

ENTWICKLUNG UND CHARAKTERISIERUNG NEUARTIGER

1-AZA-9-OXAFLUORENE ALS INHIBITOREN

CYCLIN-ABHÄNGIGER KINASEN UND GSK-3 β

DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt der

Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät
(mathematisch-naturwissenschaftlicher Bereich)
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Herrn Burkhardt Voigt

geb. am 24.05.1977 in Halle/Saale

Gutachter:

1. PD Dr. rer. nat. habil. Andreas Hilgeroth
2. Prof. Dr. rer. nat. habil. Andreas Langner
3. Dr. rer. nat. habil. Max Holzer

Verteidigungsdatum: 13.03.2007

urn:nbn:de:gbv:3-000011939

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000011939>]

Inhaltsverzeichnis

	Inhaltsverzeichnis.....	I
	Abkürzungsverzeichnis.....	V
	Abbildungsverzeichnis.....	VII
	Tabellenverzeichnis.....	IX
1	Einleitung.....	1
2	Grundlagen.....	3
2.1	Cyclin-abhängige Kinasen.....	3
2.1.1	CDKs im Zellzyklus.....	4
2.1.1.1	Deregulation der CDK-Funktionen in Tumoren.....	5
2.1.1.2	CDK-Inhibitoren als Tumorthapeutika.....	6
2.1.1.3	Selektivität von CDK-Inhibitoren.....	8
2.1.2	Beteiligung der CDKs an der Alzheimer'schen Krankheit.....	9
2.1.2.1	Die Tau-Hypothese.....	10
2.1.2.2	Die Amyloid-Hypothese.....	11
2.1.2.3	CDK5 und GSK-3 als zentrale Angriffspunkte.....	11
2.1.2.4	Inhibitoren von CDK5 und GSK-3.....	12
2.2	Die Problematik der Multidrug Resistance.....	14
2.2.1	Einleitung.....	14
2.2.2	MDR-Modulatoren.....	15
3	Zielstellung der Arbeit.....	16
4	Erste 1-Aza-9-oxafluorene.....	18
4.1	Synthese der Verbindungen.....	18
4.1.1	Darstellung der <i>N</i> -Acetyl-1,4-dihydropyridine.....	19
4.1.2	Darstellung der 1-Aza-9-oxafluorene durch Zykladdition.....	20
4.1.3	Acetylierung von 57	23
4.2	Strukturabsicherung und Charakterisierung der Zwischenprodukte und Endverbindungen.....	24
4.2.1	<i>N</i> -Acetyl-1,4-dihydropyridine.....	24
4.2.2	1,4,4a,9a-Tetrahydro-1-aza-9-oxafluorene.....	27
4.2.3	1-Aza-9-oxafluorene.....	28
4.3	Versuche zur Darstellung tetrazyklischer 10-Aza-11-oxabenzob[<i>b</i>]fluorene....	30
4.3.1	Synthese der <i>N</i> -Acetyl-1,4-dihydrochinoline.....	31

4.3.2	Produkte der Umsetzung von 83a,b mit <i>p</i> -Benzochinon.....	31
4.4	Biologische Evaluierung der 1-Aza-9-oxafluorene.....	34
4.4.1	Untersuchung der zytostatischen Aktivität im NCI-Antitumor-Screen.....	34
4.4.1.1	Ergebnisse des Pre-Screenings.....	34
4.4.1.2	Ergebnisse des NCI-Antitumor-Screens.....	35
4.4.1.3	COMPARE-Analyse des mean graph.....	36
4.4.2	Untersuchung auf DNA-bindende Eigenschaften im Ethidiumbromid- Verdrängungs-Assay.....	39
4.4.3	CDK-inhibitorische Eigenschaften der 1-Aza-9-oxafluorene.....	41
4.5	Zwischenfazit.....	42
5	Strukturell variierte 1-Aza-9-oxafluorene.....	43
5.1	Synthese der Verbindungen.....	43
5.1.1	Variation des 3-Substituenten.....	43
5.1.1.1	3-Methyl-, 3,6-Dihydroxy- und 3-Alkyloxyderivate.....	44
5.1.1.1.1	Synthese der Pyridingrundkörper.....	44
5.1.1.1.2	Darstellung der 1,4-Dihydropyridine 11-14	44
5.1.1.1.3	Zykloaddition zu den 1-Aza-9-oxafluorenen 60-63	46
5.1.1.1.4	Debenzylierung von 63 zu 64	46
5.1.1.2	Versuche zur Verbesserung der Ausbeuten durch Darstellung von <i>N</i> -Phenoxycarbonyl-1,4-dihydropyridinen.....	47
5.1.1.3	Synthese der Amide 67-69	48
5.1.2	Einführung von Substituenten in den 4-Phenylring.....	49
5.2	CDK-Testung.....	51
5.2.1	Ergebnisse der Kinaseinhibitionsassays.....	51
5.2.2	Berechnung von K_i -Werten.....	54
5.2.3	DNA-Bindungsstudien.....	56
5.2.3.1	Methoden.....	56
5.2.3.1.1	UV-Photometrie.....	56
5.2.3.1.2	DNA-Schmelzkurven.....	56
5.2.3.2	Ergebnisse der Testungen.....	57
5.2.4	In-vitro Zellversuche zum P-gp-inhibitorischen Potential der 1-Aza-9-oxafluorene.....	59
5.2.4.1	Untersuchte Verbindungen.....	59
5.2.4.2	MTT-Zytotoxizitätsassay.....	59
5.2.4.3	Untersuchung der P-gp-modulierenden Eigenschaften.....	60
5.2.4.3.1	Fluoreszenz-Aufnahme-Assay.....	60

5.2.4.3.2	Ergebnisse und Diskussion.....	61
6	Zusammenfassung.....	66
7	Experimenteller Teil.....	69
7.1	Synthese und Charakterisierung der Verbindungen.....	69
7.1.1	Allgemeine Angaben.....	69
7.1.1.1	Schmelzpunktbestimmung.....	69
7.1.1.2	NMR-Spektroskopie.....	69
7.1.1.3	IR-Spektroskopie.....	69
7.1.1.4	Massenspektrometrie.....	70
7.1.1.5	Elementaranalyse.....	70
7.1.1.6	Chromatographie.....	70
7.1.1.6.1	Dünnschichtchromatographie.....	70
7.1.1.6.2	Präparative Dünnschichtchromatographie.....	70
7.1.1.6.3	Säulenchromatographie.....	70
7.1.1.7	Röntgenstrukturanalyse.....	71
7.1.1.8	Verwendete Chemikalien und Lösungsmittel.....	71
7.1.2	Beschreibung der Verbindungen.....	73
7.1.2.1	3-substituierte Pyridine.....	73
7.1.2.2	<i>N</i> -Acetyl-1,4-dihydropyridine.....	75
7.1.2.2.1	Allgemeine Synthesevorschrift.....	75
7.1.2.2.2	Charakterisierung der Verbindungen.....	76
7.1.2.3	<i>N</i> -Phenoxycarbonyl-1,4-dihydropyridine.....	88
7.1.2.3.1	Allgemeine Synthesevorschrift.....	88
7.1.2.3.2	Charakterisierung der Verbindungen.....	88
7.1.2.4	3,4-disubstituierte Pyridine.....	98
7.1.2.4.1	Allgemeine Synthesevorschrift.....	98
7.1.2.4.2	Charakterisierung der Verbindungen.....	98
7.1.2.5	1-Aza-9-oxafluorene.....	106
7.1.2.5.1	Allgemeine Synthesevorschrift.....	106
7.1.2.5.2	Charakterisierung der Verbindungen.....	107
7.1.2.6	<i>N</i> -Acetyl-1,4,4a,9a-tetrahydro-1-aza-9-oxafluorene.....	123
7.1.2.6.1	Allgemeine Synthesevorschrift.....	123
7.1.2.6.2	Charakterisierung der Verbindungen.....	124
7.1.2.7	Substituierte Chinoline.....	127
7.1.2.7.1	1-Acetyl-1,4-dihydrochinoline.....	127

7.1.2.7.2	Produkte der Umsetzung von 83a,b mit <i>p</i> -Benzochinon.....	128
7.1.2.8	Dibenzo[d,d']benzo[1,2-b;4,5-b']difuran-2,8-diol (91).....	132
7.2	DNA-Bindungsstudien.....	133
7.2.1	Verwendete Materialien.....	133
7.2.2	Geräte.....	133
7.2.3	Ethidiumbromid-Verdrängungs-Assay.....	133
7.2.4	UV-Photometrie.....	134
7.2.5	DNA-Schmelzkurven.....	134
7.3	Untersuchung der P-gp modulierenden Eigenschaften der synthetisierten Substanzen an Mouse-T-Lymphoma-Zellen.....	135
7.3.1	Verwendete Materialien.....	135
7.3.2	Verwendete Geräte.....	135
7.3.3	Herstellung von Stammlösungen.....	136
7.3.4	Verwendete Zelllinien.....	136
7.3.5	Bestimmung der Zellzahl.....	137
7.3.6	MTT-Zytotoxizitätstest.....	137
7.3.7	Fluoreszenz-Aufnahme-Assay.....	138
7.4	Kinase-Assays.....	139
7.4.1	Kinase-Assay des CNRS.....	139
7.4.2	³³ Panquinase®-Assay der ProQuinase GmbH.....	140
	Literaturverzeichnis	142

Anhang

Abkürzungsverzeichnis

A β	β -Amyloid-Protein
ABC	ATP-binding-cassette
Ac	Acetyl-
APP	Amyloid precursor protein
ATP	Adenosintriphosphat
Bn	Benzyl-
CAK	CDK-aktivierende Kinase (entspricht CDK7)
cdc	cell division cycle
CDK	Cyclin dependant kinase
CKI	Cyclin dependant kinase inhibitor
CNRS	Centre National de la Recherche Scientifique
COMPARE	Computerized Pattern Recognition Algorithm
COSY	Korrelationsspektroskopie (correlation spectroscopy)
d	Dublett (NMR)
DC	Dünnschichtchromatographie
dd	Doppeldublett (NMR)
DMF	Dimethylformamid
DMS	Dimethylsulfid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (desoxyribonucleic acid)
DTT	Dithiothreitol
EA	Elementaranalyse
EGTA	Ethylenglykolbis(2-aminoethylether)tetraessigsäure
EI	Electron ionisation
ESI	Elektrospray ionisation
Et	Ethyl-
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorter
FAR	Fluorescence activity ratio
FSC	Vorwärtsstreulicht (forward scattered light)
GI ₅₀	Halbmaximale Hemmkonzentration des Wachstums
GSK-3 β	Glykogensynthasekinase-3 β
GST	Glutathion-S-transferase
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonsäure
IR	Infrarot

i. v.	in vacuo
log	Dekadischer Logarithmus
J	Kopplungskonstante (NMR)
LC ₅₀	Halbmaximale Konzentration der Zytotoxizität
m	Multiplett (NMR), medium (IR)
m/z	Massezahl pro Ladung
MA	Morbus Alzheimer
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MDR	Multidrug resistance
MOPS	3-(<i>N</i> -Morpholino)-propansulfonsäure
MRP	Multidrug-resistance-associated protein
MS	Massenspektrometrie
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
NCI	National Cancer Institute, Bethesda, USA
NFTs	Neurofibrillary tangles
NMR	Kernmagnetresonanz (nuclear magnetic resonance)
P-gp	P-Glykoprotein
PBS	Phosphate buffered saline
PCC	Pearson-Korrelationskoeffizient (Pearson Correlation Coefficient)
Ph	Phenyl-
pRb	Retinoblastoma protein
PSC	Präparative Schichtchromatographie
q	Quartett (NMR)
RNA	Ribonukleinsäure (ribonucleic acid)
RT	Raumtemperatur
s	Singulett (NMR), strong (IR)
SDS	Sodium-dodecylsulfate
SSC	Seitwärtsstreulicht (side scattered light)
t	Triplett (NMR)
TGI	Substanzkonzentration für totale Wachstumshemmung
THF	Tetrahydrofuran
TMS	Tetramethylsilan
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
UV	Ultraviolett

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	CDKs und Cycline als zentrale Steuerelemente des Zellzyklus.....	1
Abbildung 2:	Potentielle Anwendungsgebiete von CDK-Inhibitoren.....	2
Abbildung 3:	Der eukaryotische Teilungszyklus und die an ihm beteiligten CDK/Cyclin-Komplexe.....	5
Abbildung 4:	Häufige Mutationen von G1/S-Regulatoren in Tumoren.....	6
Abbildung 5:	CDK-Inhibitoren in klinischer Testung.....	7
Abbildung 6:	Die histopathologischen Merkmale der Alzheimer'schen Krankheit.....	10
Abbildung 7:	CDK-Inhibitoren mit CDK5/GSK-3-hemmender Wirkung.....	12
Abbildung 8:	GSK-3-selektive Inhibitoren.....	13
Abbildung 9:	Synthese von 1,4,4a,9a-Tetrahydro-1-aza-9-oxafluorenen durch Zykloaddition.....	16
Abbildung 10:	1-Aza-9-oxafluorene als Sauerstoffanaloge zytostatisch aktiver α -Carboline.....	16
Abbildung 11:	Inaktivierung des 6-Hydroxy-1-azacarbazols durch Dimerisierung.....	17
Abbildung 12:	Darstellung der planar-aromatischen 1-Aza-9-oxafluorene durch Zykloaddition.....	18
Abbildung 13:	Darstellung der 3,4-disubstituierten <i>N</i> -Acetyl-1,4-dihydropyridine 6-9	19
Abbildung 14:	Addition von Grignardreagenzien an den aktivierten Pyridiniumring.....	19
Abbildung 15:	Umsetzungen von 6-9	21
Abbildung 16:	Bildung von Indolen durch <i>Nenitzescu</i> -Reaktion.....	21
Abbildung 17:	Radikalischer Mechanismus der Scandium-katalysierten Zykloaddition von 1-Benzyl-4- <i>tert</i> -butyl-1,4-dihydrornikotinamid an <i>p</i> -Benzochinon....	22
Abbildung 18:	Acetylierung von 57	23
Abbildung 19:	Rotameren der <i>N</i> -Acetyl-1,4-dihydropyridine.....	24
Abbildung 20:	¹ H-NMR-Spektrum von 8 in CDCl ₃	25
Abbildung 21:	Enantiomere der 1,4-Dihydropyridine 6-9	26
Abbildung 22:	Bildung unsymmetrischer und C ₂ -symmetrischer Tetrakishomocubane durch Photodimerisierung unsymmetrisch substituierter 4-Aryl- 1,4-dihydropyridine.....	26
Abbildung 23:	Röntgenstruktur von 8	27
Abbildung 24:	Kopplungskonstanten im Ringsystem der Tetrahydrofluorene.....	28
Abbildung 25.:	Ringstrommodell am Aromaten.....	29
Abbildung 26:	Energieminimiertes Modell von 8	29
Abbildung 27:	Vergleich der Zielstrukturen 91a,b mit Ellipticin und dem Azacarbazolderivat IV	30

Abbildung 28: Geplante Darstellung der 10-Aza-11-oxabenzob[b]fluorene 91a,b ausgehend von Chinolin.....	30
Abbildung 29: Produkte der Umsetzung von 83a,b mit <i>p</i> -Benzochinon.....	32
Abbildung 30: GI ₅₀ -mean-graphs der Verbindungen 57 und 58	36
Abbildung 31: Verbindungen mit den höchsten PCC-Werten in der COMPARE-Analyse der „ <i>synthetics database</i> “.....	38
Abbildung 32: Strukturen der im Ethidiumbromid-Verdrängungs-Assay verwendeten DNA-Interkalatoren.....	39
Abbildung 33: Ergebnisse des Ethidiumbromid-Verdrängungs-Assays.....	40
Abbildung 34: Alkylierung von 3-Hydroxypyridin.....	44
Abbildung 35: ¹ H-NMR-Spektrum von 14 in CDCl ₃	45
Abbildung 36: Debenzylierung von 63	46
Abbildung 37: Polymerisierung von <i>p</i> -Benzochinon in Dioxan mit HClO ₄	48
Abbildung 38: Darstellung der Amide 67-69 aus 57	48
Abbildung 39: <i>Lineweaver-Burk</i> -Plot der Kinetikdaten von GSK-3β mit 5 verschiedenen Konzentrationen von 63 als Inhibitor.....	55
Abbildung 40: UV-Absorptionen von 60 und 62 bei steigender DNA-Konzentration.....	57
Abbildung 41: DNA-Schmelzkurven von DNA nach Zugabe von DMF, 60 , 62 und Ellipticin; erste Ableitung der Kurven.....	58
Abbildung 42: Metabolisierung von MTT zu Formazan durch mitochondriale Dehydrogenasen.....	59
Abbildung 43: FACS-Analyse von 63 bei 1, 2, 5 und 10 μM.....	65

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: CDKs und ihre regulatorischen Untereinheiten und Funktionen (soweit bekannt).....	3
Tabelle 2: Substitutionsmuster der in 4.1 dargestellten Verbindungen.....	18
Tabelle 3: chemische Verschiebungen δ [ppm] von H-2 und H-6 in den Rotameren von 6-9	25
Tabelle 4: Vergleich der chemischen Verschiebungen δ [ppm] von H-2, H-7 und H-8 der Tetrahydrofluorene 79-82 und der korrespondierenden Fluorene 55-58 . ..	28
Tabelle 5: Wachstum der Zelllinien nach 48 h Inkubation mit den Testverbindungen....	34
Tabelle 6: log GI ₅₀ -Werte der sensitivsten Zelllinien.....	35
Tabelle 7: Ergebnisse der COMPARE-Analyse.....	37
Tabelle 8: CDK-inhibitorische Eigenschaften der 1-Aza-9-oxafluorene, IC ₅₀ [μ M].....	41
Tabelle 9: Substitutionsmuster der in 5.1.1 dargestellten Verbindungen.....	43
Tabelle 10: Substitutionsmuster der in 5.1.2 dargestellten Verbindungen.....	49
Tabelle 11: CDK-inhibitorische Eigenschaften der 1-Aza-9-oxafluorene, IC ₅₀ [μ M].....	51
Tabelle 12: IC ₅₀ -Werte [μ M] der CDK-Inhibition der im ³³ PanQuinase®-Assay untersuchten 1-Aza-9-oxafluorene [μ M] (c _{ATP} = 1 μ M).....	53
Tabelle 13: K _i -Werte der im ³³ PanQuinase®-Assay untersuchten 1-Aza-9-oxafluorene [μ M].....	55
Tabelle 14: UV-Maxima und T _m der in 5.2.3 untersuchten Verbindungen.....	58
Tabelle 15: Im MTT-Test ermittelte IC ₅₀ -Werte für die L5178YvMDR-Zelllinie.....	60
Tabelle 16: Ergebnisse der FACS-Untersuchungen der 3-Alkylester im Vergleich.....	62
Tabelle 17: Ergebnisse der FACS-Untersuchungen der 3-Alkyloxyverbindungen.....	62
Tabelle 18: FAR-Werte der weiteren Verbindungen.....	63

1 Einleitung

Aufbauend auf den Arbeiten von *L. Hartwell*, *P. Nurse* und *T. Hunt*, die im Jahre 2001 wegen der Tragweite ihrer Entdeckung den Medizinnobelpreis erhielten, wurde mit den Cyclin-abhängigen Kinasen (CDKs) eine Gruppe von Proteinkinasen entdeckt, die aufgrund ihrer maßgeblichen Beteiligung an einer großen Anzahl physiologischer und pathophysiologischer Prozesse vielversprechende pharmakologische Zielstrukturen darstellen¹. Den Ausgangspunkt des Interesses an den CDKs bildete deren zentrale Rolle im Teilungszyklus eukaryotischer Zellen. *L. Hartwell* identifizierte etwa 80 *cdc*-Gene, die an der Regulation des Zellzyklus der von ihm untersuchten Hefearten beteiligt sind. *P. Nurse* zeigte, dass *cdc2* eine Schlüsselrolle beim Übergang von der G₂-Phase zur Mitose einnimmt. Er identifizierte das von *cdc2* kodierte p34 als das entscheidende Kontrollprotein im Zellzyklus der Spalthefe. Das dem *cdc2* entsprechende Gen beim Menschen erhielt später wegen der von ihm exprimierten Cyclin-abhängigen Kinase den Namen *cdk1*. *T. Hunt* entdeckte schließlich die aufgrund ihrer zyklisch schwankenden Konzentrationen als Cycline bezeichneten regulatorischen Partner der Cyclin-abhängigen Kinasen¹. Inzwischen wurden zahlreiche CDKs, Cycline und homologe Proteine entdeckt, deren Funktionen nicht auf den Zellzyklus beschränkt sind.

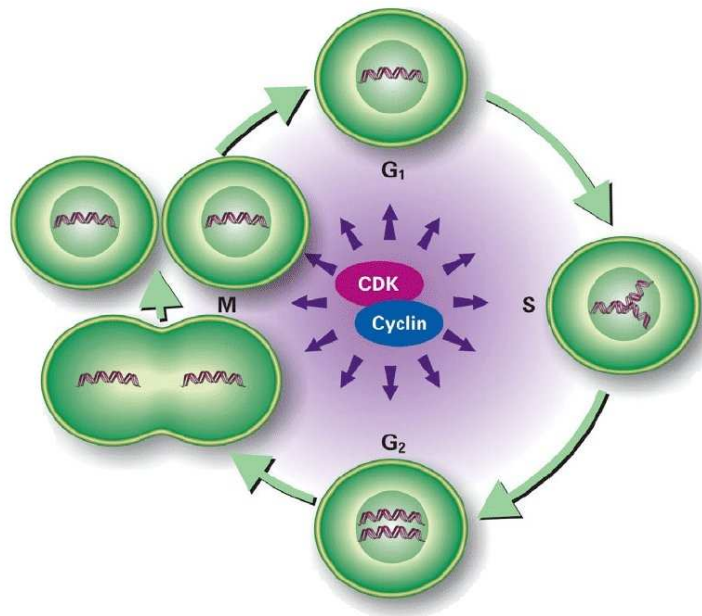


Abbildung 1: CDKs und Cycline als zentrale Steuerelemente des Zellzyklus¹.

Die Deregulation mehrerer CDKs in verschiedenen menschlichen Tumoren, unter anderem bei Brustkrebs und Gehirntumoren, war der Hauptgrund für die intensive Arbeit an der Entwicklung von CDK-Inhibitoren². Da die CDKs außerdem in den Apoptosesignalweg, neuronale Funktionen, Transkription und weitere Prozesse involviert sind, wird die Anwendbarkeit entsprechender Inhibitoren neben der Chemotherapie maligner Tumoren und verschiedener neuronaler Erkrankungen unter anderem auch für Virus- und Protozoeninfektionen diskutiert³.

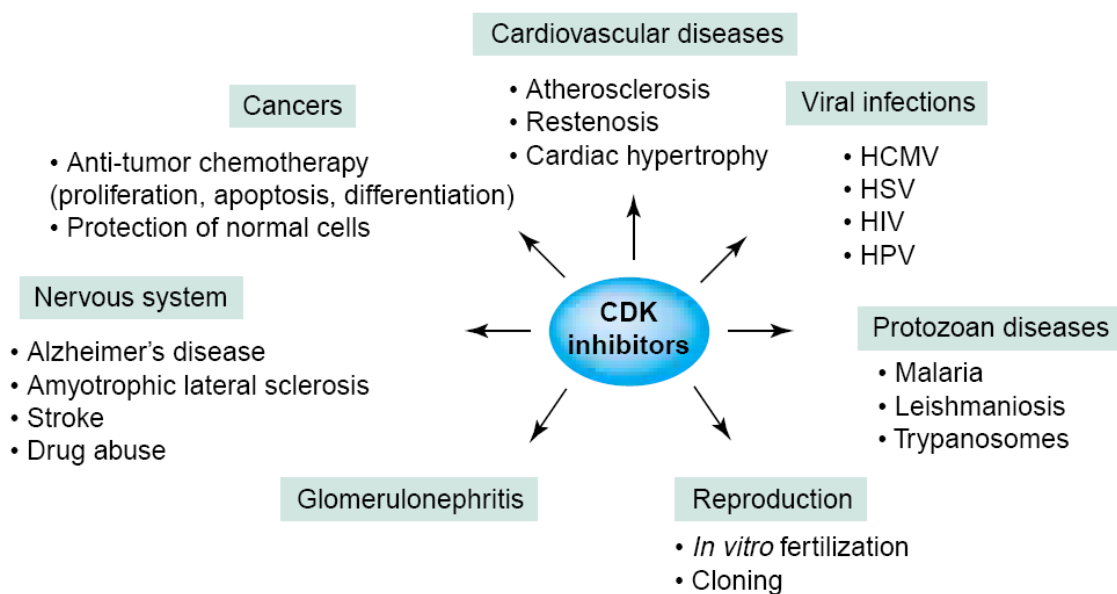


Abbildung 2: Potentielle Anwendungsgebiete von CDK-Inhibitoren³.

Inzwischen wurde eine große Anzahl synthetischer Inhibitoren der CDKs identifiziert, von denen sich einige bereits in der klinischen Testung befinden⁴. Trotz erster ermutigender Befunde stellen die mangelnde Selektivität der Verbindungen und die noch immer lückenhafte Kenntnis der Funktionen der einzelnen CDKs ein unübersehbares Problem dar. Neue Leitstrukturen, welche das Spektrum der verfügbaren CDK-Inhibitoren sowohl chemisch als auch funktionell erweitern, bieten die Möglichkeit, tiefere Einblicke in die Funktionsweise der CDKs zu erlangen und der therapeutischen Anwendbarkeit von CDK-Inhibitoren näher zu kommen.

2 Grundlagen

2.1 Cyclin-abhängige Kinasen

Die Cyclin-abhängigen Kinasen sind Serin/Threonin-Kinasen, die ihren Namen wegen der zur Erlangung ihrer enzymatischen Aktivität erforderlichen Bindung eines Cyclins als regulatorische Untereinheit erhielten. Durch die Bildung des CDK/Cyclin-Komplexes werden wesentliche Änderungen in der CDK-Struktur induziert, welche die Kinase in eine aktive Konformation versetzen. Neben Cyclinen wurden auch andere Proteine wie p35 als regulatorische Untereinheiten Cyclin-abhängiger Kinasen identifiziert. *Tabelle 1* gibt einen Überblick über die CDKs, deren Funktion und regulatorische Untereinheiten bereits aufgeklärt wurden.

Insgesamt werden vom menschlichen Genom 13 CDKs und 25 Proteine mit Homologie in der Cyclin-Box, dem Sequenzabschnitt, der für die Bindung an die CDKs verantwortlich

Tabelle 1: CDKs und ihre regulatorischen Untereinheiten und Funktionen (soweit bekannt)^{3,5}

Kinase	Regulatorische Untereinheit(en)	Funktion
CDK1 (CDC2)	Cyclin A, Cyclin B	Übergang von Prophase zu Metaphase Regulation von Topoisomerase II
CDK2	Cyclin A, Cyclin E	G1/S-Übergang, Centrosomenduplikation in S- und G2-Phase, DNA-Fehler-induzierte Apoptose
CDK3	Cyclin E (vermutet)	G1/S-Übergang
CDK4	Cyclin D1, D2, D3	Wachstumsfaktor in G1-Phase Excitotoxin-induzierter Zelltod
CDK5	p35, p39, p25, p29	u. a. Neuritenwachstum, Neuronenmigration und Apoptose
CDK6	Cyclin D1, D2, D3	Wachstumsfaktor in G1-Phase Induktion von Apoptose in Nervenzellen
CDK7 (CAK)	Cyclin H	Transkriptionsfaktor, Aktivierung von CDK1, 2, 4 und 6
CDK8	Cyclin C	Transkriptionsfaktor, Regulation von CDK7/Cyclin H
CDK9	Cyclin T1, T2a, T2b, Cyclin K	Transkriptionsfaktor
CDK11	Cyclin L1/2 α	Transkriptionsfaktor, RNA-Splicing, Apoptose

ist, kodiert⁶. Die regulatorischen Partner einiger CDKs sind bislang ebenso wie ihre physiologische Funktion noch unbekannt. Umgekehrt kennt man auch so genannte *orphan cyclins* wie Cyclin F, G, I, M, O und P, deren Funktionen bislang nicht aufgeklärt werden konnten³.

Die an der Regulation des Zellzyklus beteiligten CDKs sind CDK1, 2, 3, 4 und 6 im Zusammenspiel mit den Cyclinen A, B, und E^{7,8,9}. CDK7/Cyclin H, CDK8/Cyclin C, CDK9/Cyclin T und CDK11/Cyclin L sind als Transkriptionsfaktoren für die Vervielfältigung der Nukleinsäuren von Bedeutung⁵. CDK5, die von p35, p39 und deren Spaltprodukten p25 und p29 aktiviert wird, kommen Funktionen im Nervensystem, unter anderem bei der Kontrolle des Neuritenwachstums, zu. Außerdem wurde eine Beteiligung am Apoptosesignalweg für die CDKs 1, 4, 5, 6 und 11 nachgewiesen⁶.

2.1.1 CDKs im Zellzyklus

Der Teilungszyklus eukaryotischer Zellen, in dessen Verlauf die Zelle wächst, ihr Erbgut verdoppelt und schließlich auf zwei Tochterzellen verteilt, ist einer der zentralen Vorgänge in der Biologie. Er lässt sich in die vier Phasen G1, S, G2 und M einteilen, deren geregeltes Durchlaufen durch strenge Kontrollmechanismen an so genannten *checkpoints* gewährleistet wird, für deren Überschreiten im Wesentlichen die CDKs verantwortlich sind⁹. In jeder Phase des Zellzyklus werden nur bestimmte, charakteristische Cycline exprimiert, wohingegen die Konzentration der CDKs während des gesamten Teilungszyklus aufgrund ihrer gleichmäßigen Biosynthese im Wesentlichen konstant bleibt. Die CDK-Aktivität wird durch Assoziation mit den Cyclinen und spezifischen proteinogenen CDK-Inhibitoren der CIP/KIP- und INK4-Familien gesteuert. Da die Konzentration der Cycline einer strengen Kontrolle durch schnellen Ubiquitin-vermittelten proteolytischen Abbau unterliegt, sind die CDK/Cyclin-Komplexe nur in bestimmten Phasen des Zellzyklus aktiv⁶. Ihre Aktivierung bedarf außerdem einer Phosphorylierung an bestimmten Threonin-Resten durch die CDK-aktivierende Kinase CAK (CDK7). Die Bedeutung der Aktivierung von CDK7 für die Zellzykluskontrolle ist allerdings nicht geklärt. Nach bisherigen Erkenntnissen ist die CDK7-Aktivität kein limitierender Faktor im Teilungszyklus².

Als Reaktion auf mitogene Signale exprimiert eine ruhende Zelle die Cycline D1, D2 und D3, welche mit den CDKs 4 und 6 assoziieren. Hauptsubstrat der CDK/Cyclin D-Komplexe, die im Wesentlichen als Wachstumsfaktoren wirken, ist das Retinoblastoma-Protein (pRb), dessen Bindung an Transkriptionsfaktoren der E2F-Familie nach

Phosphorylierung gelöst wird². Dies resultiert in einer Aktivierung von E2F, die zur Transkription von Cyclin E und weiteren Molekülen, die für den G1/S-Übergang benötigt werden, führt⁷. Der sich durch die steigende Konzentration von Cyclin E bildende CDK2/E-Komplex phosphoryliert ebenfalls pRb, was in einer noch stärkeren Aktivierung von E2F resultiert, wodurch die Transkription von Cyclin E weiter gesteigert wird. Aufgrund dieser positiven Rückkopplung überschreitet die Zelle den so genannten Restriktionspunkt und gelangt aus der durch Cyclin D gesteuerten wachstumsfaktorabhängigen G1-Phase in die durch Cyclin E initiierte wachstumsfaktorunabhängige S-Phase.

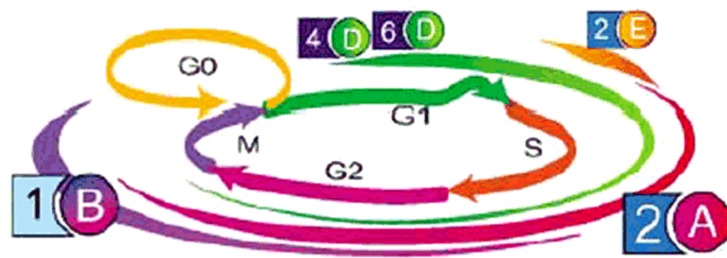


Abbildung 3: Der eukaryotische Teilungszyklus und die an ihm beteiligten CDK/Cyclin-Komplexe. Die Dicke der Balken symbolisiert die jeweilige Konzentration der Cycline während der Zyklusphasen⁶.

Der Beginn der S-Phase ist vom Beginn der DNA-Synthese, einem schnellen Absinken der Cyclin E-Konzentration durch proteolytischen Abbau sowie der Aktivierung von CDK2 durch Cyclin A gekennzeichnet. Der CDK2/A-Komplex inhibiert E2F und phosphoryliert nun aufgrund seiner veränderten Substratspezifität verschiedene Proteine, die an der Regulation der DNA-Synthese beteiligt sind, wodurch eine Rereplikation der DNA verhindert wird. Während der späten S-Phase und der G2-Phase wird nach einem Anstieg der Cyclin B-Konzentration der CDK1/B-Komplex gebildet, dessen Aktivierung in der G2-Phase durch Mitglieder der cdc25-Phosphatasen erfolgt. CDK1/B phosphoryliert daraufhin zahlreiche regulatorische Proteine und gewährleistet so eine globale Inhibierung der Proteinbiosynthese und der DNA-Replikation und -Transkription. Außerdem werden durch Phosphorylierung Strukturproteine aktiviert, welche für die später stattfindende Mitosephase nötig sind⁶.

2.1.1.1 Deregulation der CDK-Funktionen in Tumoren

Die meisten Tumore weisen in mindestens einer dieser zentralen Komponenten des Zellzyklus genetische Defekte auf⁷. Zu den häufigsten Fehlregulationen zählen die Inaktivierung endogener CDK-Inhibitoren der KIP- und INK4-Familien, die konstitutive

Aktivierung von CDK4, die Überexpression der Cycline D1, E und A oder der Verlust an funktionellem pRb. Durch solche Mutationen werden die Zellen von extrazellulären Wachstumssignalen unabhängig, was zu einer unkontrollierten Zellproliferation führt¹⁰.

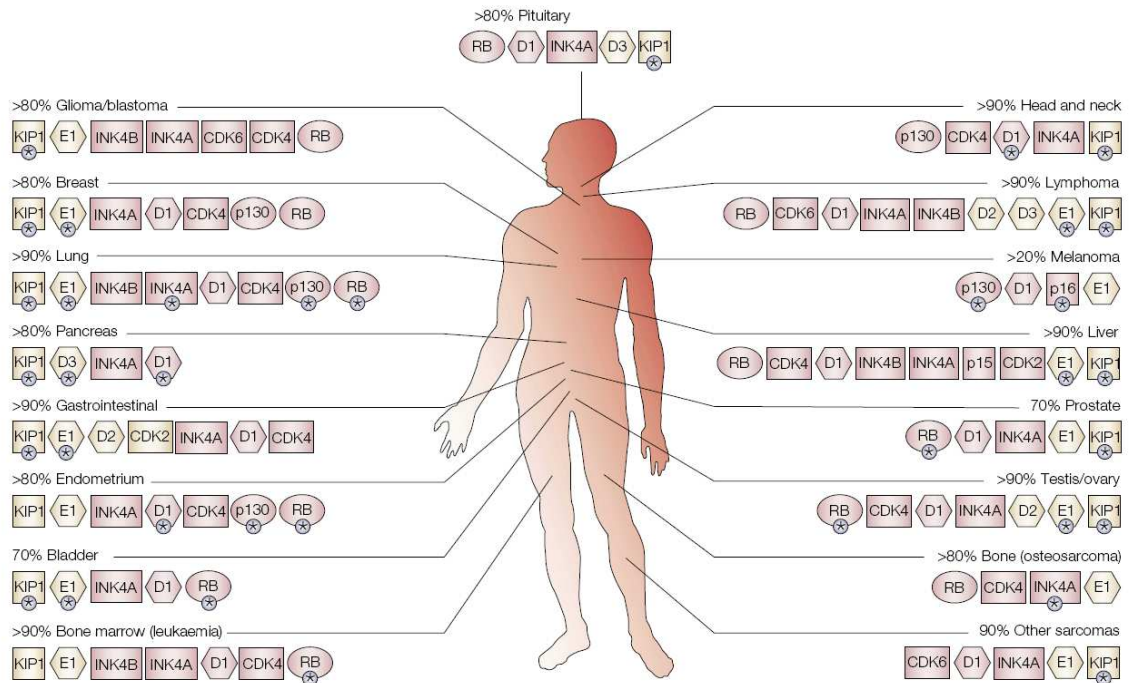


Abbildung 4: Häufige Mutationen von G1/S-Regulatoren in Tumoren⁷.

2.1.1.2 CDK-Inhibitoren als Tumorthapeutika

Die zentrale Rolle der CDKs im Zellzyklus und der potentielle Nutzen ihrer Hemmung zur Therapie maligner Tumoren stellten den Hauptgrund für die intensive Suche nach entsprechenden Inhibitoren dar. Eine große Anzahl chemisch sehr unterschiedlicher Naturstoffe und synthetischer Verbindungen wurde als CDK-Inhibitoren identifiziert (Abbildungen 5 und 7). Trotz ihrer verschiedenen Strukturen weisen diese Moleküle einige Gemeinsamkeiten auf. Sie sind flache, hydrophobe Heterozyklen mit einem geringen Molekulargewicht (unter 600), welche die enzymatische Aktivität der CDKs durch Konkurrenz mit ATP an der ATP-Bindungsregion hemmen. Die Bindung erfolgt im Wesentlichen durch hydrophobe Wechselwirkungen und 2-3 Wasserstoffbrückenbindungen mit Asp133 und Val135 des Kinasebackbones³. Die Verbindungen lassen sich nach ihrer Selektivität in unspezifische Pan-CDK-Inhibitoren, die meistens viele weitere Proteinkinasen ähnlich stark hemmen, und in Inhibitoren mit Präferenz für CDK4 und 6 bzw. CDK1, 2 und 5 einteilen. Letztere besitzen oftmals zusätzlich eine starke Affinität zu der mit den CDKs eng verwandten Glykogensynthasekinase-3 β , auf die in Kapitel 2.1.2

näher eingegangen wird.

Vier zytostatisch aktive CDK-Inhibitoren haben bereits den Weg in die klinische Testung gefunden⁴ (Abbildung 5). Wie der größte Teil der bekannten CDK-Hemmer weisen auch diese Verbindungen nur eine geringe Selektivität auf. UCN-01 gehört zu den unspezifischen Kinase-Inhibitoren aus der Klasse der Staurosporine und hemmt neben den CDKs eine Reihe weiterer Serin/Threonin- und Tyrosin-Kinasen bereits in nanomolekularen Konzentrationen. CYC-202 inhibiert neben CDK1 und CDK2 in ähnlicher Potenz auch CDK5, 7 und 9. Flavopiridol hemmt hauptsächlich die CDKs 1, 4 und 9 im submikromolekularen Bereich und in etwas schwächerer Potenz auch CDK2 und 7. BMS-387032 ist mit einer zehnfach stärkeren Wirkung auf CDK2 gegenüber CDK1 und CDK4 der wohl selektivste CDK2-Inhibitor der genannten vier Verbindungen. Jedoch weist auch diese Substanz eine zytostatische Aktivität gegen ein sehr breites Spektrum nicht nur CDK2-sensitiver Krebszellen auf, was auf weitere Wirkungen neben der Inhibition von CDK2 hinweist¹¹.

Die Erfahrungen mit Inhibitoren der am Zellzyklus beteiligten CDKs zeigen, dass diese

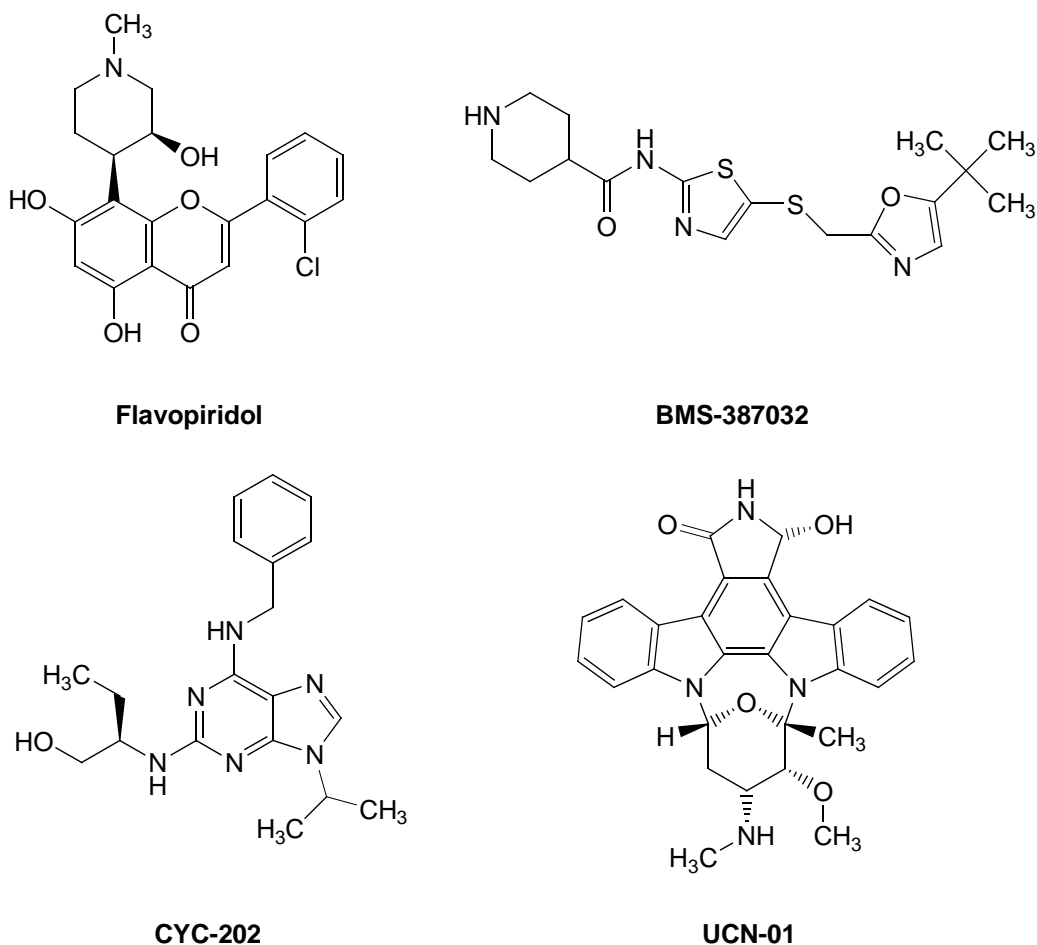


Abbildung 5: CDK-Inhibitoren in klinischer Testung⁴.

Wirkstoffe sich teilende Zellen in der G1-Phase oder am G2/M-Übergang arretieren. Unter bestimmten Umständen nehmen sie außerdem Einfluss auf die Zelldifferenzierung. Weiterhin können CDK-Inhibitoren in sich stark teilenden Zellen Apoptose auslösen, ruhende Zellen hingegen vor durch zytotoxische Stoffe induzierter Apoptose schützen^{12,7}. Dies eröffnet die Möglichkeit einer Kombination von CDK-Inhibitoren mit anderen Chemotherapeutika, um normale Zellen vor von der Therapie verursachten Schäden zu bewahren. Beispielsweise arretiert Staurosporin normale Zellen in der G1-Phase, während Tumorzellen ohne G1-*Checkpoint*-Kontrolle nicht beeinflusst und daher bevorzugt von Doxorubicin oder Camptothecin abgetötet werden¹³. Außerdem scheinen CDK-Inhibitoren eine durch Chemotherapie bedingte Alopezie zu verhindern¹⁴.

2.1.1.3 Selektivität von CDK-Inhibitoren

Mangels wirklich monoselektiver Verbindungen ist nicht genau auszumachen, welche der beschriebenen Einzelwirkungen der Inhibitoren zu den in den klinischen Studien beobachteten Effekten führen. Die nachgewiesene Antitumorwirkung vieler CDK-Inhibitoren rührt wahrscheinlich von der Beeinflussung mehrerer zellulärer Targets her. Für Flavopiridol wird beispielsweise angenommen, dass die beobachtete Arretierung sich teilender Zellen in der G1- und G2/M-Phase mit der nachgewiesenen Inhibition von CDK1 und CDK2 zu begründen ist. Zusätzlich hemmt Flavopiridol aber die Aktivierung weiterer CDKs durch Inhibierung des CDK7/H-Komplexes und unterdrückt die Expression von Cyclin D1, was ebenfalls Auswirkungen auf den Zellzyklus hat. Flavopiridol besitzt außerdem antivirale Eigenschaften, die auf eine Hemmung von CDK9 als Transkriptionsfaktor zurückgeführt werden. Darüber hinaus wird vermutet, dass noch weitere Mechanismen zu seiner Aktivität beitragen, da die zytotoxischen Eigenschaften von Flavopiridol nicht auf proliferierende Zellen beschränkt sind⁶.

Es stellt sich somit die Frage, welche CDK das beste Target bei der Entwicklung von Inhibitoren darstellt. Die Hemmung der den Restriktionspunkt kontrollierenden CDK2 galt längere Zeit als Königsweg, um potente und selektive antiproliferative Wirkung gegen transformierte Zellen zu erzielen⁴. Neuere Veröffentlichungen zeigen allerdings anhand von Zell- und Tierversuchen mit verschiedenen Gen-*Knockouts*, dass CDK2, 4 und 6, die bisher als essentiell für das Fortschreiten des Zellzyklus galten, in ihrer Funktion untereinander und möglicherweise auch durch CDK1 und CDK3 ersetzt werden können^{9,15}. Diese Befunde sind nicht notwendigerweise auf die Wirkung von CDK-Inhibitoren übertragbar, denn im Gegensatz zur ausgeschalteten Expression einer CDK kann eine

inaktivierte Kinase auch ohne ihre enzymatische Funktion weiterhin Komplexe mit anderen Proteinen bilden und regulatorisch wirken⁴.

Zur Aufklärung sind daher möglichst selektive Inhibitoren einzelner CDKs nötig. Wirkliche Selektivität ist wegen der Ähnlichkeit der ATP-Bindungstaschen allerdings schwer zu erreichen. Die gezielte Entwicklung selektiver Verbindungen wird zusätzlich durch das Fehlen von Kristallstrukturen der meisten CDKs erschwert. Zwischen den Kinasen besteht zwar eine hohe Sequenzhomologie, was vermuten lässt, dass die 3D-Strukturen sehr ähnlich sind, bisher konnten allerdings nur CDK2, CDK5 und CDK6 mit verschiedenen Cyclinen und Inhibitoren kokristallisiert werden³.

