzt. Auf eine 96-Well-Platte wurde jede Vertiefung mit 0,5 µg des JNK3-Substrats ATF-2 beschichtet (1:196 in TBS-Puffer, bei pH 7,8). Anschließend blockte man die Platte mit einem *Blocking*-Puffer (**BB**: TBS-Puffer bei pH 7,8, 0,025 % BSA, 0,05 % Tween-20) für 30 min bei RT. Parallel brachte man die Kinase in einen Kinasereaktionspuffer (500 µL 1 M TRIS bei pH 7,5, 100 µL 1 M Magnesiumchlorid, 100 µL 1 M β-Glycerolphosphat, 100 µL 10 mg/mL BSA-Lösung, 10 µL 1 M DTT, 10 µL 10 mM ATP, 10 µL 100 mM Natriumorthovanadat und 9,17 mL zweifach destilliertes Wasser) ein, bis eine Lösung mit einer Konzentration von 10 ng/50 µL vorlag. 50 µL dieser Lösung wurde in jede Vertiefung der 96-Well-Platte gegeben und die Platte für 50 min bei 37 °C inkubiert. Folglich blockte man die Platte erneut für 15 min.^[315]

Die erfolgte Phosphorylierung des JNK3-Substrats wurde mit einem monoklonalen antiphospho ATF-2(Thr^{69/71})-Peroxidase-Antikörper detektiert (Abbildung 69). Der Antikörper wurde 1:5000 mit BB (TBS-Puffer bei pH 6,5, 0,025 % BSA und 0,05 Tween-20) verdünnt. 50 µL dieser Lösung wurde in jedes Well gegeben und für 60 min bei 37 °C inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Platte dreimal mit zweifach destilliertem Wasser gewaschen und für 5 min bei 37 °C getrocknet. Zur Detektion des antiphospho ATF-2-Komplexes ergänzte man in jedes Well 50 µL 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB) und inkubierte bis zu 10 min bei RT. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von 25 µL 2 N Schwefelsäure pro Vertiefung abgebrochen. Die Absorption maß man bei 450 nm unter Nutzung eines *ELISA-Readers* und der Software SOFTMAX PRO. Durch die Intensität der Färbung schloss man auf den durch JNK3-vermittelten Phosphorylierungsstatus von ATF-2.^[315]

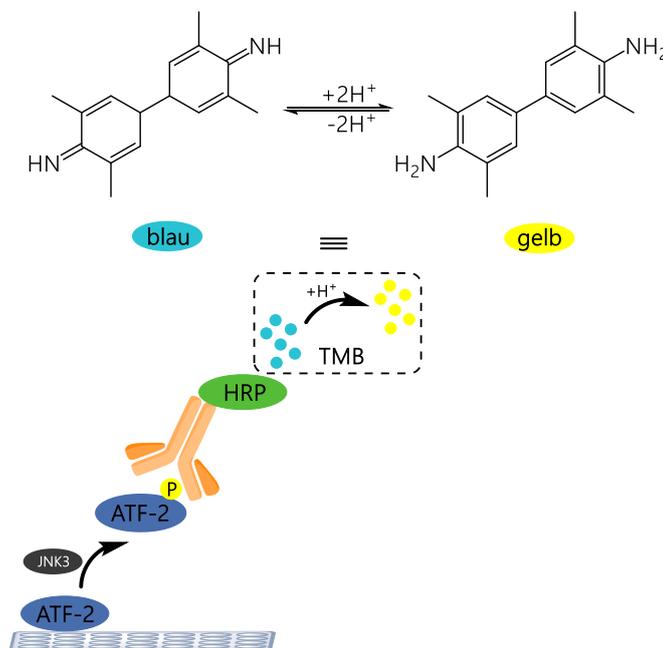


Abbildung 69: Schematische Darstellung des JNK3-assoziierten ELISAs. JNK3 phosphoryliert sein Substrat ATF-2. Über einen antiphospho-basierten Antikörper wird die Meerrettichperoxidase HRP aktiviert, wodurch 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB) oxidiert wird und es sich daraufhin blau verfärbt. Durch anschließender Protonierung wird das chinoide System aromatisch, was sich in einer Gelbfärbung widerspiegelt (adaptiert nach GOETTERT *et al.*).^[315]

Die Testreihen erfolgten mittels Dreifachbestimmung. Die Restaktivitäten wurden bei einer Konzentration von 10 µM der Testverbindung angegeben.

Die exakten IC₅₀-Werte wurden nur bei prozentualen Restaktivitäten unter 55 Prozent bestimmt. Bei höheren Restaktivitäten wurden die IC₅₀-Werte als größer (> 10 µM) oder deutlich größer (>> 10 µM) deklariert.

Testergebnisse

Tabelle 22: Testergebnisse Teil II an der JNK3.

JNK3					
	Restaktivität [%]	IC ₅₀ [µM]		Restaktivität [%]	IC ₅₀ [µM]
28	50	13,00	82	78	>> 10
30	57	> 10	83	82	>> 10
31	57	> 10	84	71	>> 10
32	59	> 10	85	78	>> 10
33	52	36,20	86	79	>> 10
34	58	> 10	88	54	ca. 10
35	85	>> 10	89	86	>> 10
42	87	>> 10	90	84	>> 10
43	83	>> 10	91	89	>> 10
49	88	>> 10	92E	96	>> 10
50	84	>> 10	92Z	92	>> 10
77	21	1,22	93	90	>> 10
78	50	11,60	94	84	>> 10
79	52	ca. 10	95	92	>> 10
80	73	> 10	96E	100	>> 10
81	78	>> 10	96Z	94	>> 10

8.4 Inhibitionsbestimmung an CDK1/CycB, CDK2/CycE und Fyn wt

Im Arbeitskreis von V. KRSTOF an der Universität Palacky in Olomouc (Tschechien) erfolgte an den Kinasen, CDK1/CycB, CDK2/CycE und Fyn wt die zweite Testreihe.

CDK1/CycB und CDK2/CycE wurden in Sf9-Insektenzellen durch ein Baculovirus-Expressionssystem hergestellt und mit anschließender NiNTA-Affinitätschromatographie aufgereinigt. Die Fynkinase bezog man von der PROQINASE GmbH. Als Substrate wurden Histon H1 (1 mg/mL) für CDK1/CycB und CDK2/CycE sowie Poly(Glu:Tyr)_{4,1} (0,1 mg/mL) für Fyn, in Anwesenheit von 15 µM ATP, 0,05 µCi [γ -³³P]-ATP und 10 µL der zu testenden Verbindungen (max. 0,02 % DMSO), verwendet. Alle Lösungen wurden jeweils mit dem Reaktionspuffer folgender Zusammensetzung hergestellt bzw. verdünnt: 60 mM HEPES-NaOH, bei pH 7,5, 3 mM Magnesiumchlorid, 3 mM Mangan-(II)-chlorid, 3 µM Natriumorthovanadat, 1,2 mM DDT und 2,5 µg/50 µL PEG₂₀₀₀₀. Der Assay wurde mindestens dreifach für 60 min bei 30 °C, unter Verwendung eines EPPENDORF-Thermomischers (350 UpM), in einem 96-Well-Format durchgeführt.

Die Reaktion wurde durch Zugabe von 5 µL 3%-iger, wässriger Phosphorsäurelösung abgebrochen. Den Inhalt der Wells überführte man auf P-81-Phosphocellulose (WHATMAN), wusch ihn dreimal mit 0,5%-iger, wässriger Phosphorsäurelösung und trocknete ihn schließlich an der Luft. Die Kinasehemmung wurde unter Verwendung des digitalen Bildanalysators FLA-7000 (FUJIFILM) quantifiziert.

Die Restaktivitäten wurden bei einer Konzentration von 20 µM der Testverbindung angegeben.

Die zur Verringerung der CDK- und Fyn-Aktivität um 50% erforderliche Konzentration der Testverbindungen wurde aus den Dosis-Wirkungskurven bestimmt und als IC₅₀-Wert angegeben.^[346]

Lagen während der ersten Messung die ermittelten Restaktivitäten über 58 % sowie die IC₅₀-Werte über 20 µM, wurde auf eine Dreifachbestimmung verzichtet. Der Mittelwert wurde erst ab einer Bestimmungsgröße von zwei Messungen ermittelt.

Testergebnisse

Tabelle 23: Testergebnisse Teil II an der CDK1/CycB, CDK2/CycE und Fyn wt.
 Angegeben als Restaktivität in %, - nicht gemessen.

	CDK1/CycB				CDK2/CycE				Fyn wt			
	1	2	3	MW	1	2	3	MW	1	2	3	MW
28	71,86	-	-	-	64,96	-	-	-	83,3	-	-	-
29	71,52	-	-	-	54,00	63,42	-	58,71	90,6	-	-	-
30	65,68	-	-	-	53,39	68,99	-	61,19	105,4	-	-	-
31	59,60	-	-	-	59,98	-	-	-	75,5	-	-	-
32	70,20	-	-	-	62,59	-	-	-	74,9	-	-	-
33	66,95	-	-	-	54,69	94,62	-	74,66	54,8	71,7	65,1	63,9
34	66,10	-	-	-	63,58	-	-	-	85,6	-	-	-
35	73,82	-	-	-	54,72	92,28	-	73,5	77,4	-	-	-
42	89,02	-	-	-	90,49	-	-	-	75,0	-	-	-
43	85,67	-	-	-	75,60	-	-	-	103,3	-	-	-
49	87,48	-	-	-	63,01	-	-	-	65,2	-	-	-
50	105,40	-	-	-	83,73	-	-	-	57,6	65,7	45,7	56,3
77	10,53	16,06	15,78	14,12	20,11	20,78	15,14	18,68	77,1	-	-	-
78	24,41	17,22	20,57	20,73	26,52	31,26	14,12	23,97	43,9	75,2	71,2	63,4
79	26,22	23,52	26,26	25,33	24,14	24,32	34,82	27,76	66,2	-	-	-
80	83,38	-	-	-	51,97	45,10	62,14	53,07	62,1	-	-	-
81	50,13	60,22	62,19	57,51	45,62	82,94	81,65	70,07	55,0	77,9	77,9	70,26
82	65,02	-	-	-	63,33	-	-	-	48,4	64,8	74,0	62,4
83	59,37	-	-	-	56,75	80,67	-	68,71	78,4	-	-	-
84	58,15	-	-	-	50,44	64,98	-	57,71	50,6	63,5	68,4	60,83
85	72,66	-	-	-	57,61	-	-	-	66,3	-	-	-
86	56,39	-	-	-	47,38	58,35	66,58	57,43	49,8	65,9	67,3	61,0
88	36,79	30,95	39,15	35,63	25,09	26,20	37,97	29,75	71,1	-	-	-
89	76,33	-	-	-	78,36	-	-	-	63,8	-	-	-
90	76,60	-	-	-	79,75	-	-	-	46,5	66,9	61,5	58,3
91	100,39	-	-	-	106,51	-	-	-	62,7	-	-	-
92E	84,61	-	-	-	81,62	-	-	-	76,8	-	-	-
92Z	82,72	-	-	-	89,22	-	-	-	56,1	60,7	57,0	57,9
93	97,48	-	-	-	91,48	-	-	-	51,5	61,5	76,4	63,1
94	83,57	-	-	-	77,29	-	-	-	63,2	-	-	-
95	81,56	-	-	-	79,84	-	-	-	79,4	-	-	-
96E	94,41	-	-	-	85,40	-	-	-	75,3	-	-	-
96Z	91,13	-	-	-	95,97	94,62	-	-	75,7	-	-	-

Tabelle 24: IC₅₀-Werte der Testergebnisse Teil II an der CDK1/CycB, CDK2/CycE und Fyn wt.
 Es sind nur diejenigen Werte dokumentiert, deren gemittelte IC₅₀-Werte unter oder gleich 20 µM entsprechen. SD = Standardabweichung (*standard deviation*)

	CDK1/CycB		CDK2/CycE		Fyn wt	
	IC ₅₀	SD	IC ₅₀	SD	IC ₅₀	SD
50	> 20	-	> 20	-	12,4	0,3
77	3,60	1,78	2,31	0,39	> 20	-
78	6,89	1,65	4,88	2,67	16,3	0,5
79	7,59	1,05	6,21	2,05	> 20	-
80	> 20	-	15,91	5,79	> 20	-
88	8,73	1,93	5,77	2,20	> 20	-
89	> 20	-	> 20	-	13,1	1,6
90	> 20	-	> 20	-	17,2	4,0
93	> 20	-	> 20	-	19,3	1,0

8.5 Bestimmung des Verteilungskoeffizienten Log P von ausgewählten Verbindungen

Die Bestimmung des Verteilungskoeffizienten erfolgte unter Einbeziehung der OECD-Leitlinie 117. In dieser werden die Log P-Werte mit Hilfe der HPLC-Methodik bestimmt. Dazu ist eine Regressionsgerade von Nöten. Diese wird mit Hilfe der experimentell bestimmten k-Werte der notwendigen Referenzsubstanzen und ihrer literaturbekannten Log P-Werte erstellt. Anschließend bestimmt man die k-Werte der Testverbindungen und kann mittels der Regressionsgeraden die gesuchten Log P-Werte ermitteln. Zur Erstellung der Regressionsgeraden nutzte man ausschließlich nichtionisierbare Referenzen.^[320]

HPLC-Anlage:

JASCO, PU-980, 851 AS.