Für den therapeutischen Einsatz sind hingegen monoselektive Inhibitoren möglicherweise nicht wünschenswert, da aufgrund der Austauschbarkeit der Funktionen einiger CDKs nur durch die selektive Inhibition mehrerer Kinasen eine effektive Blockade des Zellzyklus erreicht werden kann. Nach wie vor ist es daher nötig, das Spektrum der CDK-Inhibitoren verschiedener Selektivität beständig zu erweitern, um weitere Aufschlüsse über die Auswirkungen der Hemmung einzelner und bestimmter Kombinationen der am Zellzyklus beteiligten CDKs zu erhalten.

2.1.2 Beteiligung der CDKs an der Alzheimer'schen Krankheit

Wie eingangs erwähnt sind die Cyclin-abhängigen Kinasen neben der Steuerung des Zellzyklus an weiteren physiologischen Prozessen zentral beteiligt, weshalb der Einsatz entsprechender Inhibitoren für weitere Indikationen neben der Tumorthherapie diskutiert wird (*Abbildung 2*). Aufgrund der steigenden epidemiologischen Bedeutung ist eine mögliche Anwendung von CDK-Inhibitoren zur Behandlung der neurodegenerativen Prozesse, welche zum Krankheitsbild der Alzheimer'schen Krankheit (*morbus alzheimer*, MA) führen, von besonderem Interesse. Der Krankheitsverlauf von MA ist durch einen schleichenden Verlust der kognitiven Funktionen gekennzeichnet, kann aber üblicherweise erst post mortem anhand typischer histopathologischer Merkmale sicher von anderen Formen der Demenz unterschieden werden¹⁶. Dies sind eine massive Atrophie der Hirnrinde, bedingt durch den Untergang von Nervenzellen, sowie typische Proteinablagerungen in Form intrazellulärer neurofibrillärer Bündel (*neurofibrillary tangles*, NFTs) aus Tau-Protein und extrazellulärer Amyloid-Plaques auf der gesamten Hirnrinde und in den Zerebralgefäßen von Alzheimerpatienten (*Abbildung 6*).

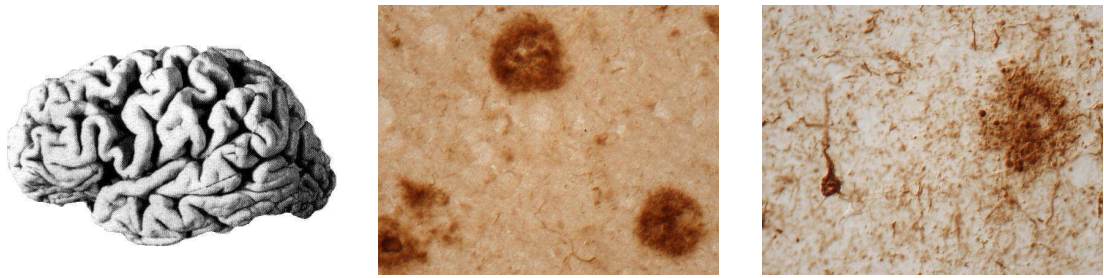


Abbildung 6: Die histopathologischen Merkmale der Alzheimer'schen Krankheit: Atrophie der Hirnrinde, senile Plaques und neurofibrilläre Tau-Ablagerungen (von links nach rechts).

Das Interesse an der Verwendung von CDK-Inhibitoren zur Eindämmung dieser pathologischen Prozesse wurde aus zwei Gründen geweckt. Zum einen ist CDK5 an der Ablagerung von Tau und der Bildung der Amyloid-Plaques beteiligt, zum anderen hemmen viele CDK-Inhibitoren zusätzlich die drei bekannten Isoformen der mit den CDKs verwandten¹⁷ Glykogensynthasekinase-3 (GSK-3 α , GSK-3 β und deren Splicing-Variante GSK-3 β 2), die ebenfalls zentral an den neurodegenerativen Prozessen von MA beteiligt sind.

2.1.2.1 Die Tau-Hypothese

Die NFTs, die innerhalb der Nervenzellen von Alzheimerpatienten gefunden werden, bestehen aus Tau, einem Protein des Zytoskeletts, dessen Funktion in der Steuerung der Aggregation und Desaggregation der Mikrotubuli besteht. Seine Aktivität wird über ein kompliziertes Gleichgewicht von Phosphorylierung und Dephosphorylierung an über 20 Positionen^{3,18} durch verschiedene Kinasen, hauptsächlich CDK5, GSK-3 β und MAP-Kinasen, kontrolliert¹⁶.

Die physiologischen Funktionen der im Nervensystem stark exprimierten CDK5 und seiner regulatorischen Untereinheit p35 bestehen unter anderem in der Steuerung von Wachstum und Differenzierung der Neuriten^{3,19}. In verschiedenen Untersuchungen wurde gezeigt, dass durch neurotoxische Einflüsse eine Spaltung von p35 zum verkürzten p25 ausgelöst wird, welches im Gegensatz zu p35 einem sehr langsamen Abbau unterliegt und daher in den betroffenen Geweben akkumuliert. CDK5 wird durch Bindung von p25 konstitutiv aktiviert, innerhalb der Zellen delokalisiert und erhält eine veränderte Substratspezifität^{19,20}. Der so hyperaktivierte CDK5/p25-Komplex führte in Zellversuchen zu Neurodegeneration, erhöhter Apoptoserate und zum Kollaps des Zytoskeletts durch die Hyperphosphorylierung von Tau und anderen Proteinen des Spindelapparates. Man geht davon aus, dass diese Hyperphosphorylierung der Grund für die Tau-Aggregation zu helikalen Filamenten ist,

welche die für MA typischen neurofibrillären Ablagerungen bilden²¹. Da die Dichte der NFTs mit dem Ausmaß der Demenz korreliert¹⁶, wird die Hemmung der an der Hyperphosphorylierung von Tau beteiligten Kinasen CDK5 und GSK-3 β als möglicher therapeutischer Angriffspunkt zur Behandlung von MA betrachtet.

2.1.2.2 Die Amyloid-Hypothese

GSK-3 ist zusätzlich an der massiven Ablagerung von Amyloid- β (A β) in Form der senilen Plaques auf der Hirnrinde beteiligt. Die Amyloid-Peptide werden aus dem Amyloid-Precursor-Protein (APP), einem membranständigen Glykoprotein, gebildet. A β ist das Ergebnis einer zweistufigen Spaltung von APP zunächst durch β -Sekretase in der extrazellulären Domäne, dann durch γ -Sekretase im transmembranären Teil. Die so entstehenden Peptide haben eine Länge von 39-43 Aminosäuren. Die toxische Spezies ist A β 42, welches sehr stark zur Aggregation neigt und den Hauptbestandteil der Amyloid-Plaques bildet¹⁶. GSK-3 wirkt auf mehreren Wegen förderlich auf die Bildung von A β . Man nimmt an, dass GSK-3 α durch Phosphorylierung von APP dessen Abbau zu A β steigert^{22,23}. Eine Hyperphosphorylierung von A β durch CDK5/p25 und GSK-3 β führt wiederum zu dessen vermehrter Aggregation. Auslöser der neurotoxischen Kaskade, die zum massiven Untergang der Nervenzellen führt, sind nicht die unlöslichen Plaques, sondern aus diesen gebildete lösliche A β -Oligomere¹⁶. Die Mechanismen der Neurotoxizität sind nicht sicher geklärt, allerdings induziert A β unter anderem DNA-Schäden und Apoptose in kultivierten Nervenzellen²⁴ sowie die Bildung von p25, welches wiederum durch die Hyperaktivierung von CDK5 zu vermehrter Tau-Aggregation führt¹⁹.

2.1.2.3 CDK5 und GSK-3 als zentrale Angriffspunkte

Nach wie vor existiert keine effektive Alzheimertherapie, da die ursächlichen Zusammenhänge der beobachteten pathologischen Prozesse nicht geklärt sind. Aktuelle Therapieformen versuchen, den allgemeinen Symptomen des dementiellen Syndroms durch Steigerung der Acetylcholin-vermittelten Neurotransmission zu begegnen. Zwar werden insbesondere mit Acetylcholinesterasehemmern Erfolge erzielt, jedoch setzt diese Therapie zu spät ein, da Symptome der Demenz erst auftreten, wenn ein Großteil der betreffenden Neurone bereits zerstört ist. Ein Fortschreiten der Erkrankung kann auf diesem Wege prinzipbedingt nicht verhindert werden. Wesentliche Bedeutung für die Behandlung von MA besitzen somit verbesserte Methoden zu Frühdiagnose und Substanzen, welche das Fortschreiten der Grunderkrankung verzögern²⁵. Neue, in der

Entwicklung befindliche Verbindungen sollen daher die A β -Belastung durch Sekretase-Inhibition oder Verhinderung der Aggregation von Tau und A β senken¹⁶. Erste Versuche, einen A β -Antikörper einzusetzen, scheiterten an schweren Komplikationen, die zum Abbruch der Studien zwangen²⁶.

Die zentrale Beteiligung von CDK5 und GSK-3 an der Bildung der für MA typischen Proteinablagerungen bietet möglicherweise einen sehr effektiven Angriffspunkt für eine Therapie der Alzheimer'schen Krankheit, da durch Hemmung der abnormal gesteigerten Aktivität dieser Kinasen mehrere der pathologischen Kreisläufe unterbrochen werden könnten. In Modellen nachgewiesene Effekte der Inhibition von CDK5 und GSK-3 sind eine Verringerung der Apoptoserate, der Aggregation von Tau und der Produktion von A β ¹⁷.

2.1.2.4 Inhibitoren von CDK5 und GSK-3

Viele CDK-Inhibitoren sind potente Hemmer der GSK-3. Dies ist nicht überraschend, da sich die ATP-Bindungstasche der GSK-3-Isoformen nur wenig von jener der CDK-Familie unterscheidet. Da die ATP-Bindungsstellen von GSK-3 α und GSK-3 β nahezu identisch sind, ist zu erwarten, dass die ATP-kompetitiven GSK-3-Inhibitoren keine der beiden Isoformen bevorzugt hemmen¹⁷. Tatsächlich ist die Selektivität der meisten in der Literatur beschriebenen Verbindungen nur unzureichend untersucht, da die Testung meist nur an GSK-3 β oder an einem Gemisch beider Isoformen vorgenommen wird. In den Fällen, in denen explizit sowohl gegen GSK-3 α als auch GSK-3 β getestet wurde, konnten erwartungsgemäß kaum Unterschiede festgestellt werden¹⁷.

Beispiele für die strukturelle Vielfalt potenter Inhibitoren von CDK5 und GSK-3 β mit IC₅₀-Werten im submikromolekularen Bereich sind Kenpaullon²⁷, das Indirubin-Derivat 5-Iodo-indirubin-3'-monoxim^{28,29} und der Naturstoff Hymenialdisin³⁰.

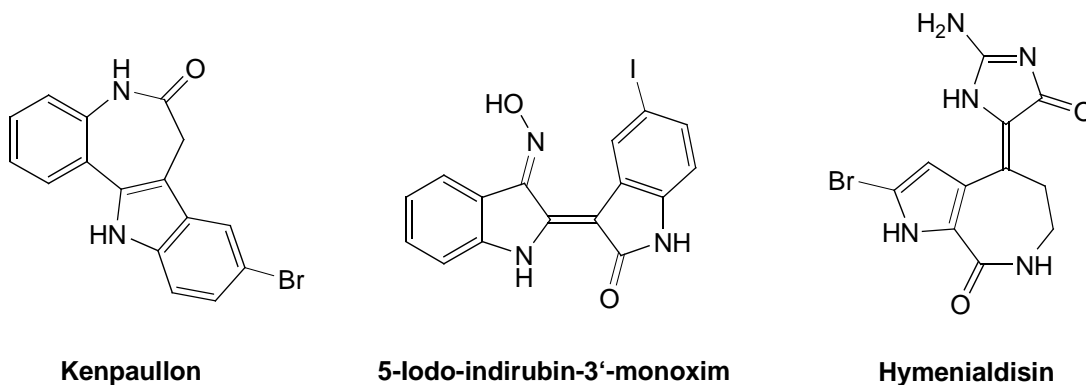


Abbildung 7: CDK-Inhibitoren mit CDK5/GSK-3-hemmender Wirkung.

Wie der Großteil der CDK5/GSK-3-Inhibitoren sind auch diese Verbindungen wenig selektiv und hemmen zusätzlich CDK1 und 2, Hymenialdisin auch CDK4 in ähnlicher Potenz.

Eine Monoselektivität für GSK-3 ist offenbar leichter zu erreichen als eine Selektivität für eine einzelne CDK, was sich mit den Unterschieden der Struktur der ATP-Bindungsregion der GSK-3-Isoformen und jener der CDK-Familie begründen lässt. Aus den Leitstrukturen für CDK-Inhibitoren sind einige sehr potente GSK-3-Inhibitoren hervorgegangen (*Abbildung 8*). 1-Azakenpaullon ist mit IC_{50} -Werten im nanomolekularen Bereich 100-fach stärker gegen GSK-3 β als gegen CDK1 und CDK5³¹ wirksam. Die Selektivität von 1-Azakenpaullon ist allerdings unzureichend geklärt, da es nur an wenigen Kinasen getestet wurde. Vertreter aus der Verbindungsklasse der makrozyklischen Bisindolylmaleinimide wurden in einem Screen an einem breiten Kinasenspektrum als GSK-3 β -spezifisch charakterisiert³².

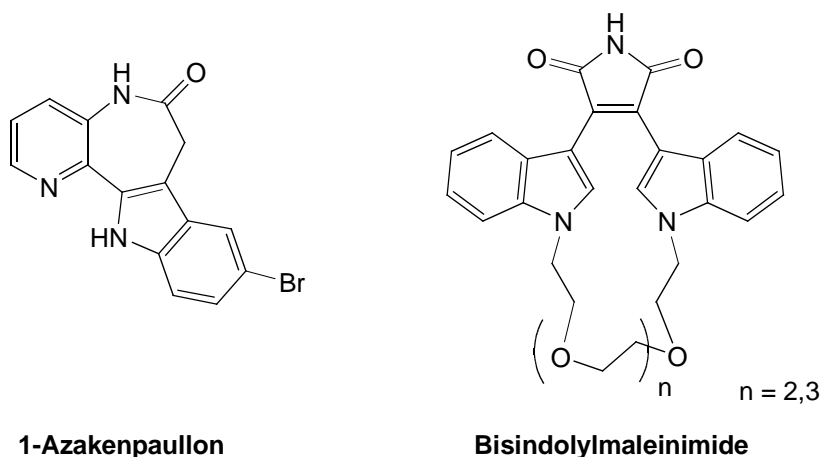


Abbildung 8: GSK-3-selektive Inhibitoren.

Die Entwicklung möglichst selektiver Inhibitoren ist unabdingbar, solange sie als pharmakologische Werkzeuge zum Nachweis der Beteiligung von GSK-3 und CDK5 an zellulären Prozessen eingesetzt werden sollen. Im Gegensatz dazu erscheinen Inhibitoren mit breiterem Wirkspektrum für den therapeutischen Einsatz möglicherweise sinnvoller, um mehrere pathologische Prozesse gleichzeitig zu unterbinden. Besonders aussichtsreich ist hierbei ein dualer Wirkmechanismus gegen GSK-3 und CDK5 aufgrund der gemeinsamen Beteiligung an den gleichen pathologischen Prozessen. Außerdem wird der Nutzen einer zusätzlichen Hemmung von CDK1 oder 2 diskutiert, da diese in den Apoptosemechanismus der Neuronen involviert sind³.

2.2 Die Problematik der Multidrug Resistance

2.2.1 Einleitung

Die Multidrug-Resistance (MDR) beschreibt das Phänomen der Entwicklung einer körpereigenen Resistenz gegen mehrere strukturell und funktionell verschiedene Wirkstoffe, die deren Akkumulation in den Zellen verhindert und somit die Therapie verschiedener Krankheiten erschwert. MDR stellt insbesondere in der Krebstherapie ein wesentliches therapielimitierendes Problem dar, da maligne Tumore oft eine Resistenz gegen verschiedene Zytostatika aufweisen oder während der Therapie entwickeln³³.

Die Mechanismen, die der MDR zugrunde liegen, sind vielfältiger Natur. Neben nichtzellulären Ursachen, die sich durch unterschiedlich vaskularisierte Bereiche im Inneren solider Tumore ergeben, werden auf zellulärer Ebene die nicht transporterbasierte und die klassische transporterbasierte MDR unterschieden. Beispiele für die nicht transporterbasierte MDR sind eine gesteigerte Inaktivierung von Zytostatika durch Glutathion-S-Transferase oder die Resistenzentwicklung gegen die Gruppe der Topoisomerase-II-Inhibitoren durch Genmutation von Topoisomerase II³³. Die bedeutendste Form der MDR ist jedoch die transporterbasierte Resistenz, die auf einer Senkung der Wirkstoffkonzentration durch aktiven Transport von Molekülen aus der Zelle heraus basiert. Als erster Transporter dieser Art wurde in den 70er Jahren das P-Glycoprotein (P-gp), ein Transkriptionsprodukt des MDR1-Gens, durch *Ling et al.* erstmals beschrieben³³. Sowohl in Tumoren von Gewebearten wie Niere, Leber, Darm und Pankreas, die eine natürliche Expression des MDR1-Gens aufweisen, als auch bei anderen Krebstypen, deren Ursprungsgewebe kaum MDR1-RNA in nachweisbaren Mengen exprimiert, wurde eine Überexpression von P-gp gefunden, die mit der verminderten Effektivität einer Chemotherapie korreliert³⁴. Neben P-gp besitzt das 1992 von *Cole et al.* entdeckte Multidrug-resistance-associated Protein (MRP) ebenfalls eine für die Entstehung der MDR hohe Relevanz.

Bis heute sind 48 solcher Transportproteine identifiziert worden, die alle der Superfamilie der ABC-Transporter (ATP binding cassette) zugeordnet werden, da sie die nötige Energie für den Transport von Substanzen aus der Zelle durch die Hydrolyse von ATP beziehen³⁵. Die ubiquitäre Verbreitung solcher ATP-abhängigen Transporter bei Bakterien, Protozoen und Pilzen bis hin zum Menschen legt eine evolutionäre Entwicklung zum Schutz der Zellen vor Xenobiotika nahe³⁶. Innerhalb der Vielzahl der bekannten MDR-Transporter

nimmt P-gp eine herausragende Rolle ein und stellt das am besten untersuchte und charakterisierte MDR-relevante Transportprotein dar³³.

2.2.2 MDR-Modulatoren

Ein Ansatz zur Überwindung der transporterbasierten MDR besteht in der Kombination der zur Therapie eingesetzten Wirkstoffe mit einem MDR-Modulator. Solche auch als Chemosensitizer bezeichneten Verbindungen erhöhen die Akkumulation der therapeutisch wirksamen Substanzen in der Zelle, indem sie durch kompetitive oder allosterische Wechselwirkung mit den für die MDR verantwortlichen Transportproteinen deren Aktivität unterbinden und so den Efflux der Pharmaka aus den Zellen verringern.

Die ersten als MDR-Modulatoren identifizierten Verbindungen waren Arzneistoffe mit ursprünglich anderer Indikation wie die Calciumkanalblocker Verapamil und Nifedipin oder das Immunsuppressivum Cyclosporin A. Trotz der teilweise hervorragenden MDR-hemmenden Eigenschaften dieser Modulatoren der ersten Generation, kommt eine Verwendung dieser Verbindungen nicht in Frage, da bei den für die erwünschten MDR-modulierenden Effekte nötigen hohen Konzentrationen aufgrund der primären pharmakologischen Wirkung dieser Stoffe toxische Effekte auftreten. Der Versuch, Analoga dieser Arzneistoffe mit verringerter Toxizität und erhöhtem MDR-modulatorischen Potential zu finden, führte zur Entwicklung von Modulatoren der zweiten Generation wie Dexverapamil, dem R-Enantiomer von Verapamil, und PSC 833, einem nicht immunsuppressiven Analogon von Cyclosporin A. Die dritte Generation von Modulatoren umfasst neue Verbindungsklassen, die anhand der Struktur-Wirkungsbeziehungen der bekannten MDR-Modulatoren speziell gegen den MDR-Mechanismus entwickelt wurden. Diese neuen Verbindungen beseitigten zwar viele Probleme der Modulatoren der ersten und zweiten Generation, beeinflussten bei Coadministration mit Zytostatika jedoch deren Pharmakokinetik und Biodistribution. Der Grund ist möglicherweise die Inhibition von P-gp im gesunden Gewebe durch die fehlende Tumorselektivität³³. Obwohl bereits einige Verbindungen den Weg in die klinische Testung gefunden haben, existiert aufgrund der genannten Probleme nach wie vor keine Substanz, die für den klinischen Einsatz als MDR-Modulator zugelassen ist³⁶.

Versuch, die zytostatische Aktivität zu erhöhen, führte zur Entwicklung einer Reihe strukturell variiertes α -Carboline, von denen sich die meisten als unwirksam oder vergleichsweise schwach zytostatisch aktiv erwiesen. Lediglich die 6-substituierten Verbindungen **IIa-c**, das 4-Methylderivat **III** und das Ellipticinanalogon **IV** zeigten eine mit **I** vergleichbare Antitumorwirkung^{39,40}. Die geringe Aktivität der Vielzahl der untersuchten Verbindungen wurde unter anderem auf eine enzymatische Inaktivierung durch Dimerisierung der Azacarbazole zurückgeführt, da für das 6-Hydroxyderivat **II d** eine solche Dimerisierung nachgewiesen werden konnte (*Abbildung 11*) und sich das Dimer **V** ebenfalls als zytostatisch inaktiv erwies⁴¹.

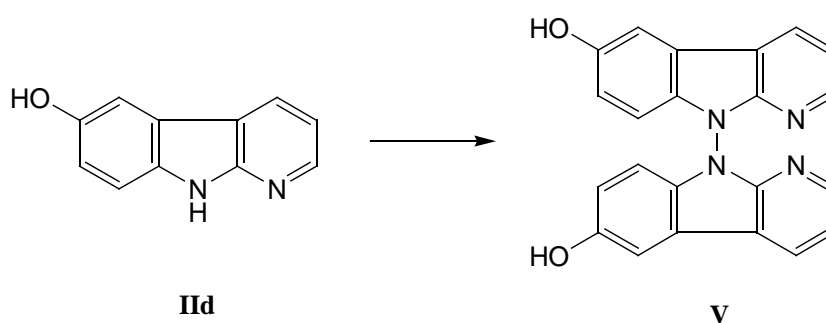


Abbildung 11: Inaktivierung des 6-Hydroxy-1-azacarbazols durch Dimerisierung.

Da die 1-Aza-9-oxafluorene wegen des formalen Austauschs des Stickstoffs an Position 9 gegen ein Sauerstoffatom nicht auf diesem Wege inaktiviert werden können, wurde bei ihnen eine den Azacarbazolen gegenüber erhöhte zytostatische Wirkung erwartet. Bereits 1970 hatten außerdem 2,4-disubstituierte 1-Aza-9-oxafluorene aufgrund antiviraler Wirksamkeit und geringer Toxizität in Tierversuchen Interesse geweckt⁴².

Das Ziel des ersten Teils der praktischen Arbeiten bestand somit in der Synthese erster Vertreter der durch die Zykladdition zugänglichen 1-Aza-9-oxafluorene. Diese sollten auf ihre zytostatischen Eigenschaften und bei nachgewiesener Aktivität auf die Ursachen der Wirksamkeit, insbesondere auf die Fähigkeit zur DNA-Interkalation, untersucht werden.

Nachdem die 1-Aza-9-oxafluorene als CDK-Inhibitoren identifiziert wurden, bestand die Zielstellung im zweiten Teil der Arbeit darin, durch Variation der 3- und 4-Substituenten Informationen über deren Einfluss auf Stärke und Selektivität der CDK-hemmenden Eigenschaften der 1-Aza-9-oxafluorene zu gewinnen. Es wurde versucht, erste Struktur-Wirkungsbeziehungen abzuleiten, um eine Richtung für die künftige Weiterentwicklung der 1-Aza-9-oxafluorene aufzuzeigen. Außerdem wurden die 1-Aza-9-oxafluorene auf ihre Fähigkeit zur P-gp-Modulation hin untersucht.

4 Erste 1-Aza-9-oxafluorene

4.1 Synthese der Verbindungen

Grundlage der Synthese der ersten 1-Aza-9-oxafluorene bildete die von *Hilgeroth et al.*³⁷ beschriebene Zykladdition von *p*-Benzochinon an mehrfach substituierte symmetrische 1,4-Dihydropyridine (*Abbildung 9*). Um die vollständig planar-aromatischen 1-Aza-9-oxafluorene **55-58** zu erhalten, wurden anstelle der symmetrischen 1,4-Dihydropyridine unsymmetrisch 3-substituierte Dihydropyridine als Ausgangsstoffe für die Zykladdition eingesetzt (*Abbildung 12*). Da analoge 4-unsubstituierte 1,4-Dihydropyridine unter den angestrebten Reaktionsbedingungen zu den entsprechenden Pyridinen oxidiert werden⁴³ und sich ein 4-Methylsubstituent als vorteilhaft für die biologische Aktivität der Azacarbazole erwiesen hatte⁴⁰, wurde die Einführung eines Substituenten an 4-Position in die Synthesestrategie einbezogen. Zur Darstellung dieser ersten Gruppe von 1-Aza-9-oxafluorenen wurden zunächst analog zu den Arbeiten von *Hilgeroth et al.* 1,4-Dihydropyridine mit einer 3-Carbonylfunktion eingesetzt.

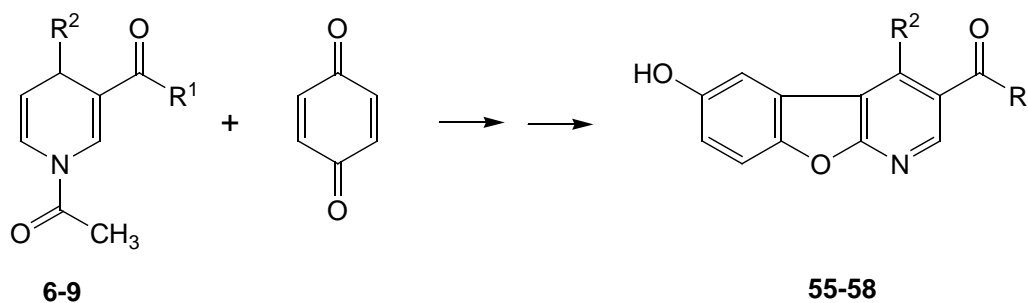


Abbildung 12: Darstellung der planar-aromatischen 1-Aza-9-oxafluorene durch Zykladdition.

Tabelle 2: Substitutionsmuster der in 4.1 dargestellten Verbindungen

Verbindung				R^1	R^2
6	41	55	79	OCH ₂ CH ₃	CH ₃
7	42	56	80	CH ₃	CH ₃
8	43	57	81	OCH ₂ CH ₃	C ₆ H ₅
9	44	58	82	CH ₃	C ₆ H ₅

4.1.1 Darstellung der *N*-Acetyl-1,4-dihydropyridine

Die 3,4-disubstituierten *N*-Acetyl-1,4-dihydropyridine **6-9** wurden nach einer Vorschrift von *Comins et al.* durch Acetylierung 3-substituierter Pyridine am Ringstickstoff und nachfolgende Grignardaddition dargestellt (*Abbildung 13*). Durch die Wahl entsprechender Pyridine und Grignardreagenzien sind die Substituenten R^1 und R^2 variabel.

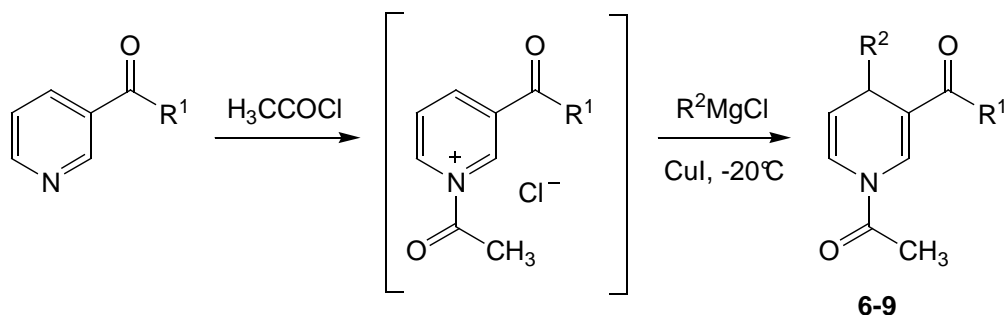


Abbildung 13: Darstellung der 3,4-disubstituierten N-Acetyl-1,4-dihydropyridine 6-9.

Nach *N*-Acetylierung des Pyridins ist das so erhaltene Pyridiniumsalz wegen der im Pyridiniumring delokalisierten positiven Ladung derart aktiviert, dass Grignardreagenzien bei tiefen Temperaturen ($-20^\circ C$ im Kältebad) auch in Gegenwart anderer reaktiver Gruppen wie Ketonen, Estern oder Halogeniden quantitativ am Pyridiniumring angreifen^{44,45}. Die bevorzugten Angriffspositionen sind aufgrund der Ladungsverteilung im Pyridiniumring die Positionen 2, 4 und 6.

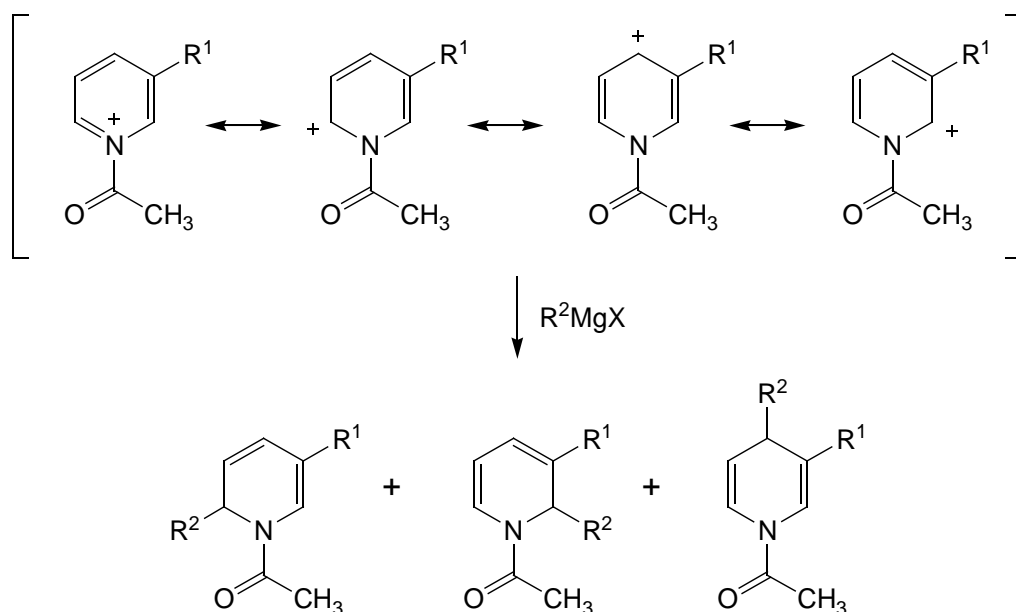


Abbildung 14: Addition von Grignardreagenzien an den aktivierten Pyridiniumring.

Das Mengenverhältnis der gebildeten 2-, 4- und 6-Addukte variiert stark in Abhängigkeit von den verwendeten Reaktionspartnern. In Gegenwart katalytischer Mengen von Kupfer-(I)-iodid erfolgt der Angriff des Grignards hingegen nahezu regioselektiv am C-4^{44,45,46,47}. *Comins* setzte hierbei CuI·SMe₂ ein, da dieses eine bessere Löslichkeit und Effektivität als CuI allein aufweist⁴⁸. Zu Beginn der hier dargelegten Arbeiten wurde ebenfalls CuI·SMe₂ verwendet. Später erwies sich abweichend von der *Comins*-Vorschrift die Verwendung des ebenfalls leicht löslichen CuI·2 LiCl als vorteilhaft, da es die gleiche katalytische Wirkung wie CuI·SMe₂ aufweist^{48,49}, LiCl aber im Gegensatz zu Dimethylsulfid aufgrund der geringeren Geruchsbelastung leichter zu handhaben ist.

Als Ausgangsstoffe wurden die kommerziell verfügbaren Pyridine 3-Acetylpyridin und Ethylnikotinat verwendet. Nach Acetylierung im Kältebad kamen zur Einführung des 4-Methyl- und 4-Phenylsubstituenten ohne Isolation der Zwischenprodukte Methylmagnesiumchlorid und Phenylmagnesiumchlorid in ebenfalls kommerziell erhältlichen, gebrauchsfertigen Lösungen zum Einsatz. Nach Hydrolyse und mehrfacher Extraktion der Reaktionsgemische konnten die 1,4-Dihydropyridine **6-9** in guten Ausbeuten von bis zu 77 % erhalten werden. Im ¹H-NMR-Spektrum der Produktgemische wurde durch Vergleich der Integrale ein mit 1-5 % sehr geringer Anteil an 6-Addukten beobachtet, wie dies auch von *Comins* beschrieben wurde⁴⁴.

4.1.2 Darstellung der 1-Aza-9-oxafluorene durch Zykoaddition

Zur Darstellung der Zielstrukturen **55-58** wurden **6-9** nach der Vorschrift von *Hilgeroth et al.*³⁷ in Dioxan und 5 % HClO₄ mit *p*-Benzochinon umgesetzt. Bereits nach 24 Stunden waren mittels DC-Kontrolle keine Ausgangsstoffe mehr nachweisbar. Die Analyse der Hauptprodukte ergab die erwarteten 1,4,4a,9a-Tetrahydro-1-aza-9-oxafluorene **79-82**. Die Pyridine **41-44** als Produkte einer Oxidation von **6-9** durch *p*-Benzochinon wurden nicht gefunden, konnten zu Vergleichszwecken aber durch Oxidation von **6-9** mit MnO₂ dargestellt werden. Die unsymmetrisch substituierten 1,4-Dihydropyridine mit 3-Carbonylfunktion sind also ebenso stabil gegen eine Oxidation durch *p*-Benzochinon, wie dies für die symmetrischen Dihydropyridine beschrieben wurde⁴³. Die 1,4,4a,9a-Tetrahydro-1-aza-9-oxafluorene **79-82** erwiesen sich hingegen als sehr instabil und oxidierten bereits bei Luftkontakt zu den 1-Aza-9-oxafluorenen **55-58**. Daher konnten nur geringe Mengen dieser Zwischenprodukte isoliert und charakterisiert werden. Die im Vergleich zu **6-9** leichtere Oxidierbarkeit von **79-82** ließ sich nutzen, um ohne die Isolierung der Zwischenprodukte in einer Ein-Topf-Reaktion direkt die 1-Aza-

9-oxafluorene **55-58** zu erhalten. Durch Zugabe eines Überschusses von *p*-Benzochinon zu den Zykoadditionsansätzen wurden die im ersten Schritt gebildeten Tetrahydrofluorene nach mehrwöchigem Rühren vollständig zu den 1-Aza-9-oxafluorenen oxidiert. **79-82** konnten säulenchromatographisch aus den Produktgemischen isoliert und aus Ether kristallisiert werden. Nach Umkristallisation in einem Methanol/Essigester-Gemisch wurden die 1-Aza-9-oxafluorene in reiner Form als beige bis hellbraune amorphe Substanzen erhalten.

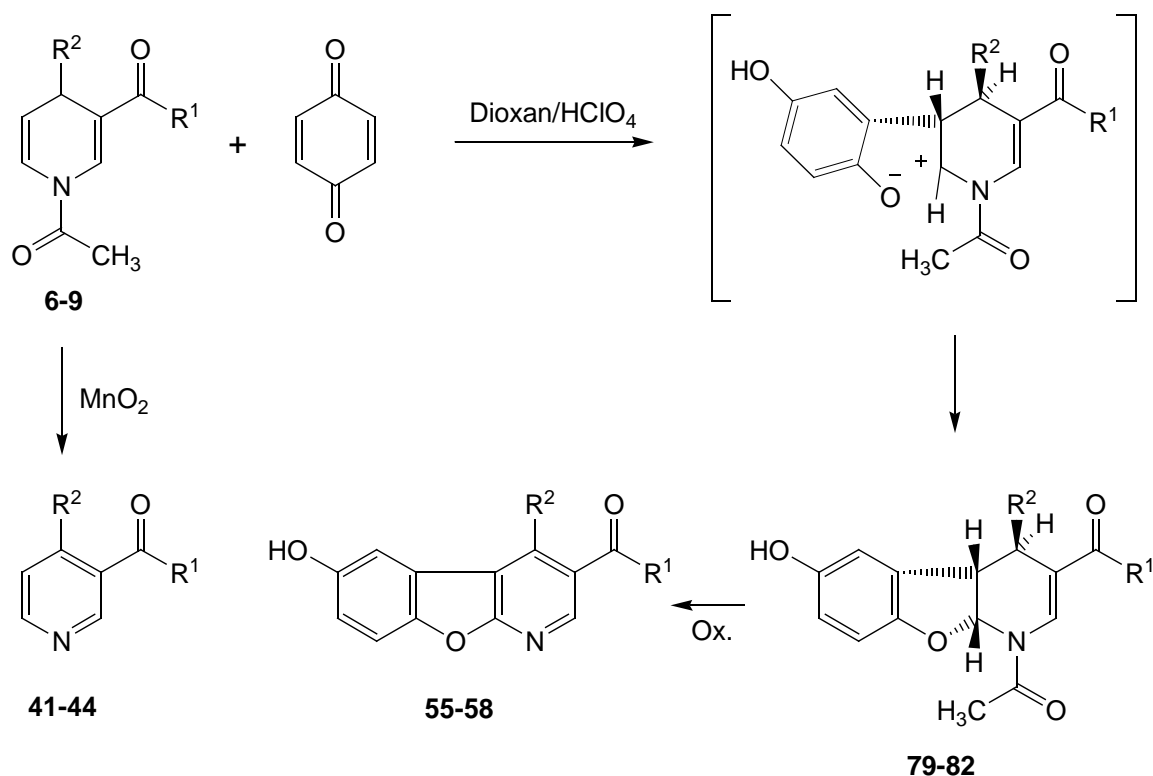


Abbildung 15: Umsetzungen von **6-9**.

Die Bildung der 1,4,4a,9a-Tetrahydro-1-aza-9-oxafluorene verläuft vermutlich über die Zwischenstufe des primären *Michael*-Addukts (Abbildung 15) durch Angriff des C-5 der Dihydropyridine am C-2 des Benzochinons. Die Reaktion folgt daher im ersten Schritt dem Mechanismus der *Nenitzescu*-Reaktion, einer Sonderform der *Michael*-Addition von Enaminen an *p*-Benzochinon, die zur Bildung von Indolen führt^{50,51}. Der Ringschluss zum 1,4,4a,9a-Tetrahydro-1-aza-9-oxafluorenen erfolgt im Unterschied zur *Nenitzescu*-Reaktion

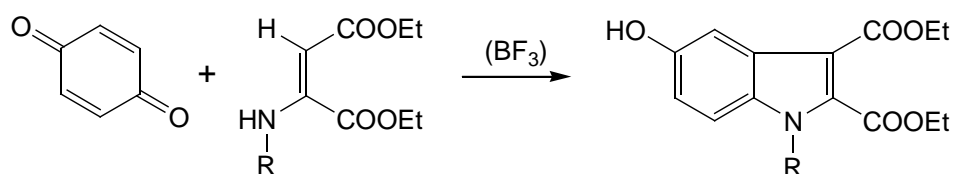
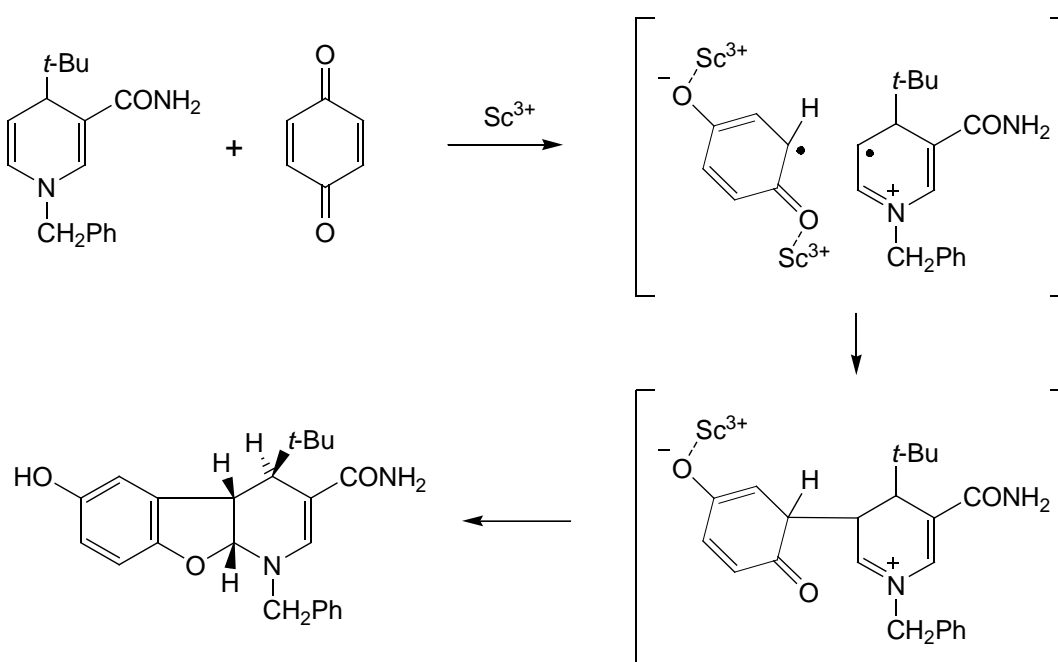


Abbildung 16: Bildung von Indolen durch *Nenitzescu*-Reaktion.

durch nukleophilen Angriff des Benzochinon-Sauerstoffs am C-6 des Dihydropyridins.

Eine ähnliche Synthese von 1,4,4a,9a-Tetrahydro-1-aza-9-oxafluoren-Derivaten aus 1,4-Dihydropyridinen und *p*-Benzochinon wurde jüngst von *Fukuzumi et. al.* beschrieben⁵². Für diese Scandium-katalysierte [2+3]-Zykloaddition von 1-Benzyl-4-*tert*-butyl-1,4-dihydropyridin an *p*-Benzochinon wiesen *Fukuzumi et. al.* als ersten Schritt die Bildung eines Radikalionenpaars durch Scandium-vermittelte Elektronenübertragung von 1-Benzyl-4-*tert*-butyl-1,4-dihydropyridin auf *p*-Benzochinon nach. Durch Radikalkupplung entsteht das primäre zwitterionische Addukt, das anschließend zum Tetrahydrofluoren zyklisiert (*Abbildung 17*).



*Abbildung 17: Radikalischer Mechanismus der Scandium-katalysierten Zykloaddition von 1-Benzyl-4-tert-butyl-1,4-dihydropyridin an p-Benzochinon nach Fukuzumi et. al.*⁵²

4.1.3 Acetylierung von **57**

Zum Nachweis der 6-Hydroxygruppe wurde aus **57** zusätzlich das 6-acetylierte Derivat **57a** dargestellt. Die Acetylierung gelang in reinem Acetanhydrid mit geringen Mengen Pyridin als Base. Nach Spaltung des überschüssigen Acetanhydrids durch Zugabe von Ethanol und Entfernung der Lösungsmittel am Rotationsverdampfer wurde **57a** als hellbraunes amorphes Pulver erhalten.

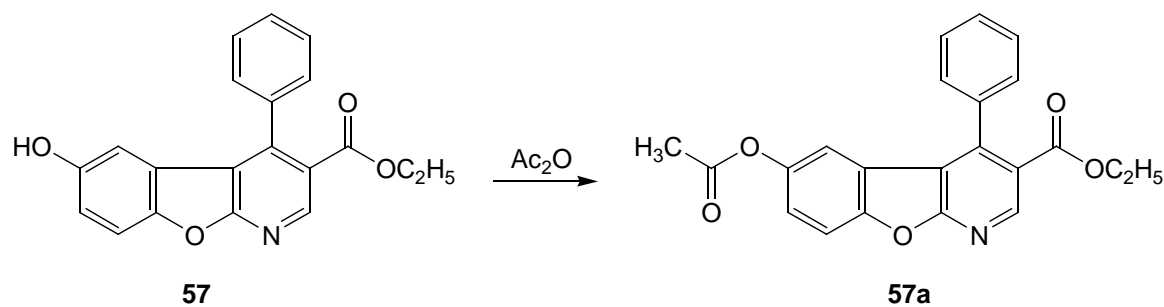


Abbildung 18: Acetylierung von **57**.

4.2 Strukturabsicherung und Charakterisierung der Zwischenprodukte und Endverbindungen

Alle im Rahmen dieser Arbeit synthetisierten und isolierten Verbindungen wurden zur Strukturabsicherung und -aufklärung durch $^1\text{H-NMR}$ - und IR-Spektroskopie sowie durch Massenspektrometrie charakterisiert. Die Reinheit der isolierten Produkte wurde durch Elementaranalyse nachgewiesen. Die vollständigen analytischen Daten der in 4.1 dargestellten Verbindungen sind in *Kapitel 7.1.2* angegeben. Auf für die Stoffklassen charakteristische spektroskopische Eigenschaften, die für alle dargestellten Derivate als Strukturnachweise verwendet wurden, soll an dieser Stelle näher eingegangen werden.

4.2.1 *N*-Acetyl-1,4-dihydropyridine

Die *N*-Acetylgruppe der *N*-Acetyl-1,4-dihydropyridine ist wegen des partiellen Doppelbindungscharakters der N-C-Bindung in ihrer Drehbarkeit behindert⁵³. Dadurch existieren für jedes Dihydropyridin dieses Typs zwei Rotationsisomere, eine *E*- und eine *Z*-Form (*Abbildung 19*). Im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum sind diese Rotamere deutlich unterscheidbar, da für die Protonen H-2 und H-6 je zwei Signale mit einer Verschiebungsdifferenz von bis zu 1 ppm zu finden sind (*Tabelle 3*). Durch die magnetische Anisotropie der Carbonylgruppe werden die Protonen derjenigen Molekülseite, die der Doppelbindung der *N*-Acetylgruppe zugewandt ist, abgeschirmt, wodurch ihre Kernresonanzsignale ins Hochfeld verschoben werden. Die Protonen der abgewandten Seite werden entsprechend entschirmt, was in einer Tieffeldverschiebung ihrer Signale resultiert⁵⁴.

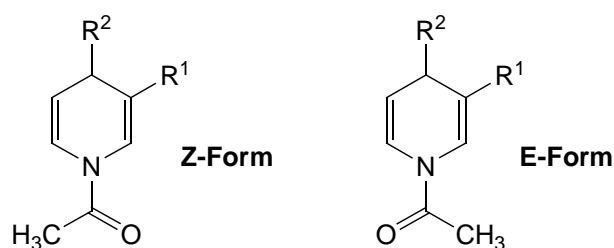


Abbildung 19: Rotameren der N-Acetyl-1,4-dihydropyridine.