Säule: LICHROSPHER® 100 RP-18 Säule von MERCK KGaA.

Detektion: UV-Vis-Detektor UV-970, bei 235 und 254 nm gemessen.

Injektionsvolumen: 20 µL.

Flussrate: 1,0 mL/min.

Laufzeit pro Messung: max. 60 min.

Software: BORWIN 1.50.

Laufmittel: Erstellung des PBS (pH: 7,4) nach Ph.Eur. 7.0

8,0 g Natriumchlorid (NaCl),

0,2 g Kaliumchlorid (KCl),

1,42 g Dinatriumhydrogenphosphat (Na₂HPO₄) oder

2,88 g Dinatriumhydrogenphosphat Dodecahydrat (Na₂HPO₄•12 H₂O),

0,20 g Kaliumdihydrogenphosphat (KH₂PO₄)

und auf 1 L mit destilliertem Wasser aufgefüllt.

Der ermittelte pH-Wert lag zwischen 7,39 und 7,41.

Laufmittelgemisch: MeOH zu PBS (3:2).

Stationäre Phase: XTERRA RP-18 Säule (3,5 µM, 3,9 × 100 mm) von WATERS.

Zur Bestimmung der Totzeit (t₀) der RP-Säule wurde Thioharnstoff bei 254 nm vermessen. Zu jeder Proben- und Referenzlösung wurden 10 µL einer Thioharnstoff-Stammlösung (1 mg/ 1 mL) zugesetzt. Die Totzeit lag zwischen 0,683 bis 0,692 min.

Herstellung der Untersuchungs- und Referenzlösungen:

1,0 mg Untersuchungssubstanz bzw. 0,3 bis 1,6 mg Referenzsubstanz wurden in 1 mL Methanol (ggf. 0,3 mL DMSO addiert) gelöst. Von diesen Stammlösungen wurden wiederum 100 µL entnommen und auf 1 mL mit MeOH verdünnt. Diese Verdünnungslösungen wurden schließlich vermessen.

Erstellung der Kalibriergeraden:

Die Retentionszeiten der Referenzsubstanzen sowie die Totzeit der Säule unterlagen einer Vierfachbestimmung. Die Berechnung der k-Werte erfolgte mit folgender Gleichung:

$$k = \frac{t_R - t_0}{t_0}$$

Gleichung 3: k-Wert-Bestimmung.
t_R = Retentionszeit, t₀ = Totzeit.

Die ermittelten k-Werte wurden logarithmiert gegen die literaturbekannten Log P-Werte aufgetragen und die Regressionsgerade bestimmt. Zur Überprüfung von Ausreißern wurde der Dean-Dixon-Ausreißertest angewandt.

Tabelle 25: Verwendete Referenzsubstanzen und ihre Messdaten.

Referenzsubstanz	Retentionszeit \emptyset [min]	Log k \emptyset	Log P
Acetophenon	1,87	0,23	1,7
Methylbenzoat	3,05	0,53	2,1
Ethylbenzoat	4,80	0,78	2,6
Brombenzen	7,56	0,99	3
Naphthalen	10,76	1,16	3,6
Diphenylether	16,81	1,37	4,2
Bibenzyl	43,85	1,79	4,8

Daraus resultierte die folgende Kalibriergerade:

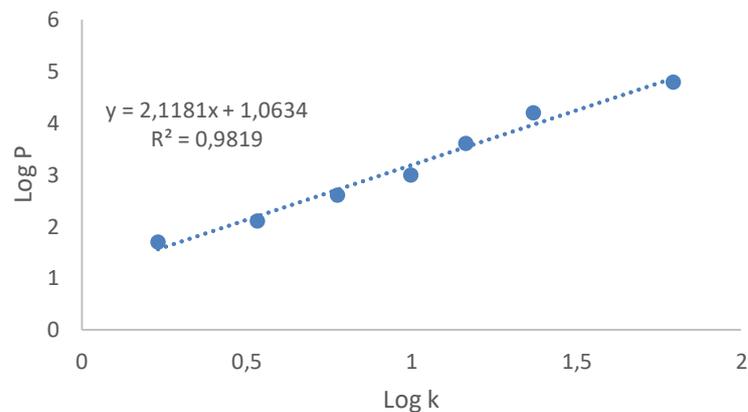


Abbildung 70: Kalibriergerade zur Bestimmung der gesuchten Log P-Werte. Regressionsgleichung: $y = 2,1181x + 1,0634$; Bestimmungsmaß: 0,9819.

Ermittlung der gesuchten Log P-Werte:

Tabelle 26: Ermittelte Log P-Werte der Azoxafluorene.

Verbindung	Retentionszeit \emptyset [min]	Log k \emptyset	Log P
23	3,70	0,64	2,4
24	8,16	1,04	3,2
36	13,33	1,27	3,8
77	3,78	0,65	2,4
78	14,13	1,29	3,8
80	46,60	1,90	5,1*

* extrapolierter Wert.

LITERATURVERZEICHNIS

1. Reagan, R., *Text of letter written by President Ronald Reagan announcing he has Alzheimer's disease*. <https://www.reaganlibrary.gov/sreference/reagan-s-letter-announcing-his-alzheimer-s-diagnosis>, aktueller Status: 21.03.2018 2018.
2. Lakotta, B., *Reise in den Sonnenuntergang*. Spiegel Wissen, <http://www.spiegel.de/spiegel/spiegelwissen/d-69123028.html>, 2010.
3. Prince, M.; Enders, W.; Guerchet, M., et al., *World Alzheimer Report 2015*. In *The Global Impact of Dementia, An analysis of prevalence, incidence, cost and trends*, Alzheimer's Disease International, 2015.
4. *S3-Leitlinie "Demenzen"*. Deutsche Gesellschaft für Psychiatrie und Psychotherapie, Psychosomatik und Nervenheilkunde (DGPPN), Deutsche Gesellschaft für Neurologie (DGN), 2016.
5. Kurz, A.; Freter, H.-J.; Saxl, S., et al., *Demenz. Das Wichtigste*. 2017; 4.
6. Schneider, J. A.; Arvanitakis, Z.; Bang, W., et al., *Mixed brain pathologies account for most dementia cases in community-dwelling older persons*. *Neurology*, 2007, 69 (24), 2197.
7. Qiu, C.; De Ronchi, D.; Fratiglioni, L., *The epidemiology of the dementias: an update*. *Current Opinion in Psychiatry*, 2007, 20 (4), 380-385.
8. *Global action plan on the public health response to dementia, 2017-2025*. World Health Organization, 2017.
9. Einecke, H., *Die Akte Auguste Deter*. *Sueddeutsche Zeitung*, <https://www.sueddeutsche.de/wirtschaft/erste-alzheimer-patientin-die-akte-auguste-deter-1.2573958>, aktueller Status: 20.07. 2015.
10. Barage, S. H.; Sonawane, K. D., *Amyloid cascade hypothesis: Pathogenesis and therapeutic strategies in Alzheimer's disease*. *Neuropeptides*, 2015, 52, 1-18.
11. Deutschen Institut für Medizinische Dokumentation und Information (DIMDI), http://www.icd-code.de/icd/code/F00.0*.html, 2019.
12. Blennow, K.; de Leon, M. J.; Zetterberg, H., *Alzheimer's disease*. *The Lancet*, 2006, 368 (9533), 387-403.
13. Huang, Y.; Mucke, L., *Alzheimer mechanisms and therapeutic strategies*. *Cell*, 2012, 148 (6), 1204-1222.
14. Xu, H.; Finkelstein, D. I.; Adlard, P. A., *Interactions of metals and Apolipoprotein E in Alzheimer's disease*. *Frontiers in aging neuroscience*, 2014, 6, 121-121.
15. Kandimalla, R.; Vallamkondu, J.; Corgiat, E. B., et al., *Understanding Aspects of Aluminum Exposure in Alzheimer's Disease Development*. *International Society of Neuropathology*, 2016, 26 (2), 139-154.
16. Lipton, S. A., *Paradigm shift in neuroprotection by NMDA receptor blockade: Memantine and beyond*. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2006, 5, 160.
17. Querfurth, H. W.; LaFerla, F. M., *Alzheimer's Disease*. *The New England Journal of Medicine*, 2010, 362 (4), 329-344.
18. Singer, F., *Ratgeber Alzheimer*. <https://www.morbus-alzheimer.net/stadien-der-alzheimererkrankung/>, 2018.
19. Martorana, A.; Esposito, Z.; Koch, G., *Beyond the Cholinergic Hypothesis: Do Current Drugs Work in Alzheimer's Disease?* *CNS- Neuroscience & Therapeutics*, 2010, 16 (4), 235-245.
20. Anand, R.; Gill, K. D.; Mahdi, A. A., *Therapeutics of Alzheimer's disease: Past, present and future*. *Neuropharmacology*, 2014, 76, 27-50.
21. Birks, J. S.; Harvey, R. J., *Donepezil for dementia due to Alzheimer's disease*. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, 2018, (6).
22. Lipton, S. A.; Rosenberg, P. A., *Excitatory Amino Acids as a Final Common Pathway for Neurologic Disorders*. *The New England Journal of Medicine*, 1994, 330 (9), 613-622.
23. Steinhilber, D.; Schubert-Zsilavecz, M.; Roth, H. J., *Medizinische Chemie- Targets, Arzneistoffe, Chemische Biologie*. 2010; Vol. 2.
24. Parsons, C. G.; Danysz, W.; Dekundy, A., et al., *Memantine and cholinesterase inhibitors: complementary mechanisms in the treatment of Alzheimer's disease*. *Neurotoxicity research*, 2013, 24 (3), 358-369.
25. Sotiropoulos, I.; Catania, C.; Riedemann, T., et al., *Glucocorticoids trigger Alzheimer disease-like pathobiochemistry in rat neuronal cells expressing human tau*. *J. Neurochem.*, 2008, 107 (2), 385-397.
26. Serrano-Pozo, A.; Frosch, M. P.; Masliah, E., et al., *Neuropathological alterations in Alzheimer disease*. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 2011, 1 (1), a006189-a006189.
27. Tarasoff-Conway, J. M.; Carare, R. O.; Osorio, R. S., et al., *Clearance systems in the brain—implications for Alzheimer disease*. *Nature Reviews Neurology*, 2015, 11, 457.
28. Walsh, D. M.; Klyubin, I.; Fadeeva, J. V., et al., *Naturally secreted oligomers of amyloid β protein potently inhibit hippocampal long-term potentiation in vivo*. *Nature*, 2002, 416, 535.
29. Townsend, M.; Shankar, G. M.; Mehta, T., et al., *Effects of secreted oligomers of amyloid β -protein on hippocampal synaptic plasticity: a potent role for trimers*. *The Journal of Physiology*, 2006, 572 (2), 477-492.
30. Lambert, M. P.; Barlow, A. K.; Chromy, B. A., et al., *Diffusible, nonfibrillar ligands derived from A β 1-42 are potent central nervous system neurotoxins*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1998, 95 (12), 6448-6454.