Wie das beispielhaft in *Abbildung 20* dargestellte $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von **8** zeigt, ergeben die Signale dieser vom Rotamereneffekt betroffenen Protonen keine scharfen Peaks, sondern unscharfe breite „Singulets“. Das Signal von H-4 bei 4,47 ppm weist ebenso wie das Signal der *N*-Acetylgruppe bei 2,37 ppm eine durch die Rotameren bedingte Aufspaltung zu einem unsymmetrischen breiten Signal auf.

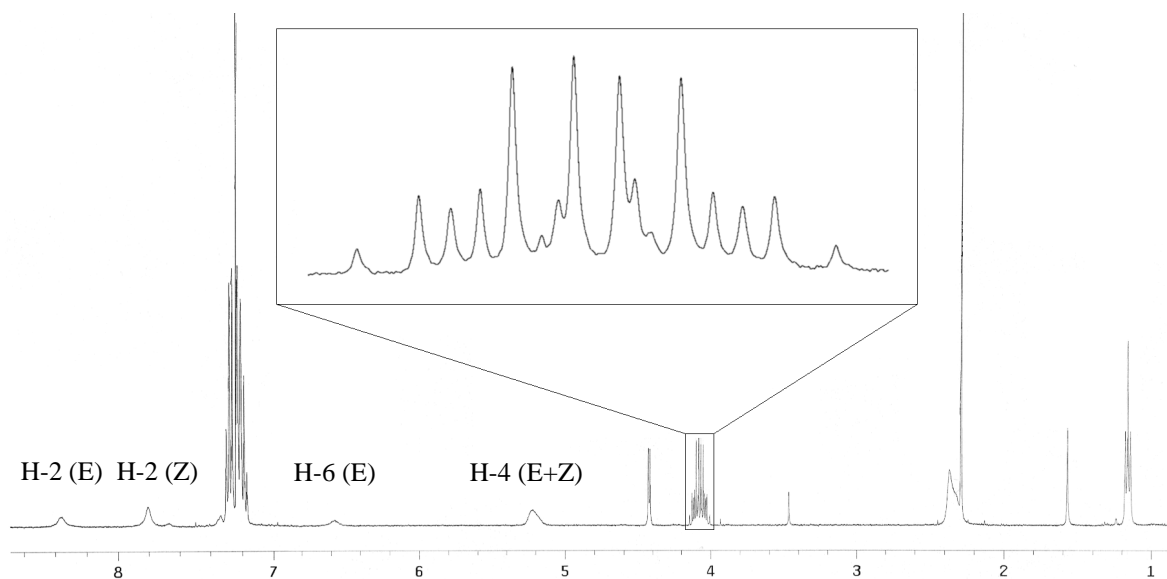


Abbildung 20: $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von **8** in CDCl_3 ; der AB-Teil des ABX_3 -Systems der Ethylestermethylengruppe ist vergrößert dargestellt.

Tabelle 3: chemische Verschiebungen δ [ppm] von H-2 und H-6 in den Rotameren von **6-9**

	H-2		H-6	
	Z-Form	E-Form	Z-Form	E-Form
6	7,61	8,14	7,06	6,49
7	7,50	8,12	7,07	6,49
8	7,80	8,37	7,30-7,16*	6,60
9	7,34-7,15*	8,33	7,34-7,15*	6,60

* vom Multipllett der aromatischen Protonen überlagertes Signal

Von **8** wurden außerdem ein $^{13}\text{C-NMR}$ -Spektrum und ein entkoppeltes $^{13}\text{C-NMR}$ -Spektrum aufgenommen. Auch in diesen Spektren sind die Rotameren unterscheidbar, da die Signale der Kohlenstoffatome der *N*-Acetylgruppe sowie die Signale von C-2 und C-6 aufgrund der Rotameren jeweils doppelt vorhanden sind.

Durch die Einführung des 4-Substituenten in den unsymmetrisch substituierten 1,4-Dihydropyridinring entsteht an C-4-Position ein Chiralitätszentrum. Neben den Rotameren existieren somit von den 3,4-disubstituierten Dihydropyridinen je ein R- und ein S-Enantiomer. Da der Angriff des Grignards nicht stereoselektiv verläuft, werden beide Enantiomere der 1,4-Dihydropyridine zu gleichen Teilen gebildet.

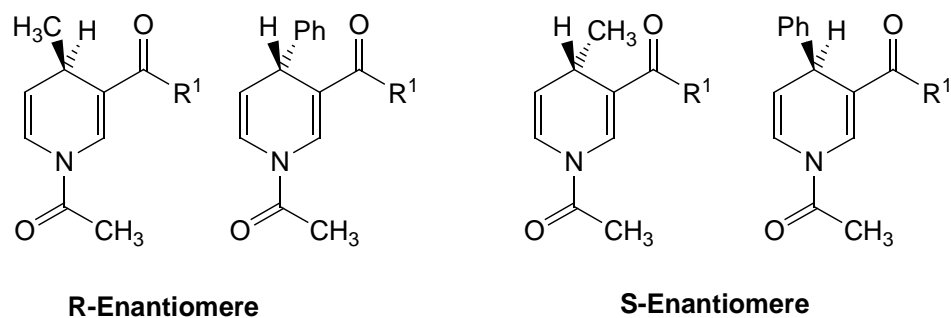


Abbildung 21: Enantiomere der 1,4-Dihydropyridine 6-9.

Die Existenz beider Enantiomere wurde in Arbeiten unserer Arbeitsgruppe zur Photodimerisierung ähnlicher, ebenfalls mit der in 4.1.1 beschriebenen Grignardaddition dargestellten *N*-Alkyl-1,4-dihydropyridine bestätigt. So entstehen nebeneinander durch Dimerisierung gleicher enantiomerer Formen C_2 -symmetrische und durch Verknüpfung verschiedener Enantiomere unsymmetrische 6,12-Diazatetrakishomocubane^{55,56}.

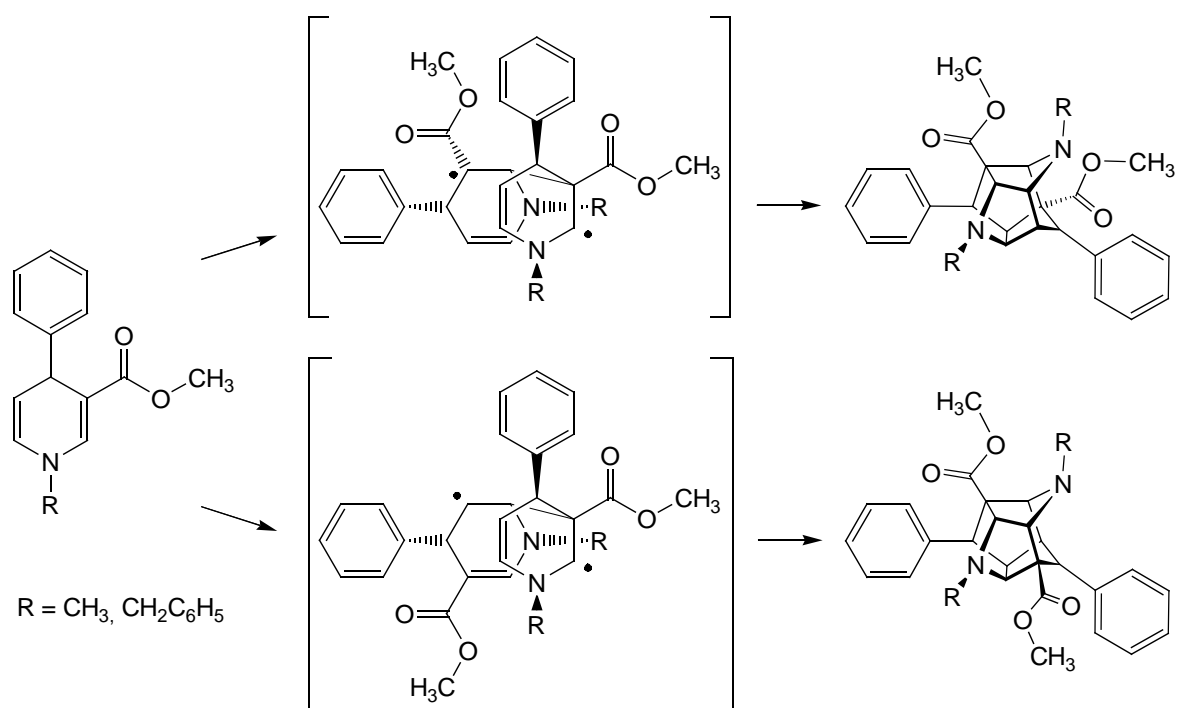


Abbildung 22: Bildung unsymmetrischer (oben) und C_2 -symmetrischer (unten) Tetrakishomocubane durch Photodimerisierung unsymmetrisch substituierter 4-Aryl-1,4-dihydropyridine⁵⁶.

Eine von **8** angefertigte Röntgenstrukturanalyse (Abbildung 23) bestätigt außerdem die pseudoaxiale Stellung des 4-Substituenten am Chiralitätszentrum.

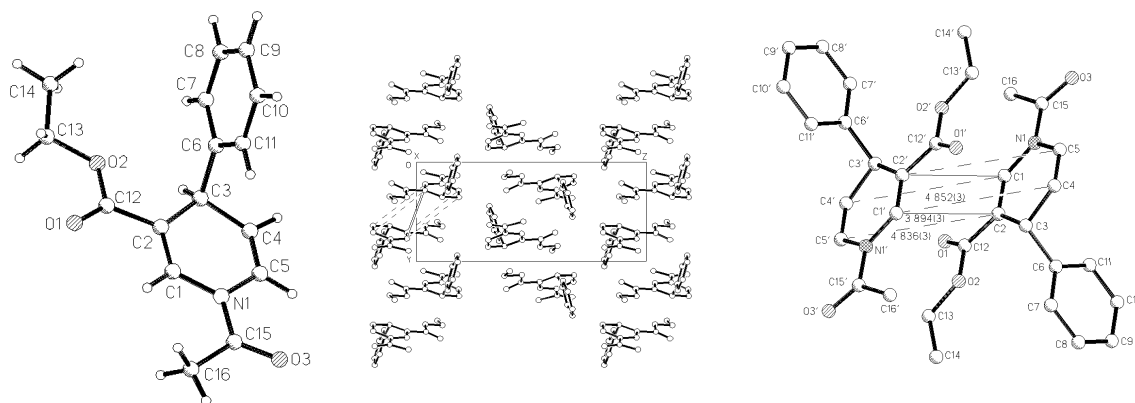


Abbildung 23: Röntgenstruktur von **8**; einzelnes Molekül (links), Moleküle in der Kristallpackung (Mitte); Molekülpaar (rechts).

Im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum sind die Enantiomere bei Verwendung der üblichen achiralen Lösungsmittel erwartungsgemäß nicht unterscheidbar, da ihre Spektren deckungsgleich sind. Intramolekular wird hingegen durch die Nähe zum Chiralitätszentrum die magnetische Äquivalenz des Methylenprotonenpaares der Ethylestergruppe von **6** und **8** aufgehoben⁵⁴. Die Ethylprotonen sind daher nicht in ein Quartett und ein Triplet aufgespalten, sondern ergeben ein Spektrum vom ABX_3 -Typ, welches sich im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von **8** (Abbildung 20) sehr gut analysieren lässt. Das symmetrische Multiplett bei $\delta = 4,07$ ppm stellt den AB-Teil dar und besteht folglich aus einem Quartett von AB-Systemen, welche eine Intensitätsverteilung von 1:3:3:1 aufweisen. Die geminale Kopplung der Methylenprotonen lässt sich auf $^2\text{J} = 10,8$ Hz, die vicinale Kopplung mit den Protonen der Methylgruppe auf $^3\text{J} = 7,1$ Hz bestimmen.

In den zum Vergleich dargestellten Pyridinen **41** und **43** ist das C-4 nicht asymmetrisch substituiert. Die Signale der Ethylprotonen spalten erwartungsgemäß nach den Regeln für Spektren erster Ordnung in ein Triplet und ein Quartett auf.

4.2.2 1,4,4a,9a-Tetrahydro-1-aza-9-oxafluorene

Anhand der $^1\text{H-NMR}$ -Spektren der 1,4,4a,9a-Tetrahydro-1-aza-9-oxafluorene ließ sich die Verknüpfung des Tetrahydropyridinringes mit dem Tetrahydrofuran als *cis* bestimmen, da die Protonen H-4a und H-9a eine Kopplungskonstante $^3\text{J}_{4a/9a}$ zwischen 7,23 und 7,81 Hz aufweisen. Dieser Wert liegt damit in der Größenordnung der Kopplungskonstanten vergleichbarer *cis*-ständiger Protonen der dimeren 4-Aryl-1,4-dihydropyridine vom Typ der Tetrakishomocubane⁵⁵ (Abbildung 22). H-4 und H-4a sind dagegen *trans*-ständig, die Kopplungskonstante $^3\text{J}_{4/4a}$ liegt zwischen 1 und 2,5 Hz.

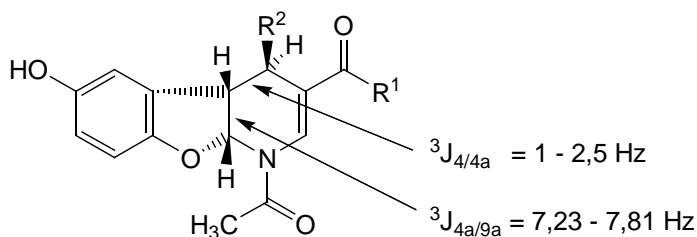


Abbildung 24: Kopplungskonstanten im Ringsystem der Tetrahydrofluorene.

Dies zeigt, dass das *p*-Benzochinon bei der Bildung des *Michael*-Addukts (Abbildung 15) von der nicht durch den pseudoaxial orientierten 4-Substituenten sterisch behinderten Molekülseite am C-5 des Dihydropyridinringes angreift. Der anschließende Ringschluss zum 1,4,4a,9a-Tetrahydro-1-aza-9-oxafluoren erfolgt danach durch nukleophilen Angriff des Sauerstoffs am C-6 ebenfalls an der Rückseite der Molekülebene, woraus die *cis*-Stellung der Protonen H-4a und H-9a resultiert.

4.2.3 1-Aza-9-oxafluorene

In den $^1\text{H-NMR}$ -Spektren der 1-Aza-9-oxafluorene zeigt sich im Vergleich zu den Tetrahydro-1-aza-9-oxafluoren erwartungsgemäß eine Tieffeldverschiebung der Signale der Protonen H-2, H-7 und H-8 durch die entschirmende Wirkung des erweiterten, vollständig aromatischen Ringsystems. Im Gegensatz dazu fällt auf, dass das Signal von H-5 nur bei den 4-Methylderivaten **55** und **56** ins Tieffeld verschoben ist, während es bei den 4-Phenylderivaten **57** und **58** eine Hochfeldverschiebung erfährt (Tabelle 4).

Die Erklärung dafür ist in einer abschirmenden Wirkung des 4-Phenylsubstituenten zu suchen. Während an Aromaten gebundene Protonen aufgrund des durch den Ringstrom der π -Elektronen erzeugten Magnetfeldes entschirmt werden, wirkt dieses ober- und unterhalb der Ringebene abschirmend⁵⁴ (Abbildung 25). Da der Phenylsubstituent in den Tetrahydroverbindungen ähnlich wie in den 1,4-Dihydropyridinen pseudoaxial orientiert

Tabelle 4: Vergleich der chemischen Verschiebungen δ [ppm] von H-2, H-7 und H-8 der Tetrahydrofluorene **79-82** und der korrespondierenden Fluorene **55-58**

	79	55	80	56	81	57	82	58
H-2	8,15	8,98	7,66	8,83	8,40	9,02	7,63	8,74
H-5	6,61-6,57*	7,53	6,62	7,56	6,73	6,28	6,66	6,46
H-7	6,61-6,57*	7,03	6,59	7,06	6,61	6,96	6,51	6,67
H-8	6,61-6,57*	7,50	6,64	7,53	6,66	7,47	6,59	7,48

* Signale sind nicht differenziert, sondern bilden ein Multipllett

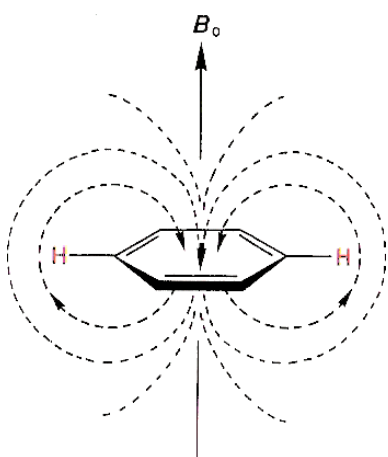


Abbildung 25.: Ringstrommodell am Aromaten⁵⁴.

ist, tritt der Abschirmeffekt bei diesen Strukturen nicht auf. Aus der beobachteten Abschirmung in den 1-Aza-9-oxafluorenen lässt sich schließen, dass der Phenylring beinahe senkrecht zur Ebene des planaren trizyklischen Grundgerüsts steht. Zur Überprüfung dieser Annahme wurde mit dem Programm *Hyperchem* unter Anwendung der semiempirischen Methode *AM1* ein energieminiertes Modell von **8** berechnet (Abbildung 26). Im Modell ist der Phenylring um 61° zur Molekülebene verdreht, H-5 befindet sich somit oberhalb der Ringebene und unterliegt dem beschriebenen abschirmenden Effekt.

Die Lage des Kernresonanzsignals phenolischer Hydroxyprotonen ist sehr stark vom verwendeten Lösungsmittel und der Temperatur abhängig⁵⁴. Der Nachweis der 6-OH-Gruppen der 1-Aza-9-oxafluorene **55-58** und der Tetrahydro-1-aza-9-oxafluorene **79-82** erfolgte daher durch Zugabe von D_2O und anschließende erneute Messung. Durch den Austausch der Hydroxyprotonen gegen Deuterium verschwindet das entsprechende Kernresonanzsignal im 1H -NMR-Spektrum und lässt sich damit eindeutig der OH-Gruppe zuordnen. Im 1H -NMR-Spektrum des 6-acetylierten Derivates **57a** fehlt ebenfalls das der 6-OH-Gruppe von **57** zugeordnete Signal, wodurch die Acetylierung der OH-Gruppe bestätigt wird.

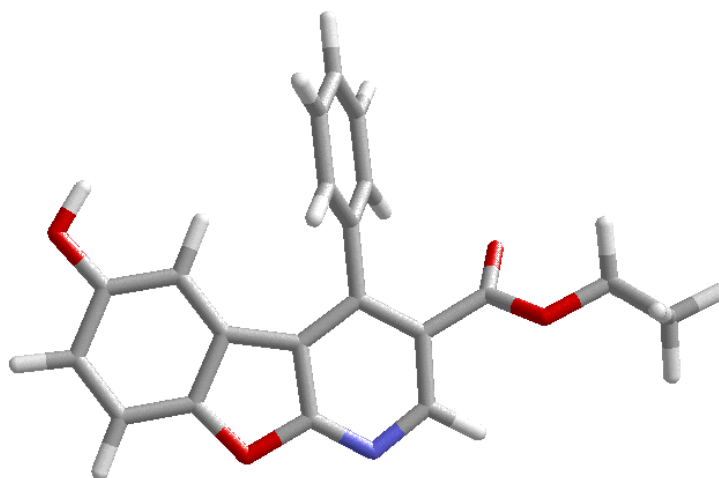


Abbildung 26: Energieminimiertes Modell von **8**.

4.3.1 Synthese der *N*-Acetyl-1,4-dihydrochinoline

Die *N*-Acetyl-1,4-dihydrochinoline **83a, b** waren analog zu den *N*-Acetyl-1,4-dihydropyridinen **6-9** durch Acetylierung am Ringstickstoff und nachfolgende regioselektive 4-Arylierung bzw. 4-Alkylierung mit den entsprechenden Grignard-reagenzien aus frisch destilliertem Chinolin in guten Ausbeuten zugänglich.

Beide Dihydrochinoline wurden aus Ether kristallisiert und charakterisiert. Im Gegensatz zu den 1,4-Dihydropyridinen sind in den ¹H-NMR-Spektren dieser Verbindungen keine unterschiedlichen Rotameren erkennbar; für die Protonen 2 und 8, die nahe an der *N*-Acetylgruppe liegen, ist nur je ein Signal vorhanden.

4.3.2 Produkte der Umsetzung von **83a, b** mit *p*-Benzochinon

83a, b wurden analog zu den 1,4-Dihydropyridinen in Dioxan und 5 % Perchlorsäure bei Raumtemperatur mit einer äquimolaren Menge *p*-Benzochinon umgesetzt. Der Reaktionsverlauf konnte per DC bis zur endgültigen Bildung der Reaktionsprodukte verfolgt werden. Nach Aufarbeitung und Charakterisierung der Produkte wurden allerdings nicht die erwarteten Zielverbindungen **91a, b** gefunden. Stattdessen wurden je zwei Produkte isoliert, die sich als die oxidierten 4-substituierten Chinoline **84a, b** sowie die 3-Hydrochinolylchinoline **86a, b** identifizieren ließen (*Abbildung 29*). Ein Großteil der *N*-Acetyl-1,4-dihydrochinoline wird der Zykoaddition somit bereits durch Oxidation zu **84a, b** entzogen. Außerdem bilden **83a, b** offensichtlich zwar mit *p*-Benzochinon die primären *Michael*-Addukte **85a, b**, allerdings werden diese zu **86a, b** oxidiert, bevor der Ringschluss stattfinden kann. Die *N*-Acetyl-1,4-dihydrochinoline sind offensichtlich wesentlich anfälliger für eine Oxidation als die *N*-Acetyl-1,4-dihydropyridine **6-9** und deren primäre Addukte mit *p*-Benzochinon, die durch die erweiterten Konjugationsmöglichkeiten der 3-Carbonylgruppe stabilisiert werden. Später synthetisierte 1,4-Dihydropyridine ohne 3-Carbonylfunktion (*Kapitel 5.1.1*) erwiesen sich ebenfalls als stark oxidationsempfindlich.

Im ¹H-NMR-Spektrum sind **86a, b** durch das Auftreten zweier Peaks für die Hydroxygruppen charakterisiert. Außerdem ist das Signal des 5-H von **86a** (7,59 ppm), verglichen mit **86b** (8,03 ppm), deutlich ins Hochfeld verschoben, was analog zu den 1-Aza-9-oxafluorenen **57** und **58** durch die abschirmende Wirkung des zur Molekülebene verdrehten 4-Phenylrings bedingt ist. Die Strukturen von **86a, b** wurden zusätzlich durch Acetylierung der Hydroxygruppen zu **87a, b** bestätigt.

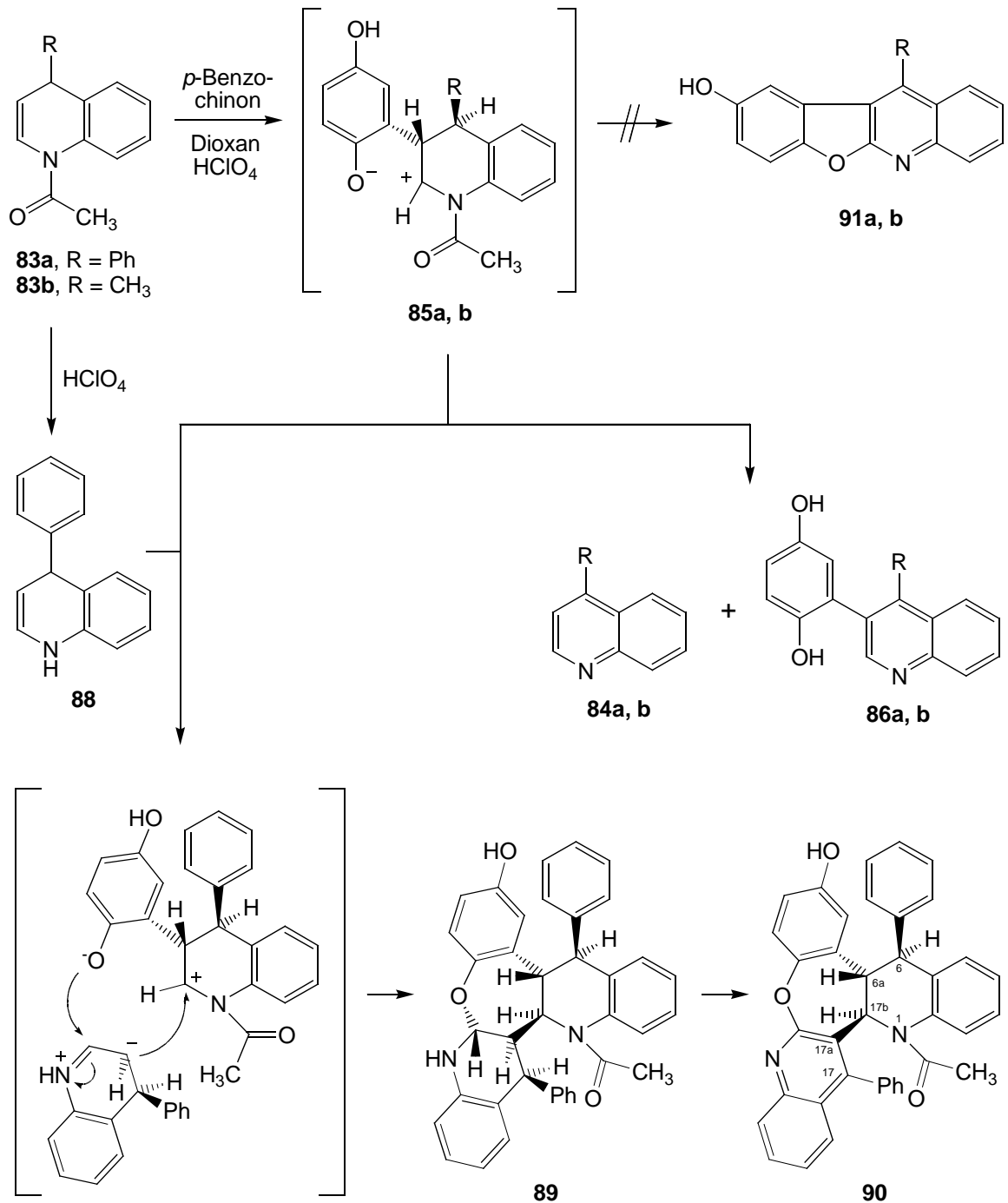


Abbildung 29: Produkte der Umsetzung von **83a, b** mit *p*-Benzoquinon.

Bei der Umsetzung von **83a** wurde zusätzlich das Nebenprodukt **90** als Benzoxepin, ein Additionsprodukt aus *p*-Benzoquinon und zwei Molekülen **83a**, identifiziert. Unter Säureeinwirkung wird aus **83a** das desacetylierte 4-Phenyl-1,4-dihydrochinolin **88** gebildet. Durch Angriff des C-3 von **83a** an **88** entsteht die Octahydroverbindung **89**, die danach durch überschüssiges *p*-Benzoquinon zu **90** oxidiert wird. Aufgrund seiner Oxidationsempfindlichkeit ist **89** sehr instabil und konnte lediglich massenspektrometrisch (EI-MS: m/z: 564 [M⁺]) nachgewiesen werden. Die Verknüpfung des Tetrahydrochinolins

mit dem Oxepinring konnte aufgrund der kleinen Kopplungskonstanten (${}^3J_{6a/17b} < 1$ Hz) des H-6a mit dem H-17b als *trans* bestimmt werden. Die Protonen H-6a und H-6 weisen ebenfalls eine *trans*-Kopplung (${}^3J_{6/6a} = 1,2$ Hz) auf.

Der Angriff des *p*-Benzochinons erfolgte somit an der sterisch ungehinderten Rückseite, der Angriff des C-3 von **88** an der Vorderseite des 1,4-Dihydrochinolins **83a**. Die Tatsache, dass die Tetrahydropartialstruktur von **90** nicht oxidiert wurde, bestätigt ebenfalls die *trans*-Verknüpfung, da das *p*-Benzochinon sterisch daran gehindert wird, nach Überlagerung mit der Tetrahydropartialstruktur als Oxidationsmittel zu wirken.

Es konnte gezeigt werden, dass die 4-substituierten *N*-Acetyl-1,4-dihydrochinoline ein anderes Reaktionsverhalten aufweisen als die *N*-Acetyl-1,4-dihydropyridine. Eine Vergrößerung des aromatischen Ringsystems erfordert somit eine veränderte Synthesestrategie. Da das Augenmerk zu diesem Zeitpunkt bereits auf der CDK-inhibitorischen Wirksamkeit der 1-Aza-9-oxafluorene lag (siehe *Kapitel 4.4.3*), wurde das Ziel, durch Strukturvariation interkalatorisch wirksame 1-Aza-9-oxafluorene zu finden, im Rahmen dieser Arbeit nicht weiter verfolgt.

4.4 Biologische Evaluierung der 1-Aza-9-oxafluorene

4.4.1 Untersuchung der zytostatischen Aktivität im NCI-Antitumor-Screen

Die 1-Aza-9-oxafluorene **55-58** wurden beim *National Cancer Institute* (NCI) in Bethesda, USA, auf ihre zytostatische Aktivität getestet. Das NCI setzt seit 1991 einen umfangreichen, standardisierten Antitumor-Screen ein, um neue potentielle Zytostatika schnell an einem breiten, repräsentativen Spektrum von Krebszelllinien auf ihre Aktivität hin zu untersuchen. Dieser Screen ermöglicht eine allgemeine Abschätzung der zytostatischen Wirksamkeit und gibt bereits Hinweise auf eine Selektivität für bestimmte Tumortypen⁵⁷.

4.4.1.1 Ergebnisse des Pre-Screenings

Um inaktive Verbindungen noch vor dem eigentlichen Screen zu erkennen, werden neue Testkandidaten zunächst an den Zelllinien NCI-H460 (Lunge), MCF7 (Brust) und SF-268 (ZNS) bei einer Konzentration von 10^{-4} M auf ihre zytostatische Aktivität getestet. Substanzen, welche das Wachstum mindestens einer dieser drei Zelllinien auf 32 % oder weniger reduzieren können, rechtfertigen eine genauere Charakterisierung im kompletten Antitumor-Screen. Mit dieser Methode können nach Aussage des NCI 95 % der aktiven Verbindungen identifiziert werden⁵⁷. **55**, **57** und **58** qualifizierten sich demnach für den kompletten NCI-Screen; **56** wies hingegen ebenso wie das an der 6-Hydroxygruppe acetylierte Derivat **57a** keine ausreichende Aktivität auf. **56** und **57a** wurden daher nicht im vollständigen Screen untersucht.

Tabelle 5: Wachstum der Zelllinien nach 48 h Inkubation mit den Testverbindungen [%]
negative Werte weisen auf eine zytotoxische Wirkung hin

	<i>NCI-H460</i>	<i>MCF7</i>	<i>SF-268</i>	<i>Einstufung des NCI</i>
55	80	46	31	aktiv
56	33	39	39	nicht aktiv
57	-5	14	-1	aktiv
58	33	41	26	aktiv

4.4.1.2 Ergebnisse des NCI-Antitumor-Screens

Zum Zeitpunkt dieser Arbeiten umfasste der NCI-Antitumor-Screen 60 humane Krebszelllinien. Alle Substanzen wurden in einem fünf Zehnerpotenzen umfassenden Konzentrationsbereich (10^{-4} bis 10^{-9} M) an allen Zelllinien getestet. Die Quantifizierung der zytostatischen oder zytotoxischen Aktivität erfolgte mittels eines Sulforhodamin-B-Assays. Die verwendeten Zelllinien und die Testmethodik werden in Veröffentlichungen des NCI ausführlich beschrieben^{57,58,59}.

Aus den im Screen ermittelten Daten werden vom NCI für jede der 60 Zelllinien die Kennwerte GI_{50} (Verringerung des Zellwachstums auf 50 %), TGI (totale Unterbindung des Zellwachstums) und LC_{50} (Zellüberlebensrate von 50 %) errechnet. Um eine Vergleichbarkeit zwischen den Testverbindungen zu ermöglichen, wird zusätzlich für jeden der drei Kennwerte der MG_MID als Mittelwert der log-Werte berechnet. Nicht sensitive Zelllinien gehen bei der Berechnung des MG_MID mit der höchsten getesteten Substanzkonzentration (in diesem Falle 10^{-4}) ein.

Die drei getesteten Substanzen weisen auf der GI_{50} -Ebene ein differenziertes Inhibitionsprofil auf. Während **55** auf nur 23 der 60 Zelllinien antiproliferativ wirkt, hemmen **57** und **58** 49 bzw. 58 der 60 Zelllinien im Wachstum. Die log GI_{50} -Werte sind für die sensitivsten Zelllinien im Vergleich zum MG_MID in *Tabelle 6* aufgeführt. Auf der TGI- und LC_{50} -Ebene weisen die 1-Aza-9-oxafluorene hingegen nur wenig oder keine Aktivität auf (Daten im Anhang).

Tabelle 6: log GI_{50} -Werte der sensitivsten Zelllinien

	MG_MID	IGROVI	SNB-75	MOLT-4	RPMI-8226	KM12	NCI/ADR-RES
55	-4,12	-4,06	-4,59	-4,32	> -4	-4,15	-4,38
57	-4,52	-5,60	-4,78	-5,13	-5,06	-5,29	-5,32
58	-4,53	-5,30	-5,59	-4,72	-4,73	-4,39	-4,71

Die Ergebnisse zeigen, dass der 4-Phenylsubstituent wesentlich zur antiproliferativen Wirksamkeit der 1-Aza-9-oxafluorene beiträgt, da das 4-Methylderivat **56** bereits beim Pre-Screen als inaktiv bewertet wurde und der analoge 3-Ethylester **55** mit einem MG_MID von -4,12 nur sehr schwach wirksam ist, während die 4-Phenylderivate im Vergleich mit -4,52 (**57**) und -4,53 (**58**) eine deutlich erhöhte zytostatische Wirksamkeit aufweisen.

4.4.1.3 COMPARE-Analyse des *mean graph*

Das NCI bereitet die log GI₅₀-Werte zusätzlich in Form des sogenannten *mean graph* graphisch auf⁶⁰. Dazu werden alle log GI₅₀-Werte als positive oder negative Abweichung vom Mittelwert, welcher dem MG_MID entspricht, aufgetragen. Der *mean graph* stellt einen „Fingerabdruck“ der getesteten Verbindungen dar, aus dem sich wertvolle Informationen ableiten lassen. Während die einzelnen GI₅₀-Werte lediglich ein Maß für die zytostatische oder zytotoxische Wirksamkeit in den entsprechenden Zelllinien darstellen, enthält das Muster aller 60 GI₅₀-Werte einer Verbindung Informationen über ihre molekularen Targets und die Wirk- und Resistenzmechanismen⁶¹.

Zur Analyse des *mean graph* wurde vom NCI der COMPARE-Algorithmus entwickelt. COMPARE ist ein Mustererkennungsalgorithmus, der den *mean graph* einer beliebigen Substanz mit den *mean graphs* aller Substanzen in den Datenbanken des NCI korreliert und eine Rangliste nach dem Grad der Ähnlichkeit erstellt⁶⁰. COMPARE ermittelt dazu den Pearson'schen Korrelationskoeffizienten (PCC) mit Werten von -1,0 für keinerlei

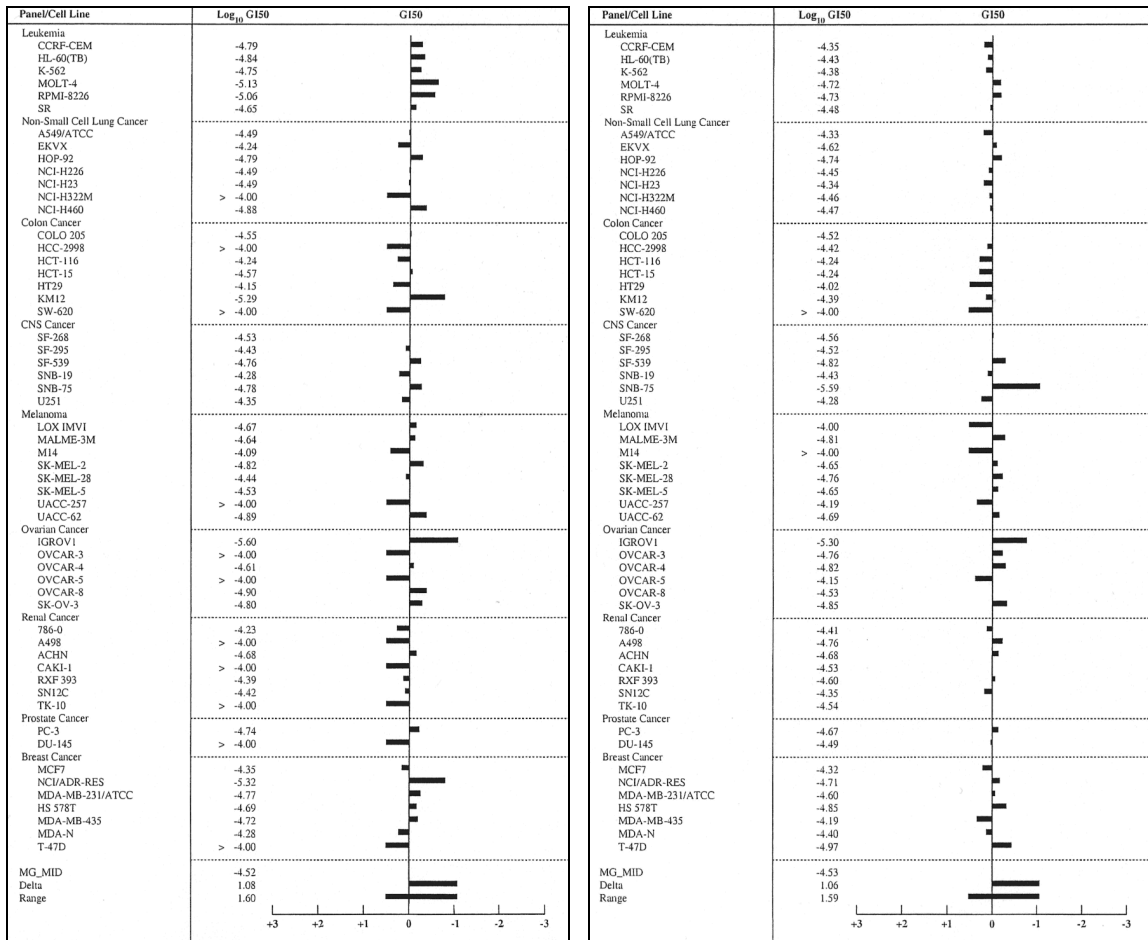


Abbildung 30: GI₅₀-mean-graphs der Verbindungen 57 (links) und 58 (rechts).

Ähnlichkeit bis 1,0 für absolute Übereinstimmung. Der Nutzen von COMPARE besteht darin, dass chemisch verschiedene Substanzen mit ähnlichem biochemischem Wirkmechanismus identifiziert werden können, auch wenn das molekulare Target an sich unbekannt ist⁶². Koeffizienten mit Werten $> 0,6$ weisen auf Gemeinsamkeiten beim Wirkmechanismus der verglichenen Substanzen hin⁶³.

COMPARE ist als Java-Applet auf der Internetseite des NCI⁶⁴ frei zugänglich. Als Ausgangspunkt der Suche wurden die GI_{50} -Werte von **58**, der Substanz mit dem besten MG_MID, in die Eingabemaske des Applets eingetragen. Als Vergleichsdatenbanken wurden die *standard agents database*, eine Sammlung von 555 bekannten Zytostatika, und die *synthetics database*, eine Datenbank, die zu diesem Zeitpunkt etwa 43000 vom NCI im Antitumor-Screen getestete Verbindungen umfasste⁶⁴, durchsucht. COMPARE lieferte die Ergebnisse in Form nach Höhe des PCC sortierter Ranglisten (Tabelle 7). Da der beste PCC der *standard agents database* nur 0,503 betrug, wurden diese Ergebnisse nicht näher untersucht. Die 5 besten Treffer in der *synthetics database* wiesen hingegen alle einen PCC von $> 0,6$ auf.

Tabelle 7: Ergebnisse der COMPARE-Analyse

<i>synthetics database</i>		<i>standard agents database</i>	
NCI-Nummer	PCC	NCI-Nummer	PCC
NSC 675799	0,687	NSC 366241	0,503
NSC 634793	0,650	NSC 267213	0,469
NSC 692368	0,638	NSC 226080	0,429
NSC 627746	0,638	NSC 602668	0,423
NSC 691827	0,638	NSC 73754	0,423

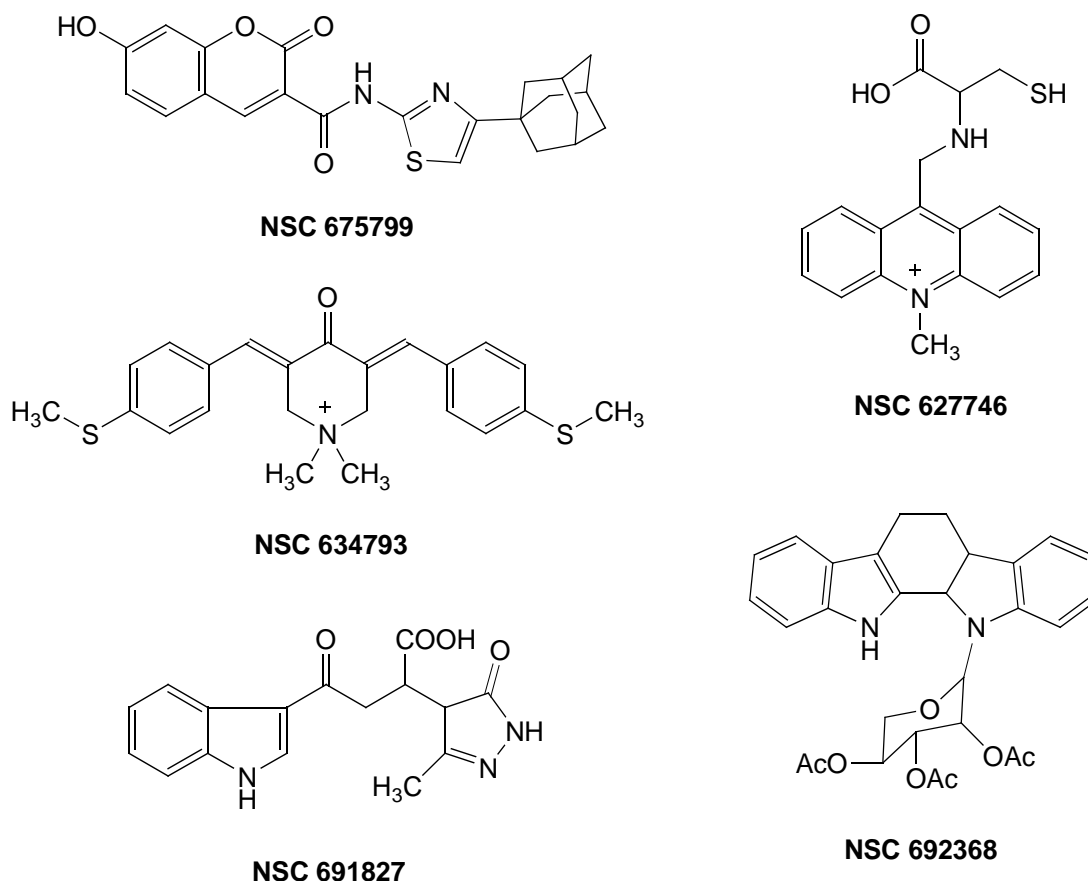


Abbildung 31: Verbindungen mit den höchsten PCC-Werten in der COMPARE-Analyse der „synthetics database“.

Für das 7-Hydroxycumarinderivat NSC 675799 und das 3-substituierte Indol NSC 691827 werden in den zugehörigen Veröffentlichungen keine Angaben zum Mechanismus der zytostatischen Wirksamkeit gemacht. NSC 634793 gehört zu einer Serie zytostatisch aktiver 3,5-Bisarylidene-1-methyl-4-piperidone, für die DNA-bindende Eigenschaften beschrieben wurden^{65,66}. NSC 692368 ist ein Indolo[2,3a]carbazolglykosid aus der Klasse der Rebeccamycine. Verbindungen dieser Stoffklasse wurden als DNA-Interkalatoren, Topoisomeraseinhibitoren und Inhibitoren der Proteinkinase C beschrieben⁶⁷. Aus dieser Gruppe und den mit ihnen strukturell eng verwandten Indolo[2,3-a]pyrrolo[3,4-c]carbazolen und Bisindolylmaleinimiden stammen eine ganze Reihe potenter, unspezifischer Kinaseinhibitoren wie Staurosporin oder UCN-01 (siehe *Kapitel 2.1.1.2*)^{6,32,68}. NSC 627746 ist Teil einer Gruppe zytostatisch aktiver 9-Aminomethyl-10-methylacridinium-Derivate⁶⁹. Auch diese Stoffklasse zählt zu den DNA-Interkalatoren⁷⁰.

Aufgrund dieser Ergebnisse wurden mögliche DNA-bindende und kinaseinhibitorische Eigenschaften als Mechanismen der zytostatischen Aktivität der 1-Aza-9-oxafluorene untersucht.

4.4.2 Untersuchung auf DNA-bindende Eigenschaften im Ethidiumbromid-Verdrängungs-Assay

Um neue Verbindungen auf ihre DNA-Bindungseigenschaften zu untersuchen, bieten sich zunächst optische Methoden aufgrund ihrer einfachen Durchführbarkeit an⁷¹. Als Standardmethode für eine erste Evaluierung potentieller DNA-Liganden hat sich der Ethidiumbromid-Verdrängungs-Assay etabliert^{72,73,74}. Ethidiumbromid, ein Farbstoff, der seit den 50er Jahren zur Bekämpfung von Trypanosomeninfektionen bei Rindern eingesetzt wird, bildet durch Interkalation in die Nukleinsäuren einen Komplex, dessen Fluoreszenzintensität jene der freien Substanz um ein Vielfaches übertrifft⁷⁵. In Gegenwart anderer DNA-Liganden wird Ethidiumbromid kompetitiv aus diesem Komplex verdrängt. Die Substanzkonzentration, die zu einer Verringerung der Fluoreszenzintensität um 50 % führt, ist als c_{50} definiert und ist indirekt proportional zur scheinbaren Bindungskonstante K_{app} der untersuchten Substanz. Kleinere c_{50} -Werte weisen somit auf eine höhere DNA-Affinität hin⁷⁶.

Der Assay wurde nach Literaturangaben⁷⁷ für die im NCI-Screen zytostatisch aktiven Substanzen **55**, **57** und **58** durchgeführt. Als Positivkontrolle wurde der DNA-Interkalator Ellipticin verwendet. Die Ergebnisse sind in *Abbildung 33* dargestellt.