- States of America, 1998, 95 (11), 6448-6453.
31. Lacor, P. N.; Buniel, M. C.; Furlow, P. W., et al., *A β Oligomer-Induced Aberrations in Synapse Composition, Shape, and Density Provide a Molecular Basis for Loss of Connectivity in Alzheimer's Disease*. The Journal of Neuroscience, 2007, 27 (4), 796-807.
32. Lesné, S.; Koh, M. T.; Kotilinek, L., et al., *A specific amyloid- β protein assembly in the brain impairs memory*. Nature, 2006, 440, 352.
33. Nelson, P. T.; Alafuzoff, I.; Bigio, E. H., et al., *Correlation of Alzheimer disease neuropathologic changes with cognitive status: a review of the literature*. Journal of neuropathology and experimental neurology, 2012, 71 (5), 362-381.
34. Lott, I. T.; Head, E., *Alzheimer disease and Down syndrome: factors in pathogenesis*. Neurobiol Aging, 2005, 26 (3), 383-389.
35. Doody, R. S.; Raman, R.; Farlow, M., et al., *A Phase 3 Trial of Semagacestat for Treatment of Alzheimer's Disease*. The New England Journal of Medicine, 2013, 369 (4), 341-350.
36. Coric, V.; Salloway, S.; van Dyck, C. H., et al., *Targeting Prodromal Alzheimer Disease With Avagacestat: A Randomized Clinical Trial* Targeting Prodromal Alzheimer Disease With Avagacestat. JAMA Neurology, 2015, 72 (11), 1324-1333.
37. Kemp, A., *Update on Phase III clinical trials of lanabecestat for Alzheimer's disease*. Astra Zeneca, <https://www.astrazeneca.com/media-centre/press-releases/2018/update-on-phase-iii-clinical-trials-of-lanabecestat-for-alzheimers-disease-12062018.html>, aktueller Status: 12.07. 2018.
38. *Alzheimer: MSD stellt Studie mit Verubecestat ein*. Pharmazeutische Zeitung, <https://www.pharmazeutische-zeitung.de/2018-02/alzheimer-msd-stellt-studie-mit-verubecestat-ein/>, 2018.
39. *PHASE II CLINICAL STUDY OF ELENBECESTAT DEMONSTRATES SAFETY AND TOLERABILITY IN MCI AND MILD TO MODERATE ALZHEIMER'S DISEASE AT 18-MONTHS*. <https://www.eisai.com/news/2018/news201844.html>, 2018.
40. *A 24-Month Study to Evaluate the Efficacy and Safety of E2609 in Subjects With Early Alzheimer's Disease (MissionAD1)*. <https://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02956486>, 2019.
41. Nedergaard, M.; Iliff, J. J.; Wang, M., et al., *A paravascular pathway facilitates CSF flow through the brain parenchyma and the clearance of interstitial solutes, including amyloid β* . Science translational medicine, 2012, 4 (147), 147RA111.
42. Salloway, S.; Sperling, R.; Fox, N. C., et al., *Two Phase 3 Trials of Bapineuzumab in Mild-to-Moderate Alzheimer's Disease*. The New England Journal of Medicine, 2014, 370 (4), 322-333.
43. Honig, L. S.; Vellas, B.; Woodward, M., et al., *Trial of Solanezumab for Mild Dementia Due to Alzheimer's Disease*. The New England Journal of Medicine, 2018, 378 (4), 321-330.
44. Hebert, N.; Johnson, P., *Lilly Announces Top-Line Results of Solanezumab Phase 3 Clinical Trial*. <https://investor.lilly.com/static-files/9117f89a-0f6a-4dd8-a73e-97c108cf613d>, 23.11.2016.
45. Dilts, E., *Pfizer ends research for new Alzheimer's, Parkinson's drugs*. Reuters, <https://www.reuters.com/article/us-pfizer-alzheimers/pfizer-ends-research-for-new-alzheimers-parkinsons-drugs-idUSKBN1EW0TN>, 07.01.2018
46. *Roche to discontinue Phase III CREAD 1 and 2 clinical studies of crenezumab in early Alzheimer's disease (AD) - other company programmes in AD continue*. Roche, https://www.roche.com/dam/jcr:e3181d56-8cac-4db8-a7d4-2f883ee2847c/en/20190130-MR_CREN_EN.pdf, 30.01.2019.
47. *Roche provides update on gantenerumab development programme*. Roche, <https://www.roche.com/dam/jcr:c2fd909c-5122-4b17-81e2-703b4fc18551/en/med-cor-2014-12-19b-e.pdf>, 19.12.2014.
48. *Biogen and Eisai to Discontinue Phase 3 ENGAGE and EMERGE Trials of aducanumab in Alzheimer's Disease*. Alzheimer's News Today, <http://investors.biogen.com/news-releases/news-release-details/biogen-and-eisai-discontinue-phase-3-engage-and-emerge-trials>, aktueller Status: 21.03. 2019.
49. Rogers, M. B., *'Reports of My Death Are Greatly Exaggerated.' Signed, Aducanumab*. ALZFORUM, <https://www.alzforum.org/news/research-news/reports-my-death-are-greatly-exaggerated-signed-aducanumab>, abgerufen am: 24.03.2020, 2019.
50. *CAD106*. Alzheimer's News Today, <https://alzheimersnewstoday.com/cad106/>, abgerufen am: 21.02.2019.
51. *Amilomotide*. ALZFORUM, <https://www.alzforum.org/therapeutics/amilomotide>, abgerufen am: 24.03.2020, aktueller Status: 30.12.2019.
52. Morsch, R.; Coleman, P. D.; Simon, W., *Neurons May Live for Decades with Neurofibrillary Tangles*. Journal of Neuropathology & Experimental Neurology, 1999, 58 (2), 188-197.
53. Bobinski, M.; Wegiel, J.; Tarnawski, M., et al., *Duration of neurofibrillary changes in the hippocampal pyramidal neurons*. Brain Research, 1998, 799 (1), 156-158.

54. Braak, H.; Del Tredici, K.; Thal, D. R., et al., *Stages of the Pathologic Process in Alzheimer Disease: Age Categories From 1 to 100 Years*. Journal of Neuropathology & Experimental Neurology, 2011, 70 (11), 960-969.
55. Weingarten, M. D.; Lockwood, A. H.; Hwo, S. Y., et al., *A protein factor essential for microtubule assembly*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1975, 72 (5), 1858-1862.
56. Kadavath, H.; Hofele, R. V.; Biernat, J., et al., *Tau stabilizes microtubules by binding at the interface between tubulin heterodimers*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2015, 112 (24), 7501.
57. Chun, W.; Johnson, G. V. W., *The role of tau phosphorylation and cleavage in neuronal cell death*. Frontiers in Bioscience, 2007, 12, 733-756.
58. Martin, L.; Latypova, X.; Wilson, C. M., et al., *Tau protein kinases: Involvement in Alzheimer's disease*. Ageing Research Reviews, 2013, 12 (1), 289-309.
59. Kellogg, E. H.; Hejab, N. M. A.; Poepsel, S., et al., *Near-atomic model of microtubule-tau interactions*. Science, 2018, 360 (6394), 1242.
60. Arendt, T.; Stieler, J. T.; Holzer, M., *Tau and tauopathies*. Brain Research Bulletin, 2016, 126, 238-292.
61. Iqbal, K.; Alonso, A. d. C.; Chen, S., et al., *Tau pathology in Alzheimer disease and other tauopathies*. Biochim. Biophys. Acta, 2005, 1739 (2-3), 198-210.
62. Friedhoff, P.; von Bergen, M.; Mandelkow, E. M., et al., *A nucleated assembly mechanism of Alzheimer paired helical filaments*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1998, 95 (26), 15712-15717.
63. Schweers, O.; Mandelkow, E. M.; Biernat, J., et al., *Oxidation of cysteine-322 in the repeat domain of microtubule-associated protein tau controls the in vitro assembly of paired helical filaments*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1995, 92 (18), 8463-8467.
64. Meraz-Ríos, M. A.; Lira-De León, K. I.; Campos-Peña, V., et al., *Tau oligomers and aggregation in Alzheimer's disease*. J. Neurochem., 2010, 112 (6), 1353-1367.
65. Hernández, F.; Avila, J. J. C.; Sciences, M. L., *Tauopathies*. Cellular and Molecular Life Sciences, 2007, 64 (17), 2219-2233.
66. Hanger, D. P.; Anderton, B. H.; Noble, W., *Tau phosphorylation: the therapeutic challenge for neurodegenerative disease*. Trends in Molecular Medicine, 2009, 15 (3), 112-119.
67. Gustke, N.; Trinczek, B.; Biernat, J., et al., *Domains of tau Protein and Interactions with Microtubules*. Biochemistry, 1994, 33 (32), 9511-9522.
68. Lu, P.-J.; Wulf, G.; Zhou, X. Z., et al., *The prolyl isomerase Pin1 restores the function of Alzheimer-associated phosphorylated tau protein*. Nature, 1999, 399, 784.
69. von Bergen, M.; Barghorn, S.; Biernat, J., et al., *Tau aggregation is driven by a transition from random coil to beta sheet structure*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease, 2005, 1739 (2), 158-166.
70. Uchihara, T., *Pretangles and neurofibrillary changes: Similarities and differences between AD and CBD based on molecular and morphological evolution*. Neuropathology, 2014, 34 (6), 571-577.
71. Berger, Z.; Roder, H.; Hanna, A., et al., *Accumulation of Pathological Tau Species and Memory Loss in a Conditional Model of Tauopathy*. The Journal of Neuroscience, 2007, 27 (14), 3650.
72. Cowan, C. M.; Bossing, T.; Page, A., et al., *Soluble hyper-phosphorylated tau causes microtubule breakdown and functionally compromises normal tau in vivo*. Acta Neuropathologica, 2010, 120 (5), 593-604.
73. Iqbal, K.; Liu, F.; Gong, C.-X., et al., *Mechanisms of tau-induced neurodegeneration*. Acta neuropathologica, 2009, 118 (1), 53-69.
74. Braak, H.; Del Tredici, K. J. A. N., *The pathological process underlying Alzheimer's disease in individuals under thirty*. Acta Neurologica, 2011, 121 (2), 171-181.
75. Braak, H.; Braak, E., *Neuropathological staging of Alzheimer-related changes*. Acta Neuropathologica, 1991, 82 (4), 239-259.
76. Braak, H.; Del Tredici, K., *Alzheimer's pathogenesis: is there neuron-to-neuron propagation?* Acta Neuropathologica, 2011, 121 (5), 589-595.
77. Frost, B.; Jacks, R. L.; Diamond, M. I., *Propagation of tau misfolding from the outside to the inside of a cell*. The Journal of biological chemistry, 2009, 284 (19), 12845-12852.
78. Iba, M.; Guo, J. L.; McBride, J. D., et al., *Synthetic Tau Fibrils Mediate Transmission of Neurofibrillary Tangles in a Transgenic Mouse Model of Alzheimer's-Like Tauopathy*. The Journal of Neuroscience, 2013, 33 (3), 1024.
79. Goedert, M.; Jakes, R.; Spillantini, M. G., et al., *Assembly of microtubule-associated protein tau into Alzheimer-like filaments induced by sulphated glycosaminoglycans*. Nature, 1996, 383 (6600), 550-553.
80. Gauthier, S.; Feldman, H. H.; Schneider, L. S., et al., *Efficacy and safety of tau-aggregation inhibitor therapy in patients with mild or moderate Alzheimer's disease: a randomised, controlled, double-blind, parallel-arm, phase 3 trial*. The Lancet, 2016, 388 (10062), 2873-2884.
81. Wilcock, G. K.; Gauthier, S.; Frisoni, G. B., et al., *Potential of Low Dose Leuco-Methylthionium Bis(Hydromethanesulphonate) (LMTM) Monotherapy for Treatment of Mild Alzheimer's Disease: Cohort Analysis*

- as Modified Primary Outcome in a Phase III Clinical Trial. *Journal of Alzheimer's disease : JAD*, 2017, 61 (1), 435-457.
82. *LUCIDITY Study –Protocol Amendment*. TauRx Therapeutics, <https://taurx.com/uploads/LUCIDITY%20Study%20%E2%80%93%20Protocol%20Amendment.pdf>, 20.07.2018.
83. Medina, M., *An Overview on the Clinical Development of Tau-Based Therapeutics*. *International journal of molecular sciences*, 2018, 19 (4), 1160.
84. Novak, P.; Schmidt, R.; Kontsekova, E., et al., *FUNDAMANT: an interventional 72-week phase 1 follow-up study of AADvac1, an active immunotherapy against tau protein pathology in Alzheimer's disease*. *Alzheimer's research & therapy*, 2018, 10 (1), 108-108.
85. *24 Months Safety and Efficacy Study of AADvac1 in Patients With Mild Alzheimer's Disease (ADAMANT)*. *ClinicalTrials.gov*, <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02579252>, abgerufen am: 28.02.2019, aktueller Status: 29.08.2017.
86. Kile, S.; Au, W.; Parise, C., et al., *IVIG treatment of mild cognitive impairment due to Alzheimer's disease: a randomised double-blinded exploratory study of the effect on brain atrophy, cognition and conversion to dementia*. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*, 2017, 88 (2), 106.
87. Oliver, C. J.; Shenolikar, S., *PHYSIOLOGIC IMPORTANCE OF PROTEIN PHOSPHATASE INHIBITORS* *Frontier in Bioscience*, 1998, 3, 961-972.
88. Sontag, E.; Nunbhakdi-Craig, V.; Sontag, J.-M., et al., *Protein Phosphatase 2A Methyltransferase Links Homocysteine Metabolism with Tau and Amyloid Precursor Protein Regulation*. *The Journal of Neuroscience*, 2007, 27 (11), 2751.
89. Zhou, X.-W.; Gustafsson, J.-Å.; Tanila, H., et al., *Tau hyperphosphorylation correlates with reduced methylation of protein phosphatase 2A*. *Neurobiology of Disease*, 2008, 31 (3), 386-394.
90. Malpas, C. B.; Vivash, L.; Genc, S., et al., *A Phase IIa Randomized Control Trial of VEL015 (Sodium Selenate) in Mild-Moderate Alzheimer's Disease*. *Journal of Alzheimer's disease : JAD*, 2016, 54 (1), 223-232.
91. Vulpetti, A.; Bosotti, R., *Sequence and structural analysis of kinase ATP pocket residues*. *Il Farmaco*, 2004, 59 (10), 759-765.
92. Manning, G.; Whyte, D. B.; Martinez, R., et al., *The Protein Kinase Complement of the Human Genome*. *Science*, 2002, 298 (5600), 1912.
93. Hunter, T., Protein kinase classification. In *Methods Enzymol.*, Academic Press: 1991; Vol. 200, pp 3-37.
94. Huang, D.; Zhou, T.; Lafleur, K., et al., *Kinase selectivity potential for inhibitors targeting the ATP binding site: a network analysis*. *Bioinformatics*, 2009, 26 (2), 198-204.
95. Klebe, G., *Wirkstoffdesign*. Springer Spektrum: 2009; Vol. 2.
96. Pierce, A. C.; Sandretto, K. L.; Bemis, G. W., *Kinase inhibitors and the case for CH...O hydrogen bonds in protein-ligand binding*. *Proteins*, 2002, 49 (4), 567-576.
97. Pei, J.-J.; Braak, E.; Braak, H., et al., *Distribution of Active Glycogen Synthase Kinase 3β (GSK-3β) in Brains Staged for Alzheimer Disease Neurofibrillary Changes*. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*, 1999, 58 (9), 1010-1019.
98. Pei, J.-J.; Grundke-Iqbal, I.; Iqbal, K., et al., *Accumulation of cyclin-dependent kinase 5 (cdk5) in neurons with early stages of Alzheimer's disease neurofibrillary degeneration*. *Brain Research*, 1998, 797 (2), 267-277.
99. Perry, G.; Roder, H.; Nunomura, A., et al., *Activation of neuronal extracellular receptor kinase (ERK) in Alzheimer disease links oxidative stress to abnormal phosphorylation*. *Neuro Report*, 1999, 10 (11), 2411-2415.
100. Jicha, G. A.; Weaver, C.; Lane, E., et al., *cAMP-Dependent Protein Kinase Phosphorylations on Tau in Alzheimer's Disease*. *The Journal of Neuroscience*, 1999, 19 (17), 7486.
101. Necula, M.; Kuret, J., *Site-specific pseudophosphorylation modulates the rate of tau filament dissociation*. *FEBS Lett.*, 2005, 579 (6), 1453-1457.
102. Rankin, C. A.; Sun, Q.; Gamblin, T. C., *Pseudo-phosphorylation of tau at Ser202 and Thr205 affects tau filament formation*. *Molecular Brain Research*, 2005, 138 (1), 84-93.
103. Abraha, A.; Ghoshal, N.; Gamblin, T. C., et al., *C-terminal inhibition of tau assembly in vitro and in Alzheimer's disease*. *J. Cell Sci.*, 2000, 113 (21), 3737.
104. Nishimura, I.; Yang, Y.; Lu, B., *PAR-1 Kinase Plays an Initiator Role in a Temporally Ordered Phosphorylation Process that Confers Tau Toxicity in Drosophila*. *Cell*, 2004, 116 (5), 671-682.
105. Malumbres, M., *Cyclin-dependent kinases*. *Genome Biol*, 2014, 15 (6), 122-122.
106. Savage, M. J.; Gingrich, D. E., *Advances in the development of kinase inhibitor therapeutics for Alzheimer's disease*. *Drug Dev. Res.*, 2009, 70 (2), 125-144.
107. Baumann, K.; Mandelkow, E.-M.; Biernat, J., et al., *Abnormal Alzheimer-like phosphorylation of tau-protein by cyclin-dependent kinases cdk2 and cdk5*. *FEBS Lett.*, 1993, 336 (3), 417-424.
108. Knockaert, M.; Greengard, P.; Meijer, L., *Pharmacological inhibitors of cyclin-dependent kinases*. *Trends in Pharmacological Sciences*, 2002, 23 (9), 417-425.