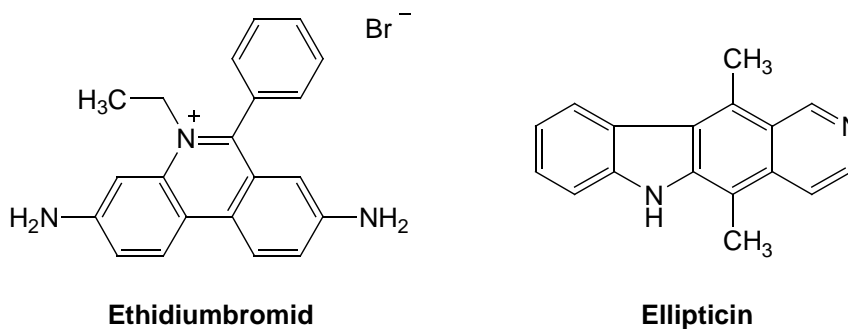


Abbildung 32: Strukturen der im Ethidiumbromid-Verdrängungs-Assay verwendeten DNA-Interkalatoren.

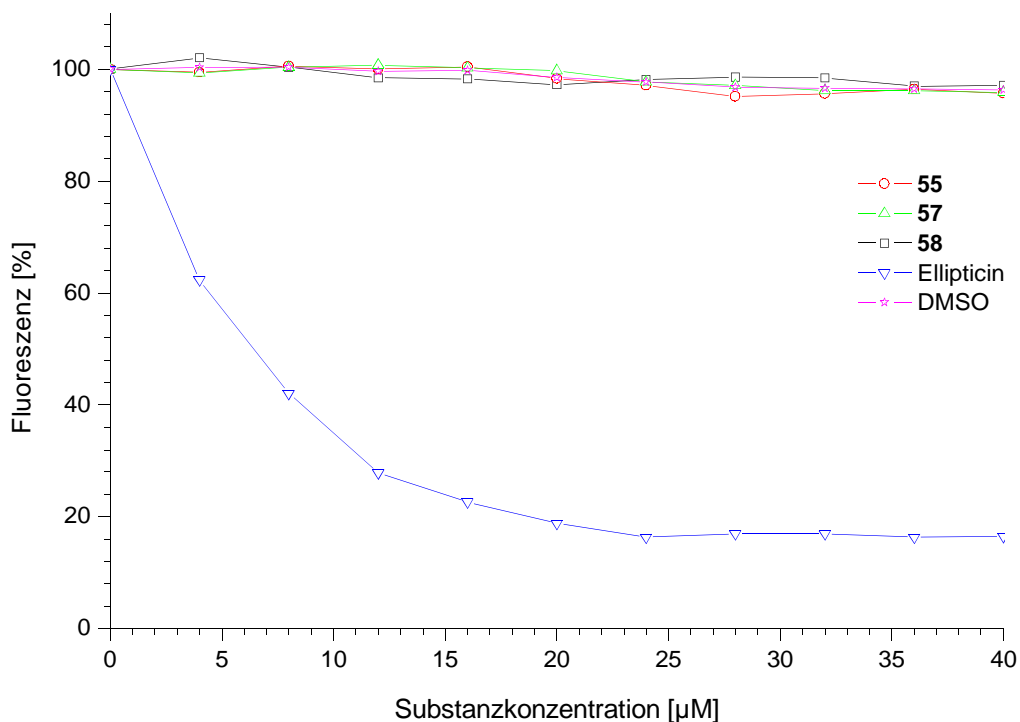


Abbildung 33: Ergebnisse des Ethidiumbromid-Verdrängungs-Assays.

Während Ellipticin die Fluoreszenzintensität in Übereinstimmung mit den Literaturangaben⁷⁶ bereits bei einer Konzentration von 6,5 µM auf 50 % verringerte, waren bei **55**, **57** und **58** lediglich Schwankungen im Rahmen der Messgenauigkeit und Verdünnungseffekte durch das zugesetzte Volumen der Testlösungen zu beobachten. DNA-bindende Eigenschaften konnten für die untersuchten 1-Aza-9-oxafluorene somit ausgeschlossen werden.

Gründe für die fehlenden DNA-Bindungseigenschaften sind darin zu suchen, dass die strukturellen Voraussetzungen für DNA-Interkalatoren, ein planares, carbo- oder heterocyclisches Ringsystem mit basischem Charakter⁷⁸, von den 1-Aza-9-oxafluorenen **55-58** nur zum Teil erfüllt werden. Zwar besitzen sie das für DNA-Interkalation nötige planar-aromatische Ringsystem und weisen durch den Ringstickstoff basische Eigenschaften auf, jedoch ist die Basizität des Stickstoffs aufgrund der vinylogenen Amidpartialstruktur, die sich durch die 3-Carbonylfunktion ergibt, als gering einzuschätzen. Auch die Anforderungen an *minor-groove*-bindende DNA-Liganden, welche meist eine flexible Seitenkette mit einem quarternären oder leicht protonierbaren Stickstoff besitzen⁷⁹, werden nicht erfüllt.

4.4.3 CDK-inhibitorische Eigenschaften der 1-Aza-9-oxafluorene

Nachdem für die 1-Aza-9-oxafluorene keine DNA-bindenden Eigenschaften nachweisbar waren, wurden die Verbindungen aufgrund des Ergebnisses der COMPARE-Analyse, in der neben DNA-Interkalatoren der Kinaseinhibitor NSC 692368 als Substanz mit dem dritthöchsten PCC ermittelt wurde (*Kapitel 4.4.1.3*), auf ihre Fähigkeit zur Inhibition von Proteinkinasen untersucht.

Die Verbindungen **55-58** wurden am *Centre National de la Recherche Scientifique* (CNRS, Roscoff, Frankreich) an der für den Zellzyklus wichtigen CDK1 getestet (*Tabelle 8*). Sowohl die 4-Methylverbindungen **55** und **56**, als auch das 6-acetylierte **57a** erwiesen sich dabei als inaktiv, die 4-Phenylverbindungen **57** und **58** wurden hingegen als Inhibitoren von CDK1/Cyclin B identifiziert. Um die Selektivität innerhalb der CDK-Familie abzuklären, wurden alle Verbindungen zusätzlich an CDK2, 4, 5, und GSK-3 β getestet. Im Vergleich mit anderen CDK1-Inhibitoren wie Kenpaullon⁸⁰ und Flavopiridol²⁹ sind **57** und **58** zwar schwächere Inhibitoren der CDK1, weisen aber innerhalb der CDK-Familie eine gewisse Selektivität für CDK1 neben einer deutlich schwächeren Wirkung für CDK5/p25 auf. Diese Präferenz für CDK1 gegenüber CDK2 und 4 ist durchaus bemerkenswert, da bisher nur wenige Inhibitoren mit CDK1-Selektivität beschrieben wurden⁴.

Tabelle 8: CDK-inhibitorische Eigenschaften der 1-Aza-9-oxafluorene, IC₅₀ [μ M]

	CDK1/B	CDK2/A	CDK4/D	CDK5/p25		GSK-3 β	MG_MID
Flavopiridol ^c	0,2-0,4	0,1	0,4	0,17	-	0,45	-7,2
Kenpaullon ^c	0,4	0,68	> 100	0,85	-	0,02	-4,3
55	> 100	> 100	> 100	- ^a	3 % ^d	> 100	-4,1
56	> 100	> 100	> 100	- ^a	10 % ^d	> 100	- ^b
57	28,8	> 100	> 100	- ^a	6 % ^d	> 100	-4,5
58	4,2	> 100	> 100	47,4	15 % ^d	> 100	-4,5
57a	> 100	- ^a	- ^a	- ^a	n.a. ^e	> 100	- ^b

^a IC₅₀-Werte wurden nicht bestimmt

^b Substanz qualifizierte sich nicht für den NCI-Antitumor-Screen

^c Daten aus der Literatur^{80,29}

^d % Inhibition bei 10 μ M

^e nicht aktiv

4.5 Zwischenfazit

Im ersten Teil der Arbeit ist es gelungen, eine erste Serie neuartiger 3,4-substituierter 6-Hydroxy-1-aza-9-oxafluorene darzustellen. Die Verbindungen wurden als eine neue Klasse zytostatisch aktiver Verbindungen identifiziert, als deren Wirkungsmechanismus überraschend eine selektive Inhibition der am Zellzyklus beteiligten CDK1 gefunden wurde. DNA-interkalatorische Eigenschaften, die zunächst vermutet wurden, konnten ausgeschlossen werden.

Sowohl im NCI-Antitumor-Screen als auch bei der CDK-Testung erwiesen sich die 4-Methylverbindungen **55** und **56** sowie das 6-acetylierte Derivat **57a** als nur sehr schwach wirksam bis wirkungslos. Im Umkehrschluss bedeutet dies, dass der 4-Phenylsubstituent und die 6-Hydroxygruppe wichtige Strukturmerkmale für die biologische Wirksamkeit der 1-Aza-9-oxafluorene darstellen. Diese Beobachtung steht im Einklang mit der Tatsache, dass CDK-Inhibitoren hauptsächlich durch hydrophobe Wechselwirkungen und Wasserstoffbrückenbindungen an die ATP-Bindungsregion binden. Im Falle der 1-Aza-9-oxafluorene stellt der 4-Phenylring demnach vermutlich eine für die Bindung wichtige hydrophobe Moleküldomäne dar, während die 6-Hydroxygruppe als H-Brückendonator und die 3-Carbonylfunktion als H-Brückenakzeptor fungieren.

In den sich anschließenden Arbeiten sollten weitere Vertreter dieser Verbindungsklasse unter Beibehaltung der für die Wirksamkeit nötigen Strukturmerkmale an mehreren Positionen variiert werden, um Struktur-Wirkungsbeziehungen ableiten und die Richtung für künftige strukturelle Modifikationen vorgeben zu können.

5 Strukturell variierte 1-Aza-9-oxafluorene

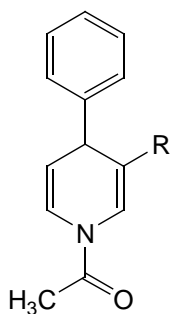
5.1 Synthese der Verbindungen

5.1.1 Variation des 3-Substituenten

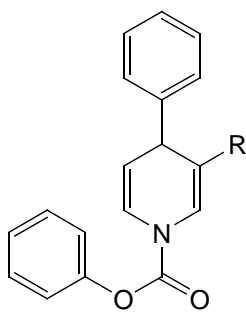
Im zweiten Teil der synthetischen Arbeiten sollte das Substitutionsmuster der 1-Aza-9-oxafluorene variiert werden. Das Hauptaugenmerk lag zunächst auf der Einführung verschiedener elektronenschiebender und -ziehender Substituenten an Position 3, um die Möglichkeiten der Bildung von Wasserstoffbrücken und die Basizität des Ringstickstoffs zu verändern. Grundsätzlich folgte die Darstellung der neuen Verbindungen der in 4.1 beschriebenen Strategie. Die Vorgehensweisen zur Darstellung der einzelnen Verbindungsgruppen sowie deren Charakterisierung werden im Folgenden dargelegt.

Tabelle 9: Substitutionsmuster der in 5.1.1 dargestellten Verbindungen

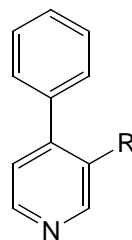
Verbindung				R
10	27	-	59	-COOCH ₃
11	-	45	60	-CH ₃
12	29	46	61	-OCH ₃
13	30	47	62	-OC ₂ H ₅
14	31	48	63	-OBn
-	-	-	64	-OH
-	25	49	65	-Br
-	26	50	66	-Cl
15	28	51	67	-CON(CH ₃) ₂
-	-	-	68	-CONHCH ₃
-	-	-	69	-CONH ₂



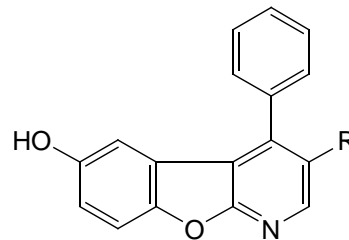
10-15



25-31



45-51



59-69

5.1.1.1 3-Methyl-, 3,6-Dihydroxy- und 3-Alkyloxyderivate

5.1.1.1.1 Synthese der Pyridingrundkörper

Zur Synthese des geplanten 3,6-Dihydroxy-1-aza-9-oxafluorens **64** musste zunächst das als Ausgangsstoff verwendete 3-Hydroxypyridin mit einer Schutzgruppe versehen werden, da das azide Proton der 3-Hydroxygruppe andernfalls den bevorzugten Angriffspunkt bei der Umsetzung mit einer Grignardverbindung darstellen würde⁸¹. Als Schutzgruppe wurde eine Benzylgruppe gewählt, da diese zum einen sehr leicht wieder entfernbar ist und zum anderen die Gruppe der 3-Alkyloxyderivate durch den voluminösen 3-Benzyloxy-substituenten in **63** sinnvoll erweitert wird. Die Darstellung von 3-Benzyloxy-pyridin (**2**) gelang nach Literaturvorgaben⁴⁹ durch Umsetzung von 3-Hydroxypyridin mit Benzylchlorid in THF unter Phasentransferbedingungen. Die Ausbeute entsprach mit 59 % den Literaturvorgaben. Unter den gleichen Bedingungen konnte unter Verwendung von Ethylbromid auch 3-Ethoxy-pyridin (**1**) mit einer Ausbeute von 78 % erhalten werden.

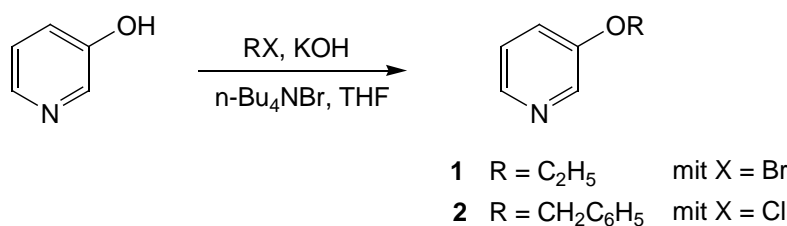
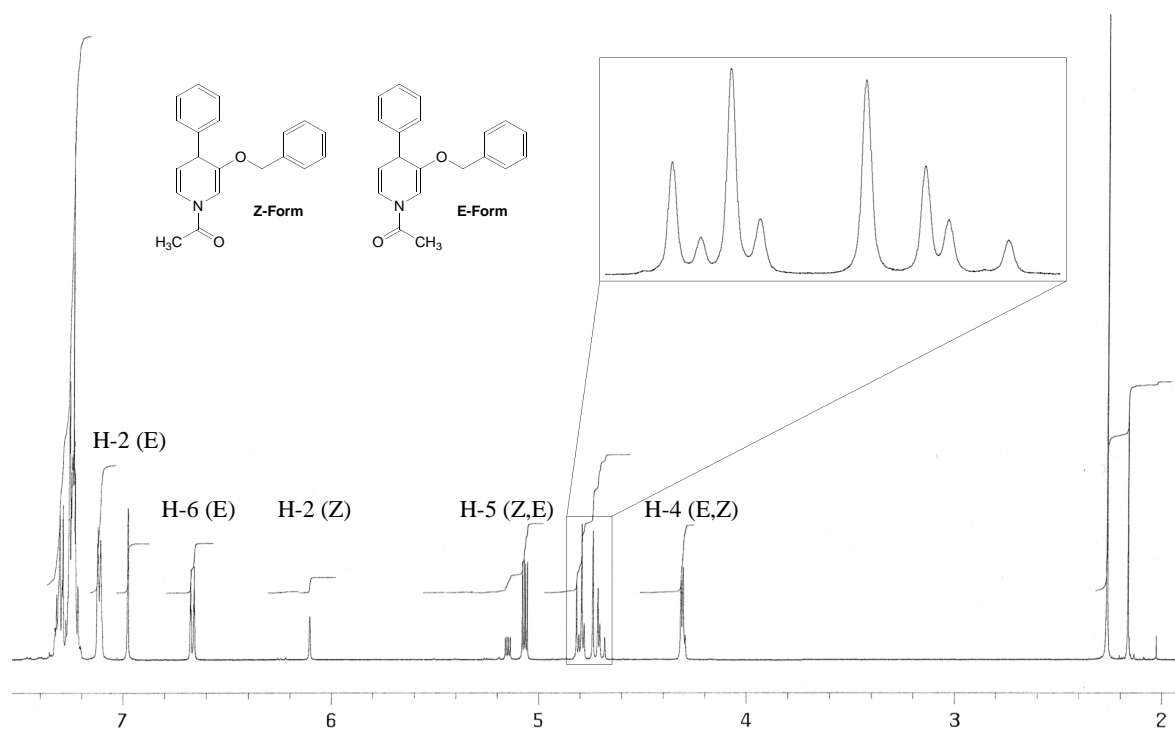


Abbildung 34: Alkylierung von 3-Hydroxypyridin.

5.1.1.1.2 Darstellung der 1,4-Dihydropyridine 11-14

Die 3-Alkyloxy-1,4-dihydropyridine **12-14** und das 3-Methylderivat **11** konnten analog zu der in Kapitel 4.1.1 beschriebenen Vorgehensweise synthetisiert werden. Abweichend von den Umsetzungen mit Ethylnikotinat und 3-Acetylpyridin weist das intermediär durch die N-Acylierung der 3-Alkyloxy-pyridine gebildete Pyridiniumsalz eine dunkelrote Farbe auf, die nach der 4-Arylierung mit Phenylmagnesiumchlorid wieder verschwindet. Durch diese optische Indikation des Reaktionsverlaufs kann der Grignard im Überschuss exakt bis zur vollständigen Umsetzung der Pyridiniumzwischenstufe zugegeben werden. Das Mengenverhältnis der gebildeten 4- und 6-phenylierten Produkte ist bei diesen Verbindungen von der Temperatur während der Zugabe des Grignards abhängig. Um die Regioselektivität der Grignardreaktion für Position 4 hoch zu halten, erwies es sich als vorteilhaft, die Temperatur auf -20 °C zu senken. **11-14** ließen sich nach Aufarbeitung der Ansätze leicht aus Methanol kristallisieren, erwiesen sich aber im Gegensatz zu den

Dihydropyridinen mit 3-Carbonylfunktion **6-9** als sehr oxidationsempfindlich. Eine Lagerung bei Raumtemperatur führte innerhalb weniger Stunden zur kompletten Oxidation zu den entsprechenden Pyridinen **45-48**. Durch Aufbewahrung bei tiefen Temperaturen unter einer Argonatmosphäre blieben die Dihydropyridine dagegen über den gesamten Zeitraum dieser Arbeiten stabil. Die starke Oxidationsanfälligkeit lässt sich mit der durch den elektronenschiebenden Effekt des 3-Substituenten erhöhten Elektronendichte im Dihydropyridinring erklären. Zusätzlich fehlen im Vergleich zu **6-9** die stabilisierenden Möglichkeiten zur Mesomerie durch die fehlende 3-Carbonylfunktion. Diese elektronischen Effekte haben außerdem einen bemerkenswerten Einfluss auf das Erscheinungsbild der $^1\text{H-NMR}$ -Spektren der Verbindungen. Wie **6-9** sind **11-14** durch die Existenz von Rotameren gekennzeichnet (siehe *Kapitel 4.1.1*). Durch den Wegfall der vinylogenen Amidpartialstruktur besitzt die N-C-Bindung der N-Acetylgruppe in **11-14** einen höheren Doppelbindungscharakter als in **6-9**, was in einer reduzierten Beweglichkeit der N-Acetylgruppe resultiert. Die vom Abschirmeffekt der Carbonylgruppe betroffenen Protonen ergeben daher im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum statt der breiten unscharfen Singulets deutlich differenzierte Multipletts. Durch die schärfere Trennung der Signale sind auch die Signale des 3-Substituenten und der N-Acetylgruppe deutlich in zwei Peaks aufgespalten. *Abbildung 35* zeigt beispielhaft das $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von **14**. Besonders charakteristisch



*Abbildung 35: $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von **14** in CDCl_3 ; die AB-Systeme der Methylenprotonen der E- und Z-Formen sind vergrößert dargestellt.*

für die *N*-Acetyl-1,4-dihydropyridine ohne 3-Carbonylfunktion ist das zweifach vorhandene Doppeldublett von H-5 (**14**: 5,15 und 5,07 ppm). Die Methylenprotonen der 3-Benzylgruppe der Rotameren von **14** ergeben zwei AB-Systeme, die nach ihrer Integralhöhe den Rotameren zugeordnet werden können. Außerdem sind die AB-Systeme der Rotameren unterschiedlich charakterisiert. So beträgt die geminale Kopplungskonstante der Methylenprotonen bei der *Z*-Form $^2J_{AB} = 11,9$ Hz und das AB-System ist breiter ($\nu_0\delta = 0,10$ ppm) als das der *E*-Form ($\nu_0\delta = 0,07$ ppm, $^2J_{AB} = 11,8$ Hz).

5.1.1.1.3 Zykladdition zu den 1-Aza-9-oxafluorenen 60-63

Die erhöhte Oxidationsempfindlichkeit von **11-14** führte zu Veränderungen beim Ablauf der Zykladdition. Im Gegensatz zu den 1,4-Dihydropyridinen mit 3-Carbonylfunktion werden **11-14** im sauren Milieu durch *p*-Benzochinon sehr schnell oxidiert. Zwar gelingt die Zykladdition mit *p*-Benzochinon grundsätzlich, der größte Teil des eingesetzten Dihydropyridins wird der Zyklisierung jedoch durch die bevorzugt ablaufende Oxidation entzogen. Die Dihydropyridine waren in der Regel bereits nach 24 Stunden vollständig zu den Endprodukten umgesetzt, eine Zugabe von zusätzlichem *p*-Benzochinon war nicht nötig. Auch konnten keine Zwischenstufen der Zyklisierung isoliert oder dünnschichtchromatographisch beobachtet werden, was auf eine ebenfalls deutlich erleichterte Oxidation der Zwischenverbindungen hinweist. Das Methylderivat **60** konnte mit einer Ausbeute von etwa 10 % gewonnen werden, die Ausbeuten der Zykladdition zu **61-63** fielen aufgrund der deutlich stärker ausgeprägten Oxidationsempfindlichkeit von **12-14** sehr gering aus.

5.1.1.1.4 Debenzylierung von 63 zu 64

Durch hydrogenolytische Abspaltung des Benzylrestes mit Wasserstoff an Pd/Kohle bei Normaldruck konnte **63** problemlos innerhalb von zwei Stunden quantitativ zum 3,6-Dihydroxy-4-phenyl-1-aza-9-oxafluoren **64** umgesetzt werden.

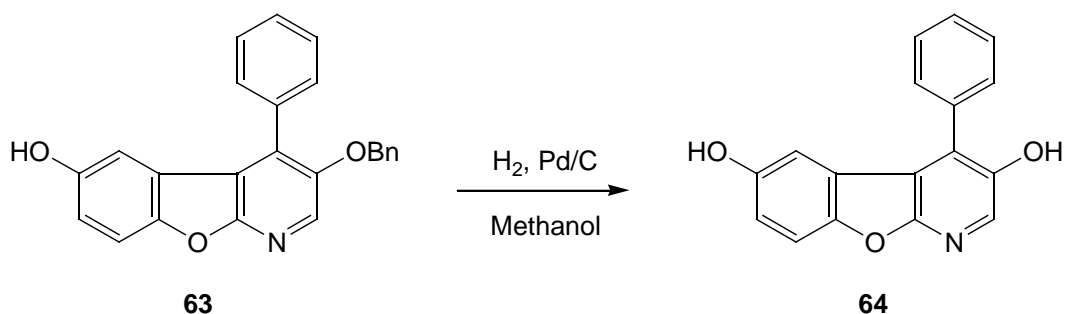


Abbildung 36: Debenzylierung von **63**.

5.1.1.2 Versuche zur Verbesserung der Ausbeuten durch Darstellung von *N*-Phenoxycarbonyl-1,4-dihydropyridinen

Um die Ausbeuten der Zykladdition zu verbessern, wurde versucht, die Oxidationsempfindlichkeit der 1,4-Dihydropyridine durch Einführung anderer *N*-Acylreste, welche den Dihydropyridinring durch erweiterte Konjugationsmöglichkeiten über einen größeren Molekülrest gegen Oxidation stabilisieren können, zu senken. *Comins* hatte bereits den Einfluss verschiedener Säurechloride auf die Regioselektivität und die Ausbeuten der Grignardaddition untersucht⁴⁴. Bei Verwendung von Pivaloylchlorid wurde nach Zugabe von Phenylmagnesiumchlorid lediglich die Bildung von *t*-Butylphenylketon beobachtet, eine Bildung des Pyridiniumsalzes fand nicht statt. Die Verwendung von Ethylchloroformiat führte zwar zur Bildung der gewünschten *N*-Ethoxycarbonyl-1,4-dihydropyridine, allerdings waren die Ausbeuten und Regioselektivität der Reaktion unbefriedigend. Als Säurechlorid der Wahl fand *Comins* Phenylchloroformiat, da die entsprechenden *N*-Phenoxycarbonyl-1,4-dihydropyridine in Ausbeuten von über 80 % erhalten wurden und eine stark erhöhte Stabilität gegenüber der Oxidation aufwiesen⁴⁴. Ein Großteil der in 5.1.1 und 5.1.2 benötigten Dihydropyridine wurde daher versuchsweise zusätzlich als *N*-Phenoxycarbonyl-1,4-dihydropyridine dargestellt. Die Ausbeuten dieser Synthesen übertrafen in der Regel 80 % und erreichten im Einzelfall über 90 %. Alle *N*-Phenoxycarbonyl-1,4-dihydropyridine erwiesen sich als sehr leicht handhabbar, da sie sehr gut aus Methanol kristallisieren und derart oxidationsstabil sind, dass sie auch bei Raumtemperatur ohne Schutzatmosphäre gelagert werden können. Allerdings erwiesen sich die *N*-Phenoxycarbonyl-1,4-dihydropyridine als ungeeignete Ausgangsstoffe für die Zykladdition. Einzig die Darstellung der 3-halogenierten Verbindungen **65** und **66** gelang aus **25** und **26**. Zwar wurden auch **25** und **26** zu einem Großteil durch *p*-Benzochinon oxidiert, jedoch erstreckte sich dieser Prozess über einen Zeitraum von mehreren Tagen und ergab die 1-Aza-9-oxafluorene **65** und **66** in Ausbeuten von nahezu 21 % bzw. 17 %. Die 3-Alkyloxyverbindungen **29-31** wurden hingegen durch *p*-Benzochinon vollständig zu den entsprechenden Pyridinen **12-14** oxidiert; Produkte der angestrebten Zykladdition konnten nicht gefunden werden. Die 3-Carbonylverbindungen waren zwar gegen die Oxidation durch *p*-Benzochinon stabil, ergaben allerdings unidentifizierbare, mit den verwendeten Methoden nicht trennbare Gemische aromatischer Substanzen. Mit hohem Aufwand konnten aus diesen Gemischen zwar Spuren der erwünschten 1-Aza-9-oxafluorene isoliert werden, die Ausbeuten lagen allerdings weit unter 1 % und damit deutlich unter den mit den *N*-Acetyl-1,4-dihydropyridinen erzielten. Es wurde versucht, durch Zugabe eines zwei- oder mehrfachen Überschusses von *p*-Benzochinon zu diesen

Ansätzen bessere Ergebnisse der Zykladdition zu erzielen. Dabei wurde die massive Bildung eines unerwünschten Hauptproduktes beobachtet, das nach Isolierung als Dibenzo[d,d']benzo[1,2-b;4,5-b']difuran-2,8-diol (**91**), ein Polymerisierungsprodukt aus drei Molekülen *p*-Benzochinon, identifiziert wurde. Die Bildung von **91** wurde bereits als ein Produkt der Polymerisierung von *p*-Benzochinon unter schwefelsaurer Katalyse beschrieben⁸².

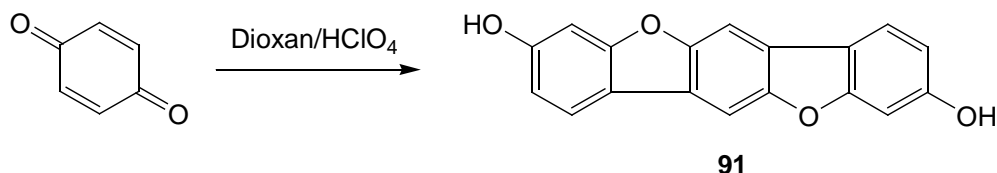


Abbildung 37: Polymerisierung von *p*-Benzochinon in Dioxan mit HClO_4 .

5.1.1.3 Synthese der Amide 67-69

Zunächst wurde versucht, das Dimethylamid **67** durch Zykladdition aus den entsprechenden *N*-Acetyl- bzw. *N*-Phenoxycarbonyl-dihydropyridinen **15** und **28** darzustellen. Allerdings konnte als Produkt der Umsetzung nur das Oxidationsprodukt *N,N*-Dimethyl-4-phenylnikotinsäureamid (**46**) gefunden werden. Erfolgversprechender schien eine Amidierung des bereits vorhandenen 3-Ethylesters **57** mit Ammoniak, Methylamin bzw. Dimethylamin. Versuchsweise wurde Nikotinsäureethylester zu Nikotinsäureamid (**5**), -methylamid (**4**) und -dimethylamid (**3**) umgesetzt. Diese Reaktionen waren nach wenigen Tagen nahezu quantitativ abgeschlossen. **57** wurde daher unter gleichen Bedingungen umgesetzt. **68** konnte bereits nach 4 Tagen in einer Ausbeute von 65 % isoliert werden. Die Umsetzungen zu **67** und **69** erstreckten sich über mehrere Wochen und ergaben befriedigende Ausbeuten von 39 und 48 %.

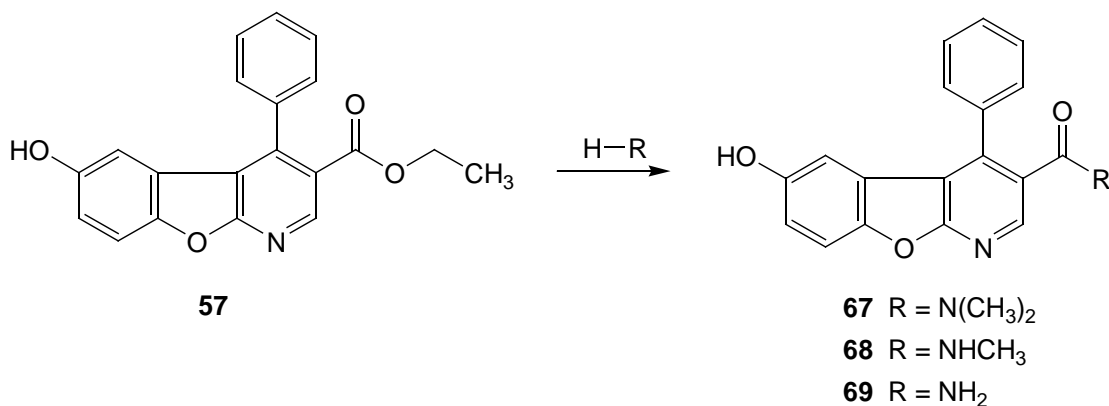


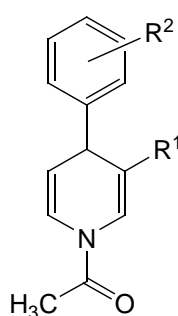
Abbildung 38: Darstellung der Amide **67-69** aus **57**.

5.1.2 Einführung von Substituenten in den 4-Phenylring

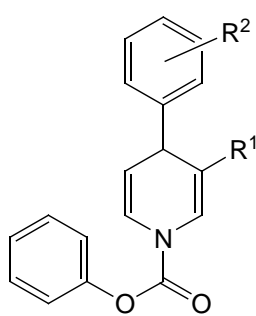
Da CDK- und GSK-3-Inhibitoren hauptsächlich durch hydrophobe Wechselwirkungen und Wasserstoffbrücken an die ATP-Bindungsregion der Kinasen binden¹⁷, sollten die Möglichkeiten zur Ausbildung dieser Wechselwirkungen durch systematische Einführung von 2'-Methoxy-, 4'-Methoxy- und 4'-Methyl-Substituenten in den 4-Phenylsubstituenten der als CDK-Inhibitoren identifizierten Verbindungen variiert werden. Zu Beginn der Planungen dieser Arbeiten lagen die Ergebnisse der CDK-Hemmung der Verbindungen **55-62** vor. Als Leitstrukturen wurden daher die CDK1-Inhibitoren **57** und **58** sowie das CDK5/GSK-3 β inhibitorische Derivat **60** ausgewählt.

Tabelle 10: Substitutionsmuster der in 5.1.2 dargestellten Verbindungen

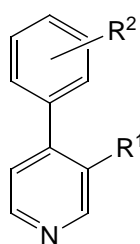
Verbindung				R^1	R^2
16	32	52	70	-OCH ₃	4'-CH ₃
17	33	53	71		4'-OCH ₃
18	34	54	72		2'-OCH ₃
19	35	-	73	-COCH ₃	4'-CH ₃
20	36	-	74		4'-OCH ₃
21	37	-	75		2'-OCH ₃
22	38	-	76	-COOC ₂ H ₅	4'-CH ₃
23	39	-	77		4'-OCH ₃
24	40	-	78		2'-OCH ₃



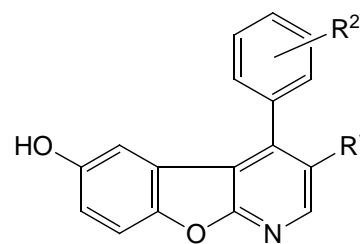
16-24



32-40



52-54



70-78

Die Synthese der *N*-Acetyl-1,4-dihydropyridine **16-24** gelang analog zu den bereits in 4.1.1 und 5.1.1 beschriebenen Verbindungen mit vergleichbaren Ausbeuten. Zur Einführung des substituierten 4-Arylrestes wurden *p*-Tolylmagnesiumchlorid bzw. *p*-Methoxyphenyl- und *o*-Methoxyphenylmagnesiumbromid in Form kommerziell erhältlicher Lösungen eingesetzt. Aus **16-24** waren durch Zykladdition die 1-Aza-9-oxafluorene **70-78** mit

vergleichbaren Ausbeuten zugänglich. Wie bei der Umsetzung der in 5.1.1 beschriebenen *N*-Acetyl-1,4-dihydropyridine mit 3-Alkyloxyfunktion wurde auch bei der Zykladdition von **16-19** primär deren Oxidation zu den Pyridinen **52-54** beobachtet.

Die Synthese der *N*-Phenoxycarbonyl-1,4-dihydropyridine **32-40** gelang zwar wiederum in deutlich besseren Ausbeuten, jedoch konnte wie in den Versuchen zuvor (*Kapitel 5.1.1.2*) keine Zykladdition mit *p*-Benzochinon erreicht werden.

Die spektroskopischen Eigenschaften der neuen Verbindungen entsprechen denen der analogen 4-Phenylverbindungen. Als Differenzierungsmerkmale dienten die Aufspaltungsmuster der Protonensignale des 4-Aromaten im ¹H-NMR-Spektrum, die bei den 4'-substituierten Verbindungen ein AA'BB'-System und bei den 2'-substituierten das typische Aufspaltungsmuster in zwei Doppeldoublets und zwei Dreifachdoublets ergeben.

5.2 CDK-Testung

5.2.1 Ergebnisse der Kinaseinhibitionsassays

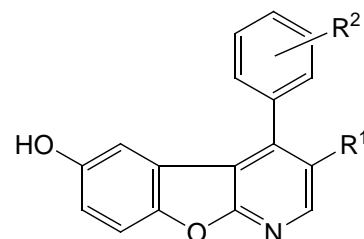
Die neuen 1-Aza-9-oxafluorene wurden wie die Verbindungen der ersten Serie (Kapitel 4.4.3) auf ihre inhibitorische Aktivität an den CDKs 1, 2, 4, 5 und GSK-3 β getestet (Tabelle 11). Zum Zeitpunkt des Abschlusses der synthetischen Arbeiten am zuletzt fertiggestellten Teil der Verbindungen stand das bis dahin genutzte Testsystem am CNRS, in welchem die bisherige Testung für CDK1, CDK5 und GSK-3 β erfolgte, nicht mehr zur Verfügung. Die Bestimmung der kinaseinhibitorischen Eigenschaften dieser Substanzen wurde daher von der ProQuinase GmbH mit dem proprietären ³³PanQuinase[®]-Assay vorgenommen. Auf diese Ergebnisse wird später näher eingegangen (Tabelle 12).

Tabelle 11: CDK-inhibitorische Eigenschaften der 1-Aza-9-oxafluorene, IC₅₀ [μ M]

	CDK1/B	CDK2/A	CDK4/D	CDK5/p25	GSK-3 β	R ¹	R ²
59	> 10 ^a	> 10 ^a	> 10 ^a	> 10 ^a	> 10 ^a	-COOCH ₃	-
60	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100	-CH ₃	-
61	12	80	> 100	8,1	3,9	-OCH ₃	-
62	11	> 100	> 100	5,8	4,6	-OC ₂ H ₅	-
63	> 100	64	> 100	> 100	7,3	-OBn	-
64	0,64	> 100	> 100	1,4	1,1	-OH	-
65	> 100	3,2	28,7	> 100	> 100	-Br	-
66	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100	-Cl	-
68	15	> 100	> 100	45	15	-CONHCH ₃	-
76	> 10 ^a	> 10 ^a	> 10 ^a	> 10 ^a	> 10 ^a	-COOC ₂ H ₅	4'-CH ₃
77	8	> 100	> 100	20	12	-COOC ₂ H ₅	4'-OCH ₃
78	42	> 100	> 100	> 100	> 100	-COOC ₂ H ₅	2'-OCH ₃

^a Löslichkeitsprobleme bei Konzentrationen über 10 μ M

^d % Inhibition bei 10 μ M



Wie erwartet besitzt der 3-Substituent einen erheblichen Einfluss auf die inhibitorischen Eigenschaften der 1-Aza-9-oxafluorene, der auf die unterschiedlichen Möglichkeiten zur Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen und die Veränderung der Basizität des Ringstickstoffs durch elektronenziehende bzw. -schiebende Effekte entsprechender funktioneller Gruppen zurückgeführt werden kann. Das 3-Methylderivat **60**, das im Gegensatz zu den aktiven Verbindungen der ersten Serie mit 3-Carbonylfunktion keine zusätzlichen Möglichkeiten zur Wasserstoffbrückenbindung besitzt, wies keinerlei inhibitorische Aktivität auf. Die Einführung eines kurzen 3-Alkyloxysubstituenten in **61** und **62**, der einen schwachen Wasserstoffbrückenakzeptor darstellt und durch seinen +M-Effekt die Elektronendichte im Ring und die Basizität des Ringstickstoffs erhöht, resultierte hingegen in einer Inhibition von CDK1, CDK5 und GSK-3 β . Die Erhöhung der Fähigkeit zur H-Brückenbildung durch Austausch der Alkyloxy- gegen eine Hydroxy-Gruppe im 3,6-Dihydroxyderivat **64** bewirkt eine weitere Steigerung der inhibitorischen Potenz. Mit IC₅₀-Werten für CDK1, 5 und GSK-3 β um 1 μ M ist **64** somit das am stärksten CDK-inhibitorisch aktive 1-Aza-9-oxafluoren. Die Verlängerung der 3-Alkyloxyfunktion zum Benzyloxysubstituenten bewirkt überraschend einen Wirkungsverlust für CDK1 und 5, während die GSK3-inhibitorische Wirkung bestehen bleibt. Diese Präferenz für GSK-3 β gegenüber den CDKs ist möglicherweise durch sterische Gründe oder zusätzliche hydrophobe Wechselwirkungen der 3-Benzyloxygruppe in der ATP-Bindungstasche von GSK-3 β bedingt. Der Austausch der Ester- gegen eine Methylamidfunktion in **68** bewirkt, verglichen mit **57**, eine leichte Steigerung der Hemmung von CDK1 und erweitert das Wirkspektrum ebenfalls auf CDK5 und GSK-3 β .

Interessant ist das Ergebnis der Verbindungen mit direkt an den Aromaten gebundenen Halogenen. Während die 3-Chlorverbindung **66** nicht aktiv ist, inhibiert das 3-Bromderivat **65** CDK2 und 4 mit IC₅₀-Werten von 3,2 und 28,7 μ M. Dies ist insofern bemerkenswert, da diese Kinasen von keinem der übrigen 1-Aza-9-oxafluorene in bedeutendem Maße gehemmt werden.

Auch für die Einführung von Substituenten in den 4-Phenylring von **57** konnte ein Einfluss auf die inhibitorische Wirkung gefunden werden. Die Einführung einer Methoxygruppe in 2'-Position erwies sich als nachteilig, da **78** CDK1 schwächer zu inhibieren vermag als die 2'-unsubstituierte Verbindung. Dagegen weist die 4'-Methoxyverbindung **77** für die Inhibition von CDK1 einen IC₅₀-Wert von 8 μ M auf und hemmt zusätzlich auch CDK5 und GSK-3 β mit IC₅₀-Werten von 20 und 12 μ M.

Der Einfluss der Einführung der 4'-Methylfunktion in **76** sowie der Verkürzung des

3-Ethylesters zum Methylester **59** konnte nicht ermittelt werden, da bei beiden Verbindungen Löslichkeitsprobleme auftraten, die keine Konzentrationen über 10 μM zuließen.

Tabelle 12: IC_{50} -Werte [μM] der CDK-Inhibition der im $^{33}\text{PanQuinase}^{\text{®}}$ -Assay untersuchten 1-Aza-9-oxafluorene [μM] ($c_{\text{ATP}} = 1 \mu\text{M}$)

	CDK1/B	CDK2/A	CDK4/D	CDK5/p25	GSK-3 β	R ¹	R ²
61	30,3	41,7	97,8	338	37,6	-OCH ₃	-
70	156	86,7	827	762	25,1	-OCH ₃	4'-CH ₃
71	178	419	- ^a	- ^a	41,4	-OCH ₃	4'-OCH ₃
72	- ^a	464	143	- ^a	- ^a	-OCH ₃	2'-OCH ₃
67	- ^a	- ^a	358	- ^a	38,2 ^b	-CON(CH ₃) ₂	-
68	- ^a	- ^a	- ^a	- ^a	- ^a	-CONHCH ₃	-
69	- ^a	- ^a	853	- ^a	99,9 ^b	-CONH ₂	-
73	- ^a	- ^a	- ^a	- ^a	- ^a	-COCH ₃	4'-CH ₃
74	- ^a	- ^a	- ^a	- ^a	- ^a	-COCH ₃	4'-OCH ₃
75	- ^a	- ^a	- ^a	- ^a	- ^a	-COCH ₃	2'-OCH ₃

^a $IC_{50} > 1 \text{ mM}$

^b ATP-Konzentration 15 μM

Die in *Tabelle 12* aufgeführten Verbindungen wurden im $^{33}\text{PanQuinase}^{\text{®}}$ -Assay der ProQuinase GmbH auf ihre CDK-inhibitorische Aktivität getestet. Auffällig sind die Unterschiede der Ergebnisse des in beiden Testsystemen untersuchten 3-Methoxyderivates **61**. Zwar weist die Verbindung auch im $^{33}\text{PanQuinase}^{\text{®}}$ -Assay eine deutliche Hemmwirkung auf CDK1 und GSK-3 β auf, jedoch sind die IC_{50} -Werte für CDK1 und GSK-3 β um etwa eine Zehnerpotenz höher; bezogen auf CDK5 ist **61** in diesem Assay inaktiv.

Dieses Phänomen ist in der Literatur mehrfach beschrieben worden^{6,83} und belegt, dass eine Vergleichbarkeit der inhibitorischen Potenz verschiedener Inhibitoren in unterschiedlichen Testsystemen nicht ohne weiteres möglich ist⁸⁴. Die Unterschiede sind in verschiedenen Versuchsbedingungen, hauptsächlich aber vermutlich in der Herkunft der verwendeten Kinasen begründet. Die verwendeten rekombinanten oder aus natürlichen Quellen gewonnenen Kinasen enthalten unterschiedliche Anteile falsch gefalteter und somit inaktiver Proteine, die zwar den Inhibitor binden, jedoch keine katalytische Aktivität aufweisen, wodurch die IC_{50} -Werte künstlich erhöht werden⁸³.

5.2.2 Berechnung von K_i -Werten

Neben Unterschieden bei den aktiven Anteilen der in verschiedenen Assays verwendeten Enzyme wird die Vergleichbarkeit zu in verschiedenen Veröffentlichungen angegebenen Werten zusätzlich dadurch erschwert, dass in den verschiedenen Testsystemen unterschiedliche ATP-Konzentrationen eingesetzt werden⁶. Da es sich bei Inhibitoren von Proteinkinasen zumeist um ATP-kompetitive Wirkstoffe handelt, sind die IC_{50} -Werte stark von der verwendeten Konzentration an ATP, die je nach Test zwischen 0,1 und 40 μM liegt, abhängig. Dies erschwert außerdem eine Übertragbarkeit auf in vivo-Daten, da die zelluläre ATP-Konzentration eigentlich im unteren millimolaren Bereich liegt. Diese Abweichungen sind in der Natur der Assays, in Löslichkeitsproblemen und dem Versuch, die Belastung durch die notwendige radioaktive Markierung von ATP möglichst gering zu halten, begründet⁶.

Eine von der Konzentration des Substrates unabhängige Größe zur Beschreibung der Wirkung eines Inhibitors stellt der K_i -Wert dar, da dieser die absolute Affinität des Inhibitors zum Enzym ausdrückt. Anhand der Gleichung von *Cheng* und *Prusoff*

$$K_i = \frac{K_m \cdot IC50}{K_m + [S]}$$

lassen sich aus den IC_{50} -Werten entsprechende K_i -Werte berechnen⁸⁵. Voraussetzung für die Anwendung der *Cheng-Prusoff*-Gleichung ist ein kompetitiver Inhibitionsmechanismus sowie die enzymkinetische Bestimmung der Affinität des Substrates in Form der Michaelis-Menten-Konstante.

Da der größte Teil der bekannten CDK-Inhibitoren ATP-kompetitiv wirkt, wurde auch für die 1-Aza-9-oxafluorene ein kompetitiver Wirkungsmechanismus angenommen. Diese Vermutung wurde durch enzymkinetische Untersuchungen, die mit **63** an GSK-3 β vorgenommen wurden, bestätigt (*Abbildung 39*). Anhand der Kinetikdaten der im ³³*PanQuinase*[®]-Assay verwendeten Enzyme wurden die K_i -Werte für die getesteten Verbindungen als Grundlage für eine künftige Vergleichbarkeit mit weiteren Kinaseinhibitoren berechnet (*Tabelle 13*). Da entsprechende Kinetikdaten von den am CNRS verwendeten Enzymen nicht vorlagen, war aus diesen Werten keine Berechnung von K_i -Werten möglich.

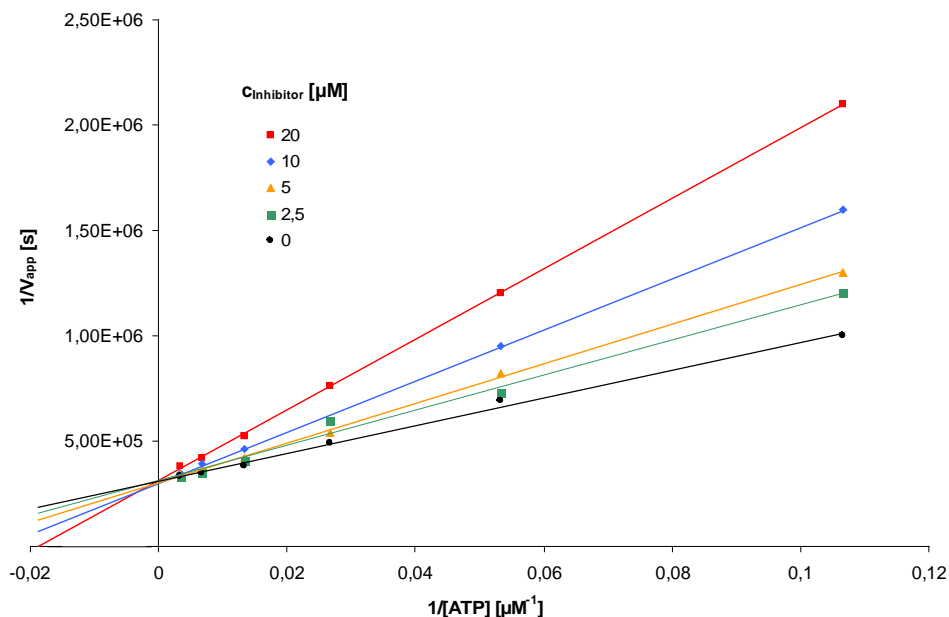


Abbildung 39: Lineweaver-Burk-Plot der Kinetikdaten von GSK-3 β mit 5 verschiedenen Konzentrationen von **63** als Inhibitor. Der gemeinsame Schnittpunkt aller Linien mit der Y-Achse belegt den kompetitiven Inhibitionsmechanismus.

Tabelle 13: K_i -Werte der im ³³PanQuinase[®]-Assay untersuchten 1-Aza-9-oxafluorene [μM]

	CDK1/B	CDK2/A	CDK4/D	CDK5/p25	GSK-3 β	R ¹	R ²
61	5,3	24	92,6	217	14,8	-OCH ₃	-
70	27,4	50	782,8	489,9	9,9	-OCH ₃	4'-CH ₃
71	31,3	241	- ^a	- ^a	16,3	-OCH ₃	4'-OCH ₃
72	- ^a	267,4	135,4	- ^a	- ^a	-OCH ₃	2'-OCH ₃
67	- ^a	- ^a	193,8	- ^a	1,59	-CON(CH ₃) ₂	-
68	- ^a	- ^a	- ^a	- ^a	- ^a	-CONHCH ₃	-
69	- ^a	- ^a	461,7	- ^a	4,15	-CONH ₂	-

^a K_i Werte >1000 μM

Der Vergleich der zusätzlich am 4-Phenylring substituierten 3-Methoxyverbindungen **70-72** mit **61** zeigt, dass die Einführung einer 2'-Methoxygruppe (**72**) die Wirksamkeit stark verringert, wie dies bereits bei den Estern beobachtet wurde. Die 4'-Substitution mit einer Methyl- (**70**) bzw. Methoxygruppe (**71**) führt hingegen zu einer leichten Präferenz für GSK-3 β . Das Dimethylamid **67** sowie das *N*-unsubstituierte Amid **69** weisen eine selektive inhibitorische Wirkung auf GSK-3 β auf. Die am 4-Phenylring substituierten 3-Acetylderivate **73-75** waren überraschend alle inaktiv.

5.2.3 DNA-Bindungsstudien

Ein Teil der neuen in 5.1 dargestellten 1-Aza-9-oxafluorene wurde im Rahmen eines Auslandsaufenthaltes an der Universität von Manchester auf mögliche DNA-bindende Eigenschaften untersucht. Zur Überprüfung der Ergebnisse des Ethidiumbromid-Verdrängungs-Assays (Kapitel 4.4.2) wurden die Verbindungen **57** und **58** ebenfalls in diese Testungen einbezogen.

5.2.3.1 Methoden

5.2.3.1.1 UV-Photometrie

Die Bindung eines DNA-Liganden an Nukleinsäuren resultiert in Veränderungen seines UV-Spektrums aufgrund der Änderung seiner Umgebung. Zu beobachten sind eine Verschiebung des UV-Absorptionsmaximums zu längeren Wellenlängen (bathochromer Effekt) und eine Verringerung des molaren Absorptionskoeffizienten (hypochromer Effekt)⁷⁹. Um die störende Eigenabsorption der DNA auszuschließen, müssen die Testverbindungen Licht bei Wellenlängen oberhalb von 311 nm absorbieren. **61-64** weisen ein Maximum exakt bei 311 nm auf, bei allen anderen 1-Aza-9-oxafluorenen liegt das Maximum unterhalb von 311 nm im Bereich der Absorption der DNA (Tabelle 14). Als Anhaltspunkt für die Auswertung wurde $\lambda = 311$ nm verwendet, da alle untersuchten Verbindungen bei dieser Wellenlänge eine ausreichend hohe Absorption aufweisen.

5.2.3.1.2 DNA-Schmelzkurven

Wird eine Lösung eines Nukleinsäuredoppelstranges erhitzt, beginnt sich die Doppelhelix ab einer bestimmten Temperatur in die Einzelstränge aufzulösen. Dieser Schmelzprozess kann anhand eines Anstiegs der UV-Eigenabsorption der DNA beobachtet werden und wird durch die mittlere Temperatur T_m charakterisiert, bei der 50 % der Nukleinsäure in die Einzelstränge aufgeteilt sind. DNA-Liganden, wie Interkalatoren oder Binder der *minor groove*, stabilisieren durch Interaktion mit dem Doppelstrang das DNA-Molekül und erhöhen somit T_m deutlich^{86,87}.

5.2.3.2 Ergebnisse der Testungen

In *Abbildung 40* sind beispielhaft für alle untersuchten Substanzen die UV-Absorptionskurven von **60** ($\lambda_{\max} = 301 \text{ nm}$) und **62** ($\lambda_{\max} = 311 \text{ nm}$) dargestellt. Oberhalb der Wellenlänge von 311 nm konnte auch nach Zugabe der DNA bei keiner der Testverbindungen eine Veränderung der Absorption ermittelt werden, während bei kleineren Wellenlängen lediglich die Eigenabsorption der erhöhten DNA-Konzentration beobachtet wurde. Ein Vergleich der Lage des Absorptionsmaximums war wegen der Eigenabsorption der DNA nur bei **61-64** möglich; eine Verschiebung konnte nicht festgestellt werden.

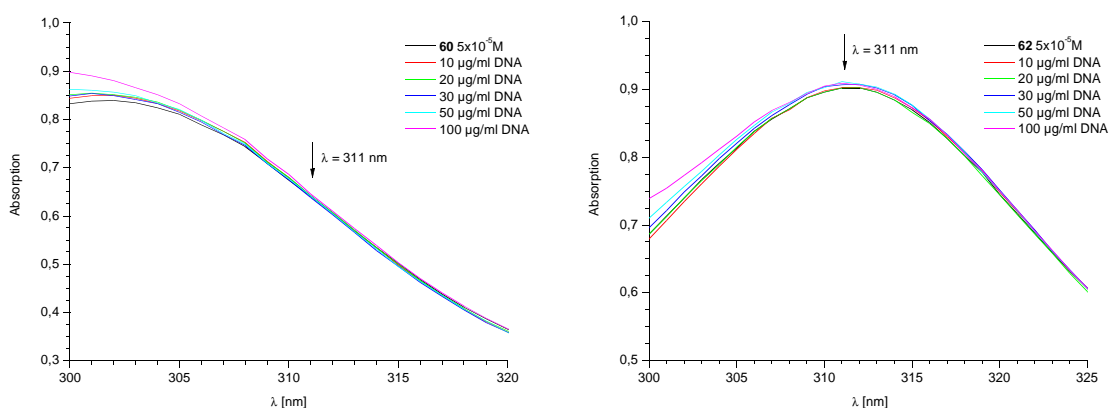


Abbildung 40: UV-Absorptionen von 60 (links) und 62 (rechts) bei steigender DNA-Konzentration.

Die DNA-Schmelzkurven bestätigen das Ergebnis der UV-Photometrie. In *Abbildung 41* ist der UV-Absorptionsanstieg der DNA-Lösung beispielhaft für alle Testsubstanzen anhand der Kurven der Verbindungen **60** und **62** und der Ellipticin-Referenz dargestellt. T_m wurde aus diesen Kurven durch Bildung der ersten Ableitung ermittelt und betrug sowohl in der DNA-Referenz als auch in den Versuchen mit den 1-Aza-9-oxafluorenen $63 \text{ }^\circ\text{C}$. Durch Zugabe von Ellipticin wurde T_m hingegen deutlich um $7 \text{ }^\circ\text{C}$ auf $70 \text{ }^\circ\text{C}$ erhöht.

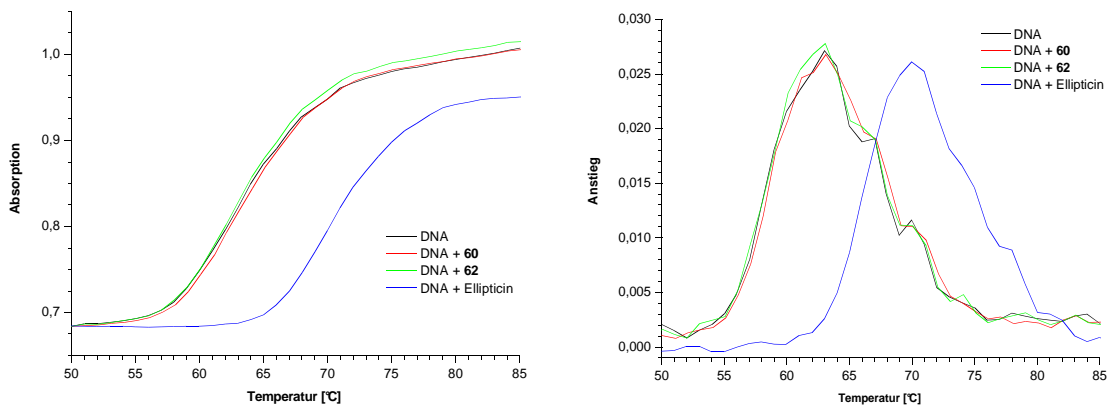


Abbildung 41: DNA-Schmelzkurven von DNA nach Zugabe von DMF, **60**, **62** und Ellipticin (links); erste Ableitung der Kurven (rechts).

Diese Ergebnisse bestätigen für **57** und **58** somit den Befund des Ethidiumbromid-Verdrängungsassays (Kapitel 4.4.2). Keines der bisher dargestellten 1-Aza-9-oxafluorene bindet an DNA.

Tabelle 14: UV-Maxima und T_m der in 5.2.3 untersuchten Verbindungen

	λ_{max}^* [nm]	T_m [nm]
DNA-Ref.	-	63
Ellipticin	-	70
57	300	63
58	300	63
59	300	63
60	301	63
61	311	63
62	311	63
63	311	63
64	311	63
65	301	63
66	301	63
68	302	63

* in Tris-Puffer

5.2.4 In-vitro Zellversuche zum P-gp-inhibitorischen Potential der 1-Aza-9-oxafluorene

5.2.4.1 Untersuchte Verbindungen

Aufgrund der Problematik der MDR in der Krebstherapie wurden die 1-Aza-9-oxafluorene im Hinblick auf den möglichen therapeutischen Einsatz verschiedener Kombinationen von CDK-Inhibitoren untereinander oder mit anderen Zytostatika auf ihr P-gp-modulatorisches Potential untersucht. In diesen Versuchen wurden die zu diesem Zeitpunkt fertiggestellten 1-Aza-9-oxafluorene **57-69**, **71**, **73**, **74** und **76-78** im Rahmen eines Auslandsaufenthaltes an der Mikrobiologischen Fakultät der Universität Szeged in Ungarn eingesetzt.

Als Modellsystem kam die Bestimmung der Aufnahme von Rhodamin 123 in die Maus-T-Lymphomzelllinie NCI-L5178Y und die durch Gen-Transfektion und Selektion mit Colchicin aus ihr erhaltene P-gp exprimierende MDR-Zelllinie L5178YvMDR, im folgenden als PAR- bzw. MDR-Zellen abgekürzt, zum Einsatz. Die Verwendung dieser beiden Zelllinien erlaubt einen direkten Vergleich der Aufnahme von P-gp-Substraten ins Zellinnere, da entsprechende Veränderungen direkt auf eine P-gp-Hemmung zurückgeführt werden können⁸⁸.

5.2.4.2 MTT-Zytotoxizitätsassay

Zunächst wurden alle Substanzen in einem MTT-Zytotoxizitätsassay auf ihre toxische Wirkung gegen die im Modell verwendete MDR-Zelllinie untersucht. Der colorimetrische MTT-Assay dient der spektrophotometrischen Quantifizierung von Zellwachstum und -überlebensrate und basiert auf der Metabolisierung des gelb gefärbten MTT zu einem violetten Formazansalz durch mitochondriale Dehydrogenasen (*Abbildung 42*).

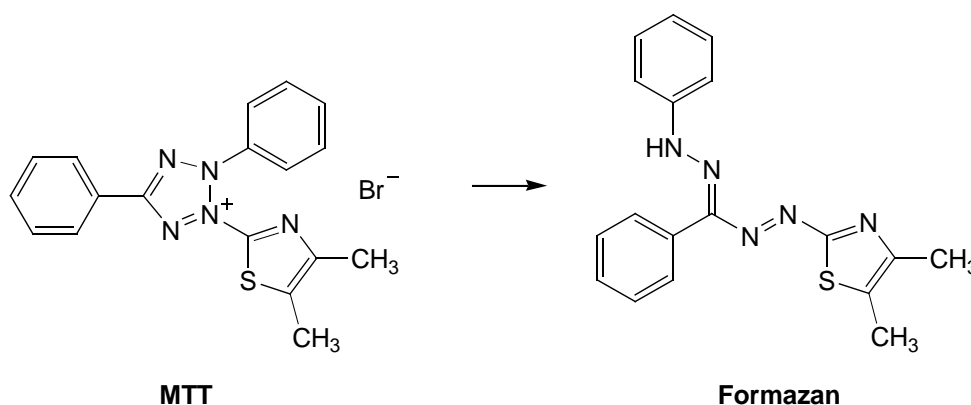


Abbildung 42: Metabolisierung von MTT zu Formazan durch mitochondriale Dehydrogenasen.

Da nur lebende Zellen diese Enzymaktivität aufweisen, ist eine einfache Quantifizierung metabolisch aktiver Zellen durch Messung der Absorption des gebildeten Formazans in einem Spektrophotometer möglich.

Die nach einer 72-stündigen Inkubation ermittelten IC_{50} -Werte sind in *Tabelle 15* angegeben. Die IC_{50} -Werte für die Zytotoxizität lagen in allen Fällen über der höchsten im folgenden Fluoreszenz-Aufnahme-Assay verwendeten Konzentration von 10 μ M, so dass eine akute toxische Aktivität ausgeschlossen werden konnte.

Tabelle 15: Im MTT-Test ermittelte IC_{50} -Werte für die L5178YvMDR-Zelllinie.

Verbindung	IC_{50} [μ M \pm SD]	Verbindung	IC_{50} [μ M \pm SD]
57	12,8 \pm 1,8	67	12,0 \pm 3,9
58	15,5 \pm 1,8	68	21,8 \pm 0,4
59	26,0 \pm 0,8	69	27,7 \pm 4,7
60	14,7 \pm 5,7	71	28,0 \pm 3,6
61	21,1 \pm 0,5	73	15,0 \pm 0,7
62	30,8 \pm 0,2	74	19,7 \pm 0,2
63	29,3 \pm 0,9	76	27,1 \pm 0,2
64	22,8 \pm 0,6	77	17,6 \pm 1,2
65	18,4 \pm 0,6	78	10,7 \pm 0,7
66	21,2 \pm 0,6	DMSO	38,8 \pm 5,4

5.2.4.3 Untersuchung der P-gp-modulierenden Eigenschaften

5.2.4.3.1 Fluoreszenz-Aufnahme-Assay

Die Untersuchung der Testsubstanzen auf P-gp-hemmende Eigenschaften erfolgte im Fluoreszenz-Aufnahme-Assay, einer etablierten Methode zur Bestimmung der Aktivität von P-gp⁸⁹. Grundsätzlich beruht die Untersuchung einer Zellprobe mit einem FACS auf der Emission von optischen Signalen seitens der Zelle, wenn diese einen Laserstrahl passiert. Die in einer Pufferlösung suspendierten Zellen werden durch eine Kapillare gesaugt und im Sensormodul einzeln mit einem 488 nm-Laser bestrahlt. Die Charakterisierung der Zellen erfolgt anhand der drei Parameter FSC, SSC und Fluoreszenz. Das Vorwärtsstreulicht FSC dient als Maß für die Zellgröße, das Seitwärtsstreulicht SSC als Maß für die Granularität (Größe und Struktur des Zellkerns etc.) der Zelle⁹⁰. Mit diesen beiden Parametern lassen sich verschiedene Zellpopulationen sowie lebendige und tote

Zellen einer Population unterscheiden. Für jede Zelle wird die Aufnahme des spezifisch bindenden, fluoreszierenden P-gp-Substrates Rhodamin 123 gemessen. Durch Bestimmung des Verhältnisses der Fluoreszenz der behandelten Zellen zu den unbehandelten Zellen in Form des Fluoreszenz-Aktivitäts-Verhältnisses FAR werden vergleichbare Ergebnisse erhalten.

$$FAR = \frac{MDR \text{ behandelt} / MDR \text{ unbehandelte Kontrolle}}{PAR \text{ behandelt} / PAR \text{ unbehandelte Kontrolle}}$$

Substanzen mit FAR-Werten unter 1,1 gelten dabei als inaktiv, Werte oberhalb von 1,1 weisen auf eine P-gp-modulierende Aktivität hin⁹¹. Als Positivkontrolle und Vergleichssubstanz diente der als P-gp-Inhibitor bekannte Calciumkanalblocker Verapamil.

5.2.4.3.2 Ergebnisse und Diskussion

Zunächst wurden alle Substanzen bei zwei Konzentrationen (1 μ M und 10 μ M) auf ein eventuelles P-gp-inhibitorisches Potential untersucht. Bei 1 μ M erwiesen sich alle Verbindungen als inaktiv. **64** und **73** bilden eine Ausnahme mit Werten von 1,26 und 1,25, allerdings stieg deren Aktivität bei der höheren Konzentration von 10 μ M nicht weiter an. Für **62**, **63**, **71** und **77** wurde bei 10 μ M eine FAR von über 2 ermittelt. Diese Verbindungen wurden daher zusätzlich in den Konzentrationen 2, 5 und 20 μ M getestet.

Die Ergebnisse des Fluoreszenzaufnahme-Assays zeigen eine deutliche Abhängigkeit der P-gp-modulierenden Aktivität vom 3-Substituenten und der zusätzlichen Substitution des 4-Phenylrestes. Die aktiven Verbindungen gehören zu den Gruppen der 1-Aza-9-oxafluorene mit 3-Alkylester- (*Tabelle 16*) und 3-Alkyloxyfunktion (*Tabelle 17*). Alle weiteren Verbindungen sind inaktiv oder mit FAR-Werten von < 1,4 nur sehr schwach aktiv und wurden daher in *Tabelle 18* zusammengefasst.

Tabelle 16: Ergebnisse der FACS-Untersuchungen der 3-Alkylester im Vergleich

Verbindung	c [μM]	FAR	Vielfaches der Verapamil-Kontrolle*
57	1	0,93 \pm 0,03	0,2
	10	1,42 \pm 0,08	0,3
59	1	0,89 \pm 0,01	0,2
	10	1,60 \pm 0,07	0,3
76	1	0,84 \pm 0,02	0,2
	10	1,06 \pm 0,02	0,2
77	1	0,98 \pm 0,04	0,2
	2	1,25 \pm 0,21	0,2
	5	4,69 \pm 0,95	0,9
	10	10,78 \pm 2,31	2,0
	20	38,06 \pm 3,48	7,1
78	1	0,83 \pm 0,03	0,2
	10	1,38 \pm 0,04	0,3

*FAR Verapamil = 5,36 \pm 0,98

Tabelle 17: Ergebnisse der FACS-Untersuchungen der 3-Alkyloxyverbindungen

Verbindung	c [μM]	FAR	Vielfaches der Verapamil-Kontrolle*
61	1	0,82 \pm 0,05	0,2
	10	1,54 \pm 0,08	0,3
62	1	0,98 \pm 0,22	0,2
	2	1,11 \pm 0,20	0,2
	5	2,45 \pm 0,18	0,5
	10	3,68 \pm 0,18	0,7
	20	30,60 \pm 1,00	5,7
63	1	1,04 \pm 0,23	0,2
	2	1,50 \pm 0,30	0,3
	5	41,01 \pm 3,90	7,7
	10	66,28 \pm 5,80	12,4
	20	230,80 \pm 20,15	43,1
71	1	1,01 \pm 0,24	0,2
	2	1,15 \pm 0,07	0,2
	5	4,10 \pm 0,16	0,8
	10	3,72 \pm 0,40	0,7
	20	12,25 \pm 0,54	2,3

*FAR Verapamil = 5,36 \pm 0,98

Tabelle 18: FAR-Werte der weiteren Verbindungen

Verbindung	c [μM]	FAR	Vielfaches der Verapamil-Kontrolle*
58	1	0,60 \pm 0,01	0,1
	10	0,96 \pm 0,08	0,2
60	1	1,05 \pm 0,04	0,2
	10	0,91 \pm 0,06	0,2
64	1	1,26 \pm 0,13	0,2
	10	0,91 \pm 0,15	0,2
65	1	0,73 \pm 0,05	0,1
	10	0,89 \pm 0,05	0,2
66	1	0,67 \pm 0,01	0,1
	10	0,65 \pm 0,01	0,1
67	1	1,03 \pm 0,02	0,2
	10	0,94 \pm 0,04	0,2
68	1	0,92 \pm 0,01	0,2
	10	0,81 \pm 0,15	0,2
69	1	0,97 \pm 0,01	0,2
	10	1,40 \pm 0,01	0,3
73	1	1,25 \pm 0,10	0,2
	10	1,19 \pm 0,06	0,2
74	1	0,69 \pm 0,02	0,1
	10	1,23 \pm 0,03	0,2

*FAR Verapamil = 5,36 \pm 0,98

Innerhalb der Gruppe der 3-Alkylester sind der Methylester **59** und der am 4-Aromaten unsubstituierte Ethylester **57** etwa gleichwertig. Deutliche Unterschiede treten hingegen bei den Verbindungen mit zusätzlicher Substitution am Aromaten auf. Während die FAR des 2'-Methoxyderivates **78** mit jener von **57** und **59** vergleichbar ist, ist das 4'-Methylderivat **76** auch bei 10 μM unwirksam. Das 4'-Methoxyderivat **77** ist dagegen bereits bei einer Konzentration von 2 μM aktiv und erreicht bei 5 μM etwa die Wirksamkeit von Verapamil. Eine Steigerung der Konzentration resultierte in deutlich höheren Aktivitäten von bis zu 38,06 bei 20 μM , was der siebenfachen Wirkung im Vergleich zur Verapamilkontrolle bei gleicher Konzentration entspricht.

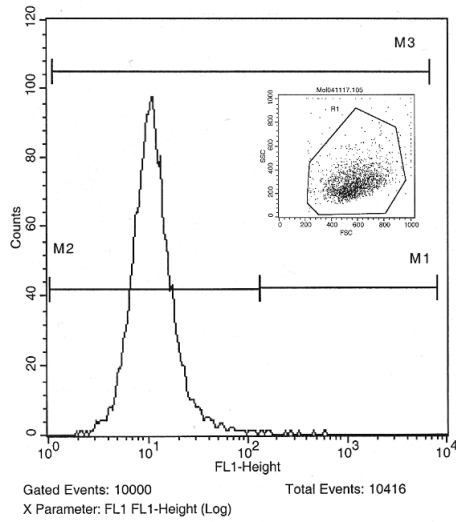
Die 3-Alkyloxysubstitution führte durchweg zu aktiven Verbindungen. Die 3-Methoxyverbindung **61** weist bei 10 μM eine mit den Estern **57** und **59** vergleichbare Wirkung auf, die ebenfalls durch die 4'-Methoxysubstitution in **71** deutlich gesteigert wird. Die Verlängerung der Seitenkette um eine CH_2 -Gruppe bei **62** bewirkt ebenso eine deutliche Steigerung der Aktivität. Bemerkenswert sind die Werte, welche für die

3-Benzoyloxyverbindung **63** ermittelt wurden. **63** besitzt bereits bei 5 μM eine höhere Aktivität als alle anderen 1-Aza-9-oxafluorene. Die bei 10 μM ermittelte FAR von 66,28 entspricht etwa dem Wert, der auch bei der PAR-Zelllinie gemessen wurde und ist somit mit einer fast vollständigen Hemmung von P-gp gleichzusetzen. Eine weitere Steigerung der Konzentration auf 20 μM führte zu ungewöhnlich hohen Fluoreszenzwerten, die eine Erhöhung der Rhodamin 123-Aufnahme möglicherweise durch Beeinflussung der Zellmembran zusätzlich zum verringerten Efflux durch P-gp-Hemmung vermuten lassen.

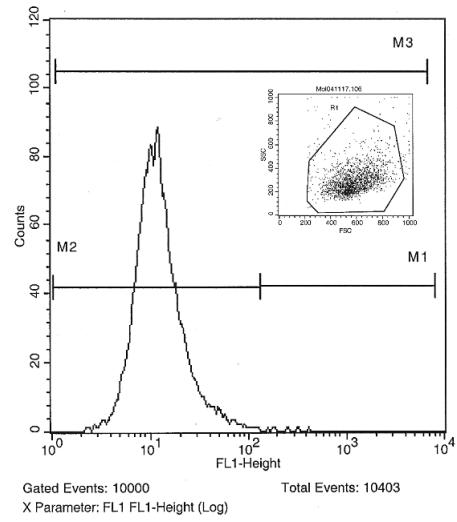
Die beobachteten Struktur-Wirkungs-Beziehungen stimmen mit den bekannten Erkenntnissen über die strukturellen Anforderungen an P-gp Modulatoren überein, wonach diese sehr lipophile Moleküle mit mehreren aromatischen Ringen sind, die zusätzlich einen basischen Molekülteil aufweisen⁹². An Position 3 der 1-Aza-9-oxafluorene wird offenbar ein lipophiler Substituent mit Fähigkeit zur Wasserstoffbrückenbildung bevorzugt. Da das 3-Methylderivat **60**, die 3,6-Dihydroxyverbindung **64** und die 3-Halogenderivate **65** und **66** inaktiv sind, das 3-Methoxyderivat **61** jedoch P-gp-modulierende Aktivität aufweist und von der 3-Ethoxyverbindung **62** in der Wirkung noch übertroffen wird, lässt sich darauf schließen, dass die Seitenkette außerdem eine gewisse Größe und Beweglichkeit aufweisen muss. Besonders vorteilhaft wirkt sich der zusätzliche aromatische Kern der 3-Benzoyloxyverbindung **63** auf die Wirkung aus, da dieser die Lipophilie des Moleküls stark erhöht. Inwiefern eine Verlängerung des 3-Alkyloxysubstituenten auch ohne aromatischen Ring die Wirkung weiter verstärkt, werden künftige Variationen des 3-Substituenten zeigen.

Einen deutlichen Einfluss übt auch die Substitution mit einer Methoxygruppe an 4'-Position auf die P-gp modulierende Aktivität aus, die sowohl in der 3-Methoxyverbindung **71** als auch im 3-Ethylester **77** die Wirkung gegenüber den 4'-unsubstituierten Verbindungen **61** und **57** deutlich erhöht. Dies ist wahrscheinlich durch die zusätzlichen Möglichkeiten zur Wasserstoffbrückenbindung bedingt, da die 4'-Methylsubstitution in **76** die Wirkung gegenüber **57** nicht verstärkt. Außerdem wird die 4'-Position offenbar bevorzugt, denn eine Methoxygruppe in 2'-Position erhöhte bei **78** die Wirkung gegenüber **57** nicht.

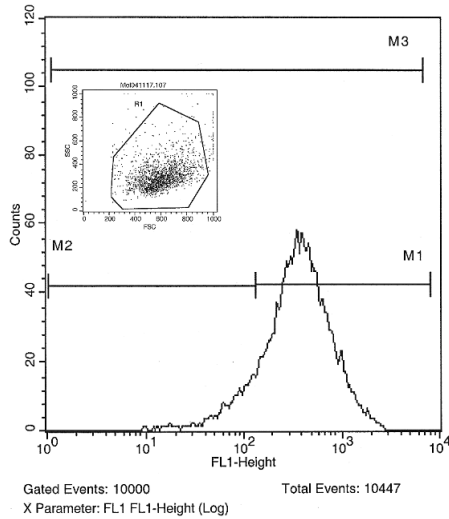
Die systematische Kombination der für die Wirkung förderlichen Strukturelemente könnte in künftigen Arbeiten sehr potente P-gp-Modulatoren hervorbringen.



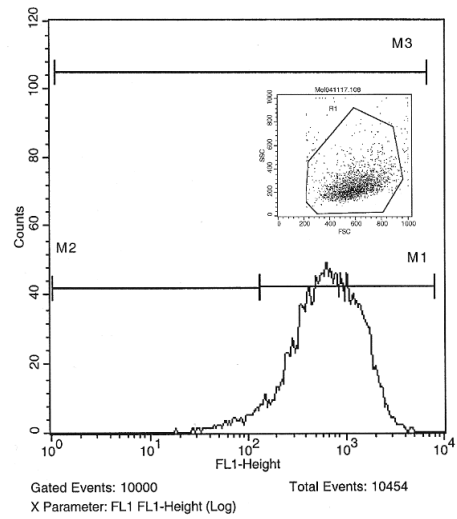
Marker	Left, Right	Events	% Gated	% Total	Mean	SD	Peak Ch
All	1, 9910	10000	100.00	96.01	15.19	41.77	10
M1	131, 8058	66	0.66	0.63	381.34	343.86	134
M2	1, 131	9936	99.36	95.39	12.78	9.44	10
M3	1, 6793	10000	100.00	96.01	15.19	41.77	10



Marker	Left, Right	Events	% Gated	% Total	Mean	SD	Peak Ch
All	1, 9910	10000	100.00	96.13	16.29	37.03	9
M1	131, 8058	46	0.46	0.44	405.32	348.95	176
M2	1, 131	9955	99.55	95.69	14.50	11.21	9
M3	1, 6793	10000	100.00	96.13	16.29	37.03	9



Marker	Left, Right	Events	% Gated	% Total	Mean	SD	Peak Ch
All	1, 9910	10000	100.00	95.72	435.36	341.92	327
M1	131, 8058	8784	87.84	84.08	484.36	336.46	327
M2	1, 131	1237	12.37	11.84	82.26	32.05	116
M3	1, 6793	10000	100.00	95.72	435.36	341.92	327



Marker	Left, Right	Events	% Gated	% Total	Mean	SD	Peak Ch
All	1, 9910	10000	100.00	95.66	788.22	589.32	609
M1	131, 8058	9523	95.23	91.09	823.63	581.69	609
M2	1, 131	485	4.85	4.64	82.18	33.16	118
M3	1, 6793	9999	99.99	95.65	787.58	585.88	609

Abbildung 43: FACS-Analyse von **63** bei 1, 2, 5 und 10 μ M.

6 Zusammenfassung

Die Cyclin-abhängigen Kinasen stellen aufgrund ihrer Schlüsselfunktionen in vielen physiologischen und pathophysiologischen Prozessen sehr attraktive pharmakologische Zielstrukturen dar. Von besonderem Interesse sind hierbei die an der Kontrolle des Zellzyklus beteiligten CDKs 1, 2, 4 und 6, die in vielen Tumortypen dereguliert sind und somit für die Krebstherapie neue potentielle Angriffspunkte bieten. Im Nervensystem sind CDK5 und die eng mit den CDKs verwandte GSK-3 β an der Entwicklung der Alzheimer'schen Krankheit beteiligt und bieten hier möglicherweise ebenfalls neue Therapieoptionen.

Trotz der breiten Vielfalt der bereits als CDK-Inhibitoren identifizierten Verbindungen sind CDK-Inhibitoren noch weit von einem therapeutischen Einsatz entfernt. Zwar befinden sich erste Vertreter bereits in klinischen Studien, doch nach wie vor sind die vollständigen Zusammenhänge der Funktionen der CDKs, sowie die Frage, welcher Grad an Selektivität für den therapeutischen Einsatz von CDK-Inhibitoren nötig ist, nicht geklärt. Eine ständige Erweiterung des Spektrums der verfügbaren CDK-Inhibitoren sowohl um selektive als auch stärker wirksame Verbindungen ist somit unabdingbar.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollten zunächst neuartige planar-aromatische 6-Hydroxy-1-aza-9-oxafluorene auf Grundlage einer durch Perchlorsäure katalysierten Zykoaddition von *p*-Benzochinon mit 1,4-Dihydropyridinen synthetisiert werden. Aufgrund ihrer Ähnlichkeit zu den zytostatisch aktiven Azacarbazolen wurden für die 1-Aza-9-oxafluorene ebenfalls zytostatische Eigenschaften erwartet. Die als Ausgangsstoffe zur Synthese der 1-Aza-9-oxafluorene benötigten unsymmetrisch 3,4-disubstituierten *N*-Acetyl-1,4-dihydropyridine konnten durch eine regioselektive Grignardreaktion erhalten werden. Durch Zykoaddition mit *p*-Benzochinon gelang schließlich die Darstellung einer ersten Serie von vier 1-Aza-9-oxafluorenen.

In einem Antitumor-Screen des NCI wurden drei dieser Verbindungen als zytostatisch aktiv identifiziert. Hierbei erwiesen sich die Vertreter mit einem 4-Phenylsubstituenten als aktiver als die 4-Methyl-derivate. Um Hinweise auf den Wirkungsmechanismus zu erhalten, wurden die Ergebnisse des NCI-Screens der aktivsten Verbindung mit Hilfe des COMPARE-Programms mit den Substanzdatenbanken des NCI korreliert. Die Ergebnisse dieser Analyse ließen DNA-Bindungseigenschaften oder Inhibition von Proteinkinasen vermuten. Durch einen Ethidiumbromid-Verdrängungsassay konnte zunächst DNA-Bindung als Mechanismus der zytostatischen Wirksamkeit ausgeschlossen werden. In

weiteren Untersuchungen wurden die zytostatisch aktiven Verbindungen als CDK-Inhibitoren mit einer gewissen Selektivität für CDK1 identifiziert.

Im zweiten Teil der Arbeit wurden weitere 1-Aza-9-oxafluorene mit variiertem Substitutionsmuster synthetisiert. Die für die Wirkung wichtigen Strukturelemente, die 4-Phenylgruppe sowie die 6-Hydroxyfunktion, wurden beibehalten, an 3-Position wurden hingegen verschiedene elektronenschiebende und -ziehende Substituenten eingeführt, um die Auswirkungen des elektronischen Einflusses auf das Ringsystem und die veränderten Möglichkeiten zur H-Brückenbindung zu evaluieren. Zusätzlich wurden im weiteren Verlauf in den 4-Phenylsubstituenten der aktiven Verbindungen mit 3-Acetyl-, 3-Ethoxycarbonyl- und 3-Methoxyfunktion 4'-Methyl- sowie 2'- und 4'-Methoxygruppen eingefügt, um erste Aufschlüsse über die Auswirkungen einer Substitution des 4-Phenylrings zu erhalten.

Die Testung der neuen Verbindungen zeigte, dass sowohl die Selektivität als auch die Stärke der Kinaseinhibition der 1-Aza-9-oxafluorene stark durch den 3-Substituenten beeinflusst werden kann. Das 3,6-Dihydroxyderivat wurde als bisher stärkster Inhibitor dieser Verbindungsklasse identifiziert. Die Vertreter mit 3-Alkyloxyfunktion sind duale Inhibitoren von CDK5 und GSK-3 β , das 3-Benzyloxyderivat erwies sich als selektiver Inhibitor der GSK-3 β . Zusätzlich wurde beobachtet, dass eine Methoxygruppe in 2'-Position bei allen Verbindungen die Wirksamkeit verschlechtert, während sie in 4'-Position toleriert wird und im Falle des 3-Ethoxycarbonylderivates die inhibitorische Potenz steigert.

Aufgrund der Bedeutung der Multidrug-Resistance, insbesondere in der Krebstherapie, welche das primäre potentielle Einsatzgebiet von CDK-Inhibitoren darstellt, wurden die 1-Aza-9-oxafluorene zusätzlich in einem Fluoreszenz-Aufnahme-Assay auf ihre Fähigkeit zur Modulation von P-gp untersucht. Ein Vertreter der Verbindungen mit 3-Alkylesterfunktion und alle 3-Alkyloxyderivate erwiesen sich als wirksam, wobei die Aktivität stark von der Größe des 3-Alkyloxysubstituenten und der Substitution am 4-Phenylring beeinflusst wird. Das 3-Benzyloxyderivat, welches bereits als GSK-3 β -Inhibitor identifiziert wurde, erwies sich als stärkster P-gp-Modulator der getesteten Verbindungen. Eine 4'-Methoxysubstitution erwies sich auch in Bezug auf die P-gp-modulatorischen Eigenschaften der 1-Aza-9-oxafluorene als vorteilhaft.

Die 1-Aza-9-oxafluorene stellen somit neue Leitstrukturen für die Entwicklung von CDK-Inhibitoren und MDR-Modulatoren dar. Ausgehend von den in dieser Arbeit erarbeiteten

Strukturvorgaben sollten weiter unterschiedlich variierte 1-Aza-9-oxafluorene dargestellt werden, um weitere Struktur-Wirkungsbeziehungen ableiten zu können und möglicherweise stärker wirksame Verbindungen zu erhalten. Insbesondere die Kombination einer 4'-Methoxygruppe mit dem 3-Benzoyloxysubstituenten scheint aussichtsreich, um sowohl die kinaseinhibitorischen als auch die P-gp-modulatorischen Eigenschaften zu verbessern. Die Einführung verschiedener Substitutionsmuster in die 3-Benzoyloxygruppe bietet hierbei weiteren Spielraum für Variationen. Zusätzlich bietet sich der Einsatz von Methoden des *molecular modeling* an, um künftige 1-Aza-9-oxafluorene auf Basis der erarbeiteten Leitstrukturen zu optimieren.

7 Experimenteller Teil

7.1 Synthese und Charakterisierung der Verbindungen

7.1.1 Allgemeine Angaben

7.1.1.1 Schmelzpunktbestimmung

Die Bestimmung der Schmelzbereiche erfolgte an einem *Boetius-Heiztischmikroskop*. Sie stellen unkorrigierte Werte dar.

7.1.1.2 NMR-Spektroskopie

Die einzelnen Spektren wurden an folgenden Geräten aufgenommen:

- *Varian Gemini 2000* mit 400 Mhz Arbeitsfrequenz für ^1H -NMR und 100 Mhz für ^{13}C -NMR
- *Varian Inova Unity 500* mit 500 Mhz Arbeitsfrequenz für ^1H - ^1H -COSY-Spektren

Als interner Standard für die ^1H - und ^{13}C -Messungen diente Tetramethylsilan. In der Auflistung der NMR-spektroskopischen Daten werden jeweils zunächst die Arbeitsfrequenz und das verwendete deuterierte Lösungsmittel angegeben. Es folgt die Auflistung der chemischen Verschiebungen δ , die in ppm angegeben sind und sich auf die Symmetrieachse der Signale beziehen. In Klammern folgen für jedes Signal die Multiplizität, die integrierte Protonenanzahl, die Kopplungskonstanten J in Hz sowie die chemische Zuordnung. In der Anführung der Multiplizitäten gelten folgende Abkürzungen: s (Singulett), d (Duplett), t (Triplett), q (Quadruplett), br (breites Signal), spl (gesplittetes Signal). Ggf. werden Kombinationen von Multiplizitäten wie dd (Doppeldublett) verwendet. Unscharfe Signale mit einer scheinbar geringeren Multiplizität sind mit Anführungszeichen gekennzeichnet.

Als Lösungsmittel wurden DMSO- d_6 , CDCl_3 , Aceton- d_6 , Methanol- d_4 und D_2O verwendet.

7.1.1.3 IR-Spektroskopie

Die ATR-Spektren wurden an einem FT-IR-Spektrometer *IFS 28* der Firma *Bruker*, die KBr-Spektren an einem FT-IR-Spektrometer *Spectrum BX* der Firma *Perkin-Elmer* gemessen.

7.1.1.4 Massenspektrometrie

Die ESI Spektren wurden an einem *Finnigan LCQ Classic* der Firma *Thermo Electron* gemessen. Die Aufnahme der EI-Massenspektren erfolgte an einem *AMD 402* der Firma *AMD INTEDRA* mit einer Ionisierungsenergie von 70 eV. Die Mengenverteilung der Massensignale wird relativ zum größten Signal in Prozent nach der Massenzahl angegeben.

7.1.1.5 Elementaranalyse

Die Kohlenstoff-, Wasserstoff- und Stickstoffanteile wurden an einem *CHNS-932* Analysenautomaten der *LECO-Corporation* im automatischen Mikroverfahren bestimmt. Die Chlor- und Bromgehalte wurden im Halbmikroverfahren titrimetrisch ermittelt.

7.1.1.6 Chromatographie

7.1.1.6.1 Dünnschichtchromatographie

Der Verlauf der Reaktionen sowie die Identität isolierter Zwischen-, End- und Nebenprodukte wurden dünnschichtchromatographisch kontrolliert. Hierbei kamen Fertigplatten der Firmen *Merck* und *Macherey-Nagel* zum Einsatz, die mit 0,2 mm Kieselgel 60 und dem Fluoreszenzindikator F_{254} beschichtet sind.

Die Detektion der Verbindungen erfolgte ausnahmslos mit UV-Licht der Wellenlängen 254 nm und 366 nm und optischer Kontrolle der Eigenfluoreszenz bzw. der fluoreszenzlöschenden Eigenschaften der Verbindungen.

7.1.1.6.2 Präparative Dünnschichtchromatographie

Die Trennung kleinerer Mengen von Substanzgemischen wurde zum Teil auf PSC-Glasplatten der Firma *Merck* (20 x 20 cm, Kieselgel 60 F_{254}) vorgenommen. Zur Trennung von Gemischen mit einer Gesamtmasse von bis zu 40 mg wurden Platten mit einer Schichtdicke von 0,2 mm und Konzentrierungszone, für Gemische bis zu 150 mg Platten mit einer Schichtdicke von 1 mm verwendet.

7.1.1.6.3 Säulenchromatographie

Zur Trennung und Reinigung der Zwischen- und Endprodukte dienten säulenchromatographische Verfahren bei Normaldruck an Kieselgel 60 F_{254} der Firma *Merck* mit einem Korngrößenbereich von 0,063 mm - 0,200 mm.

Als Elutionsmittel wurden Lösungsmittelgemische mit folgenden Zusammensetzungen

verwendet:

LM 1: Chloroform/Essigester/Methanol	85:15:1
LM 2: Chloroform/Essigester/Methanol	85:15:5
LM 3: Chloroform/Essigester	75:25
LM 4: Cyclohexan/Essigester	60:40
LM 5: Cyclohexan/Essigester	50:50
LM 6 Toluol/Methanol	85:15

7.1.1.7 Röntgenstrukturanalyse

Die Kristalldaten wurden bei Raumtemperatur unter Verwendung von Graphit-monochromatisierter Mo-K α -Strahlung der Wellenlänge $\lambda = 0,71073 \text{ \AA}$ an einem IPDS-Diffraktometer der Firma *Stoe & Cie.* bei 200 K gemessen. Die Kristallstruktur wurde mit Hilfe des IPDS-Programmsystems berechnet. Die Strukturauflösung erfolgte in *SHELXS-97* mittels direkter Methode, die Verfeinerungsmethode mittels *full-matrix least-squares* in *SHELXL-97*. Die graphische Darstellung erfolgte mit dem *XP/PC-molecular-graphic-program*.

7.1.1.8 Verwendete Chemikalien und Lösungsmittel

Lösungsmittel:

Alle eingesetzten Lösungsmittel wurden vor Verwendung nach literaturbekannten Vorschriften⁹³ getrocknet und frisch destilliert.

Chemikalien:

Folgende Chemikalien wurden entweder kommerziell erworben (Bezugsquelle in Klammern) oder aus den Beständen des Fachbereichs Pharmazie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg bezogen.

Acetanhydrid

Acetylchlorid (*Lancaster*)

3-Acetylpyridin (*Lancaster*)

Ammoniak 32% (*Grüssing*)

Ammoniumchlorid
p-Benzochinon (*Sigma-Aldrich*)
Benzylchlorid (*Lancaster*)
Blei-(IV)-acetat
3-Brompyridin (*Sigma-Aldrich*)
3-Chlorpyridin (*Sigma-Aldrich*)
Dimethylamin-Lösung (*Fluka*)
Dimethylsulfid (*Fluka*)
Ethylbromid (*Lancaster*)
3-Hydroxypyridin (*Lancaster*)
Kaliumhydroxid
Kupfer-(I)-iodid
Lithiumchlorid
Mangan-(IV)-oxid
2-Methoxyphenylmagnesiumbromid (1,0 M Lösung in THF, *Sigma-Aldrich*)
4-Methoxyphenylmagnesiumbromid (0,5 M Lösung in THF, *Sigma-Aldrich*)
3-Methoxypyridin (*Sigma-Aldrich*)
Methylamin-Lösung (*Fluka*)
Methylmagnesiumchlorid (2 M Lösung in THF, *Sigma-Aldrich*)
3-Methylpyridin (*Sigma-Aldrich*)
Natriumchlorid
Natriumhydroxid
Natriumsulfat
Nikotinsäuremethylester (*Lancaster*)
Nikotinsäureethylester (*Sigma-Aldrich*)
Palladium-Kohle (*Sigma-Aldrich*)
Perchlorsäure 70% (*Sigma-Aldrich*)
Phenylchloroformiat (*Sigma-Aldrich*)
Phenylmagnesiumchlorid 2 M Lösung in THF (*Sigma-Aldrich*)
Pikrinsäure
Tetrabutylammoniumbromid (*Sigma-Aldrich*)
p-Tolylmagnesiumbromid (1,0 M Lösung in THF, *Sigma-Aldrich*)

7.1.2 Beschreibung der Verbindungen

7.1.2.1 3-substituierte Pyridine

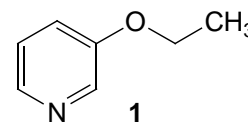
3-Ethoxyppyridin (1)

5 g (52,6 mmol) 3-Hydroxypyridin, 5,9 g (110 mmol) pulverisierte KOH und 0,85 g (2,6 mmol) $n\text{Bu}_4\text{NBr}$ wurden in 150 ml trockenem THF gelöst. Nach Zugabe von 9 g (84 mmol) Ethylbromid wurde der Ansatz unter Rückfluss für 12 Stunden erhitzt. Nach Abschluss der Reaktion wurden 200 ml destilliertes Wasser zugegeben und zweimal mit 100 ml wässriger HCl (10 %) extrahiert. Die vereinten wässrigen Phasen wurden daraufhin mit 10 M NaOH alkalisiert und dreimal mit 75 ml CHCl_3 extrahiert. Das nach Entfernung des Lösungsmittels im Rotationsverdampfer erhaltene Rohprodukt wurde säulenchromatographisch gereinigt (Laufmittel 5). **1** wurde in 78 % Ausbeute als schwach gelbliches Öl erhalten.