109. Noble, W.; Olm, V.; Takata, K., et al., *Cdk5 Is a Key Factor in Tau Aggregation and Tangle Formation In Vivo*. *Neuron*, 2003, **38** (4), 555-565.
110. Cruz, J. C.; Tseng, H.-C.; Goldman, J. A., et al., *Aberrant Cdk5 Activation by p25 Triggers Pathological Events Leading to Neurodegeneration and Neurofibrillary Tangles*. *Neuron*, 2003, **40** (3), 471-483.
111. Patrick, G. N.; Zuberberg, L.; Nikolic, M., et al., *Conversion of p35 to p25 deregulates Cdk5 activity and promotes neurodegeneration*. *Nature*, 1999, **402** (6762), 615-622.
112. Hamdane, M.; Sambo, A.-V.; Bégard, S., et al., *Mitotic-like Tau Phosphorylation by p25-Cdk5 Kinase Complex*. *J. Biol. Chem.*, 2003, **278** (36), 34026-34034.
113. Piedrahita, D.; Hernández, I.; López-Tobón, A., et al., *Silencing of CDK5 reduces neurofibrillary tangles in transgenic alzheimer's mice*. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 2010, **30** (42), 13966-13976.
114. Lee, K. H.; Lee, S.-J.; Lee, H. J., et al., *Amyloid β 1-42 ($A\beta$ 1-42) Induces the CDK2-Mediated Phosphorylation of Tau through the Activation of the mTORC1 Signaling Pathway While Promoting Neuronal Cell Death*. *Front Mol Neurosci*, 2017, **10**, 229-229.
115. Alvarez, A.; Toro, R.; Cáceres, A., et al., *Inhibition of tau phosphorylating protein kinase cdk5 prevents β -amyloid-induced neuronal death*. *FEBS Lett.*, 1999, **459** (3), 421-426.
116. Neve, R. L.; McPhie, D. L., *The cell cycle as a therapeutic target for Alzheimer's disease*. *Pharmacology & Therapeutics*, 2006, **111** (1), 99-113.
117. Vincent, I.; Jicha, G.; Rosado, M., et al., *Aberrant Expression of Mitotic Cdc2/Cyclin B1 Kinase in Degenerating Neurons of Alzheimer's Disease Brain*. *The Journal of Neuroscience*, 1997, **17** (10), 3588.
118. Lee, H.-g.; Casadesus, G.; Zhu, X., et al., *Cell cycle re-entry mediated neurodegeneration and its treatment role in the pathogenesis of Alzheimer's disease*. *Neurochem. Int.*, 2009, **54** (2), 84-88.
119. Yang, Y.; Geldmacher, D. S.; Herrup, K., *DNA Replication Precedes Neuronal Cell Death in Alzheimer's Disease*. *The Journal of Neuroscience*, 2001, **21** (8), 2661.
120. Currais, A.; Hortobágyi, T.; Soriano, S., *The neuronal cell cycle as a mechanism of pathogenesis in Alzheimer's disease*. *Aging (Albany NY)*, 2009, **1** (4), 363-371.
121. Yang, Y.; Mufson, E. J.; Herrup, K., *Neuronal Cell Death Is Preceded by Cell Cycle Events at All Stages of Alzheimer's Disease*. *The Journal of Neuroscience*, 2003, **23** (7), 2557.
122. Pei, J.-J.; Braak, H.; Gong, C.-X., et al., *Up-regulation of cell division cycle (cdc) 2 kinase in neurons with early stage Alzheimer's disease neurofibrillary degeneration*. *Acta Neurologica*, 2002, **104** (4), 369-376.
123. M Clare, P.; Poorman, R. A.; Kelley, L.-L., et al., *The Cyclin-dependent Kinases cdk2 and cdk5 Act by a Random, Anticooperative Kinetic Mechanism*. *The Journal of biological chemistry*, 2002, **276**, 48292-9.
124. Coxon, C. R.; Anscombe, E.; Harnor, S. J., et al., *Cyclin-Dependent Kinase (CDK) Inhibitors: Structure-Activity Relationships and Insights into the CDK-2 Selectivity of 6-Substituted 2-Arylamino-purines*. *J. Med. Chem.*, 2017, **60** (5), 1746-1767.
125. Illenberger, S.; Zheng-Fischhöfer, Q.; Preuss, U., et al., *The endogenous and cell cycle-dependent phosphorylation of tau protein in living cells: implications for Alzheimer's disease*. *Mol Biol Cell*, 1998, **9** (6), 1495-1512.
126. Takahashi-Yanaga, F., *Activator or inhibitor? GSK-3 as a new drug target*. *Biochem. Pharmacol.*, 2013, **86** (2), 191-199.
127. Embi, N.; Rylatt, D. B.; Cohen, P., *Glycogen Synthase Kinase-3 from Rabbit Skeletal Muscle*. *The FEBS Journal*, 1980, **107** (2), 519-527.
128. Doble, B. W.; Woodgett, J. R., *GSK-3: tricks of the trade for a multi-tasking kinase*. *J. Cell Sci.*, 2003, **116** (Pt 7), 1175-1186.
129. ter Haar, E.; Coll, J. T.; Austen, D. A., et al., *Structure of GSK3 β reveals a primed phosphorylation mechanism*. *Nature Structural Biology*, 2001, **8** (7), 593-596.
130. Kaidanovich-Beilin, O.; Woodgett, J. R., *GSK-3: Functional Insights from Cell Biology and Animal Models*. *Front Mol Neurosci*, 2011, **4**, 40-40.
131. Saeki, K.; Machida, M.; Kinoshita, Y., et al., *Glycogen Synthase Kinase-3 β 2 Has Lower Phosphorylation Activity to Tau than Glycogen Synthase Kinase-3 β 1*. *Biol. Pharm. Bull.*, 2011, **34** (1), 146-149.
132. Tell, V. *Synthese, Charakterisierung und biologische Evaluation neuartiger Proteinkinase-Inhibitoren mit 1-Aza-9-oxafluoren-Grundstruktur gegen Neurodegeneration*. Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Institut der Pharmazie, 2016, 236 Seiten.
133. Beurel, E.; Grieco, S. F.; Jope, R. S., *Glycogen synthase kinase-3 (GSK3): regulation, actions, and diseases*. *Pharmacology & therapeutics*, 2015, **148**, 114-131.
134. Leroy, K.; Yilmaz, Z.; Brion, J.-P., *Increased level of active GSK-3 β in Alzheimer's disease and accumulation in argyrophilic grains and in neurones at different stages of neurofibrillary degeneration*. *Neuropathology and Applied Neurobiology*, 2007, **33** (1), 43-55.

135. Hu, S.; Begum, A. N.; Jones, M. R., et al., *GSK3 inhibitors show benefits in an Alzheimer's disease (AD) model of neurodegeneration but adverse effects in control animals*. *Neurobiology of disease*, 2009, **33** (2), 193-206.
136. Jope, R. S.; Johnson, G. V. W., *The glamour and gloom of glycogen synthase kinase-3*. *Trends Biochem. Sci.*, 2004, **29** (2), 95-102.
137. Pei, J.-J.; Tanaka, T.; Tung, Y.-C., et al., *Distribution, Levels, and Activity of Glycogen Synthase Kinase-3 in the Alzheimer Disease Brain*. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*, 1997, **56** (1), 70-78.
138. Yamaguchi, H.; Ishiguro, K.; Uchida, T., et al., *Preferential labeling of Alzheimer neurofibrillary tangles with antisera for tau protein kinase (TPK) I/glycogen synthase kinase-3 β and cyclin-dependent kinase 5, a component of TPK II*. *Acta Neuropathologica*, 1996, **92** (3), 232-241.
139. Mazanetz, M. P.; Fischer, P. M., *Untangling tau hyperphosphorylation in drug design for neurodegenerative diseases*. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2007, **6**, 464.
140. Engel, T.; Hernández, F.; Avila, J., et al., *Full reversal of Alzheimer's disease-like phenotype in a mouse model with conditional overexpression of glycogen synthase kinase-3*. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 2006, **26** (19), 5083-5090.
141. Terwel, D.; Muyllaert, D.; Dewachter, I., et al., *Amyloid activates GSK-3beta to aggravate neuronal tauopathy in bigenic mice*. *Am J Pathol*, 2008, **172** (3), 786-798.
142. Yang, K.; Belrose, J.; Trepanier, C., et al., *Fyn, a Potential Target for Alzheimer's Disease*. *Journal of Alzheimer's disease : JAD*, 2011, **27**, 243-52.
143. Hooper, C.; Markevich, V.; Plattner, F., et al., *Glycogen synthase kinase-3 inhibition is integral to long-term potentiation*. *European Journal of Neuroscience*, 2007, **25** (1), 81-86.
144. Peineau, S.; Taghibiglou, C.; Bradley, C., et al., *LTP Inhibits LTD in the Hippocampus via Regulation of GSK3 β* . *Neuron*, 2007, **53** (5), 703-717.
145. Regan, P.; Whitcomb, D. J.; Cho, K., *Physiological and Pathophysiological Implications of Synaptic Tau*. *The Neuroscientist*, 2016, **23** (2), 137-151.
146. Regan, P.; Piers, T.; Yi, J.-H., et al., *Tau phosphorylation at serine 396 residue is required for hippocampal LTD*. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 2015, **35** (12), 4804-4812.
147. Philpott, K. L.; Facci, L., *MAP Kinase Pathways in Neuronal Cell Death*. *CNS & Neurological Disorders - Drug Targets*, 2008, **7** (1), 83-97.
148. Pearson, G.; Robinson, F.; Beers Gibson, T., et al., *Mitogen-Activated Protein (MAP) Kinase Pathways: Regulation and Physiological Functions**. *Endocrine Reviews*, 2001, **22** (2), 153-183.
149. Zhu, X.; Castellani, R. J.; Takeda, A., et al., *Differential activation of neuronal ERK, JNK/SAPK and p38 in Alzheimer disease: the 'two hit' hypothesis*. *Mechanisms of Ageing and Development*, 2001, **123** (1), 39-46.
150. Shoji, M.; Iwakami, N.; Takeuchi, S., et al., *JNK activation is associated with intracellular β -amyloid accumulation*. *Molecular Brain Research*, 2000, **85** (1), 221-233.
151. Hensley, K.; Floyd, R. A.; Zheng, N.-Y., et al., *p38 Kinase Is Activated in the Alzheimer's Disease Brain*. *J. Neurochem.*, 1999, **72** (5), 2053-2058.
152. Zhu, X.; Rottkamp, C. A.; Boux, H., et al., *Activation of p38 Kinase Links Tau Phosphorylation, Oxidative Stress, and Cell Cycle-Related Events in Alzheimer Disease*. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*, 2000, **59** (10), 880-888.
153. Ferrer, I.; Blanco, R.; Carmona, M., et al., *Phosphorylated Map Kinase (ERK1, ERK2) Expression is Associated with Early Tau Deposition in Neurones and Glial Cells, but not with Increased Nuclear DNA Vulnerability and Cell Death, in Alzheimer Disease, Pick's Disease, Progressive Supranuclear Palsy and Corticobasal Degeneration*. *Brain Pathology*, 2001, **11** (2), 144-158.
154. Pei, J.-J.; Braak, H.; An, W.-L., et al., *Up-regulation of mitogen-activated protein kinases ERK1/2 and MEK1/2 is associated with the progression of neurofibrillary degeneration in Alzheimer's disease*. *Molecular Brain Research*, 2002, **109** (1), 45-55.
155. Swatton, J. E.; Sellers, L. A.; Faull, R. L. M., et al., *Increased MAP kinase activity in Alzheimer's and Down syndrome but not in schizophrenia human brain*. *European Journal of Neuroscience*, 2004, **19** (10), 2711-2719.
156. Boulton, T. G.; Nye, S. H.; Robbins, D. J., et al., *ERKs: A family of protein-serine/threonine kinases that are activated and tyrosine phosphorylated in response to insulin and NGF*. *Cell*, 1991, **65** (4), 663-675.
157. English, J. D.; Sweatt, J. D., *Activation of p42 Mitogen-activated Protein Kinase in Hippocampal Long Term Potentiation*. *The Journal of biological chemistry*, 1996, **271** (40), 24329-24332.
158. Blanchard, B. J.; Raghunandan, R. D.; Roder, H. M., et al., *Hyperphosphorylation of Human-TAU by Brain Kinase PK40erk beyond Phosphorylation by cAMP-dependent PKA: Relation to Alzheimer's Disease*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1994, **200** (1), 187-194.
159. Yoshida, H.; Hastie, C. J.; McLauchlan, H., et al., *Phosphorylation of microtubule-associated protein tau by isoforms of c-Jun N-terminal kinase (JNK)*. *J. Neurochem.*, 2004, **90** (2), 352-358.
160. Lu, Q.; Soria, J. P.; Wood, J. G., *p44mpk MAP kinase induces Alzheimer type alterations in tau function and in*