Summenformel: $\text{C}_7\text{H}_9\text{NO}$

Molgewicht: 123,15 g/mol

EA: ber.: C 68,27; H 7,37; N 11,37
gef.: C 67,98; H 7,43; N 10,99



IR (ATR): 1227, 1260 (C-O-C)

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

$^1\text{H-NMR}$: 400 MHz, CDCl_3 [δ ppm]: 8,26 (dd, 1 H, $^4\text{J}_{2/4} = 2,7$ Hz, $^5\text{J}_{2/5} = 0,8$ Hz, 2-H); 8,16 (dd, 1 H, $^3\text{J}_{6/5} = 4,2$ Hz, $^4\text{J}_{6/4} = 1,7$ Hz, 6-H); 7,16 (ddd, 1 H, $^3\text{J}_{5/4} = 8,4$ Hz, $^3\text{J}_{5/6} = 4,2$ Hz, $^5\text{J}_{5/2} = 0,8$ Hz, 5-H); 7,12 (ddd, 1 H, $^3\text{J}_{4/5} = 8,4$ Hz, $^4\text{J}_{4/2} = 2,7$ Hz, $^4\text{J}_{4/6} = 1,7$ Hz, 4-H); 4,03 (q, 2 H, $^3\text{J}_{\text{CH}_2/\text{CH}_3} = 7$ Hz, 3-O CH_2CH_3); 1,39 (t, 3 H, $^3\text{J}_{\text{CH}_3/\text{CH}_2} = 7$ Hz, 3-O CH_2CH_3)

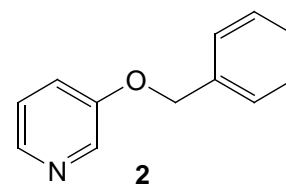
3-Benzoyloxyppyridin (2)

2 wurde analog zu **1** mit 10,6 g (9,7 ml, 84 mmol) Benzylchlorid dargestellt und in 59 % Ausbeute als schwach gelbliches Öl erhalten.

Summenformel: $\text{C}_{12}\text{H}_{11}\text{NO}$

Molgewicht: 185,22 g/mol

EA: ber.: C 77,81; H 5,99; N 7,56
gef.: C 77,43; H 6,27; N 7,35



IR (ATR): 1227, 1260 (C-O-C)

MS (ESI+): $M+H^+$

$^1\text{H-NMR}$: 400 MHz, Aceton- d_6 [δ ppm]: 8,37 (d, 1 H, $^4J_{2/4} = 2,9$ Hz, 2-H); 8,18 (dd, 1 H, $^3J_{6/5} = 4,6$ Hz, $^4J_{6/4} = 1,3$ Hz, 6-H); 7,50-7,57 (m, 2 H, 2',6'-H); 7,41-7,31 (m, 4 H, 3',4',5'-H, 4-H); 7,26 (ddd, 1 H, $^3J_{5/4} = 8,4$ Hz, $^3J_{5/6} = 4,6$ Hz, $^5J_{5/2} = 0,6$ Hz, 5-H); 5,18 (s, 2 H, 3-OCH₂C₆H₅)

***N,N*-Dimethylnikotinsäureamid (3)**

500 mg (3,3 mmol) Nikotinsäureethylester wurden mit 5 ml einer wässrigen Dimethylaminlösung versetzt und 5 Tage lang bei Raumtemperatur gerührt. Nach Entfernung des Lösungsmittels i. v. kristallisierte **3** im Kolben aus. Die ermittelten Eigenschaften entsprachen den in der Literatur angegebenen⁹⁴.

***N*-Methylnikotinsäureamid (4)**

500 mg (3,3 mmol) Nikotinsäureethylester wurden mit 5 ml einer wässrigen Methylaminlösung versetzt und 5 Tage lang bei Raumtemperatur gerührt. Nach Entfernung des Lösungsmittels i. v. kristallisierte **4** im Kolben aus. Die ermittelten Eigenschaften entsprachen den in der Literatur angegebenen⁹⁴.

Nikotinsäureamid (5)

500 mg (3,3 mmol) Nikotinsäureethylester wurden mit 5 ml einer konzentrierten Ammoniaklösung versetzt und 5 Tage lang bei Raumtemperatur gerührt. Nach Entfernung des Lösungsmittels i. v. kristallisierte **5** im Kolben aus. Die ermittelten Eigenschaften entsprachen den in der Literatur angegebenen⁹⁵.

7.1.2.2 *N*-Acetyl-1,4-dihydropyridine

7.1.2.2.1 Allgemeine Synthesevorschrift

10 mmol des Pyridins werden in einem trockenem Dreihalskolben unter Argonatmosphäre in 50 ml trockenem THF gelöst. Danach werden 0,5 mmol CuI und 3 ml Dimethylsulfid zugegeben. Das entstandene Gemisch wird bei RT gerührt, bis eine klare, in Abhängigkeit des eingesetzten Pyridins gelb bis grünbraun gefärbte Lösung entsteht. Der Kolben wird im Kältebad (Methanol/Isopropanol, Trockeneis) auf $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ abgekühlt. Diese Temperatur wird im Verlauf aller weiteren Syntheseschritte konstant gehalten. Nach 15 Minuten werden langsam 10 mmol Acetylchlorid zugetropft. In Abhängigkeit von der Substitution des Pyridins kann hierbei eine Farbveränderung der Lösung auftreten. Bei nahezu allen verwendeten Pyridinen ist das *N*-Acetylpyridinium-Salz dunkelrot gefärbt. Lediglich bei Verwendung von 3-Acetylpyridin und den Nikotinsäureestern tritt keine Farbveränderung auf. Der Ansatz wird weitere 15 Minuten bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gerührt. Danach werden 10 mmol des benötigten Grignards langsam zugetropft. Bei Ansätzen mit gefärbten Pyridiniumsalzen wird solange Grignard im Überschuss zugegeben, bis das Verschwinden der Rotfärbung eine vollständige Umsetzung der Pyridiniumverbindung anzeigt. Zur vollständigen Umsetzung wird weitere 15 Minuten bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gerührt. Danach wird der Kolben aus dem Kältebad entfernt und weitere 30 Minuten gerührt, bis der Reaktionsansatz etwa Raumtemperatur erreicht. Der Ansatz wird in einen Scheidetrichter überführt und zur Hydrolyse mit 50 ml einer Ammoniumchloridlösung (20 % m/v) versetzt. Anschließend erfolgt dreifache Extraktion mit Ether (50, 25, 25 ml). Die organischen Phasen werden vereint und in mehreren Schritten mit je 50 ml wässriger Ammoniumchlorid-Ammoniak-Lösung (2 x), Wasser, 10 % Salzsäure (2 x), Wasser und einer gesättigten NaCl-Lösung gewaschen. Nach jedem Schritt wird etwa eine Minute geschüttelt und die jeweilige wässrige Phase verworfen. Die organische Lösung wird anschließend über Na_2SO_4 getrocknet und das Lösungsmittel i. v. entfernt. Das Dihydropyridin kann anschließend säulenchromatographisch mit Laufmittel 4 gereinigt und bis auf wenige Ausnahmen durch Zugabe von Methanol zu der öligen, hell- bis dunkelgelben Substanz ausgefällt werden.

Im späteren Verlauf der Arbeiten wurde statt 0,5 mmol CuI und 3 ml DMS ein Gemisch aus 1 mmol CuI und 2 mmol LiCl verwendet. Beide Varianten erwiesen sich hinsichtlich der Ausbeuten und der Regioselektivität als gleichwertig.

7.1.2.2.2 Charakterisierung der Verbindungen

Alle NMR-Spektren der *N*-Acetyl-1,4-dihydropyridine stellen Mischspektren aus dem jeweiligen *Z*- und dem *E*-Rotamer da. Entsprechend werden alle Signale, soweit möglich, der *E*- und *Z*-Form zugeordnet.

(*EZ,RS*)-1-Acetyl-4-methyl-1,4-dihydropyridin-3-yl-carbonsäureethylester (**6**)

6 wurde nach Vorschrift 7.1.2.2.1 aus Ethylnicotinat und Methylmagnesiumchlorid (2 M Lösung in THF) in 51 % Ausbeute als gelbes Öl erhalten.

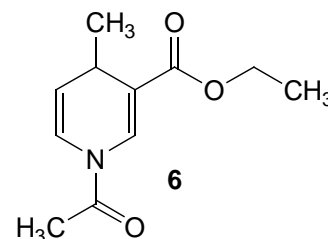
Summenformel: C₁₁H₁₅NO₃

Molgewicht: 209,24 g/mol

IR (PA): 1694 (COOC₂H₅), 1673 (NCOCH₃)

MS (EI): 209 [11,4 M⁺]; 194 [57,1 M⁺-CH₃]; 164 [6,4 M⁺-OC₂H₅]; 152 [100,0 M⁺-CH₃, -OC₂H₂]; 124 [60,7 M⁺-CH₃, -OC₂H₂, -C₂H₄]; 94 [3,6 M⁺-COOC₂H₅]

¹H-NMR: 400 Mhz, CDCl₃ [δ ppm]: 8,14 (s br, 1 H, 2-H [*E*]); 7,61 (s br; 1 H, 2-H [*Z*]); 7,06 (d br, 1 H, ³J_{6/5} = 6,5 Hz, 6-H [*Z*]); 6,49 (d, 1 H, ³J_{6/5} = 6,5 Hz, 6-H [*E*]); 5,14 (m br, 2 H, 5-H [*E,Z*]); 4,19 (m br, 4 H, 3-COOCH₂CH₃ [*E,Z*]); 3,30 (ddq, 2 H, ³J_{4/5} = 4,7 Hz, ³J_{4/CH₃} = 6,7 Hz, ⁴J_{4/6} = 0,8 Hz, 4-H [*E,Z*]); 2,12 (s, 6 H, N-COCH₃ [*E,Z*]); 1,27 (t, 6 H, ³J_{CH₃/CH₂} = 7,1 Hz, 3-COOCH₂CH₃ [*E,Z*]); 1,13 (d, 6 H, ³J_{CH₃/4} = 6,7 Hz, 4-CH₃ [*E,Z*])



(*EZ,RS*)-1-(1-Acetyl-4-methyl-1,4-dihydropyridin-3-yl)ethanon (**7**)

7 wurde nach Vorschrift 7.1.2.2.1 aus 3-Acetylpyridin und Methylmagnesiumchlorid (2 M Lösung in THF) in 36 % Ausbeute als gelbes Öl erhalten.

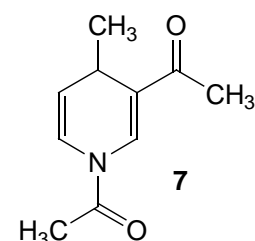
Summenformel: C₁₀H₁₃NO₂

Molgewicht: 179,22 g/mol

IR (PA): 1704 (COCH₃), 1659 (NCOCH₃)

MS (EI): 179 [14,0 M⁺]; 164 [24,0 M⁺-CH₃]; 136 [11,0 M⁺-COCH₃]; 122 [100,0 M⁺-CH₃, -OC₂H₂]; 43 [38,6 COCH₃]

¹H-NMR: 400 Mhz, CDCl₃ [δ ppm]: 8,12 (s br, 1 H, 2-H [*E*]); 7,50 (s br, 1 H, 2-H [*Z*]); 7,07 („s“ br, 1 H, 6-H [*Z*]); 6,49 („s“ br, 1 H, 6-H [*E*]); 5,16 (m br, 2 H, 5-H [*E,Z*]); 3,39 (dq, 2 H, ³J_{4/5} = 5,1 Hz, ³J_{4/CH₃} = 6,8 Hz, 4-H [*E,Z*]); 2,31 (s, 6 H, 3-COCH₃ [*E,Z*]); 2,27 (s, 6 H, N-COCH₃ [*E,Z*]); 1,07 (d, 6 H, ³J_{CH₃/4} = 6,8 Hz, 4-CH₃ [*E,Z*])



(*EZ,RS*)-1-Acetyl-4-phenyl-1,4-dihydropyridin-3-yl-carbonsäureethylester (8)

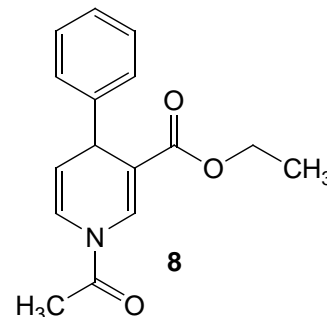
8 wurde nach Vorschrift 7.1.2.2.1 aus Ethylnicotinat und Phenylmagnesiumchlorid (2 M Lösung in THF) in 77 % Ausbeute als gelbes Öl erhalten und konnte aus Methanol als weißer Feststoff kristallisiert werden.

Summenformel: C₁₆H₁₇NO₃

Molgewicht: 271,31 g/mol

Schmelzbereich: 55-57 °C

EA: ber.: C 70,85; H 6,27; N 5,17
gef.: C 70,53; H 6,53; N 5,12



IR (PA): 1693 (COOC₂H₅), 1670 (NCOCH₃)

MS (EI): 271 [17,9 M⁺]; 242 [12,9 M⁺-C₂H₅]; 228 [4,3 M⁺-COCH₃]; 200 [10,0 M⁺-COCH₃, -C₂H₄]; 194 [19,3 M⁺-C₆H₅]; 152 [100,0 M⁺-Ph, -OC₂H₃]

¹H-NMR: 400 Mhz, CDCl₃ [δ ppm]: 8,37 (s br, 1 H, 2-H [*E*]); 7,80 (s br, 1 H, 2-H [*Z*]); 7,30-7,16 (m, 11 H, 2',3',4',5',6'-H [*E,Z*], 6-H [*Z*]); 6,60 („s“ br, 1 H, 6-H [*E*]); 5,24 (m br, 2 H, 5-H [*E,Z*]); 4,47 (d, 2 H, ³J_{4/5} = 4,3 Hz, 4-H [*E,Z*]); 4,07 (ABX₃ AB-Teil, 4 H, ν₀δ = 0,06 ppm, ²J_{A/B} = 10,8 Hz, ³J_{CH₂/CH₃} = 7,1 Hz, 3-COOCH₂CH₃ [*E,Z*]); 2,37 (s br, 6 H, N-COCH₃ [*E,Z*]); 1,14 (ABX₃ X₃-Teil, 6 H, ³J_{CH₂/CH₂} = 7,1 Hz, 3-COOCH₂CH₃ [*E,Z*])

¹³C-NMR: 100 MHz, CDCl₃ [δ ppm]: 166,98 (s, N-COCH₃ [*E*]); 166,64 (s, COOC₂H₅ [*E,Z*]); 166,63 (s, N-COCH₃ [*Z*]); 144,66 (s, C-1' [*E,Z*]); 132,13 (d, C-2 [*E*]); 130,03 (d, C-2 [*Z*]); 128,55 (d, C-3', C-5', [*E,Z*]); 128,12 (d, C-4' [*E,Z*]); 126,91 (d, C-2', C-6' [*E,Z*]); 121,05 (d, C-6 [*Z*]); 119,28 (d, C-6 [*E*]); 113,55 (d, C-5 [*E,Z*]); 113,52 (s, C-3 [*E,Z*]); 60,49 (t, COOCH₂CH₃ [*E,Z*]); 39,18 (d, C-4 [*E,Z*]); 21,33 (q spl, N-COCH₃ [*E,Z*]); 13,93 (q, COOCH₂CH₃ [*E,Z*])

Röntgenstrukturanalyse (ausgewählte Parameter):

Kristallstruktur: monoklin; Raumgruppe: P 2₁/c; Zellvolumen: 1388,6 (4) Å³; Z: 4;
Dichte: 1,298 Mg/m³; μ (Mo-K_α): 0,090 mm⁻¹; einzelne Reflexe: 2586; beobachtete Reflexe: 1923; 2θ_{max}: 88,6°

Zellausdehnung: a = 11,5025 (15) Å α = 90°

b = 7,494 (14) Å β = 99,593 (16)°

c = 16,326 (2) Å γ = 90°

(*EZ,RS*)-1-(1-Acetyl-4-phenyl-1,4-dihydropyridin-3-yl)ethanon (9)

9 wurde nach Vorschrift 7.1.2.2.1 aus 3-Acetylpyridin und Phenylmagnesiumchlorid (2 M Lösung in THF) in 38 % Ausbeute als gelber Feststoff erhalten.

Summenformel: $C_{15}H_{15}NO_2$

Molgewicht: 241,29 g/mol

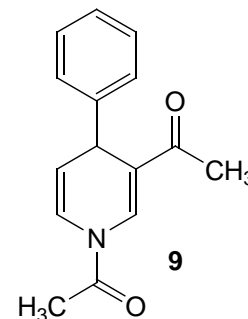
Schmelzbereich: 122-126 °C

EA: ber.: C 74,69; H 6,22; N 5,81
gef.: C 74,39; H 6,24; N 5,75

IR (KBr): 1705 (COCH₃), 1671 (NCOCH₃)

MS (EI): 241 [41,0 M⁺]; 198 [43,0 M⁺-COCH₃]; 164 [4,0 M⁺-Ph]; 122 [100,0 M⁺-Ph, -OC₂H₂]

¹H-NMR: 200 Mhz, CDCl₃ [δ ppm]: 8,33 (s br, 1 H, 2-H [*E*]); 7,34-7,15 (m, 12 H, 2',3',4',5',6'-H [*E,Z*], 2-H [*Z*], 6-H [*Z*]); 6,60 („s“ br, 1 H, 6-H [*E*]); 5,32-5,26 (m br, 2 H, 5-H [*E,Z*]); 4,58 (d, 2 H, ³J_{4/5} = 3,8 Hz, 4-H [*E,Z*]); 2,34 (s, 6 H, 3-COCH₃ [*E,Z*]); 2,27 (s, 6 H, N-COCH₃ [*E,Z*])

**(*EZ,RS*)-1-Acetyl-4-phenyl-1,4-dihydropyridin-3-yl-carbonsäuremethylester (10)**

10 wurde nach Vorschrift 7.1.2.2.1 aus Methylnikotinat und Phenylmagnesiumchlorid (2 M Lösung in THF) in 80 % Ausbeute als hellgelbes Öl erhalten und konnte aus Methanol als weißer Feststoff kristallisiert werden.

Summenformel: $C_{15}H_{15}NO_3$

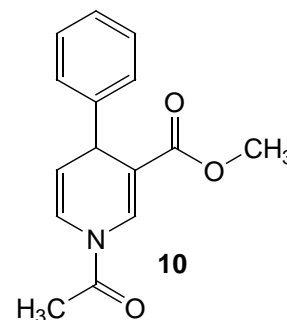
Molgewicht: 257,28 g/mol

Schmelzbereich: 78-81,5 °C

IR (ATR): 1695 (COOCH₃), 1669 (NCOCH₃)

MS (EI): 257 [15,0 M⁺]; 242 [6,4 M⁺-CH₃]; 214 [10,0 M⁺-COCH₃]; 200 [10,7 M⁺-CH₃, -COCH₂]; 180 [32,9 M⁺-C₆H₅]; 138 [100,0 M⁺-C₆H₅, -COCH₂]

¹H-NMR: 400 Mhz, CDCl₃ [δ ppm]: 8,36 (s br, 1 H, 2-H [*E*]); 7,81 (s br, 1 H, 2-H [*Z*]); 7,30-7,17 (m, 11 H, 2',3',4',5',6'-H [*Z,E*], 6-H [*Z*]); 6,60 (s br, 1 H, 6-H [*E*]); 5,24 („s“ br, 2 H, 5-H [*E,Z*]); 4,47 (d, 2 H, ³J_{4/5} = 4,6 Hz, 4-H [*E,Z*]); 3,63 (s, 6 H, 3-COOCH₃ [*E,Z*]); 2,37 (s br, 6 H, N-COCH₃ [*E,Z*])



(EZ,RS)-1-(3-Methyl-4-phenyl-4H-pyridin-1-yl)ethanon (11)

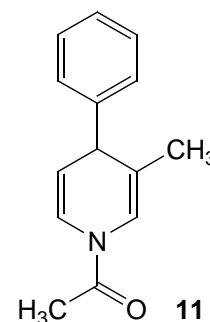
11 wurde nach Vorschrift 7.1.2.2.1 aus 3-Methylpyridin und Phenylmagnesiumchlorid (2 M Lösung in THF) in 61 % Ausbeute als farbloses Öl erhalten.

Summenformel: $C_{14}H_{15}NO$

Molgewicht: 213,28 g/mol

IR (ATR): 1674, 1636 (NCOCH₃)

MS (ESI): 242,1 [M+Na⁺]



¹H-NMR: 400 Mhz, CDCl₃ [δ ppm]: 7,32-7,18 (m, 11 H, 2',3',4',5',6'-H [Z,E], 6-H [Z]); 7,15 (d, 1 H, ⁴J_{2/6} = 1,4 Hz, 2-H [E]); 6,60 (dt, 1 H, ³J_{6/5} = 8,2 Hz, ⁴J_{6/4} = ⁴J_{6/2} = 1,4 Hz, 6-H [E]); 6,45 (d, 1 H, ⁴J_{2/6} = 1,4 Hz, 2-H [Z]); 5,07 (dd, 1 H, ³J_{5/6} = 8,2 Hz, ³J_{5/4} = 4,0 Hz, 5-H [Z]); 4,97 (dd, 1 H, ³J_{5/6} = 8,2 Hz, ³J_{5/4} = 4,0 Hz, 5-H [E]); 3,95 („s“ br, 2 H, 4-H [E,Z]); 2,25 (s, 3 H, N-COCH₃ [Z]); 2,23 (s, 3 H, N-COCH₃ [E]); 1,51 (s, 6 H, 3-CH₃ [E,Z])

(EZ,RS)-1-(3-Methoxy-4-phenyl-4H-pyridin-1-yl)ethanon (12)

12 wurde nach Vorschrift 7.1.2.2.1 aus 3-Methoxypyridin und Phenylmagnesiumchlorid (2 M Lösung in THF) in 40 % Ausbeute als gelbes Öl erhalten und konnte aus Methanol als weißer Feststoff kristallisiert werden.

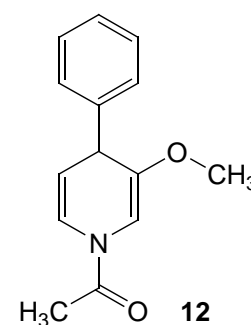
Summenformel: $C_{14}H_{15}NO_2$

Molgewicht: 229,27 g/mol

Schmelzbereich: 50-70 °C

IR (ATR): 1674, 1633 (NCOCH₃)

MS (ESI): 252,2 [M+Na⁺]



¹H-NMR: 400 Mhz, CDCl₃ [δ ppm]: 7,34 (dt, 1 H, ³J_{6/5} = 8,2 Hz, ⁴J_{6/4} = ⁴J_{6/2} = 1,3 Hz, 6-H [Z]); 7,34-7,28 (m, 4 H, 2',6'-H [E,Z]); 7,24-7,20 (m, 6 H, 3',4',5'-H [E,Z]); 6,90 (d, 1 H, ⁴J_{2/6} = 1,3 Hz, 2-H [E]); 6,64 (dt, 1 H, ³J_{6/5} = 8,2 Hz, ⁴J_{6/4} = ⁴J_{6/2} = 1,3 Hz, 6-H [E]); 6,07 (d, 1 H, ⁴J_{2/6} = 1,3 Hz, 2-H [Z]); 5,12 (dd, 1 H, ³J_{5/6} = 8,2 Hz, ³J_{5/4} = 4,3 Hz, 5-H [Z]); 5,03 (dd, 1 H, ³J_{5/6} = 8,2 Hz, ³J_{5/4} = 4,3 Hz, 5-H [E]); 4,23 (dd, 2 H, ³J_{4/5} = 4,3 Hz, ⁴J_{4/6} = 1,3 Hz, 4-H [E,Z]); 3,55 (s, 3 H, 3-OCH₃ [E]); 3,52 (s, 3 H, 3-OCH₃ [Z]); 2,27 (s spl, 6 H, N-COCH₃ [E,Z])

(*EZ,RS*)-1-(3-Ethoxy-4-phenyl-4H-pyridin-1-yl)ethanon (13)

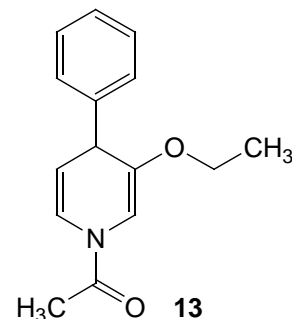
13 wurde nach Vorschrift 7.1.2.2.1 aus **1** und Phenylmagnesiumchlorid (2 M Lösung in THF) in 56 % Ausbeute als hellgelbes Öl erhalten und konnte aus Methanol als weißer Feststoff kristallisiert werden.

Summenformel: C₁₅H₁₇NO₂

Molgewicht: 243,3 g/mol

Schmelzbereich: 124-129 °C

IR (ATR): 1669, 1633 (NCOCH₃)



MS (EI): 243 [27,1 M⁺]; 200 [8,6 M⁺-COCH₃]; 172 [13,6 M⁺-COCH₃, -C₂H₄]; 166 [44,3 M⁺-Ph]; 124 [100,0 M⁺-Ph, -OC₂H₅]; 96 [17,1 M⁺-Ph, -C₂H₄, -COCH₃]

¹H-NMR: 500 Mhz, CDCl₃ [δ ppm]: 7,35-7,28 (m, 5 H, 2',6'-H [*E,Z*], 6-H [*Z*]); 7,23-7,19 (m, 6 H, 3',4',5'-H [*E,Z*]); 6,86 (d, 1 H, ⁴J_{2/6} = 1,2 Hz, 2-H [*E*]); 6,64 (dt, 1 H, ³J_{6/5} = 8,2 Hz, ⁴J_{6/4} = ⁴J_{6/2} = 1,2 Hz, 6-H [*E*]); 6,06 (d, 1 H, ⁴J_{2/6} = 1,2 Hz, 2-H [*Z*]); 5,13 (dd, 1 H, ³J_{5/6} = 8,2 Hz, ³J_{5/4} = 4,4 Hz, 5-H [*Z*]); 5,04 (dd, 1 H, ³J_{5/6} = 8,2 Hz, ³J_{5/4} = 4,4 Hz, 5-H [*E*]); 4,21 („d“, 2 H, ³J_{4/5} = 4,4 Hz, 4-H [*E,Z*]); 3,74 (ABX₃ AB-Teil, 2 H, ν₀δ = 0,1 ppm, ²J_{A/B} = 9,4 Hz, ³J_{CH₂/CH₃} = 7,0 Hz, 3-OCH₂CH₃ [*E*]); 3,68 (ABX₃ AB-Teil, 2 H, ν₀δ = 0,14 ppm, ²J_{A/B} = 9,0 Hz, ³J_{CH₂/CH₃} = 6,9 Hz, 3-OCH₂CH₃ [*Z*]); 2,25 (s, 3 H, N-COCH₃ [*E*]); 2,23 (s, 3 H, N-COCH₃ [*Z*]); 1,20 (ABX₃ X₃-Teil, 3 H, ³J_{CH₃/CH₂} = 6,9 Hz, 3-OCH₂CH₃ [*Z*]); 1,17 (ABX₃ X₃-Teil, 3 H, ³J_{CH₃/CH₂} = 7,0 Hz, 3-OCH₂CH₃ [*E*])

(*EZ,RS*)-1-(3-Benzoyloxy-4-phenyl-4H-pyridin-1-yl)ethanon (14)

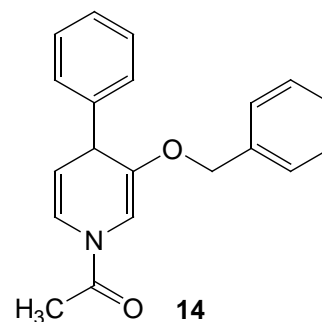
14 wurde nach Vorschrift 7.1.2.2.1 aus **2** und Phenylmagnesiumchlorid (2 M Lösung in THF) in 58 % Ausbeute als braunes Öl erhalten und konnte aus Methanol als weißer Feststoff kristallisiert werden.

Summenformel: C₂₀H₁₉NO₂

Molgewicht: 305,37 g/mol

Schmelzbereich: 78-82 °C

IR (ATR): 1672, 1635 (NCOCH₃)



MS (EI): 305 [15,0 M⁺]; 214 [25,0 M⁺-CH₂C₆H₅]; 186 [17,1 M⁺ -COCH₃, -C₆H₅]; 166 [44,3 M⁺-Ph]; 124 [100,0 M⁺-Ph, -O=C=CH₂]; 91 [32,9 C₇H₇]; 65 [7,1 C₅H₅]

¹H-NMR: 500 Mhz, CDCl₃ [δ ppm]: 7,33-7,20 (m, 17 H, 3-OCH₂C₆H₅ [E,Z], 3',4',5'-H [E,Z], 6-H [Z]); 7,13-7,10 (m, 4 H, 2',6'-H [E,Z]); 6,98 (d, 1 H, ⁴J_{2/6} = 1,3 Hz, 2-H [E]); 6,67 (dt, 1 H, ³J_{6/5} = 8,2 Hz, ⁴J_{6/4} = ⁴J_{6/2} = 1,3 Hz, 6-H [E]); 6,10 (d, 1 H, ⁴J_{2/6} = 1,3 Hz, 2-H [Z]); 5,15 (dd, 1 H, ³J_{5/6} = 8,2 Hz, ³J_{5/4} = 4,3 Hz, 5-H [Z]); 5,07 (dd, 1 H, ³J_{5/6} = 8,2 Hz, ³J_{5/4} = 4,3 Hz, 5-H [E]); 4,77 (AB-System, 2 H, ν₀δ = 0,07 ppm, ²J_{A/B} = 11,8 Hz, 3-OCH₂C₆H₅ [E]); 4,74 (AB-System, 2 H, ν₀δ = 0,10 ppm, ²J_{A/B} = 11,9 Hz, 3-OCH₂C₆H₅ [Z]); 4,31 (d br, 2 H, ³J_{4/5} = 4,3 Hz, 4-H [E,Z]); 2,26 (s, 3 H, N-COCH₃ [E]); 2,16 (s, 3 H, N-COCH₃ [Z])

(EZ,RS)-1-Acetyl-N,N-dimethyl-4-phenyl-1,4-dihydropyridin-3-carbamid (15)

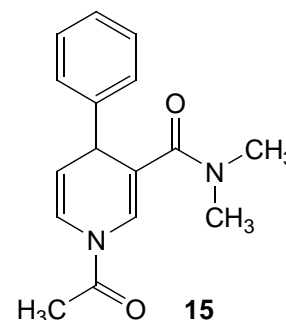
15 wurde nach Vorschrift 7.1.2.2.1 aus **3** und Phenylmagnesiumchlorid (2 M Lösung in THF) in 44 % Ausbeute als gelbes Öl erhalten und konnte aus Methanol als weißer Feststoff kristallisiert werden.

Summenformel: C₁₆H₁₈N₂O₂

Molgewicht: 270,33 g/mol

IR (ATR): 1670, 1631 (NCOCH₃)

MS (ESI): 293,3 [100 M+Na⁺], 271,2 [31 M+H⁺]



¹H-NMR: 400 Mhz, CDCl₃ [δ ppm]: 7,32-7,18 (m, 12 H, arom. H [E,Z], 6-H [Z], 2-H [E]); 6,71 (d, 1 H, ³J_{6/5} = 8,2 Hz, 6-H [E]); 6,65 (s, 1 H, 2-H [Z]); 5,20 (dd, 1 H, ³J_{5/6} = 8,2 Hz, ³J_{5/4} = 4,0 Hz, 5-H [Z]); 5,12 (dd, 1 H, ³J_{5/6} = 8,2 Hz, ³J_{5/4} = 4,0 Hz, 5-H [E]); 4,64 (d, 1 H, ³J_{4/5} = 4,0 Hz, 4-H [E]); 4,60 (d, 1 H, ³J_{4/5} = 4,0 Hz, 4-H [Z]); 2,74 (s, 12 H, 3-CON-(CH₃)₂ [E,Z]); 2,28 (s, 3 H, N-COCH₃ [E]); 2,24 (s, 3 H, N-COCH₃ [Z])

(EZ,RS)-1-(3-Methoxy-4-(4-methylphenyl)-4H-pyridin-1-yl)ethanon (16)

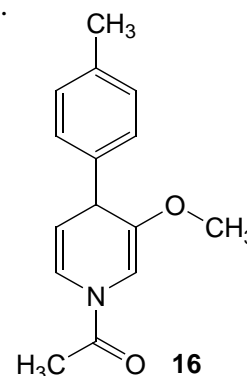
16 wurde nach Vorschrift 7.1.2.2.1 aus 3-Methoxypyridin und *p*-Tolylmagnesiumchlorid (1 M Lösung in THF) in 55 % Ausbeute als weißer Feststoff erhalten.

Summenformel: C₁₅H₁₇NO₂

Molgewicht: 243,3 g/mol

Schmelzbereich: 102-106 °C

IR (ATR): 1670, 1634 (NCOCH₃)



MS (EI): 243 [20,0 M⁺]; 200 [15,0 M⁺-COCH₃]; 152 [31,4 M⁺-C₇H₇]; 110 [100,0 M⁺-C₇H₇, -OC₂H₂]

¹H-NMR: 400 Mhz, CDCl₃ [δ ppm]: 7,31 („d“, 1 H, ³J_{6/5} = 8,3 Hz, 6-H [Z]); 7,13-7,09 (m, 8 H, 2',3',5',6'-H [E,Z]); 6,88 („s“, 1 H, 2-H [E]); 6,62 (dt, 1 H, ³J_{6/5} = 8,3 Hz, ⁴J_{6/4} = ⁴J_{6/2} = 1,3 Hz, 6-H [E]); 6,06 („s“, 1 H, 2-H [Z]); 5,10 (dd, 1 H, ³J_{5/6} = 8,3 Hz, ³J_{5/4} = 4,4 Hz, 5-H [Z]); 5,01 (dd, 1 H, ³J_{5/6} = 8,3 Hz, ³J_{5/4} = 4,4 Hz, 5-H [E]); 4,19 („d“, 2 H, ³J_{4/5} = 4,4 Hz, 4-H [E,Z]); 3,54 (s, 3 H, 3-OCH₃ [E]); 3,52 (s, 3 H, 3-OCH₃ [Z]); 2,31 (s, 6 H, 4'-CH₃ [E,Z]); 2,26 (s spl, 6 H, N-COCH₃ [E,Z])

(EZ,RS)-1-(3-Methoxy-4-(4-methoxyphenyl)-4H-pyridin-1-yl)ethanon (17)

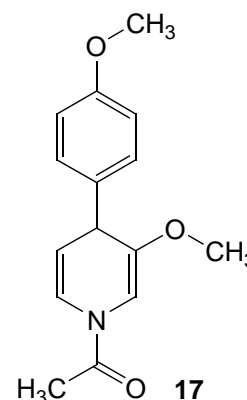
17 wurde nach Vorschrift 7.1.2.2.1 aus 3-Methoxypyridin und *p*-Methoxyphenylmagnesiumbromid (0,5 M Lösung in THF) in 33 % Ausbeute als gelbes Öl erhalten und konnte aus Methanol als weißer Feststoff kristallisiert werden.

Summenformel: C₁₅H₁₇NO₃

Molgewicht: 259,3 g/mol

Schmelzbereich: 78-83 °C

IR (ATR): 1668, 1633 (NCOCH₃)



MS (EI): 259 [50,7 M⁺]; 228 [2,1 M⁺-OCH₃]; 216 [34,3 M⁺-COCH₃]; 186 [8,6 M⁺-C₂H₂O, -OCH₃]; 152 [34,3 M⁺-C₇H₇O]; 110 [100,0 M⁺-C₇H₇O, -OC₂H₂]

¹H-NMR: 400 Mhz, CDCl₃ [δ ppm]: 7,31 („d“, 1 H, ³J_{6/5} = 8,2 Hz, 6-H [Z]); 7,14-7,11 (m, 4 H, 2',6'-H [E,Z], Teil AA' des AA'BB'-Systems); 6,87 (d, 1 H,

$^4J_{2/6} = 1,4$ Hz, 2-H [*E*]); 6,85-6,83 (m, 4 H, 3',5'-H [*E,Z*], Teil BB' des AA'BB'-Systems); 6,62 (dt, 1 H, $^3J_{6/5} = 8,2$ Hz, $^4J_{6/4} = ^4J_{6/2} = 1,4$ Hz, 6-H [*E*]); 6,04 („s“, 1 H, 2-H [*Z*]); 5,10 (dd, 1 H, $^3J_{5/6} = 8,2$ Hz, $^3J_{5/4} = 4,3$ Hz, 5-H [*Z*]); 5,00 (dd, 1 H, $^3J_{5/6} = 8,2$ Hz, $^3J_{5/4} = 4,3$ Hz, 5-H [*E*]); 4,17 („d“, 2 H, $^3J_{4/5} = 4,3$ Hz, 4-H [*E,Z*]); 3,77 (s, 6 H, 4'-OCH₃ [*E,Z*]); 3,54 (s, 3 H, 3-OCH₃ [*E*]); 3,52 (s, 3 H, 3-OCH₃ [*Z*]); 2,26 (s spl, 6 H, N-COCH₃ [*E,Z*])

(*EZ,RS*)-1-(3-Methoxy-4-(2-methoxyphenyl)-4H-pyridin-1-yl)ethanon (18)

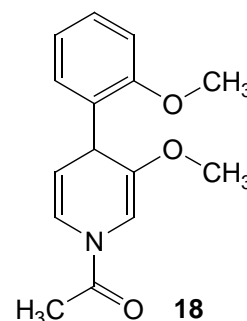
18 wurde nach Vorschrift 7.1.2.2.1 aus 3-Methoxypyridin und *o*-Methoxyphenylmagnesiumbromid (1 M Lösung in THF) in 60 % Ausbeute als gelbes Öl erhalten und konnte aus Methanol als weißer Feststoff kristallisiert werden.

Summenformel: C₁₅H₁₇NO₃

Molgewicht: 259,3 g/mol

Schmelzbereich: 94-97,5 °C

IR (ATR): 1668, 1634 (NCOCH₃)



MS (EI): 259 [43,6 M⁺]; 244 [5,0 M⁺-CH₃]; 228 [2,1 M⁺-OCH₃]; 216 [24,3 M⁺-COCH₃]; 202 [21,4 M⁺-OC₂H₂, -CH₃]; 184 [17,1 M⁺-C₂H₃O, -HOCH₃]; 169 [22,1 184-CH₃]; 152 [29,3 M⁺-C₇H₇O]; 110 [100,0 M⁺-C₇H₇O, -OC₂H₂]

¹H-NMR: 500 Mhz, CDCl₃ [δ ppm]: 7,22 (dt, 1 H, $^3J_{6/5} = 8,3$ Hz, $^4J_{6/4} = ^4J_{6/2} = 1,2$ Hz, 6-H [*Z*]); 7,18 (ddd, 2 H, $^3J_{4/3'} = 8,1$ Hz, $^3J_{4/5'} = 7,4$ Hz, $^4J_{4/6'} = 1,6$ Hz, 4'-H [*E,Z*]); 7,09 (dd, 2 H, $^3J_{6/5'} = 7,4$ Hz, $^4J_{6/4'} = 1,6$ Hz, 6'-H [*E,Z*]); 7,00 (d, 1 H, $^4J_{2/6} = 1,2$ Hz, 2-H [*E*]); 6,92 (dt, 2 H, $^3J_{5/6'} = ^3J_{5/4'} = 7,4$ Hz, $^4J_{5/3'} = 0,8$ Hz, 5'-H [*E,Z*]); 6,86 („d“, 2 H, $^3J_{3/4'} = 8,1$ Hz, 3'-H [*E,Z*]); 6,53 (dt, 1 H, $^3J_{6/5} = 8,3$ Hz, $^4J_{6/4} = ^4J_{6/2} = 1,2$ Hz, 6-H [*E*]); 6,20 (d, 1 H, $^4J_{2/6} = 1,2$ Hz, 2-H [*Z*]); 5,12 (dd, 1 H, $^3J_{5/6} = 8,3$ Hz, $^3J_{5/4} = 4,4$ Hz, 5-H [*Z*]); 5,06 (dd, 1 H, $^3J_{5/6} = 8,3$ Hz, $^3J_{5/4} = 4,4$ Hz, 5-H [*E*]); 4,77 (dd, 1 H, $^3J_{4/5} = 4,4$ Hz, $^4J_{4/6} = 1,2$ Hz, 4-H [*Z*]); 4,75 (dd, 1 H, $^3J_{4/5} = 4,4$ Hz, $^4J_{4/6} = 1,2$ Hz, 4-H [*E*]); 3,83 (s spl, 6 H, 2'-OCH₃ [*E,Z*]); 3,58 (s, 3 H, 3-OCH₃ [*E*]); 3,54 (s, 3 H, 3-OCH₃ [*Z*]); 2,26 (s, 3 H, N-COCH₃ [*Z*]); 2,24 (s, 3 H, N-COCH₃ [*E*])

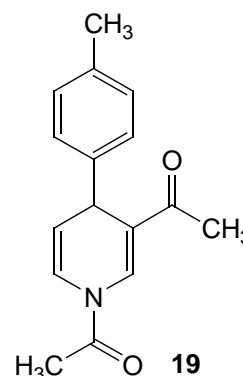
(EZ,RS)-1-(1-Acetyl-4-(4-methylphenyl)-1,4-dihydropyridin-3-yl)ethanon (19)

19 wurde nach Vorschrift 7.1.2.2.1 aus 3-Acetylpyridin und *p*-Tolylmagnesiumchlorid (1 M Lösung in THF) in 79 % Ausbeute als dunkelgelbes Öl erhalten und konnte aus Methanol als gelber Feststoff kristallisiert werden.

Summenformel: C₁₆H₁₇NO₂

Molgewicht: 255,31 g/mol

Schmelzbereich: 116-118,5 °C



IR (ATR): 1703 (3-COCH₃), 1660, 1605 (NCOCH₃)

MS (EI): 255 [32,0 M⁺]; 240 [3,6 M⁺-CH₃]; 212 [50,7 M⁺-COCH₃]; 122 [100,0 M⁺-C₇H₇, -OC₂H₂]

¹H-NMR: 400 Mhz, CDCl₃ [δ ppm]: 8,29 (s br, 1 H, 2-H [E]); 7,69 (s br, 1 H, 2-H [Z]); 7,19 (s br, 1 H, 6-H [Z]); 7,11-7,06 (m, 8 H, 2',3',5',6'-H [E,Z], AA'BB'-System); 6,63 (s br, 1 H, 6-H [E]); 5,26 (s br, 2 H, 5-H [E,Z]); 4,52 (d, 2 H, ³J_{4/5} = 4,8 Hz, 4-H [E,Z]); 2,36 (s, 6 H, 3-COCH₃ [E,Z]); 2,28 (s, 6 H, 4'-CH₃ [E,Z]); 2,25 („s“, 6 H, N-COCH₃ [E,Z])

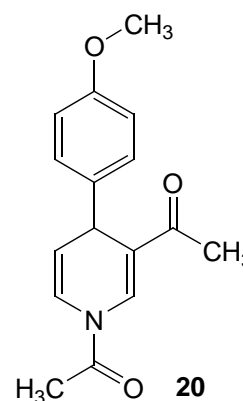
(EZ,RS)-1-(1-Acetyl-4-[4-methoxyphenyl]-1,4-dihydropyridin-3-yl)ethanon (20)

20 wurde nach Vorschrift 7.1.2.2.1 aus 3-Acetylpyridin und *p*-Methoxyphenylmagnesiumbromid (0,5 M Lösung in THF) in 47 % Ausbeute als gelbes Öl erhalten und konnte aus Methanol als weißer Feststoff kristallisiert werden.

Summenformel: C₁₆H₁₇NO₃

Molgewicht: 271,31 g/mol

Schmelzbereich: 101,5-104,5 °C



IR (ATR): 1702 (3-COCH₃), 1660, 1605 (NCOCH₃)

MS (EI): 271 [40,7 M⁺]; 228 [70,7 M⁺-COCH₃]; 186 [22,9 M⁺-2 x COCH₃]; 122 [100,0 M⁺-C₇H₇O, -OC₂H₂]

¹H-NMR: 400 Mhz, CDCl₃ [δ ppm]: 8,28 (s br, 1 H, 2-H [E]); 7,69 (s br, 1 H, 2-H [Z]); 7,24 (s br, 1 H, 6-H [Z]); 7,14-7,11 (m, 4 H, 2',6'-H [E,Z], Teil AA' des AA'BB'-Systems); 6,81-6,79 (m, 4 H, 3',5'-H [E,Z], Teil BB' des

AA'BB'-Systems); 6,63 (s br, 1 H, 6-H [E]); 5,25 (s br, 2 H, 5-H [E,Z]); 4,51 (d, 2 H, $^3J_{4/5} = 4,8$ Hz, 4-H [E,Z]); 3,75 (s, 6 H, 4'-OCH₃ [E,Z]); 2,36 (s br, 6 H, 3-COCH₃ [E,Z]); 2,25 („s“ br, 6 H, N-COCH₃ [E,Z])

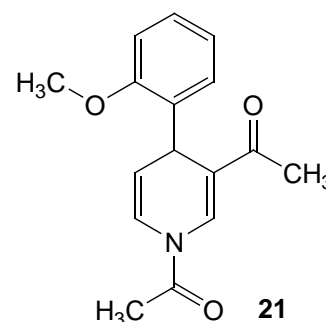
(EZ,RS)-1-(1-Acetyl-4-[2-methoxyphenyl]-1,4-dihydropyridin-3-yl)ethanon (21)

21 wurde nach Vorschrift 7.1.2.2.1 aus 3-Methoxypyridin und *o*-Methoxyphenylmagnesiumbromid (1 M Lösung in THF) in 83 % Ausbeute als gelbe zähe Substanz erhalten und konnte nicht kristallisiert werden. Nach längerer Lagerung im Gefrierfach erstarrte **21** glasartig.