- primary hippocampal neurons. 1993, 35 (4), 439-444.
161. Ferreira, A.; Lu, Q.; Orecchio, L., et al., *Selective Phosphorylation of Adult Tau Isoforms in Mature Hippocampal Neurons Exposed to Fibrillar A β* . Molecular and Cellular Neuroscience, 1997, 9 (3), 220-234.
162. Ploia, C.; Antoniou, X.; Scip, A., et al., *JNK plays a key role in Tau hyperphosphorylation in Alzheimer's disease models*. Journal of Alzheimer's disease : JAD, 2011, 26, 315-29.
163. Zhu, X.; Raina, A. K.; Rottkamp, C. A., et al., *Activation and redistribution of c-Jun N-terminal kinase/stress activated protein kinase in degenerating neurons in Alzheimer's disease*. J. Neurochem., 2001, 76 (2), 435-441.
164. Swahn, B.-M.; Xue, Y.; Arzel, E., et al., *Design and synthesis of 2'-anilino-4,4'-bipyridines as selective inhibitors of c-Jun N-terminal kinase-3*. Bioorg. Med. Chem. Lett., 2006, 16 (5), 1397-1401.
165. Bennett, B. L.; Sasaki, D. T.; Murray, B. W., et al., *SP600125, an anthrapyrazolone inhibitor of Jun N-terminal kinase*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2001, 98 (24), 13681-13686.
166. Yarza, R.; Vela, S.; Solas, M., et al., *c-Jun N-terminal Kinase (JNK) Signaling as a Therapeutic Target for Alzheimer's Disease*. Front Pharmacol, 2016, 6, 321-321.
167. Koch, P.; Gehring, M.; Laufer, S. A., *Inhibitors of c-Jun N-Terminal Kinases: An Update*. J. Med. Chem., 2015, 58 (1), 72-95.
168. Eferl, R.; Ricci, R.; Kenner, L., et al., *Liver Tumor Development: c-Jun Antagonizes the Proapoptotic Activity of p53*. Cell, 2003, 112 (2), 181-192.
169. Smith, L. M.; Wise, S. C.; Hendricks, D. T., et al., *cJun overexpression in MCF-7 breast cancer cells produces a tumorigenic, invasive and hormone resistant phenotype*. Oncogene, 1999, 18 (44), 6063-6070.
170. Zhang, Y.; Pu, X.; Shi, M., et al., *Critical role of c-Jun overexpression in liver metastasis of human breast cancer xenograft model*. BMC Cancer, 2007, 7, 145-145.
171. Mohit, A. A.; Martin, J. H.; Miller, C. A., *p493F12 kinase: A novel MAP kinase expressed in a subset of neurons in the human nervous system*. Neuron, 1995, 14 (1), 67-78.
172. Bussi re, T.; Hof, P. R.; Mailliot, C., et al., *Phosphorylated serine422 on tau proteins is a pathological epitope found in several diseases with neurofibrillary degeneration*. Acta Neuropathologica, 1999, 97 (3), 221-230.
173. Guillozet-Bongaarts, A. L.; Cahill, M. E.; Cryns, V. L., et al., *Pseudophosphorylation of tau at serine 422 inhibits caspase cleavage: in vitro evidence and implications for tangle formation in vivo*. J. Neurochem., 2006, 97 (4), 1005-1014.
174. Grueninger, F.; Bohrmann, B.; Czech, C., et al., *Phosphorylation of Tau at S422 is enhanced by A β in TauPS2APP triple transgenic mice*. Neurobiology of Disease, 2010, 37 (2), 294-306.
175. Suwanna, N.; Thangnipon, W.; Soi-ampornkul, R., *Neuroprotective effects of diarylpropionitrile against β -amyloid peptide-induced neurotoxicity in rat cultured cortical neurons*. Neuroscience Letters, 2014, 578, 44-49.
176. Savage, M. J.; Lin, Y.-G.; Ciallella, J. R., et al., *Activation of c-Jun N-Terminal Kinase and p38 in an Alzheimer's Disease Model Is Associated with Amyloid Deposition*. The Journal of Neuroscience, 2002, 22 (9), 3376.
177. Xu, N.; Xiao, Z.; Zou, T., et al., *Induction of GADD34 Regulates the Neurotoxicity of Amyloid β* . American Journal of Alzheimer's Disease & Other Dementias®, 2014, 30 (3), 313-319.
178. Shen, C.; Chen, Y.; Liu, H., et al., *Hydrogen peroxide promotes Abeta production through JNK-dependent activation of gamma-secretase*. The Journal of biological chemistry, 2008, 283 (25), 17721-17730.
179. Parsons, S. J.; Parsons, J. T., *Src family kinases, key regulators of signal transduction*. Oncogene, 2004, 23 (48), 7906-7909.
180. Schenone, S.; Brullo, C.; Musumeci, F., et al., *Fyn Kinase in Brain Diseases and Cancer: The Search for Inhibitors*. Current Medicinal Chemistry, 2011, 18 (19), 2921-2942.
181. Shirazi, S.; Wood, J., *The protein tyrosine kinase, fyn, in Alzheimer's disease pathology*. Clinical Neuroscience and Neuropathology, 1993, 4 (4), 435-437.
182. Li, C.; G tz, J., *Somatodendritic accumulation of Tau in Alzheimer's disease is promoted by Fyn-mediated local protein translation*. The EMBO journal, 2017, 36 (21), 3120-3138.
183. Nygaard, H. B., *Targeting Fyn Kinase in Alzheimer's Disease*. Biol Psychiatry, 2018, 83 (4), 369-376.
184. Bhaskar, K.; Hobbs, G. A.; Yen, S. H., et al., *Tyrosine phosphorylation of tau accompanies disease progression in transgenic mouse models of tauopathy*. Neuropathology and applied neurobiology, 2010, 36 (6), 462-477.
185. Reynolds, C.; Garwood, C.; Wray, S., et al., *Phosphorylation Regulates Tau Interactions with Src Homology 3 Domains of Phosphatidylinositol 3-Kinase, Phospholipase C 1, Grb2, and Src Family Kinases*. The Journal of biological chemistry, 2008, 283, 18177-86.
186. Lau, D. H. W.; Hogseth, M.; Phillips, E. C., et al., *Critical residues involved in tau binding to fyn: implications for tau phosphorylation in Alzheimer's disease*. Acta Neuropathol Commun, 2016, 4 (1), 49-49.
187. Bhaskar, K.; Yen, S.-H.; Lee, G., *Disease-related Modifications in Tau Affect the Interaction between Fyn and Tau*. The Journal of Biological Chemistry, 2005, 280 (42), 35119-35125.

188. Lesort, M.; Jope, R. S.; Johnson, G. V. W., *Insulin Transiently Increases Tau Phosphorylation*. *J. Neurochem.*, 1999, 72 (2), 576-584.
189. Lee, G.; Thangavel, R.; Sharma, V. M., et al., *Phosphorylation of tau by fyn: implications for Alzheimer's disease*. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 2004, 24 (9), 2304-2312.
190. Kaufman, A. C.; Salazar, S. V.; Haas, L. T., et al., *Fyn inhibition rescues established memory and synapse loss in Alzheimer mice*. *Annals of neurology*, 2015, 77 (6), 953-971.
191. Hernandez, P.; Lee, G.; Sjoberg, M., et al., *Tau Phosphorylation by cdk5 and Fyn in Response to Amyloid Peptide A beta(25-35): Involvement of Lipid Rafts*. *Journal of Alzheimer's disease : JAD*, 2009, 16, 149-56.
192. Williamson, R.; Scales, T.; Clark, B. R., et al., *Rapid Tyrosine Phosphorylation of Neuronal Proteins Including Tau and Focal Adhesion Kinase in Response to Amyloid- β Peptide Exposure: Involvement of Src Family Protein Kinases*. *J. Neurosci.*, 2002, 22 (1), 10-20.
193. Mondragón-Rodríguez, S.; Trillaud-Doppia, E.; Dudilot, A., et al., *Interaction of endogenous tau protein with synaptic proteins is regulated by N-methyl-D-aspartate receptor-dependent tau phosphorylation*. *The Journal of biological chemistry*, 2012, 287 (38), 32040-32053.
194. Chin, J.; Palop, J. J.; Yu, G.-Q., et al., *Fyn kinase modulates synaptotoxicity, but not aberrant sprouting, in human amyloid precursor protein transgenic mice*. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 2004, 24 (19), 4692-4697.
195. Chin, J.; Palop, J. J.; Puoliväli, J., et al., *Fyn kinase induces synaptic and cognitive impairments in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease*. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 2005, 25 (42), 9694-9703.
196. Ittner, L. M.; Ke, Y. D.; Delerue, F., et al., *Dendritic Function of Tau Mediates Amyloid- β Toxicity in Alzheimer's Disease Mouse Models*. *Cell*, 2010, 142 (3), 387-397.
197. Roberson, E. D.; Searce-Levie, K.; Palop, J. J., et al., *Reducing Endogenous Tau Ameliorates Amyloid β -Induced Deficits in an Alzheimer's Disease Mouse Model*. *Science*, 2007, 316 (5825), 750.
198. Haass, C.; Mandelkow, E., *Fyn-Tau-Amyloid: A Toxic Triad*. *Cell*, 2010, 142 (3), 356-358.
199. Asghar, U.; Witkiewicz, A. K.; Turner, N. C., et al., *The history and future of targeting cyclin-dependent kinases in cancer therapy*. *Nat Rev Drug Discov*, 2015, 14 (2), 130-146.
200. Bettayeb, K.; Oumata, N.; Echaliier, A., et al., *CR8, a potent and selective, roscovitine-derived inhibitor of cyclin-dependent kinases*. *Oncogene*, 2008, 27 (44), 5797-5807.
201. Demange, L.; Abdellah, F. N.; Lozach, O., et al., *Potent inhibitors of CDK5 derived from roscovitine: Synthesis, biological evaluation and molecular modelling*. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2013, 23 (1), 125-131.
202. Huwe, A.; Mazitschek, R.; Giannis, A., *Small Molecules as Inhibitors of Cyclin-Dependent Kinases*. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2003, 42 (19), 2122-2138.
203. Reinhardt, L.; Kordes, S.; Reinhardt, P., et al., *Dual Inhibition of GSK3 β and CDK5 Protects the Cytoskeleton of Neurons from Neuroinflammatory-Mediated Degeneration In Vitro and In Vivo*. *Stem Cell Reports*, 2019, 12 (3), 502-517.
204. *FDA Clears Novartis Kisqali for Combination Breast Cancer Therapy*.
<https://www.genengnews.com/topics/drug-discovery/fda-clears-novartis-kisqali-for-combination-breast-cancer-therapy/>, abgerufen am: 05.10.2019, 2017.
205. Kim, S.; Tiedt, R.; Loo, A., et al., *The potent and selective cyclin-dependent kinases 4 and 6 inhibitor ribociclib (LEE011) is a versatile combination partner in preclinical cancer models*. *Oncotarget*, 2018, 9 (81), 35226-35240.
206. Karran, E.; Palmer, A. M., *Neurodegenerative Disorders and their Treatment*. *Drugs News & Perspectives*, 2007, 20 (6), 407-412.
207. Robb, C. M.; Kour, S.; Contreras, J. I., et al., *Characterization of CDK(5) inhibitor, 20-223 (aka CP668863) for colorectal cancer therapy*. *Oncotarget*, 2017, 9 (4), 5216-5232.
208. Klein, P. S.; Melton, D. A., *A molecular mechanism for the effect of lithium on development*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1996, 93 (16), 8455-8459.
209. Ryves, W. J.; Harwood, A. J., *Lithium Inhibits Glycogen Synthase Kinase-3 by Competition for Magnesium*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2001, 280 (3), 720-725.
210. De Sarno, P.; Li, X.; Jope, R. S., *Regulation of Akt and glycogen synthase kinase-3 β phosphorylation by sodium valproate and lithium*. *Neuropharmacology*, 2002, 43 (7), 1158-1164.
211. Selenica, M. L.; Jensen, H. S.; Larsen, A. K., et al., *Efficacy of small-molecule glycogen synthase kinase-3 inhibitors in the postnatal rat model of tau hyperphosphorylation*. *British journal of pharmacology*, 2007, 152 (6), 959-979.
212. Noble, W.; Planel, E.; Zehr, C., et al., *Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by lithium correlates with reduced tauopathy and degeneration in vivo*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2005, 102 (19), 6990-6995.

213. Lovestone, S.; Davis, D. R.; Webster, M.-T., et al., *Lithium reduces tau phosphorylation: effects in living cells and in neurons at therapeutic concentrations*. *Biol Psychiatry*, 1999, **45** (8), 995-1003.
214. Hampel, H.; Ewers, M.; Bürger, K., et al., *Lithium trial in Alzheimer's disease: a randomized, single-blind, placebo-controlled, multicenter 10-week study*. *J Clin Psychiatry*, 2009, **70** (6), 922-931.
215. Coghlan, M. P.; Culbert, A. A.; Cross, D. A. E., et al., *Selective small molecule inhibitors of glycogen synthase kinase-3 modulate glycogen metabolism and gene transcription*. *Chemistry & Biology*, 2000, **7** (10), 793-803.
216. King, M. K.; Pardo, M.; Cheng, Y., et al., *Glycogen synthase kinase-3 inhibitors: Rescuers of cognitive impairments*. *Pharmacology & therapeutics*, 2014, **141** (1), 1-12.
217. Bhat, R.; Xue, Y.; Berg, S., et al., *Structural Insights and Biological Effects of Glycogen Synthase Kinase 3-specific Inhibitor AR-A014418*. *The Journal of biological chemistry*, 2003, **278**, 45937-45.
218. Ly, P. T. T.; Wu, Y.; Zou, H., et al., *Inhibition of GSK3 β -mediated BACE1 expression reduces Alzheimer-associated phenotypes*. *J Clin Invest*, 2013, **123** (1), 224-235.
219. Ding, Y.; Qiao, A.; Fan, G.-H., *Indirubin-3'-monoxime rescues spatial memory deficits and attenuates β -amyloid-associated neuropathology in a mouse model of Alzheimer's disease*. *Neurobiology of Disease*, 2010, **39** (2), 156-168.
220. Leclerc, S.; Garnier, M.; Hoessel, R., et al., *Indirubins inhibit glycogen synthase kinase-3 and CDK5/P25, two protein kinases involved in abnormal tau phosphorylation in Alzheimer's disease. A property common to most cyclin-dependent kinase inhibitors?* *The Journal of biological chemistry*, 2001, **276**, 251-60.
221. Vougiannopoulou, K.; Ferandin, Y.; Bettayeb, K., et al., *Soluble 3',6-Substituted Indirubins with Enhanced Selectivity toward Glycogen Synthase Kinase -3 Alter Circadian Period*. *J. Med. Chem.*, 2008, **51** (20), 6421-6431.
222. Martin, L.; Magnaudeix, A.; Wilson, C., et al., *The new indirubin derivative inhibitors of glycogen synthase kinase-3, 6-BIDECO and 6-BIMYEO, prevent tau phosphorylation and apoptosis induced by the inhibition of protein phosphatase-2A by okadaic acid in cultured neurons*. *J. Neurosci. Res.*, 2011, **89**, 1802-11.
223. Serenó, L.; Coma, M.; Rodríguez, M., et al., *A novel GSK-3 β inhibitor reduces Alzheimer's pathology and rescues neuronal loss in vivo*. *Neurobiology of Disease*, 2009, **35** (3), 359-367.
224. del Ser, T.; Steinwachs, K.; Gertz, H., et al., *Treatment of Alzheimer's Disease with the GSK-3 Inhibitor Tideglusib: A Pilot Study*. *Journal of Alzheimer's disease : JAD*, 2012, **33**.
225. Lovestone, S.; Boada, M.; Dubois, B., et al., *A Phase II Trial of Tideglusib in Alzheimer's Disease*. *Journal of Alzheimer's disease : JAD*, 2014, **45**.
226. Cao, M.; Liu, F.; Ji, F., et al., *Effect of c-Jun N-terminal kinase (JNK)/p38 mitogen-activated protein kinase (p38 MAPK) in morphine-induced tau protein hyperphosphorylation*. *Behavioural Brain Research*, 2013, **237**, 249-255.
227. Hashimoto, Y.; Niikura, T.; Chiba, T., et al., *The Cytoplasmic Domain of Alzheimer's Amyloid- β Protein Precursor Causes Sustained Apoptosis Signal-Regulating Kinase 1/c-Jun NH₂-Terminal Kinase-Mediated Neurotoxic Signal via Dimerization*. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 2003, **306** (3), 889.
228. Zhou, Q.; Wang, M.; Du, Y., et al., *Inhibition of JNK activation reverses AD-phenotypes in APP^{swe}/PS1^{dE9} mice*. *Annals of Neurology*, 2015, **77**.
229. Chambers, J. W.; Pachori, A.; Howard, S., et al., *Small Molecule c-jun-N-terminal Kinase (JNK) Inhibitors Protect Dopaminergic Neurons in a Model of Parkinson's Disease*. *ACS Chem Neurosci*, 2011, **2** (4), 198-206.
230. Crocker, C. E.; Khan, S.; Cameron, M. D., et al., *JNK Inhibition Protects Dopamine Neurons and Provides Behavioral Improvement in a Rat 6-hydroxydopamine Model of Parkinson's Disease*. *ACS Chem Neurosci*, 2011, **2** (4), 207-212.
231. Rüegg, U. T.; Gillian, B., *Staurosporine, K-252 and UCN-01: potent but nonspecific inhibitors of protein kinases*. *Trends in Pharmacological Sciences*, 1989, **10** (6), 218-220.
232. Himmelstein, D. S.; Ward, S. M.; Lancia, J. K., et al., *Tau as a therapeutic target in neurodegenerative disease*. *Pharmacology & therapeutics*, 2012, **136** (1), 8-22.
233. Hübinger, G.; Geis, S.; LeCorre, S., et al., *Inhibition of PHF-like Tau Hyperphosphorylation in SH-SY5Y Cells and Rat Brain Slices by K252a*. *Journal of Alzheimer's disease : JAD*, 2008, **13**, 281-94.
234. Le Corre, S.; Klafki, H. W.; Plesnila, N., et al., *An inhibitor of tau hyperphosphorylation prevents severe motor impairments in tau transgenic mice*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2006, **103** (25), 9673-9678.
235. *Saracatinib*. Alzforum, <https://www.alzforum.org/therapeutics/saracatinib>, abgerufen am: 24.09.2019.
236. Nygaard, H. B.; Wagner, A. F.; Bowen, G. S., et al., *A phase Ib multiple ascending dose study of the safety, tolerability, and central nervous system availability of AZD0530 (saracatinib) in Alzheimer's disease*. *Alzheimer's research & therapy*, 2015, **7** (1), 35-35.
237. Piette, F.; Belmin, J.; Vincent, H., et al., *Masitinib as an adjunct therapy for mild-to-moderate Alzheimer's disease: a randomised, placebo-controlled phase 2 trial*. *Alzheimer's research & therapy*, 2011, **3** (2), 16-16.
238. *Clinical Trials.gov*. U.S. National Library of Medicine, <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/study/NCT01872598>, abgerufen am: 24.09.2019.

239. Dhawan, G.; Combs, C. K., *Inhibition of Src kinase activity attenuates amyloid associated microgliosis in a murine model of Alzheimer's disease*. J Neuroinflammation, 2012, 9, 117-117.
240. Brachwitz, K.; Voigt, B.; Meijer, L., et al., *Evaluation of the First Cytostatically Active 1-Aza-9-oxafluorenes as Novel Selective CDK1 Inhibitors with P-Glycoprotein Modulating Properties*. J. Med. Chem., 2003, 46 (5), 876-879.
241. Voigt, B. *Entwicklung und Charakterisierung neuartiger 1-Aza-9-oxafluorene als Inhibitoren Cyclin-abhängiger Kinasen und GSK-3beta*. Martin-Luther-Universität Halle/Wittenberg, Institut der Pharmazie, 2007, 169 Seiten.
242. Voigt, B.; Krug, M.; Schächtele, C., et al., *Probing Novel 1-Aza-9-oxafluorenes as Selective GSK-3β Inhibitors*. CHEMMEDCHEM, 2008, 3 (1), 120-126.
243. Hilgeroth, A.; Kuna, K.; Kuckländer, U., *Novel functionalized 1,4,4a,9a-tetrahydro-1-aza-9-oxafluorenes by cycloaddition of 4-(4-methoxyphenyl)-1,4-dihydropyridines and p-benzoquinone*. 1998, 35 (3), 551-553.
244. Karantzioti, P.; Papastergiou, A.; Stefanakis, J. G., et al., *O-Benzoyl pyridine aldoxime and amidoxime derivatives: novel efficient DNA photo-cleavage agents*. Med. Chem. Commun., 2015, 6, 719-726.
245. Ishihara, K.; Ohara, S.; Yamamoto, H., *3,4,5-Trifluorobenzeneboronic Acid as an Extremely Active Amidation Catalyst*. The Journal of Organic Chemistry, 1996, 61 (13), 4196-4197.
246. Al-Zoubi, R. M.; Marion, O.; Hall, D. G., *Direct and Waste-Free Amidations and Cycloadditions by Organocatalytic Activation of Carboxylic Acids at Room Temperature*. Angew. Chem. Int. Ed., 2008, 47 (15), 2876-2879.
247. Mammalwar, B.; Muddala, N. P.; Watts, F. M., et al., *Efficient conversion of acids and esters to amides and transamidation of primary amides using OSU-6*. Tetrahedron, 2015, 71 (48), 9101-9111.
248. Pochet, L.; Doucet, C.; Schynts, M., et al., *Esters and Amides of 6-(Chloromethyl)-2-oxo-2H-1-benzopyran-3-carboxylic Acid as Inhibitors of α-Chymotrypsin: Significance of the "Aromatic" Nature of the Novel Ester-Type Coumarin for Strong Inhibitory Activity*. J. Med. Chem., 1996, 39 (13), 2579-2585.
249. Cvetovich, R. J.; DiMichele, L., *Formation of Acrylanilides, Acrylamides, and Amides Directly from Carboxylic Acids Using Thionyl Chloride in Dimethylacetamide in the Absence of Bases*. Organic Process Research & Development, 2006, 10 (5), 944-946.
250. Bull, J. A.; Mousseau, J. J.; Pelletier, G., et al., *Synthesis of Pyridine and Dihydropyridine Derivatives by Regio- and Stereoselective Addition to N-Activated Pyridines*. Chem. Rev., 2012, 112 (5), 2642-2713.
251. Fraenkel, G.; Cooper, J. W.; Fink, C. M., *One-Step Synthesis of 2-Substituted N-Ethoxycarbonyl-1,2-dihydropyridines*. Angew. Chem. Int. Ed., 1970, 9 (7), 523-523.
252. Lyle, R. E.; Marshall, J. L.; Comins, D. L., *The reaction of 1-acylpyridinium salts with grignard and organocadmium reagents*. Tetrahedron Lett., 1977, 18 (12), 1015-1018.
253. Piers, E.; Soucy, M., *Reaction of Cuprate Reagents with Pyridine in the Presence of Chloroformate. A Novel Synthesis of 1,4-Dihydropyridine Derivatives*. Can. J. Chem., 1974, 52 (20), 3563-3564.
254. Comins, D. L.; Abdullah, A. H., *Regioselective addition of Grignard reagents to 1-acylpyridinium salts. A convenient method for the synthesis of 4-alkyl(aryl)pyridines*. The Journal of Organic Chemistry, 1982, 47 (22), 4315-4319.
255. Chia, W.-L.; Shiao, M.-J., *A facile synthesis of functionalized 4-benzylpyridines by using mixed copper, zinc benzylic organometallics*. Tetrahedron Lett., 1991, 32 (18), 2033-2034.
256. Gall, E. L.; Gosmini, C.; Nédélec, J.-Y., et al., *Synthesis of functionalized 4-phenyl-pyridines via electrochemically prepared organozinc reagents*. Tetrahedron, 2001, 57 (10), 1923-1927.
257. Reetz, M. T.; Kinder, A., *The Kharasch reaction revisited: CuX3Li2-catalyzed conjugate addition reactions of Grignard reagents*. J. Organomet. Chem., 1995, 502 (1), C5-C7.
258. Eisner, U.; Kuthan, J., *Chemistry of dihydropyridines*. Chem. Rev., 1972, 72 (1), 1-42.
259. Mangeney, P.; Gosmini, R.; Raussou, S., et al., *Preparation and Utilization of Chiral Dihydropyridines. Synthesis of Chiral Indoloquinolizines and Benzoquinolizines*. The Journal of Organic Chemistry, 1994, 59 (7), 1877-1888.
260. Brignell, P. J.; Eisner, U.; Farrell, P. G., *Substituent effects in the ultraviolet spectra of 1,4-dihydropyridines*. Journal of the Chemical Society B: Physical Organic, 1966, (0), 1083-1089.
261. Robaa, D., *In silico- und Docking-Untersuchungen, Softprogramm MOE 2018, MOE 2019.1, Schrödinger 2019.1, Schrödinger Suite 2019.1, LigPrep 2019.1, ConfGen 2019.1, Glide 2019*. 2019.
262. Paulsen, H.; Todt, K., *Monosaccharide mit stickstoffhaltigem Ring, XIV. Untersuchungen über die magnetische Anisotropie der Amidgruppe*. Eur. J. Inorg. Chem., 1967, 100 (10), 3385-3396.
263. Möhrle, H.; Ehrhardt, H.; Kilian, R., et al., *Rotamere Amide*. Arch Pharm - Chemistry in Life Sciences, 1970, 303 (6), 531-544.
264. Bienz, S.; Bigler, L.; Fox, T., et al., *Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie*. Thieme: 2016; Vol. 9.
265. Brückner, R., *Reaktionsmechanismen- Organische Reaktionen, Stereochemie, Moderne Synthesemethoden*. 2004; Vol. 3.