Summenformel: C₁₆H₁₇NO₃

Molgewicht: 271,31 g/mol

Schmelzbereich: 33-35 °C



IR (ATR): 1702 (3-COCH₃), 1663, 1610 (NCOCH₃)

MS (EI): 271 [52,1 M⁺]; 240 [25,7 M⁺-OCH₃]; 228 [53,6 M⁺-COCH₃]; 198 [71,4 M⁺-OCH₃, -COCH₂]; 186 [72,9 M⁺-2 x COCH₃]; 122 [100,0 M⁺-C₇H₇O, -COCH₂]

¹H-NMR: 400 Mhz, CDCl₃ [δ ppm]: 8,43 (s br, 1 H, 2-H [E]); 7,84 (s br, 1 H, 2-H [Z]); 7,18-7,09 (m br, 3 H, 4'-H [E,Z], 6-H [Z]); 7,96-7,82 (m br, 6 H, 3',5',6'-H [E,Z]); 6,48 (s br, 1 H, 6-H [E]); 5,33 (dd, 2 H, $^3J_{5/6} = 8,1$ Hz, $^3J_{5/4} = 4,6$ Hz, 5-H [E,Z]); 4,97 (d, 2 H, $^3J_{4/5} = 4,6$ Hz, 4-H [E,Z]); 3,86 (s, 6 H, 2'-OCH₃ [E,Z]); 2,34 (s, 6 H, 3-COCH₃ [E,Z]); 2,30 („s“ br, 6 H, N-COCH₃ [E,Z])

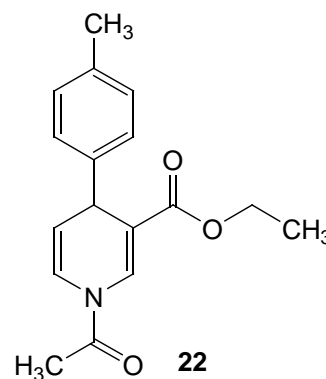
(EZ,RS)-1-Acetyl-4-(4-methylphenyl)-1,4-dihydropyridin-3-yl-carbonsäureethylester (22)

22 wurde nach Vorschrift 7.1.2.2.1 aus Ethylnicotinat und *p*-Tolylmagnesiumchlorid (1 M Lösung in THF) in 68 % Ausbeute als gelbes Öl erhalten und konnte aus Methanol als weißer Feststoff kristallisiert werden.

Summenformel: C₁₇H₁₉NO₃

Molgewicht: 285,34 g/mol

Schmelzbereich: 58-61,5 °C



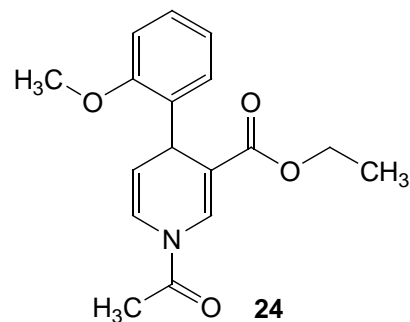
(*EZ,RS*)-1-Acetyl-4-(2-methoxyphenyl)-1,4-dihydropyridin-3-yl-carbonsäureethylester (24)

24 wurde nach Vorschrift 7.1.2.2.1 aus Ethylnikotinat und *o*-Methoxyphenylmagnesiumbromid (1 M Lösung in THF) in 38 % Ausbeute als gelbes Öl erhalten und konnte aus Methanol als weißer Feststoff kristallisiert werden.

Summenformel: C₁₇H₁₉NO₄

Molgewicht: 301,34 g/mol

Schmelzbereich: 101-103,5 °C



IR (ATR): 1697 (COOC₂H₅), 1671, 1623 (NCOCH₃)

MS (ESI): 301 [22,1 M⁺]; 272 [25,7 M⁺-OCH₃]; 230 [100,0 M⁺-COCH₃, -C₂H₄]; 212 [20,7 M⁺-CH₃, -COOC₂H₅]; 152 [44,3 M⁺-COCH₂, -C₇H₇O]

¹H-NMR: 400 Mhz, CDCl₃ [δ ppm]: 8,46 (s br, 1 H, 2-H [*E*]); 7,91 (s br, 1 H, 2-H [*Z*]); 7,15 (ddd, 2 H, ³J_{4/3'} = 7,5 Hz, ³J_{4/5'} = 8,1 Hz, ⁴J_{4/6'} = 1,7 Hz, 4'-H [*E,Z*]); 7,10 (s br, 1 H, 6-H [*Z*]); 7,03 (dd, 2 H, ³J_{6/5'} = 7,5 Hz, ⁴J_{6/4'} = 1,7 Hz, 6'-H [*E,Z*]); 6,88 (dt, 2 H, ³J_{5/6'} = ³J_{5/4'} = 7,5 Hz, ⁴J_{5/3'} = 1,0 Hz, 5'-H [*E,Z*]); 6,84 (dd, 2 H, ³J_{3/4'} = 7,5 Hz, ⁴J_{3/5'} = 1,0 Hz, 3'-H [*E,Z*]); 6,47 (s br, 1 H, 6-H [*E*]); 5,26 (s br, 2 H, 5-H [*E,Z*]); 4,92 (dd, 2 H, ³J_{4/5} = 4,5 Hz, ⁴J_{4/6} = 1,0 Hz, 4-H [*E,Z*]); 4,06 (m br, 4 H, 3-COOCH₂CH₃ [*E,Z*]); 3,84 (s, 6 H, 2'-OCH₃ [*E,Z*]); 2,38 (s br, 3 H, N-COCH₃ [*Z*]); 2,27 (s br, 3 H, N-COCH₃ [*E*]); 1,10 (s br, 6 H, 3-COOCH₂CH₃ [*E,Z*])

7.1.2.3 N-Phenoxycarbonyl-1,4-dihydropyridine

7.1.2.3.1 Allgemeine Synthesevorschrift

Die Darstellung der N-Phenoxycarbonyl-1,4-dihydropyridine erfolgte analog zur Vorschrift 7.1.2.2.1 Anstelle des Acetylchlorids wurde eine äquivalente Menge Chlorameisensäurephenylester eingesetzt. Die N-Phenoxycarbonyl-1,4-dihydropyridine wurden mit Laufmittel 6 säulenchromatographisch gereinigt.

7.1.2.3.2 Charakterisierung der Verbindungen

(*EZ,RS*)-3-Brom-4-phenyl-4H-pyridin-1-carbonsäurephenylester (**25**)

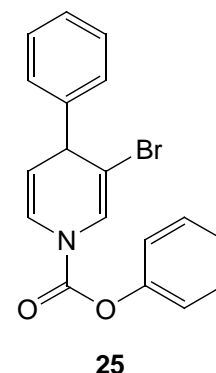
25 wurde nach Vorschrift 7.1.2.3.1 aus 3-Brompyridin und Phenylmagnesiumchlorid (2 M Lösung in THF) mit 81 % Ausbeute als gelbes Öl erhalten und konnte aus Methanol als weißer Feststoff kristallisiert werden.

Summenformel: $C_{18}H_{14}BrNO_2$

Molgewicht: 356,21 g/mol

Schmelzbereich: 115-120 °C

IR (ATR): 1734 (NCOOC₆H₅)



MS (EI): 357 [22,1 M⁺ (⁸¹Br)]; 357 [22,9 M⁺ (⁷⁹Br)]; 280 [90,7 M⁺-C₆H₅ (⁸¹Br)]; 278 [91,4 M⁺-C₆H₅ (⁷⁹Br)]; 236 [12,9 M⁺-C₆H₅OCO (⁸¹Br)]; 234 [12,9 M⁺-C₆H₅OCO (⁷⁹Br)]; 160 [22,9 M⁺-C₆H₅OCO, -C₆H₄ (⁸¹Br)]; 158 [22,5 M⁺-C₆H₅OCO, -C₆H₄ (⁷⁹Br)]; 77 [100,0 Ph]

¹H-NMR: 400 Mhz, CDCl₃ [δ ppm]: 7,41-7,26 (m, 18 H, arom. H von N-COOPh, 3',4',5'-H, 2-H [*E,Z*]); 7,17-7,16 (m, 4 H, 2',6'-H [*E,Z*]); 7,05-7,00 (m, 2 H, 6-H [*E,Z*]); 5,13-5,09 (m, 1 H, 5-H [*Z*]); 5,05-5,02 (m, 1 H, 5-H [*E*]); 4,36 (d, 2 H, ³J_{4/5} = 4,0 Hz, 4-H [*E,Z*])

(EZ,RS)-3-Chlor-4-phenyl-4H-pyridin-1-carbonsäurephenylester (26)

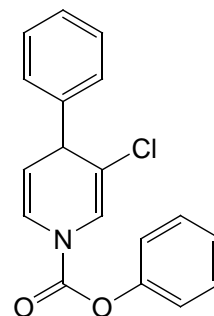
26 wurde nach Vorschrift 7.1.2.3.1 aus 3-Chlorpyridin und Phenylmagnesiumchlorid (2 M Lösung in THF) in 84 % Ausbeute als gelbes Öl erhalten und konnte aus Methanol als weißer Feststoff kristallisiert werden.

Summenformel: $C_{18}H_{14}ClNO_2$

Molgewicht: 311,76 g/mol

Schmelzbereich: 105-108 °C

IR (ATR): 1732 (NCOOC₆H₅)

**26**

MS (EI): 313 [10,7 M⁺ (³⁷Cl)]; 311 [28,6 M⁺ (³⁵Cl)]; 236 [35,7 M⁺-C₆H₅ (³⁷Cl)]; 234 [100,0 M⁺-C₆H₅ (³⁵Cl)]; 192 [8,6 M⁺-C₆H₅OCO (³⁷Cl)]; 190 [24,3 M⁺-C₆H₅OCO (³⁵Cl)]; 116 [12,1 M⁺-C₆H₅OCO, -C₆H₄ (³⁷Cl)]; 114 [34,3 M⁺-C₆H₅OCO, -C₆H₄ (³⁵Cl)]; 77 [87,1 Ph]

¹H-NMR: 500 Mhz, CDCl₃ [δ ppm]: 7,42-7,24 (m, 18 H, arom. H von N-COOPh, 3',4',5'-H, 2-H [E,Z]); 7,18-7,16 (m, 4 H, 2',6'-H [E,Z]); 7,05-7,00 (m, 2 H, 6-H [E,Z]); 5,15-5,13 (m, 1 H, 5-H [Z]); 5,08-5,06 (m, 1 H, 5-H [E]); 4,32 (d, 2 H, ³J_{4/5} = 3,9 Hz, 4-H [E,Z])

(EZ,RS)-3-Methoxycarbonyl-4-phenyl-4H-pyridin-1-carbonsäurephenylester (27)

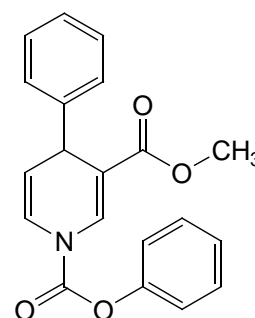
27 wurde nach Vorschrift 7.1.2.3.1 aus 3-Methylnicotinat und Phenylmagnesiumchlorid (2 M Lösung in THF) in 79 % Ausbeute als gelbes Öl erhalten und konnte aus Methanol als weißer Feststoff kristallisiert werden.

Summenformel: $C_{20}H_{17}NO_4$

Molgewicht: 335,35 g/mol

Schmelzbereich: 115-122 °C

IR (ATR): 1744 (COOCH₃), 1709 (NCOOC₆H₅)

**27**

MS (EI): 335 [22,1 M⁺]; 320 [19,3 M⁺-CH₃]; 258 [100,0 M⁺-C₆H₅]; 214 [27,1 M⁺-COOC₆H₅]; 138 [35,7 M⁺-C₆H₄-COOC₆H₅]; 77 [50,7 Ph]

¹H-NMR: 400 Mhz, CDCl₃ [δ ppm]: 8,15 (s br, 1 H, 2-H); 7,47-7,44 (m, 2 H, 2,6-H des N-COOPh); 7,35-7,30 (m, 7 H, 3,5-H des N-COOPh, arom. H des 4-C₆H₅); 7,23-7,18 (m, 1 H, 4-H des N-COOPh); 7,04 (s br, 1 H, 6-H);

5,35-5,31 (m br, 1 H, 5-H); 4,52 (dd, 1 H, $^3J_{4/5} = 4,7$ Hz, $^4J_{4/6} = 1,1$ Hz, 4-H); 3,61 (s, 3 H, 3-COOCH₃)

(EZ,RS)-3-(Dimethylcarbamoyl)-phenyl-4H-pyridin-1-carbonsäurephenylester (28)

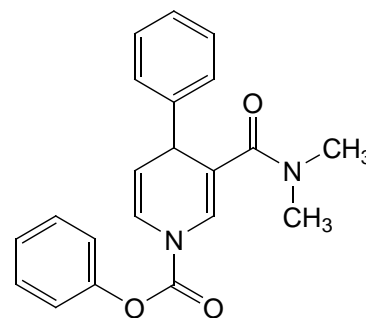
28 wurde nach Vorschrift 7.1.2.3.1 aus **3** und Phenylmagnesiumchlorid (2 M Lösung in THF) in 86 % Ausbeute als gelbes Öl erhalten und konnte aus Ether nach Anfällung mit Petrolether als weißer Feststoff kristallisiert werden.

Summenformel: C₂₁H₂₀N₂O₃

Molgewicht: 348,4 g/mol

Schmelzbereich: 92-95,5 °C

IR (ATR): 1732 (NCOOC₆H₅)



28

MS (EI): 348 [42,9 M⁺]; 303 [20,7 M⁺-HNC₂H₆]; 275 [37,1 M⁺-HCONC₂H₆]; 271 [13,6 M⁺-C₆H₅]; 227 [100,0 M⁺-COOPh]; 182 [50,0 M⁺-COOPh, -OC₂H₂, -HCONC₂H₆]; 151 [18,6 M⁺-C₆H₄, -COOPh]; 77 [65 Ph]

¹H-NMR: 400 Mhz, CDCl₃ [δ ppm]: 7,44-7,36 (m, 2 H, 2,6-H des N-COOPh); 7,33-7,04 (m, 10 H, 3,4,5-H des N-COOPh, arom. H des 4-C₆H₅, 2,6-H); 5,26-5,15 (m br, 1 H, 5-H [E,Z]); 4,68 (s br, 1 H, 4-H); 2,76 (s, 6 H, 3-CON(CH₃)₂)

(EZ,RS)-3-Methoxy-4-phenyl-4H-pyridin-1-carbonsäurephenylester (29)

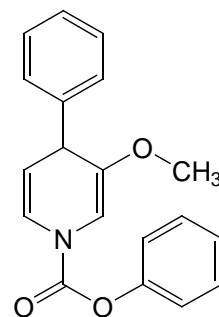
29 wurde nach Vorschrift 7.1.2.3.1 aus 3-Methoxypyridin und Phenylmagnesiumchlorid (2 M Lösung in THF) in 95 % Ausbeute als gelbes Öl erhalten und konnte aus Methanol als weißer Feststoff kristallisiert werden.

Summenformel: C₁₉H₁₇NO₃

Molgewicht: 307,34 g/mol

Schmelzbereich: 104,5-107 °C

IR (ATR): 1718 (NCOOC₆H₅)



29

MS (EI): 307 [41,4 M⁺]; 230 [100,0 M⁺-C₆H₅]; 186 [24,3 M⁺-COOC₆H₅]; 110 [46,4 M⁺-C₆H₄, -COOC₆H₅]; 77 [47,9 Ph]

¹H-NMR: 400 Mhz, CDCl₃ [δ ppm]: 7,42-7,16 (m, 20 H, arom. H [E,Z]); 7,07

(,d“, 1 H, $^3J_{6/5} = 8,2$ Hz, 6-H [*E*]); 7,04 (,d“, 1 H, $^3J_{6/5} = 8,2$ Hz, 6-H [*Z*]); 6,55 (s, 2 H, 2-H [*E,Z*]), 5,13 (dd, 1 H, $^3J_{5/6} = 8,2$ Hz, $^3J_{5/4} = 4,2$ Hz, 5-H [*Z*]); 5,06 (dd, 1 H, $^3J_{5/6} = 8,2$ Hz, $^3J_{5/4} = 4,2$ Hz, 5-H [*E*]); 4,27 (dd, 2 H, $^3J_{4/5} = 4,2$ Hz, $^4J_{4/6} = 1$ Hz, 4-H [*E,Z*]); 3,55 (s spl, 6 H, 3-OCH₃ [*E,Z*])

(*EZ,RS*)-3-Ethoxy-4-phenyl-4H-pyridin-1-carbonsäurephenylester (30)

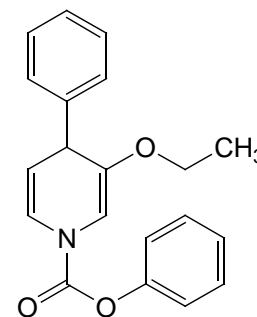
30 wurde nach Vorschrift 7.1.2.3.1 aus **1** und Phenylmagnesiumchlorid (2 M Lösung in THF) in 92 % Ausbeute als gelbes Öl erhalten und konnte aus Methanol als weißer Feststoff kristallisiert werden.

Summenformel: C₂₀H₁₉NO₃

Molgewicht: 321,37 g/mol

Schmelzbereich: 72-77 °C

IR (ATR): 1720 (NCOOC₆H₅)



30

MS (EI): 321 [27,1 M⁺]; 244 [100,0 M⁺-C₆H₅]; 200 [3,6 M⁺-COOC₆H₅]; 172 [17,1 M⁺-C₂H₄-COOC₆H₅]; 124 [41,4 M⁺-C₆H₄, -COOC₆H₅]; 96 [5,7 M⁺-C₆H₄, -C₂H₄, -COOC₆H₅]; 77 [33,6 Ph]

¹H-NMR: 400 Mhz, CDCl₃ [δ ppm]: 7,41-7,15 (m, 20 H, arom. H [*E,Z*]); 7,07 (,d“, 1 H, $^3J_{6/5} = 8,2$ Hz, 6-H [*E*]); 7,04 (,d“, 1 H, $^3J_{6/5} = 8,2$ Hz, 6-H [*Z*]); 6,52 (s spl, 2 H, 2-H [*E,Z*]), 5,15 (dd, 1 H, $^3J_{5/6} = 8,2$ Hz, $^3J_{5/4} = 4,3$ Hz, 5-H [*Z*]); 5,07 (dd, 1 H, $^3J_{5/6} = 8,2$ Hz, $^3J_{5/4} = 4,3$ Hz, 5-H [*E*]); 4,25 (dd, 2 H, $^3J_{4/5} = 4,3$ Hz, $^4J_{4/6} = 1,1$ Hz, 4-H [*E,Z*]); 3,83-3,63 (m, 4 H, 3-OCH₂CH₃ [*E,Z*]), 1,22-1,17 (m, 6 H, 3-OCH₂CH₃ [*E,Z*])

(*EZ,RS*)-3-Benzoyloxy-4-phenyl-4H-pyridin-1-carbonsäurephenylester (31)

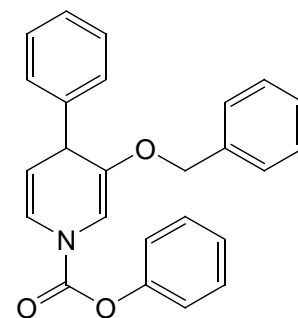
31 wurde nach Vorschrift 7.1.2.3.1 aus **2** und Phenylmagnesiumchlorid (2 M Lösung in THF) in 91 % Ausbeute als braunes Öl erhalten und konnte aus Methanol als weißer Feststoff kristallisiert werden.

Summenformel: C₂₅H₂₁NO₃

Molgewicht: 383,44 g/mol

Schmelzbereich: 61-64,5 °C

IR (ATR): 1719 (NCOOC₆H₅)



31

MS (EI): 383 [35,7 M⁺]; 292 [78,6 M⁺-C₇H₇]; 91 [100,0 C₇H₇]; 77 [66,1 Ph]; 65 [16,4 C₅H₅]

¹H-NMR: 400 Mhz, CDCl₃ [δ ppm]: 7,42-7,05 (m, 32 H, arom. H [E,Z]), 6-H [E,Z]); 6,62 (s spl, 2 H, 2-H [E,Z]), 5,17 (dd, 1 H, ³J_{5/6} = 8,2 Hz, ³J_{5/4} = 4,2 Hz, 5-H [Z]); 5,09 (dd, 1 H, ³J_{5/6} = 8,2 Hz, ³J_{5/4} = 4,2 Hz, 5-H [E]); 4,77 (AB-System, 4 H, ν₀δ = 0,08 ppm, ²J = 11,8 Hz, 3-OCH₂C₆H₅ [E,Z]); 4,34 (dd, 2 H, ³J_{4/5} = 4,2 Hz, ⁴J_{4/6} = 1,2 Hz, 4-H [E,Z])

(E,Z,RS)-3-Methoxy-4-(4-methylphenyl)-4H-pyridin-1-carbonsäurephenylester (32)

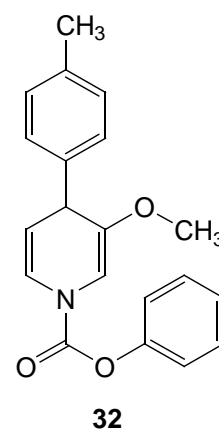
32 wurde nach Vorschrift 7.1.2.3.1 aus 3-Methoxypyridin und *p*-Tolylmagnesiumchlorid (1 M Lösung in THF) in 95 % Ausbeute als dunkelgelbes Öl erhalten und konnte aus Methanol als gelber Feststoff kristallisiert werden.

Summenformel: C₂₀H₁₉NO₃

Molgewicht: 321,37 g/mol

Schmelzbereich: 105-110 °C

IR (ATR): 1726 (NCOOC₆H₅)



MS (EI): 337 [100,0 M⁺]; 322 [13,6 M⁺-CH₃]; 306 [7,1 M⁺-OCH₃]; 230 [90,7 M⁺-C₇H₇]; 216 [18,6 M⁺-COOPh]; 110 [17,1 M⁺-COOPh, -C₇H₇, -CH₃]; 77 [18,6 Ph]

¹H-NMR: 400 Mhz, CDCl₃ [δ ppm]: 7,40-7,36 (m, 4 H, 2,6 H des N-COOPh [E,Z]); 7,19-7,12 (m, 14 H, 2',3',5',6'-H, 3,4,5 H des N-COOPh [E,Z]); 7,05 („d“, 1 H, ³J_{6/5} = 8,1 Hz, 6-H [E]); 7,01 („d“, 1 H, ³J_{6/5} = 8,1 Hz, 6-H [Z]); 6,53 (s, 2 H, 2-H [E,Z]), 5,11 (dd, 1 H, ³J_{5/6} = 8,1 Hz, ³J_{5/4} = 4,1 Hz, 5-H [Z]); 5,03 (dd, 1 H, ³J_{5/6} = 8,1 Hz, ³J_{5/4} = 4,1 Hz, 5-H [E]); 4,22 (d, 2 H, ³J_{4/5} = 4,1 Hz, 4-H [E,Z]); 3,54 (s spl, 6 H, 3-OCH₃ [E,Z]); 2,32 (s, 6 H, 4'-CH₃ [E,Z])

(*EZ,RS*)-3-Methoxy-4-(4-methoxyphenyl)-4H-pyridin-1-carbonsäurephenylester (33)

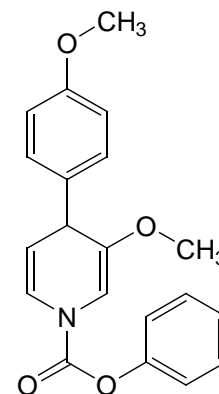
33 wurde nach Vorschrift 7.1.2.3.1 aus 3-Methoxypyridin und *p*-Methoxyphenylmagnesiumbromid (0,5 M Lösung in THF) in 81 % Ausbeute als dunkelgelbes Öl erhalten und konnte aus Methanol als gelblicher Feststoff kristallisiert werden.

Summenformel: C₂₀H₁₉NO₄

Molgewicht: 337,37 g/mol

Schmelzbereich: 77-82 °C

IR (ATR): 1725 (NCOOC₆H₅)

**33**

MS (EI): 321 [58,7 M⁺]; 230 [100,0 M⁺-C₇H₇O]; 110 [21,4 M⁺-COOPh, -C₇H₇O, -CH₃]; 77 [11,4 Ph]

¹H-NMR: 400 Mhz, CDCl₃ [δ ppm]: 7,41-7,36 (m, 4 H, 2,6 H des N-COOPh [*E,Z*]); 7,21-7,15 (m, 10 H, 2',6'-H, 3,4,5 H des N-COOPh [*E,Z*]); 7,05 („d“, 1 H, ³J_{6/5} = 8,2 Hz, 6-H [*E*]); 7,02 („d“, 1 H, ³J_{6/5} = 8,2 Hz, 6-H [*Z*]); 6,88-6,84 (m, 4 H, 3',5'-H, Teil BB' des AA'BB'-Systems [*E,Z*]); 6,52 (s, 2 H, 2-H [*E,Z*]), 5,11 (dd, 1 H, ³J_{5/6} = 8,2 Hz, ³J_{5/4} = 4,1 Hz, 5-H [*Z*]); 5,03 (dd, 1 H, ³J_{5/6} = 8,2 Hz, ³J_{5/4} = 4,1 Hz, 5-H [*E*]); 4,21 (d, 2 H, ³J_{4/5} = 4,1 Hz, 4-H [*E,Z*]); 3,78 (s spl, 6 H, 4'-OCH₃ [*E,Z*]); 3,54 (s, 6 H, 3-OCH₃ [*E,Z*])

(*EZ,RS*)-3-Methoxy-4-(2-methoxyphenyl)-4H-pyridin-1-carbonsäurephenylester (34)

34 wurde nach Vorschrift 7.1.2.3.1 aus 3-Methoxypyridin und *o*-Methoxyphenylmagnesiumbromid (1 M Lösung in THF) in 87 % Ausbeute als gelbes Öl erhalten. Trotz zahlreicher Versuche konnte **32** nicht kristallisiert werden.

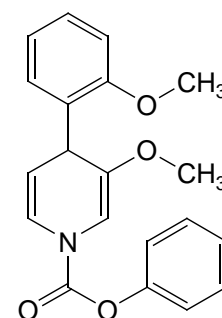
Summenformel: C₂₀H₁₉NO₄

Molgewicht: 337,37 g/mol

IR (ATR): 1726 (NCOOC₆H₅)

MS (EI): 321 [31,4 M⁺]; 230 [100,0 M⁺-C₇H₇O]; 110 [67,2 M⁺-COOPh, -C₇H₇O, -CH₃]; 77 [15,5 Ph]

¹H-NMR: 400 Mhz, CDCl₃ [δ ppm]: 7,42-7,14 (m, 16 H, arom. H des N-COOPh, 4',6'-H, 6-H [*E,Z*]); 6,95 („t“, 2 H, ³J_{5/4'} = ³J_{5/6'} = 7,4 Hz, 5'-H [*E,Z*]);

**34**

6,87 („d“, 2 H, $^3J_{3/4} = 8,0$ Hz, 3'-H [*E,Z*]); 6,88 (s, 1 H, 2-H [*Z*]); 6,86 (s, 1 H, 2-H [*E*]); 5,14 (dd, 1 H, $^3J_{5/6} = 8,2$ Hz, $^3J_{5/4} = 4,3$ Hz, 5-H [*Z*]); 5,09 (dd, 1 H, $^3J_{5/6} = 8,2$ Hz, $^3J_{5/4} = 4,3$ Hz, 5-H [*E*]); 4,79 (d spl, 2 H, $^3J_{4/5} = 4,3$ Hz, 4-H [*E,Z*]); 3,85 (s, 6 H, 2'-OCH₃ [*E,Z*]); 3,58 (s, 3 H, 3-OCH₃ [*E*]); 3,47 (s, 3 H, 3-OCH₃ [*Z*])

(*EZ,RS*)-3-Acetyl-4-(4-methylphenyl)-4H-pyridin-1-carbonsäurephenylester (35)

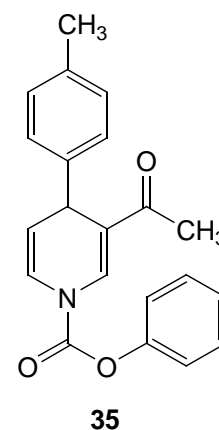
35 wurde nach Vorschrift 7.1.2.3.1 aus 3-Acetylpyridin und *p*-Tolylmagnesiumchlorid (1 M Lösung in THF) in 87 % Ausbeute als dunkelgelbes Öl erhalten und konnte aus Methanol als gelber Feststoff kristallisiert werden.

Summenformel: C₂₁H₁₉NO₃

Molgewicht: 333,38 g/mol

Schmelzbereich: 60-65 °C

IR (ATR): 1729 (NCOOC₆H₅, COCH₃)



MS (EI): 333 [100,0 M⁺]; 318 [42,9 M⁺-CH₃]; 242 [38,6 M⁺-C₇H₇]; 212 [10,7 M⁺-COOC₆H₅]; 122 [25,0 M⁺-C₇H₆, -COOC₆H₅]; 77 [37,9 Ph]

¹H-NMR: 400 Mhz, CDCl₃ [δ ppm]: 8,08 (s br, 1 H, 2-H); 7,43-7,08 (m, 9 H, arom. H); 7,00 („s“ br, 1 H, 6-H); 5,31 (s br, 1 H, 5-H); 4,57 (d, 1 H, $^3J_{4/5} = 4,6$ Hz, 4-H); 3,46 (s, 3 H, 4'-CH₃); 2,24 (s br, 3 H, 3-COCH₃)

(*EZ,RS*)-3-Acetyl-4-(4-methoxyphenyl)-4H-pyridin-1-carbonsäurephenylester (36)

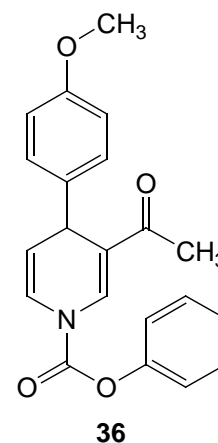
36 wurde nach Vorschrift 7.1.2.3.1 aus 3-Acetylpyridin und *p*-Methoxyphenylmagnesiumbromid (0,5 M Lösung in THF) mit 75 % Ausbeute als dunkelgelbes Öl erhalten und konnte aus Methanol als gelblicher Feststoff kristallisiert werden.

Summenformel: C₂₁H₁₉NO₄

Molgewicht: 349,38 g/mol

Schmelzbereich: 72-76 °C

IR (ATR): 1742 (NCOOC₆H₅, COCH₃)



MS (EI): 349 [26,4 M⁺]; 318 [32,1 M⁺-OCH₃]; 242 [25,0 M⁺-C₇H₇O]; 228 [20,0 M⁺-COOC₆H₅]; 214 [52,9 M⁺-COOC₆H₅, -CH₂]; 77 [100,0 Ph]; 65 [33,6 C₅H₅]

¹H-NMR: 400 Mhz, CDCl₃ [δ ppm]: 8,07 (s br, 1 H, 2-H); 7,45-7,25 (m, 4 H, 2,3,5,6-H des N-COOPh); 7,22-7,19 (m, 2 H, 2',6'-H, Teil AA' des AA'BB'-Systems); 7,05-7,00 (m, 1 H, 4-H des N-COOPh); 6,96-6,88 (m br, 1 H, 6-H); 6,85-6,80 (m, 2 H, 3',5'-H, Teil BB' des AA'BB'-Systems); 5,31 (s br, 1 H, 5-H); 4,56 (d, 1 H, ³J_{4/5} = 4,8 Hz, 4-H); 3,76 (s, 3 H, 4'-OCH₃); 2,25 (s br, 3 H, 3-COCH₃)

(EZ,RS)-3-Acetyl-4-(2-methoxyphenyl)-4H-pyridin-1-carbonsäurephenylester (37)

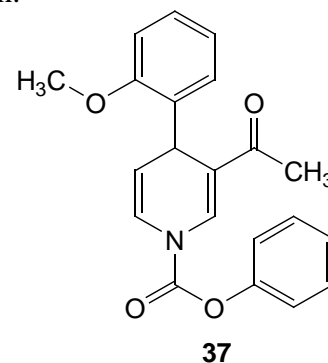
37 wurde nach Vorschrift 7.1.2.3.1 aus 3-Methoxypyridin und *o*-Methoxyphenylmagnesiumbromid (1 M Lösung in THF) mit 71 % Ausbeute als gelbes Öl erhalten und konnte aus Methanol als gelblicher Feststoff kristallisiert werden.

Summenformel: C₂₁H₁₉NO₄

Molgewicht: 349,38 g/mol

Schmelzbereich: 141-145 °C

IR (ATR): 1742 (NCOOC₆H₅, COCH₃)



MS (EI): 349 [62,1 M⁺]; 318 [12,1 M⁺-OCH₃]; 242 [30,7 M⁺-C₇H₇O]; 228 [9,3 M⁺-COOC₆H₅]; 214 [37,9 M⁺-COOC₆H₅, -CH₂]; 77 [100,0 Ph]; 65 [39,3 C₅H₅]

¹H-NMR: 400 Mhz, CDCl₃ [δ ppm]: 8,22 (s br, 1 H, 2-H); 7,44-7,39 (m, 2 H, 2,6-H des N-COOPh); 7,30-7,15 (m, 4 H, 3,5-H des N-COOPh, 4',6'-H); 7,04-7,01 (m, 1 H, 4-H des N-COOPh); 6,92-6,85 (m, 3 H, 6-H, 3',5'-H); 5,39-5,35 (m br, 1 H, 5-H); 5,01 (d, 1 H, ³J_{4/5} = 4,7 Hz, 4-H); 3,88 (s, 3 H, 2'-OCH₃); 2,25 (s br, 3 H, 3-COCH₃)

(EZ,RS)-3-Ethoxycarbonyl-4-(4-methylphenyl)-4H-pyridin-1-carbonsäurephenylester (38)

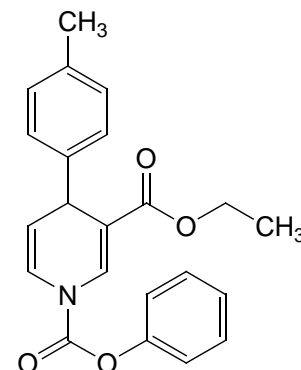
38 wurde nach Vorschrift 7.1.2.3.1 aus Ethylnikotinat und *p*-Tolylmagnesiumchlorid (1 M Lösung in THF) in 70 % Ausbeute als gelbes Öl erhalten und konnte aus Methanol als weißer Feststoff kristallisiert werden.

Summenformel: C₂₂H₂₁NO₄

Molgewicht: 363,41 g/mol

Schmelzbereich: 72-78 °C

IR (ATR): 1742 (NCOOC₆H₅), 1701 (COOC₂H₅)

**38**

MS (EI): 363 [25,0 M⁺]; 334 [40,0 M⁺-C₂H₅]; 272 [100,0 M⁺-C₇H₇]; 152 [25 M⁺-C₇H₆, -COOC₆H₅]; 106 [17,9 M⁺-COOC₆H₅, -C₇H₇, -OC₂H₄]; 77 [46,4 Ph]; 65 [7,1 C₅H₅]

¹H-NMR: 400 Mhz, CDCl₃ [δ ppm]: 8,15 (s br, 1 H, 2-H); 7,43-7,38 (m, 2 H, 2,6-H des N-COOPh); 7,29-7,16 (m, 5 H, 3,4,5-H des N-COOPh, 2',6'-H); 7,13-7,09 (m, 2 H, 3',5'-H, Teil BB' des AA'BB'-Systems); 6,99-6,94 (m br, 1 H, 6-H); 5,24 („s“ br, 1 H, 5-H); 4,46 (d, 1 H, ³J_{4/5} = 4,6 Hz, 4-H); 4,08 (ABX₃ AB-Teil, 2 H, ν₀δ = 0,06 ppm, ²J_{A/B} = 10,8 Hz, ³J_{CH₂/CH₃} = 7,1 Hz, 3-COOCH₂CH₃); 2,30 (s, 3 H, 4'-CH₃); 1,16 (ABX₃ X₃-Teil, 3 H, ³J_{CH₃/CH₂} = 7,1 Hz, 3-COOCH₂CH₃)

(EZ,RS)-3-Ethoxycarbonyl-4-(4-methoxyphenyl)-4H-pyridin-1-carbonsäurephenylester (39)

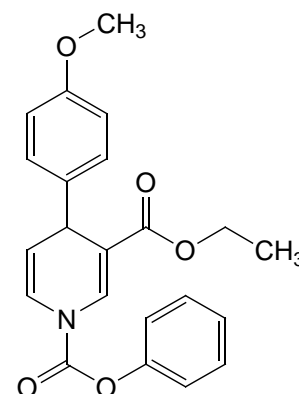
39 wurde nach Vorschrift 7.1.2.3.1 aus 3-Ethylnikotinat und *p*-Methoxyphenylmagnesiumbromid (0,5 M Lösung in THF) mit 81 % Ausbeute als gelbes Öl erhalten und konnte aus Methanol als gelblicher Feststoff kristallisiert werden.

Summenformel: C₂₂H₂₁NO₅

Molgewicht: 379,41 g/mol

Schmelzbereich: 60-63 °C

IR (ATR): 1736 (NCOOC₆H₅), 1701 (COOC₂H₅)

**39**

MS (EI): 379 [36,4 M⁺]; 350 [100,0 M⁺-C₂H₅]; 334 [7,1 M⁺-OC₂H₄]; 306 [15

M^+ -COOC₂H₅]; 272 [87,9 M^+ -C₇H₇O]; 258 [5,0 M^+ -COOPh]; 230 [13,6 M^+ -COOPh, -OC₂H₄]; 152 [23,6 M^+ -C₇H₆O, -COOPh]; 106 [14,3 M^+ -COOPh, -C₇H₇O, -OC₂H₄]; 77 [49,3 Ph]

¹H-NMR: 400 Mhz, CDCl₃ [δ ppm]: 8,14 (s br, 1 H, 2-H); 7,43-7,38 (m, 2 H, 2,6-H des N-COOPh); 7,29-7,18 (m, 5 H, 3,4,5-H des N-COOPh, 2',6'-H); 7,00-6,95 (m br, 1 H, 6-H); 6,86-6,82 (m, 2 H, 3',5'-H, Teil BB' des AA'BB'-Systems); 5,25 („s“ br, 1 H, 5-H); 4,45 (d, 1 H, ³J_{4/5} = 4,5 Hz, 4-H); 4,08 (ABX₃ AB-Teil, 2 H, $\nu_0\delta = 0,06$ ppm, ²J_{A/B} = 10,8 Hz, ³J_{CH₂/CH₃} = 7,1 Hz, 3-COOCH₂CH₃); 3,77 (s, 3 H, 4'-OCH₃); 1,17 (ABX₃ X₃-Teil, 3 H, ³J_{CH₃/CH₂} = 7,1 Hz, 3-COOCH₂CH₃)

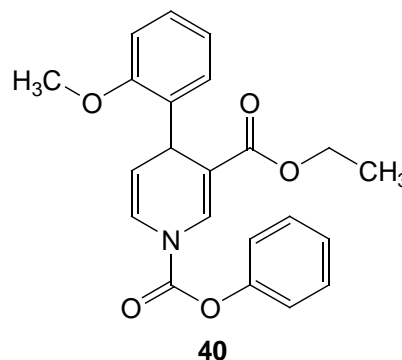
(EZ,RS)-3-Ethoxycarbonyl-4-(2-methoxyphenyl)- 4H-pyridin-1-carbonsäurephenylester (40)

40 wurde nach Vorschrift 7.1.2.3.1 aus 3-Acetylpyridin und *o*-Methoxyphenylmagnesiumbromid (1 M Lösung in THF) mit 68 % Ausbeute als gelbes Öl erhalten und konnte aus Methanol als gelblicher Feststoff kristallisiert werden.

Summenformel: C₂₂H₂₁NO₅

Molgewicht: 379,41 g/mol

Schmelzbereich: 98-103 °C



IR (ATR): 1740 (NCOOC₆H₅), 1700 (COOC₂H₅)

MS (EI): 379 [30,7 M^+]; 350 [100,0 M^+ -C₂H₅]; 333 [14,3 M^+ -OC₂H₅]; 306 [9,3 M^+ -COOC₂H₅]; 272 [39,3 M^+ -C₇H₇O]; 258 [27,1 M^+ -COOPh]; 230 [20,0 M^+ -COOPh, -OC₂H₄]; 152 [22,1 M^+ -C₇H₆O, -COOPh]; 106 [15 M^+ -COOPh, -C₇H₇O, -OC₂H₄]; 77 [53,6 Ph]

¹H-NMR: 400 Mhz, CDCl₃ [δ ppm]: 8,28 (s br, 1 H, 2-H); 7,42-7,38 (m, 2 H, 2,6-H des N-COOPh); 7,32-7,11 (m, 5 H, 3,4,5-H des N-COOPh, 4',6'-H); 6,96-6,84 (m, 3 H, 3',5'-H, 6-H); 5,30 („s“ br, 1 H, 5-H); 4,96 (d, 1 H, ³J_{4/5} = 4,4 Hz, 4-H); 4,07 (ABX₃ AB-Teil, 2 H, $\nu_0\delta = 0,06$ ppm, ²J_{A/B} = 10,8 Hz, ³J_{CH₂/CH₃} = 7,1 Hz, 3-COOCH₂CH₃); 3,87 (s, 3 H, 2'-OCH₃); 1,12 (ABX₃ X₃-Teil, 3 H, ³J_{CH₃/CH₂} = 7,1 Hz, 3-COOCH₂CH₃)

7.1.2.4 3,4-disubstituierte Pyridine

7.1.2.4.1 Allgemeine Synthesevorschrift

Ein Großteil der 3,4-disubstituierten Pyridine wird als mengenmäßiges Hauptprodukt der Umsetzung der entsprechenden *N*-Acetyl-1,4-dihydropyridine mit *p*-Benzochinon erhalten (siehe 7.1.2.5.1). Die Pyridine können bei der säulenchromatographischen Trennung des Produktgemisches üblicherweise etwa 20-40 Fraktionen nach den 1-Aza-9-oxafluorenen aufgefangen werden.

41-44 werden durch Oxidation von **6-9** mit MnO₂ dargestellt, da sich **6-9** nicht durch *p*-Benzochinon oxidieren lassen. Hierzu werden 5 mmol des Dihydropyridins in 50 ml Toluol gelöst und mit einem zehnfachen Überschuss an Mangan-IV-oxid versetzt. Der Ansatz wird unter Rückfluss über mehrere Tage im Ölbad erhitzt, bis laut DC-Kontrolle kein Ausgangsstoff mehr nachweisbar ist. Nach Abschluss der Reaktion wird das Toluol i. v. entfernt.

7.1.2.4.2 Charakterisierung der Verbindungen

Ethyl-4-methylnikotinat (**41**)

41 wurde durch Oxidation von **6** mit Mangan-IV-oxid in 50 % Ausbeute als rotbraunes Öl erhalten. Da **41** nicht sauber kristallisiert werden konnte, wurde zusätzlich das Pikrat charakterisiert.

Summenformel: C₉H₁₁NO₂ (Pikrat: C₁₅H₁₄N₄O₉)

Molgewicht: 165,19 g/mol (Pikrat: 394 g/mol)

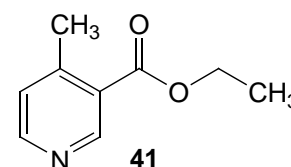
Schmelzbereich: 128-134 °C (Pikrat)

EA (Pikrat): ber.: C 45,69; H 3,55; N 14,21
gef.: C 45,39; H 3,67; N 13,86

IR (ATR): 1723 (COOC₂H₅)

MS (EI): 165 [74,3 M⁺]; 137 [39,3 M⁺-C₂H₄]; 120 [100,0 M⁺-OC₂H₅]; 92 [47,9 M⁺-COOC₂H₅]

¹H-NMR: 400 MHz, CDCl₃ [δ ppm]: 9,06 (s, 1 H, 2-H), 8,54 ("s", 1 H, 6-H); 7,17 (d, 1 H, ³J_{5/6} = 4,7 Hz, 5-H); 4,37 (q, 2 H, ³J_{CH₂/CH₃} = 7,0 Hz, 3-COOCH₂CH₃); 2,60 (s, 3 H, 4-CH₃); 1,39 (t, 3 H, ³J_{CH₃/CH₂} = 7,0 Hz, 3-COOCH₂CH₃)



1-(4-Methylpyridin-3-yl)-ethanon (42)

42 wurde durch Oxidation von **7** mit Mangan-IV-oxid in 81 % Ausbeute als rotbraunes Öl erhalten. Da die Verbindung nicht sauber kristallisiert werden konnte, wurde zusätzlich das Pikrat von **42** charakterisiert.

Summenformel: C₈H₉NO (Pikrat: C₁₄H₁₂N₄O₈)

Molgewicht: 135,16 g/mol (Pikrat: 364 g/mol)

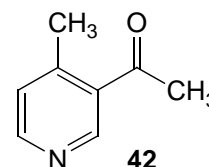
Schmelzbereich: 137-140 °C (Pikrat)

EA (Pikrat): ber.: C 46,15; H 3,30; N 15,39
gef.: C 45,71; H 3,27; N 14,98

IR (ATR): 1693 (COCH₃)

MS (EI): 135 [50,0 M⁺]; 120 [87,5 M⁺-CH₃]; 105 [93,6 M⁺-2 x CH₃]; 92 [80,3 M⁺-COCH₃]; 77 [100,0 M⁺-CH₃, -COCH₃]

¹H-NMR: 400 MHz, CDCl₃ [δ ppm]: 10,03 (s, 1 H, 2-H); 8,09 (d, 1 H, ³J_{6/5} = 7,8 Hz, 6-H); 7,54 (d, 1 H, ³J_{5/6} = 7,8 Hz, 5-H); 2,63 (s, 3 H, 4-CH₃); 2,56 (s, 3 H; COCH₃)

**Ethyl-4-phenylnicotinat (43)**

43 wurde durch Oxidation von **8** mit Mangan-IV-oxid in 61 % Ausbeute als hellbraunes Öl erhalten. Da **43** nicht sauber kristallisiert werden konnte, wurde zusätzlich das Pikrat von **43** charakterisiert.

Summenformel: C₁₄H₁₃NO₂ (Pikrat: C₂₀H₁₆N₄O₉)

Molgewicht: 227,26 g/mol (Pikrat: 456 g/mol)

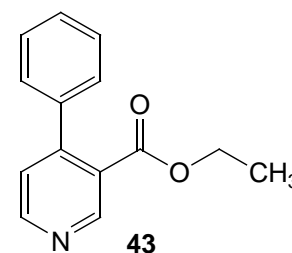
Schmelzbereich: 136-138 °C (Pikrat)

EA (Pikrat): ber.: C 51,61; H 3,66; N 12,04
gef.: C 51,78; H 3,43; N 12,14

IR (ATR): 1725 (COOC₂H₅)

MS (EI): 227 [46,4 M⁺]; 199 [13,6 M⁺-C₂H₄]; 182 [83,6 M⁺-OC₂H₅]; 154 [100 M⁺-COOC₂H₅]; 105 [22,1 M⁺-OC₂H₅, -Ph]; 77 [30 Ph]

¹H-NMR: 400 MHz, CDCl₃ [δ ppm]: 8,91 (s, 1 H, 2-H), 8,77 (d, 1 H, ³J_{6/5} = 3,9 Hz, 6-H); 7,42-7,29 (m, 6 H, 2',3',4',5',6'-H, 5-H); 4,14 (q, 2 H, ³J_{CH₂/CH₃} = 7,0 Hz, 3-COOC₂H₅); 1,64 (t, 3 H, ³J_{CH₃/CH₂} = 7,0 Hz, 3-COOC₂H₅)



1-(4-Phenylpyridin-3-yl)-ethanon (44)

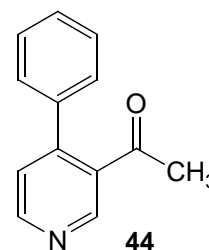
44 wurde durch Oxidation von **9** mit Mangan-IV-oxid in 75 % Ausbeute als gelbbraunes Öl erhalten. Da **44** nicht sauber kristallisiert werden konnte, wurde zusätzlich das Pikrat von **44** charakterisiert.