266. Mueller Hendrix, A. J. *NOVEL METHODOLOGIES VIA THE CATALYTIC CARBOCUPRATION OF ALKYNOATES AND THE TOTAL SYNTHESIS OF (+)-ASPERGILLIDE B*. Dissertation, The University of Alabama, 2010, 1 Seiten.
267. Fukuzumi, S.; Fujii, Y.; Suenobu, T., *Metal Ion-Catalyzed Cycloaddition vs Hydride Transfer Reactions of NADH Analogues with p-Benzoquinones*. J. Am. Chem. Soc., 2001, 123 (42), 10191-10199.
268. Engler, T. A.; Combrink, K. D.; Ray, J. E., *Stereoselective 3 + 2 and stereospecific 2 + 2 cycloaddition reactions of alkenes and quinones*. J. Am. Chem. Soc., 1988, 110 (23), 7931-7933.
269. Erdtman, H.; Stjernström, N. E., *Studies on Humic Acids. VII. The Structure of the Dihydroxy-dioxidoterphenyl Obtained by the Action of Sulphuric Acid on p-Benzoquinone*. Acta Chem. Scand., 1959, 13, 653-658.
270. Petrassi, H. M.; Sharpless, K. B.; Kelly, J. W., *The Copper-Mediated Cross-Coupling of Phenylboronic Acids and N-Hydroxyphthalimide at Room Temperature: Synthesis of Aryloxyamines*. Org. Lett., 2001, 3 (1), 139-142.
271. Dirksen, A.; Hackeng, T. M.; Dawson, P. E., *Nucleophilic Catalysis of Oxime Ligation*. Angew. Chem., 2006, 118 (45), 7743-7746.
272. Kalia, J.; Raines, R. T., *Hydrolytic stability of hydrazones and oximes*. Angew. Chem. Int. Ed., 2008, 47 (39), 7523-7526.
273. Jencks, W. P., *Studies on the Mechanism of Oxime and Semicarbazone Formation*. J. Am. Chem. Soc., 1959, 81 (2), 475-481.
274. Casimiro-Garcia, A.; Strohbach, J. W.; Hepworth, D., et al. *Novel pyrimidinecarboxamides as inhibitors of vanin-1 enzyme and their preparation*. WO2018011681A1, 2018.
275. Rubina, K.; Goldberg, Y.; Gaukhman, A., et al., *O-Alkylation of Pyridine Aldoximes Under Phase-Transfer Conditions*. Synth. Commun., 1989, 19 (18), 3129-3138.
276. Gagnon, P. E.; Gaudry, R.; King, F. E., *The synthesis of amino-acids from substituted cyanoacetic esters*. Journal of the Chemical Society (Resumed), 1944, (0), 13-15.
277. Huang, K.; Merced, F. G.; Ortiz-Marciales, M., et al., *Highly Enantioselective Borane Reduction of Heteroaryl and Heterocyclic Ketoxime Ethers Catalyzed by Novel Spiroborate Ester Derived from Diphenylvalinol: Application to the Synthesis of Nicotine Analogues*. The Journal of Organic Chemistry, 2008, 73 (11), 4017-4026.
278. Nsikabaka, S.; Harb, W.; Ruiz-López, M. F., *The role of water on the acid-promoted E/Z isomerization of oximes in aqueous solution*. Journal of Molecular Structure: THEOCHEM, 2006, 764 (1), 161-166.
279. Johnson, S. M.; Petrassi, H. M.; Palaninathan, S. K., et al., *Bisaryloxime Ethers as Potent Inhibitors of Transthyretin Amyloid Fibril Formation*. J. Med. Chem., 2005, 48 (5), 1576-1587.
280. Shinozaki, H.; Yoshida, N.; Tajima, M., *THE PREPARATION OF OXIME ETHERS UNDER PHASE TRANSFER CONDITION*. Chem. Lett., 1980, 9 (7), 869-870.
281. De, P.; Nonappa; Pandurangan, K., et al., *CuI-Mediated Cross-Coupling of Aryl Halides with Oximes: A Direct Access to O-Aryloximes*. Org. Lett., 2007, 9 (15), 2767-2770.
282. Mulla, S. A. R.; Chavan, S. S.; Inamdar, S. M., et al., *An efficient synthesis of O-aryloxime ethers by copper fluorapatite catalyzed cross-coupling of aryloximes with arylboronic acids*. Tetrahedron Lett., 2014, 55 (38), 5327-5332.
283. Beckert, R.; Fanghänel, E.; Habicher, W. D., et al., *Eigenschaften, Reinigung und Darstellung wichtiger Reagenzien, Lösungsmittel und Hilfsstoffe (Reagenzienanhang)*. In *Organikum*, WILEY-VCH: 2009; Vol. 23 pp 749-770.
284. Bartovic, A.; Decroix, B.; Netchitaïlo, P., *Synthesis of 1,2-oxazaheterocycles containing an isoindolone moiety from N-Hydroxyphthalimide*. J. Heterocycl. Chem., 2000, 37 (4), 827-830.
285. Yuthavon, Y.; Tarnchompoo, B.; Kamchonwongpaisan, S., et al., *Supporting Information of: Malarial dihydrofolate reductase as a paradigm for drug development against a resistance-compromised target*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2012, 1-8.
286. Mitsunobu, O., *The Use of Diethyl Azodicarboxylate and Triphenylphosphine in Synthesis and Transformation of Natural Products*. Synthesis, 1981, 1981 (1), 1-28.
287. Hughes, D. L., *PROGRESS IN THE MITSUNOBU REACTION. A REVIEW*. Org. Prep. Proced. Int., 1996, 28 (2), 127-164.
288. Camp, D.; Jenkins, I., *The mechanism of the Mitsunobu esterification reaction. Part I. The involvement of phosphoranes and oxyphosphonium salts*. J. Org. Chem., 1989, 54 (13).
289. Popoff, N.; Macqueron, B.; Sayhoun, W., et al., *Well-Defined Silica-Supported Zirconium-Benzyl Cationic Species: Improved Heterogenization of Single-Site Polymerization Catalysts*. Eur. J. Inorg. Chem., 2014, (5), 888-895.
290. Evans, D. A.; Katz, J. L.; West, T. R., *Synthesis of diaryl ethers through the copper-promoted arylation of phenols with arylboronic acids. An expedient synthesis of thyroxine*. Tetrahedron Lett., 1998, 39 (19), 2937-2940.
291. Lam, P. Y. S.; Clark, C. G.; Saubern, S., et al., *Copper Promoted Aryl/Saturated Heterocyclic C-N Bond Cross-Coupling with Arylboronic Acid and Arylstannane*. Synlett, 2000, 2000 (05), 0674-0676.
292. Ing, H. R.; Manske, R. H. F., *CCCXII.—A modification of the Gabriel synthesis of amines*. Journal of the

- Chemical Society (Resumed), 1926, 129 (0), 2348-2351.
293. Gabriel, S., *Ueber eine Darstellungsweise primärer Amine aus den entsprechenden Halogenverbindungen*. Eur. J. Inorg. Chem., 1887, 20 (2), 2224-2236.
294. Wei, Z.; Wang, J.; Liu, M., et al., *Synthesis, in vitro antimycobacterial and antibacterial evaluation of IMB-070593 derivatives containing a substituted benzyloxime moiety*. Molecules, 2013, 18 (4), 3872-3893.
295. Dobberstein, I., *HCl-Salzbildung mit HCl-37 % und Isopropanol*. 2018.
296. Ghosh, R.; Olofsson, B., *Metal-Free Synthesis of N-Aryloxymides and Aryloxyamines*. Org. Lett., 2014, 16 (6), 1830-1832.
297. Cordes, E. H.; Jencks, W. P., *Nucleophilic Catalysis of Semicarbazone Formation by Anilines*. J. Am. Chem. Soc., 1962, 84 (5), 826-831.
298. Morales, S.; Aceña, J. L.; García Ruano, J. L., et al., *Sustainable Synthesis of Oximes, Hydrazones, and Thiosemicarbazones under Mild Organocatalyzed Reaction Conditions*. The Journal of Organic Chemistry, 2016, 81 (20), 10016-10022.
299. Corey, E. J.; Petrzilka, M.; Ueda, Y., *A New Synthetic Route to (±)-Perhydrohistrionicotoxin*. Helv. Chim. Acta, 1977, 60 (7), 2294-2302.
300. Kociński, P. J., *Protecting Groups* Thieme Verlag: 2005; Vol. 3.
301. Dubost, E.; Fossey, C.; Cailly, T., et al., *Selective ortho-Bromination of Substituted Benzaldoximes Using Pd-Catalyzed C-H Activation: Application to the Synthesis of Substituted 2-Bromobenzaldehydes*. The Journal of Organic Chemistry, 2011, 76 (15), 6414-6420.
302. Karabatsos, G. J.; Hsi, N., *Structural studies by nuclear magnetic resonance—XI: Conformations and configurations of oxime o-methyl ethers*. Tetrahedron, 1967, 23 (3), 1079-1095.
303. Karabatsos, G. J.; Graham, J. D.; Vane, F. M., *syn-anti Isomer Determination of 2,4-Dinitrophenylhydrazones and Semicarbazones by N.m.r.* J. Am. Chem. Soc., 1962, 84 (5), 753-755.
304. Phillips, W. D., *STUDIES OF HINDERED INTERNAL ROTATION IN ORGANIC MOLECULES BY NUCLEAR MAGNETIC RESONANCE*. Annals New York Academy of Sciences, 1958, 70 (4), 817-832.
305. Curtin, D. Y.; Grubbs, E. J.; McCarty, C. G., *Uncatalyzed syn-anti Isomerization of Imines, Oxime Ethers, and Haloimines*. J. Am. Chem. Soc., 1966, 88 (12), 2775-2786.
306. Fréneau, M.; de Sainte Claire, P.; Hoffmann, N., et al., *Phototransformation of tetrazoline oxime ethers: photoisomerization vs. photodegradation*. RSC Advances, 2016, 6 (7), 5512-5522.
307. Vögtle, F.; Mannschreck, A.; Staab, H. A., *Protonenresonanz-Untersuchungen zur syn-anti-Isomerie bei Imino-kohlensäureestern und Imino-thiokohlensäureestern*. Justus Liebig Annalen der Chemie, 1967, 708 (1), 51-56.
308. Krämer, R. *E/Z Isomerisierungen in molekularen Schaltern*. Bergischen Universität Wuppertal, Fakultät für Mathematik und Naturwissenschaften, 2016, 177 Seiten.
309. Wöhrle, D.; Tausch, M. W.; Stohrer, W.-D., *Photochemie: Konzepte, Methoden, Experimente*. WILEY-VCH Verlag GmbH: 1998.
310. Baumert, C. *Synthese, Charakterisierung und biologische Evaluation von MDR-Modulatoren und HIV-1 Proteaseinhibitoren mit 1,4-Dihydropyridin-Grundstruktur*. Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Institut für Pharmazie, 2012, Seiten.
311. Padwa, A.; Albrecht, F., *Photochemical syn-anti isomerization about the carbon-nitrogen double bond*. J. Am. Chem. Soc., 1974, 96 (15), 4849-4857.
312. Marullo, N. P.; Wagener, E. H., *Isomerization Rates of Iminocarbonates*. J. Am. Chem. Soc., 1966, 88 (21), 5034-5035.
313. Kessler, H., *Inversion am doppelt gebundenen Stickstoffatom in Phenylguanidinen (I)*. Tetrahedron Lett., 1968, 9 (17), 2041-2045.
314. Marullo, N. P.; Wagener, E. H., *Structural organic chemistry by nmr. III. Isomerization of compounds containing the carbon-nitrogen double bond*. Tetrahedron Lett., 1969, 10 (30), 2555-2558.
315. Goettert, M.; Luik, S.; Graeser, R., et al., *A direct ELISA assay for quantitative determination of the inhibitory potency of small molecules inhibitors for JNK3*. J. Pharm. Biomed. Anal., 2011, 55 (1), 236-240.
316. Romano, V.; de Beer, T. A. P.; Schwede, T., *A computational protocol to evaluate the effects of protein mutants in the kinase gatekeeper position on the binding of ATP substrate analogues*. BMC Res Notes, 2017, 10 (1), 104-104.
317. Wennmohs, F. *Theoretische Untersuchungen schwacher Wasserstoffbrückenbindungen zu Schwefel*. Dissertation, Ruhr-Universität Bochum, Fakultät für Chemie und Biochemie, 2003, 117 Seiten.
318. Wood, D. J.; Korolchuk, S.; Tatum, N. J., et al., *Differences in the Conformational Energy Landscape of CDK1 and CDK2 Suggest a Mechanism for Achieving Selective CDK Inhibition*. Cell Chemical Biology, 2019, 26 (1), 121-130.e5.
319. Dickson, S. J.; Paterson, M. J.; Willans, C. E., et al., *Anion Binding and Luminescent Sensing using Cationic Ruthenium(II) Aminopyridine Complexes*. 2008, 14 (24), 7296-7305.

320. 117 - OECD GUIDELINES FOR THE TESTING OF CHEMICALS. In *Partition Coefficient (n-octanol/water), High Performance Performance Liquid Chromatography (HPLC-Method)*, 2004; p 11.
321. Norinder, U.; Haeberlein, M., *Computational approaches to the prediction of the blood–brain distribution*. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2002, **54** (3), 291-313.
322. Biotage, *Isolera- Installation and Safety*. 2017.
323. Advion, *Mass Spectrometer Designed for Chemists*. 2018.
324. Anton-Paar, *Monowave 450: Automatisierte mikrowellenunterstützte Extraktion*. <https://www.anton-paar.com/de-de/produkte/details/monowave-450-automatisierte-mikrowellenunterstuetzte-extraktion/>, 2018.
325. Mettler-Toledo, *Zuverlässiges Wägen für die professionelle Forschung*. 2010.
326. Sartorius, *Sartorius Basic Elektronisch Analysen- und Präzisionswaagen*.
327. Scaltec, *Scaltec- SBA/SBC Aufstellungs- und Betriebsanleitung*. 2001.
328. Wurm, G.; Geres, U., *Untersuchungen an 1,4-Naphthochinonen, 10. Mitt. Reaktionen von Methylethern des 1,5-Dihydroxynaphthalins mit Singuletsauerstoff*. *Arch. Pharm.*, 1985, **318** (10), 931-937.
329. Stanovnik, B.; Tišler, M.; Golob, V., et al., *Heteroacyl azides as acylating agents for aromatic or heteroaromatic amines*. *J. Heterocycl. Chem.*, 1980, **17** (4), 733-736.
330. Naresh Kumar, K.; Sreeramamurthy, K.; Palle, S., et al., *Dithiocarbamate and DBU-promoted amide bond formation under microwave condition*. *Tetrahedron Letters*: 2010; Vol. **51**.
331. Billman, J. H.; Rendall, J. L., *Amides of Nicotinic Acid and Related Acids. II*. *J. Am. Chem. Soc.*, 1944, **66** (4), 540-541.
332. Tanaka, K.; Matuso, K.; Nakanishi, A. I., et al., *Syntheses of Cyclic Hydroxamic Acid Derivatives, and Their Chelating Abilities and Biological Activities*. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 1988, **36** (7), 2323-2330.
333. Wang, M.-Z.; Xu, H.; Liu, T.-W., et al., *Design, synthesis and antifungal activities of novel pyrrole alkaloid analogs*. *European journal of medicinal chemistry*, 2011, **46** (5), 1463-1472.
334. McKay, A. F.; Garmaise, D. L.; Paris, G. Y., et al., *BACTERIOSTATS: III. OXYAMINES AND THEIR DERIVATIVES*. *Can. J. Chem.*, 1960, **38** (3), 343-358.
335. Drain, D. J.; Williams, H. W. R.; Bernard, H. J. G. *Hydroxylamine derivatives and processes for making them* GB19620011804 19620328 17.02., 1965.
336. Pégurier, C.; Morellato, L.; Chahed, E., et al., *Synthesis of new arylalkoxy amido derivatives as melatoninergic ligands*. *Biorg. Med. Chem.*, 2003, **11** (5), 789-800.
337. Veedu, R. N.; Kokas, O. J.; Couturier-Tamburelli, I., et al., *Reaction of Iminopropadienones with Amines—Formation of Zwitterionic Intermediates, Ketenes, and Ketenimines*. *The Journal of Physical Chemistry A*, 2008, **112** (40), 9742-9750.
338. *Certificate of Analysis CDK1/CycB1*. ProQinase, https://www.proqinase.com/sites/default/files/public/cdk1_cycb_lot032_v2.pdf, abgerufen am: 10.10.2019.
339. *Certificate of Analysis FYN wt*. ProQinase, https://www.proqinase.com/sites/default/files/public/fyn_wt_lot002_v8.pdf, abgerufen am: 09.10.2019.
340. *Certificate of Analysis ERK1*. ProQinase, https://www.proqinase.com/sites/default/files/public/erk1_lot002_v3.pdf, abgerufen am: 10.10.2019.
341. *Certificate of Analysis GSK3-beta*. ProQinase, https://www.proqinase.com/sites/default/files/public/gsk3-beta_lot003_v7.pdf, abgerufen am: 10.10.2019.
342. *Certificate of Analysis JNK3*. ProQinase, https://www.proqinase.com/sites/default/files/public/jnk3_lot004_v7.pdf, abgerufen am: 10.10.2019.
343. Koch, P., *Protocol ADP-Glo GSK3β*. Universität Tübingen, erhalten 2019; pp 1-5.
344. Zegzouti, H.; Zdanovskaia, M.; Hsiao, K., et al., *ADP-Glo: A Bioluminescent and Homogeneous ADP Monitoring Assay for Kinases*. Mary Ann Liebest, Inc. publishers, 2009, **7** (6), 560-572.
345. *ADP-Glo™ Kinase Assay - Simple Kinase Assay Protocol* Promega, <https://www.promega.de/products/cell-signaling/kinase-assays-and-kinase-biology/adp-glo-kinase-assay/?catNum=V6930>, abgerufen am: 08.10.2019.
346. Krystof, V., *Kinase Inhibition Assays*. Word-Dokument, 2019; pp 1-2.

EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertationsschrift gemäß der Promotionsordnung der Naturwissenschaftlichen Fakultät I (Biowissenschaften) der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg selbstständig und ohne fremde Hilfe angefertigt habe. Ich habe keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet. Die daraus wörtlich und inhaltlich entnommenen Stellen wurden als solche gekennzeichnet. Die Dissertationsschrift wurde ausschließlich der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen-Fakultät I der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg vorgelegt und an keiner anderen universitären Einrichtung, weder im In- noch im Ausland, zur Erlangung des Doktorgrades eingereicht.

____Leipzig, den 26.04.2020_____

Ort, Datum

A handwritten signature in black ink, reading "Schade, Nico", written over a horizontal line.

Nico Schade

DANKSAGUNG

Die vorliegende Arbeit entstand vom Mai 2016 bis zum März 2020 am Institut für Pharmazie in der Pharmazeutischen/Medizinischen Chemie der Martin-Luther-Universität Halle/Wittenberg unter der fachlichen Leitung von Herrn Prof. Dr. Andreas Hilgeroth. Ihm gilt mein besonderer Dank für den Vorschlag des interessanten Themas, der Bereitstellung notwendiger Arbeitsmittel für die Forschung im Labor sowie für die wissenschaftliche Betreuung und Unterstützung während der gesamten Zeit. Weiterhin möchte ich mich bei ihm für seinen vertraulichen und empathischen Umgang bedanken, den ich sehr wertschätze. Bedanken möchte ich mich weiterhin bei Herrn PD Dr. Matthias Schmidt sowie bei Frau Dr. Dina Robaa für ihre Unterstützung und ihren Ideen im Hinblick auf die HPLC- und MPLC-Analytik sowie *in silico* Untersuchungen. Einen sehr großen Dank möchte ich auch Frau Antje Herbrich-Peters aussprechen, die mir nicht nur fachkundig bei der HPLC-Analytik, sondern auch durch ihre empathische Persönlichkeit stets vertraulich bei Seite stand. Darüber hinaus danke ich Frau Rudolph, Frau Mandt und Frau Woik für ihr offenes Ohr in beruflichen und privaten Angelegenheiten, sowie für die anregenden und tollen Gespräche mit Ihnen. Ein großer Dank gilt auch demjenigen, den ich als Erstes eingearbeitet hatte, Doktorand Ansgar Opitz. Dadurch, dass unsere zu bearbeiteten Themen ähnlicher Natur waren, konnte man sich in vielen Fragestellungen optimal ergänzen und kritische Gesichtspunkte adäquat diskutieren. Des Weiteren schätze ich auch die privaten Ausflüge mit ihm, sowie die Tanzeinlagen während studentischer Abendgesellschaften. Einen sehr großen Dank möchte ich auch an den Doktoranden Marius Seethaler richten. Mit ihm konnte ich mich immer vor allem über private Herausforderungen unterhalten. Seine offene Persönlichkeit schätze ich auch nach der Zeit der Promotion und hoffe, dass wir auch in Zukunft weiterhin Kontakt haben. Außerdem möchte ich mich bei weiteren Personen unseres Arbeitskreises bedanken, die da wären: Tim Fischer, Fabian Lentz, Tobias Mohs, Robin Gehrmann, Kaveh Yasrebi, Kirolos Ashraf und David Kreutzer. Meinen Wahlpflichtfachstudenten Felix Schöne, Michael Grohe und Anna Kirschbaum möchte ich im besonderen Maße für ihre tatkräftige Unterstützung im Labor danken. Weiterhin möchte ich dem Team der ProQuinase, dem Arbeitskreis um Dr. Pierre Koch von der Eberhard-Karls-Universität in Tübingen sowie Dr. Vladimir Krystof von der Palacky-Universität in Olomouc (Tschechien) für die Durchführung der biologischen Testungen danke sagen. Außerdem möchte ich mich bei Herrn Dirk Stolzenhain und Herrn Jörg Lerche für ihre stetige Hilfe bei der Chemikalienausgabe sowie Ausleihe von Geräten bedanken.

Mein größter Dank gilt meiner Familie. Hier hervorzuheben ist vor allem meine Freundin Lisett Morawe. Sie stand mir immer selbstlos und hilfreich zur Seite. Vor allem in der schwierigen Zeit nach meiner Promotion half sie mir durch ihre positive und weise Art am meisten. Danke danke danke Lisett.

LEBENS LAUF

Nico Schade

Torgauer Straße 35, 04315 Leipzig

* 30.03.1987 (Kyritz)

männlich, deutsch, ledig

Werdegang

- 2003 – 2006 Friedrich-Ludwig-Jahn-Gymnasium Kyritz mit Abschluss der allgemeinen Hochschulreife
- 2006 – 2008 Ausbildung und erster Prüfungsteil zum Pharmazeutisch-technischen Assistenten, Schwerin
- 2008 – 2009 PTA-Praktikum und Abschluss des zweiten Teils der PTA-Prüfung
- 2009 – 2013 Studium der Pharmazie an der Ernst-Moritz-Arndt-Universität (EMAU) Greifswald, 1. und 2. Staatsexamen
- 2013 Diplom innerhalb des Pharmazeutischen Praktikums an der EMAU, „Synthese und Charakterisierung von Tetrazolylessigsäurederivaten als Modulatoren von Histon-Demethylasen“, Betreuung Prof. Dr. Andreas Link
- 2013 – 2014 Pharmazeutisches Praktikum in der Berlin Apotheke Hackescher Markt in Berlin
- 10.07.2014 3. Staatsexamen mit Erhalt der Approbation als Apotheker
- 2014 Wissenschaftlicher Mitarbeiter an der EMAU im AK „Wirkstoffsynthese“ von Prof. Dr. Andreas Link
- 2014 – 2016 Apotheker in den Quartierapotheken Berlin
- Seit Mai 2016 Promotion im Fachbereich pharmazeutische Chemie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg; Betreuung Prof. Dr. Andreas Hilgeroth
- 2018 – 2019 Wissenschaftlicher Mitarbeiter der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

BISHERIGE VERÖFFENTLICHUNGEN

- *Synthese und Charakterisierung von Tetrazolylessigsäurederivaten als Modulatoren von Histone-Demethylasen*, Diplomarbeit Nico Schade, Leitung Prof. Dr. Andreas Link.
- *Molecules*, 23 (9): 2335 (2018), *Novel Protein Kinase Inhibitors Related to Tau Pathology Modulate Tau Protein-Self Interaction Using a Luciferase Complementation Assay*, Max Holzer, Nico Schade, Ansgar Opitz, Isabell Hilbrich, Jens Stieler, Tim Vogel, Valentina Neukel, Moritz Oberstadt, Frank Totzke, Christoph Schächtele, Wolfgang Sippel und Andreas Hilgeroth, doi: 10.3390/molecules23092335