Summenformel: C₁₃H₁₁NO (Pikrat: C₁₉H₁₄N₄O₈)

Molgewicht: 197,23 g/mol (Pikrat: 426,34 g/mol)

Schmelzbereich: 145-148 °C (Pikrat)

EA (Pikrat): ber.: C 53,52; H 3,27; N 13,15
gef.: C 53,38; H 3,46; N 12,81



IR (ATR): 1693 (COCH₃)

MS (EI): 197 [68,6 M⁺]; 182 [100 M⁺-CH₃]; 154 [53,6 M⁺-COCH₃]; 77 [13,6 Ph];
43 [17,1 COOCH₃]

¹H-NMR: 400 MHz, CDCl₃ [δ ppm]: 8,80 ("s" br, 2 H, 2-H, 6-H); 7,47 (d, 1 H, ³J_{5/6} = 3,3 Hz, 5-H); 7,36-7,33 (m, 5 H, 2',3',4',5',6'-H); 2,08 (s, 3 H, 3-COCH₃)

3-Methyl-4-phenylpyridin (45)

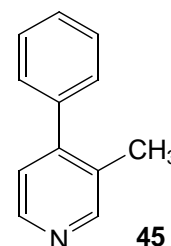
45 wurde als Nebenprodukt aus der Umsetzung von **11** mit *p*-Benzochinon (siehe 7.1.2.5.1) als farblose ölige Substanz mit 46 % Ausbeute isoliert. Eine Kristallisation der Verbindung war nicht möglich, daher wurde zusätzlich das Pikrat von **45** charakterisiert.

Summenformel: C₁₂H₁₁N (Pikrat: C₁₈H₁₄N₄O₇)

Molgewicht: 169,22 g/mol (Pikrat: 398,33 g/mol)

Schmelzbereich: 160-164 °C (Pikrat)

EA: ber.: C 85,17; H 6,55; N 8,28
gef.: C 84,98; H 6,38; N 8,31



MS (EI): 169 [100,0 M⁺]; 168 [99,9 M⁺-H]; 154 [19,3 M⁺-CH₃]; 77 [6,0 Ph]

¹H-NMR: 400 Mhz, Aceton-d₆ [δ ppm]: 8,47 (d; 1 H, ⁵J_{2/5} = 0,5 Hz, 2-H); 8,42 (dd, 1 H, ³J_{6/5} = 4,9 Hz, ⁴J_{6/2} = 0,5 Hz, 6-H); 7,50-7,36 (m, 5 H, 2',3',4',5',6'-H); 7,16 (d, 1 H, ³J_{5/6} = 4,9 Hz, 5-H); 2,25 (s, 3 H, 3-CH₃)

3-Methoxy-4-phenylpyridin (46)

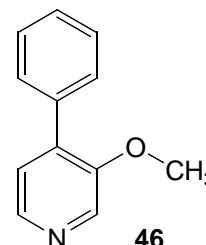
46 wurde als Nebenprodukt aus der Umsetzung von **12** oder **27** mit *p*-Benzochinon (siehe 7.1.2.5.1) mit 67 bzw. 55 % Ausbeute isoliert. Die Kristallisation gelang aus einem Ether-Petrolether-Gemisch.

Summenformel: C₁₂H₁₁NO

Molgewicht: 185,22 g/mol

Schmelzbereich: 41-44 °C

EA: ber.: C 77,81; H 5,99; N 7,56
gef.: C 77,55; H 6,27; N 7,47



IR (ATR): 1243 (C-O-C)

MS (EI): 185 [100,0 M⁺]; 170 [97,9 M⁺-CH₃]

¹H-NMR: 400 Mhz, Aceton-d₆ [δ ppm]: 8,43 (s, 1 H, ⁵J_{2/5}, 2-H); 8,26 (d, 1 H, ³J_{6/5} = 4,8 Hz, 6-H); 7,61-7,58 (m, 2 H, 2',6'-H); 7,47-7,37 (m, 3 H, 3',4',5'-H); 7,30 (dd, 1 H, ³J_{5/6} = 4,8 Hz, ⁵J_{5/2} = 0,4 Hz, 5-H); 3,93 (s, 3 H, 3-OCH₃)

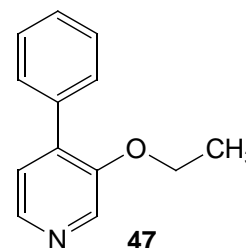
3-Ethoxy-4-phenylpyridin (47)

47 wurde als Nebenprodukt aus der Umsetzung von **13** oder **35** mit *p*-Benzochinon (siehe 7.1.2.5.1) als farblose ölige Substanz mit 49 bzw. 42 % Ausbeute isoliert. Eine Kristallisation der Verbindung war nicht möglich.

Summenformel: C₁₃H₁₃NO

Molgewicht: 199,25 g/mol

EA: ber.: C 78,36; H 6,58; N 7,03
gef.: C 78,65; H 6,76; N 6,99



IR (ATR): 1245 (C-O-C)

MS (EI): 199 [100,0 M⁺]; 184 [25,7 M⁺-CH₃]; 171 [100,0 M⁺-C₂H₄]; 170 [100,0 M⁺-C₂H₅]

¹H-NMR: 400 Mhz, Aceton-d₆ [δ ppm]: 8,40 (s, 1 H, 2-H); 8,25 (d, 1 H, ³J_{6/5} = 4,8 Hz, 6-H); 7,65-7,62 (m, 2 H, 2',6'-H); 7,47-7,42 (m, 2 H, 3',5'-H); 7,41-7,36 (m, 1 H, 4'-H); 7,30 (dd, 1 H, ³J_{5/6} = 4,8 Hz, ⁵J_{5/2} = 0,4 Hz, 5-H); 4,19 (q, 2 H, ³J_{CH₂/CH₃} = 7 Hz; 3-OCH₂CH₃); 1,34 (t, 3 H, ³J_{CH₃/CH₂} = 7 Hz, 3-OCH₂CH₃)

3-Benzyloxy-4-phenylpyridin (48)

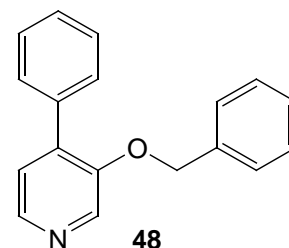
48 wurde als Nebenprodukt aus der Umsetzung von **14** oder **30** mit *p*-Benzochinon (siehe 7.1.2.5.1) mit 55 bzw. 60 % Ausbeute isoliert und kristallisierte nach Entfernung des Lösungsmittels und Umkristallisation aus Ether als orangefarbener Feststoff aus.

Summenformel: C₁₈H₁₅NO

Molgewicht: 261,32 g/mol

Schmelzbereich: 68-72 °C

EA: ber.: C 82,73; H 5,79; N 5,36
gef.: C 82,45; H 6,03; N 5,18



IR (ATR): 1235, 1248 (C-O-C)

MS (EI): 261 [64,3 M⁺]; 91 [100,0 C₇H₇]

¹H-NMR: 400 Mhz, Aceton-d₆ [δ ppm]: 8,50 (s; 1 H, 2-H); 8,28 (d, 1 H, ³J_{6/5} = 4,8 Hz, 6-H); 7,67-7,64 (m, 2 H, 2',6'-H); 7,47-7,27 (m, 9 H, 5-H, 3',4',5'-H, 3-OCH₂C₆H₅); 5,27 (s, 2 H, 3-OCH₂C₆H₅)

3-Brom-4-phenylpyridin (49)

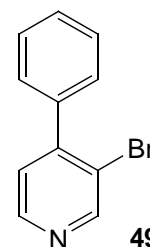
49 wurde als Nebenprodukt aus der Umsetzung von **25** mit *p*-Benzochinon (siehe 7.1.2.5.1) mit 63 % Ausbeute isoliert und kristallisierte nach Entfernung des Lösungsmittels als farbloser Feststoff im Kolben aus.

Summenformel: C₁₁H₈BrN

Molgewicht: 234,09 g/mol

Schmelzbereich: 37-41 °C

EA: ber.: C 56,44; H 3,44; N 5,98; Br 34,13
gef.: C 56,72; H 3,61; N 5,65; Br 33,58



IR (KBr): 1027 (Br)

MS (EI): 235 [100,0 M⁺ (⁸¹Br)]; 233 [99,3 M⁺ (⁷⁹Br)]; 154 [67,1 M⁺-HBr]

¹H-NMR: 400 Mhz, Aceton-d₆ [δ ppm]: 8,80 (s; 1 H, 2-H); 8,57 (d, 1 H, ³J_{6/5} = 4,9 Hz, 6-H); 7,54-7,45 (m, 5 H, 2',3',4',5',6'-H); 7,40 (dd, 1 H, ³J_{5/6} = 4,9 Hz, ⁵J_{5/2} = 0,5 Hz, 5-H)

3-Chlor-4-phenylpyridin (50)

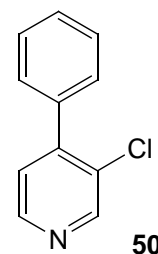
50 wurde als Nebenprodukt aus der Umsetzung von **26** mit *p*-Benzochinon (siehe 7.1.2.5.1) mit 55 % Ausbeute isoliert und kristallisierte nach Entfernung des Lösungsmittels als farbloser Feststoff im Kolben aus.

Summenformel: C₁₁H₈ClN

Molgewicht: 189,64 g/mol

Schmelzbereich: 33,5-35 °C

EA: ber.: C 69,67; H 4,25; N 7,39; Cl 18,69
gef.: C 69,68; H 4,48; N 7,24; Cl 17,89



IR (KBr): 1036 (Cl)

MS (EI): 191 [90,0 M⁺ (³⁷Cl)]; 189 [100,0 M⁺ (³⁵Cl)]; 154 [66,4 M⁺-HCl]

¹H-NMR: 400 Mhz, Aceton-d₆ [δ ppm]: 8,66 (s; 1 H, 2-H); 8,55 (d, 1 H, ³J_{6/5} = 4,9 Hz, 6-H); 7,54-7,47 (m, 5 H, 2',3',4',5',6'-H); 7,42 (d, 1 H, ³J_{5/6} = 4,9 Hz, 5-H)

***N,N*-Dimethyl-4-phenylnikotinsäureamid (51)**

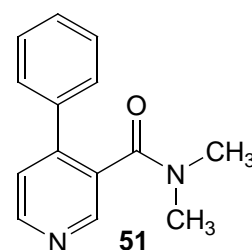
51 wurde als Hauptprodukt aus der Umsetzung von **15** mit *p*-Benzochinon (siehe 7.1.2.5.1) mit 67 % Ausbeute als brauner Feststoff isoliert. **51** kristallisierte nach Entfernung des Lösungsmittels im Rundkolben aus und konnte aus Ether umkristallisiert werden.

Summenformel: C₁₄H₁₄N₂O

Molgewicht: 226,27 g/mol

Schmelzbereich: 68-73 °C

EA: ber.: C 74,31; H 6,24; N 12,38
gef.: C 74,00; H 6,31; N 12,19



IR (ATR): 1734 (CON(CH₃)₂)

MS (EI): 226 [66,4 M⁺]; 183 [82,9 M⁺-C₂H₅N]; 182 [100 M⁺-C₂H₆N]; 154 [92,9 M⁺-C₃H₇NO]

¹H-NMR: 400 Mhz, Aceton-d₆ [δ ppm]: 8,65 (d, 1 H, ³J_{6/5} = 5,1 Hz, 6-H); 8,51 (d, 1 H, ⁵J_{2/5} = 0,7 Hz, 2-H); 7,53-7,45 (m, 6 H, 5-H, 2',3',4',5',6'-H); 2,84 (s, 3 H, N-CH₃); 2,48 (s, 3 H, N-CH₃)

3-Methoxy-4-(4-methylphenyl)-pyridin (52)

52 wurde als Nebenprodukt aus der Umsetzung von **16** mit *p*-Benzochinon (siehe 7.1.2.5.1) mit 51 % Ausbeute isoliert und kristallisierte aus Essigester in Form großer, farbloser Kristalle aus.

Summenformel: C₁₃H₁₃NO

Molgewicht: 199,25 g/mol

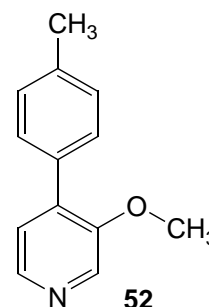
Schmelzbereich: 52-54 °C

EA: ber.: C 78,36; H 6,58; N 7,03
gef.: C 78,28; H 6,86; N 7,01

IR (ATR): 1237 (C-O-C)

MS (EI): 199 [100,0 M⁺]; 184 [97,1 M⁺-CH₃]

¹H-NMR: 400 Mhz, Aceton-d₆ [δ ppm]: 8,40 (s; 1 H, 2-H); 8,24 (d, 1 H, ³J_{6/5} = 4,8 Hz, 6-H); 7,51-7,48 (m, 2 H, 2',6'-H, Teil AA' des AA'BB'-Systems); 7,28 (d, 1 H, ³J_{5/6} = 4,8 Hz, 5-H); 7,26-7,24 (m, 2 H, 3',5'-H, Teil BB' des AA'BB'-Systems); 3,92 (s, 3 H, 3-OCH₃); 2,36 (s, 3 H, 4'-CH₃)

**3-Methoxy-4-(4-methoxyphenyl)-pyridin (53)**

53 wurde als Nebenprodukt aus der Umsetzung von **17** mit *p*-Benzochinon (siehe 7.1.2.5.1) mit 62 % Ausbeute isoliert. Die Verbindung kristallisierte nach mehreren Tagen im Kühlschrank aus einem Ether-Petrolether-Gemisch aus.

Summenformel: C₁₃H₁₃NO₂

Molgewicht: 215,25 g/mol

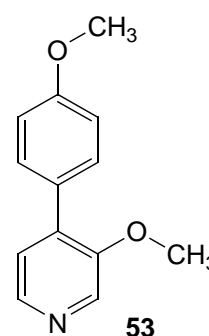
Schmelzbereich: 93-98 °C

EA: ber.: C 72,54; H 6,09; N 6,51
gef.: C 72,13; H 6,35; N 6,21

IR (ATR): 1249 (C-O-C)

MS (EI): 215 [100,0 M⁺]; 200 [68,6 M⁺-CH₃], 185 [53,6 M⁺-2 CH₃]

¹H-NMR: 400 Mhz, Aceton-d₆ [δ ppm]: 8,39 (s; 1 H, 2-H); 8,22 (d, 1 H, ³J_{6/5} = 4,8 Hz, 6-H); 7,59-7,55 (m, 2 H, 2',6'-H, Teil AA' des AA'BB'-Systems); 7,28 (d, 1 H, ³J_{5/6} = 4,8 Hz, 5-H); 7,02-6,98 (m, 2 H, 3',5'-H, Teil BB' des AA'BB'-Systems); 3,93 (s, 3 H, 3-OCH₃); 3,84 (s, 3 H, 4'-OCH₃)



3-Methoxy-4-(2-methoxyphenyl)-pyridin (54)

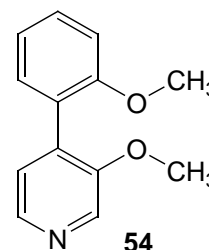
54 wurde als Nebenprodukt aus der Umsetzung von **18** mit *p*-Benzochinon (siehe 7.1.2.5.1) mit 45 % Ausbeute isoliert. Die Verbindung kristallisierte sofort nach Entfernung des Lösungsmittels aus und konnte aus Ether umkristallisiert werden.

Summenformel: C₁₃H₁₃NO₂

Molgewicht: 215,25 g/mol

Schmelzbereich: 115-119,5 °C

EA: ber.: C 72,54; H 6,09; N 6,51
gef.: C 72,86; H 6,41; N 6,30



IR (ATR): 1242 (C-O-C)

MS (EI): 215 [100,0 M⁺]; 200 [21,4 M⁺-CH₃], 185 [45,7 M⁺-2 CH₃]

¹H-NMR: 400 Mhz, Aceton-d₆ [δ ppm]: 8,38 (s; 1 H, 2-H); 8,21 (d, 1 H, ³J_{6/5} = 4,7 Hz, 6-H); 7,36 (ddd, 1 H, ³J_{4/3'} = 8,3 Hz, ³J_{4/5'} = 7,4 Hz, ⁴J_{4/6'} = 1,7 Hz, 4'-H); 7,20 (dd, 1 H, ³J_{6/5'} = 7,4 Hz, ⁴J_{6/4'} = 1,7 Hz, 6'-H); 7,16 (dd, 1 H, ³J_{5/6} = 4,7 Hz, ⁵J_{5/2} = 0,5 Hz, 5-H); 7,08 (dd, 1 H, ³J_{3/4'} = 8,3 Hz, ⁴J_{3/5'} = 1,0 Hz, 3'-H); 6,99 (dt, 1 H, ³J_{5/6'} = ³J_{5/4'} = 7,4 Hz, ⁴J_{5/3'} = 1,0 Hz, 5'-H); 3,85 (s, 3 H, 3-OCH₃); 3,76 (s, 3 H, 2'-OCH₃)

7.1.2.5 1-Aza-9-oxafluorene

7.1.2.5.1 Allgemeine Synthesevorschrift

Das entsprechende Dihydropyridin wird in einem trockenen Zweihalskolben unter Argonatmosphäre in einem möglichst geringen Volumen trockenem Dioxan gelöst und nach Zugabe eines 1,23-fachen Überschusses *p*-Benzochinon langsam mit einem Gemisch aus trockenem Dioxan und Perchlorsäure (70 %) versetzt. Das Mischungsverhältnis ist in den jeweiligen Vorschriften angegeben. Nach 24 Stunden erfolgt eine DC-Kontrolle der zu diesem Zeitpunkt tief weinrot gefärbten Lösung. Im Falle der leicht oxidierbaren Dihydropyridine ohne 3-Carbonylfunktion sind nur das entsprechende 1-Aza-9-oxafluoren und das 3,4-disubstituierte Pyridin nachweisbar und der Ansatz kann aufgearbeitet werden. Bei Umsetzung der *N*-Acetyl-1,4-dihydropyridine mit 3-Carbonylfunktion ist das 1,4,4a,9a-Tetrahydro-1-aza-9-oxafluoren als Hauptprodukt sichtbar. Es wird nun 1/3 der ursprünglich zugesetzten Menge *p*-Benzochinon zugeben. Im Abstand von 7 Tagen wird per DC-Kontrolle regelmäßig auf vollständige Umsetzung des Tetrahydrofluorens geprüft und bis zu zweimal weiteres *p*-Benzochinon zugegeben. In der Regel ist die Oxidation nach 30 bis 50 Tagen abgeschlossen und die Reaktion kann abgebrochen werden.

Zur Aufarbeitung wird der Ansatz mit 10 ml destilliertem Wasser je 50 ml Dioxan versetzt, in einen Scheidetrichter überführt und mit 1 M NaOH auf einen pH-Wert von etwa 9 eingestellt. Der Farbumschlag des Hydrochinons von rotbraun zu einem dunklen Grüngelb dient hierbei als praktische Selbstindikation. Kommt es bei der Zugabe der NaOH-Lösung zur Bildung eines Niederschlags, kann dieser durch portionsweise Zugabe von destilliertem Wasser wieder gelöst werden. Danach wird dreimal mit dem halben Volumen Chloroform extrahiert. Da sich das Hydrochinon an der Grenzschicht zwischen der wässrigen und der organischen Phase sammelt, kann es zu einer störenden Emulsionsbildung kommen. Durch Zugabe kleiner Mengen Dioxan lässt sich die Emulsion in den meisten Fällen wieder auflösen. Die organischen Phasen werden vereint, über Na₂SO₄ getrocknet und filtriert. Durch Entfernung des Lösungsmittels i. v. wird ein öliger dunkelbrauner bis schwarzer Rückstand erhalten.

Nach säulenchromatographischer Trennung des Rückstands und Entfernung des Lösungsmittels kristallisiert das 1-Aza-9-oxafluoren durch Zugabe von Diethylether aus. Eine Umkristallisation war in allen Fällen mit einem Methanol-Essigester-Gemisch (1:1) möglich.

7.1.2.5.2 Charakterisierung der Verbindungen

6-Hydroxy-4-methylbenzo[4,5]furo[2,3-b]pyridin-3-carbonsäureethylester (**55**)

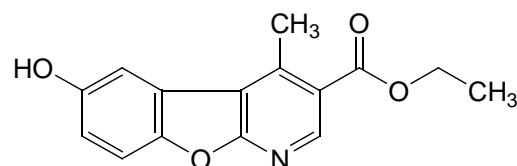
1 g (4,8 mmol) von **6** wurde nach Vorschrift 7.1.2.5.1 mit 635 mg (5,9 mmol) *p*-Benzochinon in 150 ml Dioxan-Perchlorsäure-Gemisch (10:1) bei RT gerührt. Nach 24 Stunden konnte mittels DC-Kontrolle die vollständige Umsetzung von **6** zu **79** nachgewiesen werden. Zur Oxidation von **79** wurden im Abstand von je 7 Tagen dreimal 212 mg *p*-Benzochinon zugegeben. Nach 53 Tagen war kein **79** mehr nachweisbar und der Ansatz wurde aufgearbeitet. **55** wurde säulenchromatographisch mit Laufmittel 1 isoliert und nach Umkristallisation als beigefarbenes amorphes Pulver erhalten (Ausbeute < 10 %).

Summenformel: C₁₅H₁₃NO₄

Molgewicht: 271,28 g/mol

Schmelzbereich: 250-255 °C

EA: ber.: C 66,41; H 4,83; N 5,16
gef.: C 66,29; H 5,02; N 4,98



55

IR (KBr): 3418 (OH), 1725 (COOC₂H₅), 1370,1350 (OH)

MS (EI): 271 [90,0 M⁺]; 256 [1,4 M⁺-CH₃], 243 [25,7 M⁺-C₂H₄], 226 [67,1 M⁺-OC₂H₅], 198 [27,1 M⁺-CO₂C₂H₅]

¹H-NMR: 500 Mhz, CDCl₃ [δ ppm]: 8,98 (s; 1 H, 2-H); 7,53 (d, 1 H, ⁴J_{5/7} = 2,4 Hz, 5-H); 7,50 (d, 1 H, ³J_{8/7} = 9,0 Hz, 8-H); 7,03 (dd, 1 H, ³J_{7/8} = 9,0 Hz, ⁴J_{7/5} = 2,4 Hz, 7-H); 5,14 (s, 1 H, 6-OH); 4,40 (q, 2 H, ³J_{CH₂/CH₃} = 7,0 Hz, 3-COOCH₂CH₃); 2,69 (s, 3 H, 4-CH₃); 1,56 (t, 3 H, ³J_{CH₃/CH₂} = 7,0 Hz, 3-COOCH₂CH₃)

1-(6-Hydroxy-4-methylbenzo[4,5]furo[2,3-b]pyridin-3-yl)-ethanon (**56**)

1 g (5,6 mmol) von **7** wurde nach Vorschrift 7.1.2.5.1 mit 600 mg (6,9 mmol) *p*-Benzochinon in 150 ml Dioxan-Perchlorsäure-Gemisch (10:1) bei RT gerührt. Nach 24 Stunden konnte mittels DC-Kontrolle die vollständige Umsetzung von **7** zu **80** nachgewiesen werden. Zur Oxidation von **80** wurden im Abstand von je 7 Tagen dreimal 200 mg *p*-Benzochinon zugegeben. Nach 48 Tagen war **80** nicht mehr nachweisbar und der Ansatz wurde aufgearbeitet. **56** wurde säulenchromatographisch mit Laufmittel 1 isoliert und nach Umkristallisation als hellbraunes amorphes Pulver erhalten (Ausbeute < 10 %).

Summenformel: $C_{14}H_{11}NO_3$

Molgewicht: 241,25 g/mol

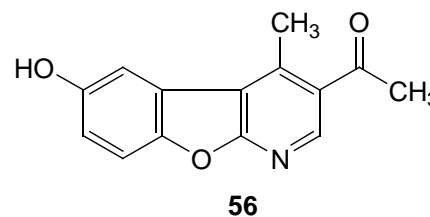
Schmelzbereich: 269-273 °C

EA: ber.: C 69,71; H 4,56; N 5,81
gef.: C 69,60; H 4,61; N 5,42

IR (KBr): 3427 (OH), 1682 (COCH₃), 1360 (OH)

MS (EI): 241 [54,3 M⁺]; 226 [100,0 M⁺-CH₃], 198 [30,7 M⁺-COCH₃]

¹H-NMR: 500 Mhz, CDCl₃ [δ ppm]: 8,83 (s; 1 H, 2-H); 7,56 (d, 1 H, ⁴J_{5/7} = 2,5 Hz, 5-H); 7,53 (d, 1 H, ³J_{8/7} = 9,0 Hz, 8-H); 7,06 (dd, 1 H, ³J_{7/8} = 9,0 Hz, ⁴J_{7/5} = 2,5 Hz, 7-H); 4,94 (s, 1 H, 6-OH); 3,00 (s, 3 H, 3-COCH₃); 2,72 (s, 3 H, 4-CH₃)



6-Hydroxy-4-phenylbenzo[4,5]furo[2,3-b]pyridin-3-carbonsäureethylester (57)

2 g (7,38 mmol) von **8** wurden nach Vorschrift 7.1.2.5.1 mit 980 mg (9,1 mmol) *p*-Benzochinon in 220 ml Dioxan-Perchlorsäure-Gemisch (10:1) bei RT gerührt. Nach 24 Stunden konnte mittels DC-Kontrolle die vollständige Umsetzung von **8** zu **81** nachgewiesen werden. Zur Oxidation von **81** wurden im Abstand von je 7 Tagen dreimal 300 mg *p*-Benzochinon zugegeben. Nach 45 Tagen war **81** nicht mehr nachweisbar und der Ansatz wurde aufgearbeitet. **57** wurde säulenchromatographisch mit Laufmittel 1 isoliert und nach Umkristallisation in Form schwach gelblicher, länglicher Kristalle erhalten (Ausbeute 18 %).

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

Molgewicht: 333,35 g/mol

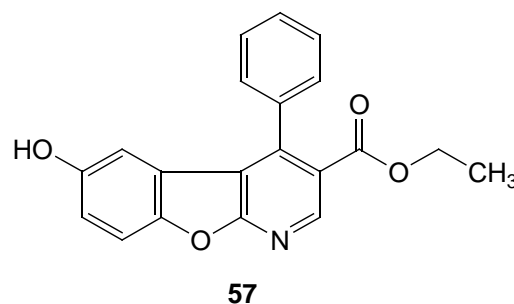
Schmelzbereich: 209-213 °C

EA: ber.: C 72,06; H 4,54; N 4,20
gef.: C 71,85; H 4,54; N 3,89

IR (KBr): 3417 (OH), 1723 (COOC₂H₅), 1390,1373 (OH)

MS (EI): 333 [100,0 M⁺]; 305 [10,0 M⁺-C₂H₄], 288 [69,3 M⁺-OC₂H₅], 260 [5,0 M⁺-C₃H₅O₂]

¹H-NMR: 500 Mhz, CDCl₃ [δ ppm]: 9,02 (s; 1 H, 2-H); 7,54-7,52 (m, 3 H, 3',4',5'-H); 7,47 (d, 1 H, ³J_{8/7} = 8,8 Hz, 8-H); 7,38-7,34 (m, 2 H, 2',6'-H); 6,97 (dd, 1 H, ³J_{7/8} = 8,8 Hz, ⁴J_{7/5} = 2,6 Hz, 7-H); 6,28 (d, 1 H, ⁴J_{5/7} = 2,6 Hz, 5-H); 4,62 (s, 1 H, 6-OH); 4,12 (q, 2 H, ³J_{CH₂/CH₃} = 7,2 Hz,



3-COOCH₂CH₃); 1,03 (t, 3 H, ³J_{CH₃/CH₂} = 7,2 Hz, 3-COOCH₂CH₃)

400 Mhz, DMSO-d₆ [δ ppm]: 9,43 (s, 1 H, 6-OH); 8,83 (s; 1 H, 2-H); 7,57-7,55 (m, 4 H, 3',4',5'-H, 8-H); 7,40-7,37 (m, 2 H, 2',6'-H); 6,94 (dd, 1 H, ³J_{7/8} = 8,8 Hz, ⁴J_{7/5} = 2,5 Hz, 7-H); 6,24 (d, 1 H, ⁴J_{5/7} = 2,5 Hz, 5-H); 4,00 (q, 2 H, ³J_{CH₂/CH₃} = 7,1 Hz, 3-COOCH₂CH₃); 0,89 (t, 3 H, ³J_{CH₃/CH₂} = 7,1 Hz, 3-COOCH₂CH₃)

6-Acetoxy-4-phenylbenzo[4,5]furo[2,3-b]pyridin-3-carbonsäureethylester (57a)

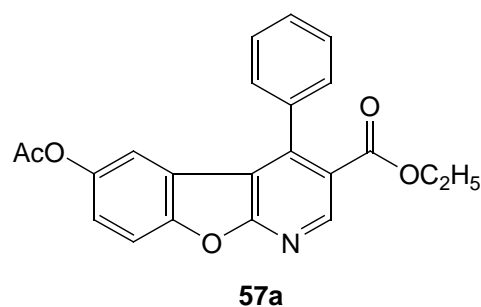
75 mg **57** wurden mit 45 ml Acetanhydrid und einem Tropfen trockenem Pyridin bei RT gerührt. Da laut DC-Kontrolle nach 24 Stunden kein Ausgangsstoff mehr nachweisbar war, erfolgte Hydrolyse mit 50 ml destilliertem Wasser. Anschließend wurde 3 x mit 50 ml Chloroform extrahiert und die vereinten organischen Phasen über Na₂SO₄ getrocknet. Nach Entfernung des Lösungsmittels i. v. konnte **57a** aus dem öligen, braunen Rückstand durch Zutropfen von Ether als hellbraune amorphe Substanz ausgefällt werden.

Summenformel: C₂₂H₁₇NO₅

Molgewicht: 375,37 g/mol

Schmelzbereich: 161-163 °C

EA: ber.: C 70,40; H 4,53; N 3,73
gef.: C 70,30; H 4,54; N 3,68



IR (KBr): 1763 (OCOCH₃), 1724 (COOC₂H₅)

MS (EI): 375 [15,0 M⁺]; 333 [100,0 M⁺-O=C=CH₂], 305 [10,7 M⁺-O=C=CH₂, -C₂H₄], 288 [46,4 M⁺-O=C=CH₂, -OC₂H₅], 43 [97,1 COCH₃]

¹H-NMR: 400 Mhz, CDCl₃ [δ ppm]: 9,04 (s; 1 H, 2-H); 7,60 (d, 1 H, ³J_{8/7} = 8,8 Hz, 8-H); 7,55-7,36 (m, 5 H, 2',3',4',5',6'-H); 7,17 (dd, 1 H, ³J_{7/8} = 8,8 Hz, ⁴J_{7/5} = 2,3 Hz, 7-H); 6,60 (d, 1 H, ⁴J_{5/7} = 2,3 Hz, 5-H); 4,13 (q, 2 H, ³J_{CH₂/CH₃} = 7,0 Hz, 3-COOCH₂CH₃); 2,23 (s, 3 H, 6-OCOCH₃); 1,03 (t, 3 H, ³J_{CH₃/CH₂} = 7,0 Hz, 3-COOCH₂CH₃)

1-(6-Hydroxy-4-phenylbenzo[4,5]furo[2,3-b]pyridin-3-yl)-ethanon (58)

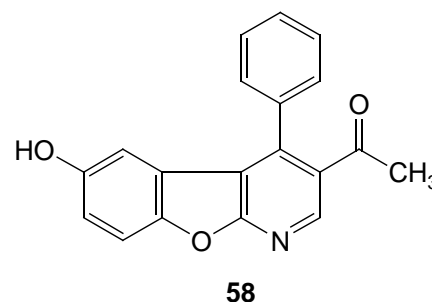
1,16 g (4,8 mmol) von **9** wurden nach Vorschrift 7.1.2.5.1 mit 640 mg (5,9 mmol) *p*-Benzochinon in 150 ml Dioxan-Perchlorsäure-Gemisch (10:1) bei RT gerührt. Nach 24 Stunden konnte mittels DC-Kontrolle die vollständige Umsetzung von **9** zu **82** nachgewiesen werden. Zur Oxidation von **82** wurden im Abstand von je 7 Tagen dreimal 210 mg *p*-Benzochinon zugegeben. Nach 53 Tagen war **82** nicht mehr nachweisbar und der Ansatz wurde aufgearbeitet. **58** wurde säulenchromatographisch mit Laufmittel 1 isoliert und nach Umkristallisation in Form beigefarbener Nadeln erhalten (Ausbeute < 10 %).

Summenformel: C₁₉H₁₃NO₃

Molgewicht: 303,32 g/mol

Schmelzbereich: 242-246 °C

EA: ber.: C 75,24; H 4,32; N 4,62
gef.: C 74,92; H 4,41; N 4,43



IR (KBr): 3427 (OH), 1690 (COCH₃), 1406,1356 (OH)

MS (EI): 303 [59,6 M⁺]; 288 [100,0 M⁺-CH₃], 260 [5,0 M⁺-COCH₃]

¹H-NMR: 500 Mhz, CDCl₃ [δ ppm]: 8,74 (s; 1 H, 2-H); 7,59-7,57 (m, 3 H, 3',4',5'-H); 7,48 (d, 1 H, ³J_{8/7} = 9,0 Hz, 8-H); 7,44-7,42 (m, 2 H, 2',6'-H); 6,97 (dd, 1 H, ³J_{7/8} = 9,0 Hz, ⁴J_{7/5} = 2,5 Hz, 7-H); 6,46 (d, 1 H, ⁴J_{5/7} = 2,5 Hz, 5-H); 4,85 (s, 1 H, 6-OH); 2,10 (s, 3 H, 3-COCH₃)

400 Mhz, DMSO-d₆ [δ ppm]: 9,42 (s, 1 H, 6-OH); 8,73 (s; 1 H, 2-H); 7,60-7,57 (m, 3 H, 3',4',5'-H); 7,55 (d, 1 H, ³J_{8/7} = 8,9 Hz, 8-H); 7,45-7,42 (m, 2 H, 2',6'-H); 6,94 (dd, 1 H, ³J_{7/8} = 8,9 Hz, ⁴J_{7/5} = 2,6 Hz, 7-H); 6,31 (d, 1 H, ⁴J_{5/7} = 2,6 Hz, 5-H); 2,18 (s, 3 H, 3-COCH₃)

6-Hydroxy-4-phenylbenzo[4,5]furo[2,3-b]pyridin-3-carbonsäuremethylester (59)

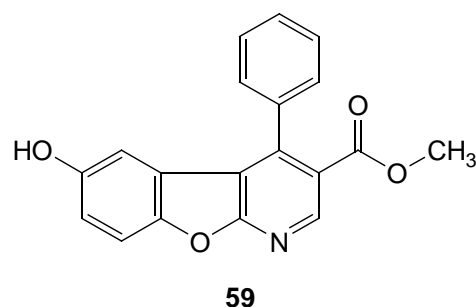
1 g (3,9 mmol) von **10** wurden nach Vorschrift 7.1.2.5.1 mit 516 mg (4,8 mmol) *p*-Benzochinon in 50 ml Dioxan-Perchlorsäure-Gemisch (9:1) bei RT gerührt. Nach 24 Stunden konnte mittels DC-Kontrolle **10** nicht mehr nachgewiesen werden. Im Abstand von je 3 Tagen wurde zweimal 200 mg *p*-Benzochinon zugegeben. Nach 10 Tagen wurde der Ansatz aufgearbeitet. **59** wurde säulenchromatographisch mit Laufmittel 1 isoliert und nach Umkristallisation als weißes amorphes Pulver erhalten (Ausbeute < 10 %).

Summenformel: $C_{19}H_{13}NO_4$

Molgewicht: 319,32 g/mol

Schmelzbereich: 238-246 °C

EA: ber.: C 71,47; H 4,10; N 4,39
gef.: C 71,31; H 4,18; N 4,27



IR (KBr): 3435 (OH), 1731, 1704 (COOCH₃), 1372 (OH)

MS (EI): 319 [100,0 M⁺]; 288 [80,0 M⁺-OCH₃], 260 [8,0 M⁺-C₂H₃O₂]

¹H-NMR: 400 Mhz, DMSO-d₆ [δ ppm]: 9,46 (s, 1 H, 6-OH); 8,88 (s; 1 H, 2-H); 7,59-7,58 (m, 3 H, 3',4',5'-H); 7,59 (d, 1 H, ³J_{8/7} = 8,8 Hz, 8-H); 7,43-7,41 (m, 2 H, 2',6'-H); 6,97 (dd, 1 H, ³J_{7/8} = 8,8 Hz, ⁴J_{7/5} = 2,7 Hz, 7-H); 6,25 (d, 1 H, ⁴J_{5/7} = 2,7 Hz, 5-H); 3,61 (s, 3 H, 3-COOCH₃)

3-Methyl-4-phenylbenzo[4,5]furo[2,3-b]pyridin-6-ol (60)

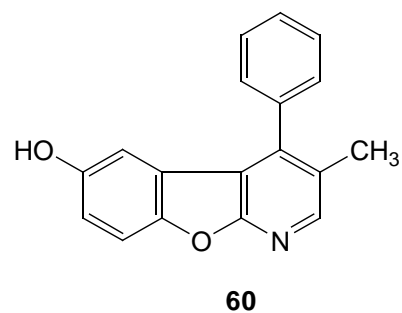
2 g (9,4 mmol) von **11** wurden nach Vorschrift 7.1.2.5.1 mit 1,26 g (11,7 mmol) *p*-Benzochinon in 270 ml Dioxan-Perchlorsäure-Gemisch (10:1) bei RT gerührt. Nach 24 Stunden konnte mittels DC-Kontrolle **11** nicht mehr nachgewiesen werden. Im Abstand von je 3 Tagen wurde zweimal 400 mg *p*-Benzochinon zugegeben. Nach 14 Tagen wurde der Ansatz aufgearbeitet. **60** wurde säulenchromatographisch mit Laufmittel 1 isoliert und nach Umkristallisation als beigefarbenes amorphes Pulver erhalten (Ausbeute < 10 %).

Summenformel: $C_{18}H_{13}NO_2$

Molgewicht: 275,31 g/mol

Schmelzbereich: 278-279 °C

EA: ber.: C 78,53; H 4,76; N 5,09
gef.: C 78,34; H 4,69; N 5,28



IR (KBr): 3428, 1368 (OH)

MS (EI): 275 [100,0 M⁺]

¹H-NMR: 400 Mhz, DMSO-d₆ [δ ppm]: 9,30 (s, 1 H, 6-OH); 8,33 (s; 1 H, 2-H); 7,66-7,57 (m, 3 H, 3',4',5'-H); 7,50 (d, 1 H, ³J_{8/7} = 8,8 Hz, 8-H); 7,46-7,43 (m, 2 H, 2',6'-H); 6,89 (dd, 1 H, ³J_{7/8} = 8,8 Hz, ⁴J_{7/5} = 2,5 Hz, 7-H); 6,28 (d, 1 H, ⁴J_{5/7} = 2,5 Hz, 5-H); 2,18 (s, 3 H, 3-CH₃)

3-Methoxy-4-phenylbenzo[4,5]furo[2,3-b]pyridin-6-ol (61)

1 g (4,4 mmol) von **12** wurden nach Vorschrift 7.1.2.5.1 mit 580 mg (5,4 mmol) *p*-Benzochinon in 50 ml Dioxan-Perchlorsäure-Gemisch (50:1) bei RT gerührt. Nach 24 Stunden war die Umsetzung abgeschlossen und der Ansatz wurde aufgearbeitet. **61** wurde säulenchromatographisch mit Laufmittel 4 isoliert und nach Umkristallisation als hellbraunes amorphes Pulver erhalten (Ausbeute < 10 %).

Summenformel: C₁₈H₁₃NO₃

Molgewicht: 291,31 g/mol

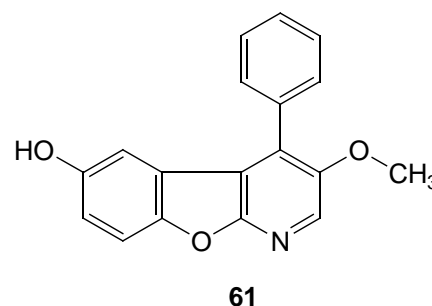
Schmelzbereich: 240-245 °C

EA: ber.: C 74,22; H 4,50; N 4,81
gef.: C 73,89; H 4,45; N 4,95

IR (KBr): 3434 (OH), 1275 (C-O-C), 1368 (OH)

MS (EI): 291 [100 M⁺]; 276 [97,8 M⁺-CH₃]

¹H-NMR: 400 Mhz, DMSO-d₆ [δ ppm]: 9,34 (s, 1 H, 6-OH); 8,25 (s; 1 H, 2-H); 7,61-7,53 (m, 3 H, 3',4',5'-H); 7,51-7,49 (m, 2 H, 2',6'-H); 7,49 (d, 1 H, ³J_{8/7} = 8,8 Hz, 8-H); 6,91 (dd, 1 H, ³J_{7/8} = 8,8 Hz, ⁴J_{7/5} = 2,5 Hz, 7-H); 6,47 (d, 1 H, ⁴J_{5/7} = 2,5 Hz, 5-H); 3,84 (s, 3 H, 3-OCH₃)

**3-Ethoxy-4-phenylbenzo[4,5]furo[2,3-b]pyridin-6-ol (62)**

0,8 g (3,3 mmol) von **13** wurden nach Vorschrift 7.1.2.5.1 mit 360 mg (4,1 mmol) *p*-Benzochinon in 50 ml Dioxan-Perchlorsäure-Gemisch (50:1) bei RT gerührt. Nach 24 Stunden war die Umsetzung abgeschlossen und der Ansatz wurde aufgearbeitet. **62** wurde säulenchromatographisch mit Laufmittel 4 isoliert und nach Umkristallisation in Form orangefarbener Kristalle erhalten (Ausbeute < 10 %).

Summenformel: C₁₉H₁₅NO₃

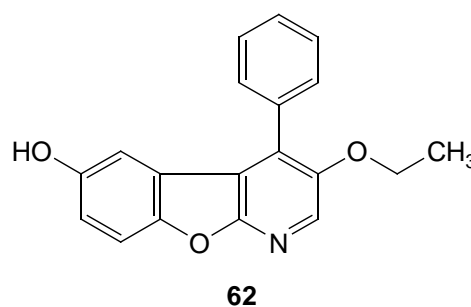
Molgewicht: 305,34 g/mol

Schmelzbereich: 231-235 °C

EA: ber.: C 74,74; H 4,95; N 4,59
gef.: C 74,99; H 4,81; N 4,70

IR (KBr): 3434 (OH), 1277 (C-O-C), 1369 (OH)

MS (EI): 305 [100 M⁺]; 277 [97,9 M⁺-C₂H₄]; 276 [47,9 M⁺-C₂H₅]



¹H-NMR: 400 Mhz, DMSO-d₆ [δ ppm]: 9,33 (s, 1 H, 6-OH); 8,25 (s; 1 H, 2-H); 7,59-7,51 (m, 5 H, 2',3',4',5',6'-H); 7,49 (d, 1 H, ³J_{8/7} = 8,9 Hz, 8-H); 6,91 (dd, 1 H, ³J_{7/8} = 8,9 Hz, ⁴J_{7/5} = 2,5 Hz, 7-H); 6,51 (d, 1 H, ⁴J_{5/7} = 2,5 Hz, 5-H); 4,09 (q, 2 H, ³J_{CH₂/CH₃} = 7,0 Hz, 3-OCH₂CH₃); 1,18 (t, 3 H, ³J_{CH₃/CH₂} = 7,0 Hz, 3-OCH₂CH₃)

3-Benzoyloxy-4-phenylbenzo[4,5]furo[2,3-b]pyridin-6-ol (**63**)

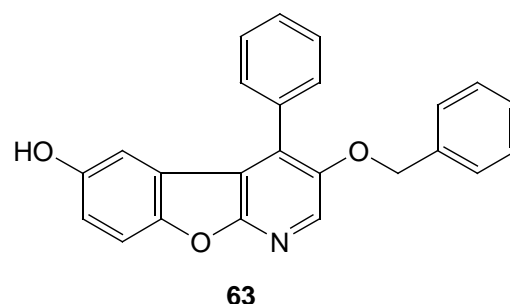
1 g (3,3 mmol) von **14** wurden nach Vorschrift 7.1.2.5.1 mit 440 mg (4,1 mmol) *p*-Benzochinon in 50 ml Dioxan-Perchlorsäure-Gemisch (50:1) bei RT gerührt. Nach 24 Stunden war die Umsetzung abgeschlossen und der Ansatz wurde aufgearbeitet. **63** wurde säulenchromatographisch mit Laufmittel 4 isoliert und nach Umkristallisation in Form hellroter bis orangefarbener Kristalle erhalten (Ausbeute 13 %).

Summenformel: C₂₄H₁₇NO₃

Molgewicht: 367,41 g/mol

Schmelzbereich: 219,5-223,5 °C

EA: ber.: C 78,46; H 4,66; N 3,81
gef.: C 78,95; H 4,59; N 3,76



IR (KBr): 3401 (OH), 1276 (C-O-C), 1359 (OH)

MS (EI): 367 [38,6 M⁺]; 276 [11,4 M⁺-C₇H₇]; 91 [100,0 C₇H₇]

¹H-NMR: 400 Mhz, DMSO-d₆ [δ ppm]: 9,34 (s, 1 H, 6-OH); 8,32 (s; 1 H, 2-H); 7,60-7,54 (m, 5 H, 2',3',4',5',6'-H); 7,49 (d, 1 H, ³J_{8/7} = 8,9 Hz, 8-H); 7,31-7,26 (m, 5 H, 3-OCH₂C₆H₅); 6,92 (dd, 1 H, ³J_{7/8} = 8,9 Hz, ⁴J_{7/5} = 2,7 Hz, 7-H); 6,51 (d, 1 H, ⁴J_{5/7} = 2,7 Hz, 5-H); 5,17 (s, 2 H, 3-OCH₂C₆H₅)

4-Phenylbenzo[4,5]furo[2,3-b]pyridin-3,6-diol (**64**)

25 mg von **63** wurden in 20 ml trockenem Methanol gelöst und nach Zugabe von 20 mg Pd/C gelöst unter einer H₂-Atmosphäre bei 2 bar geschüttelt. Die zunächst durch **63** stark orange gefärbte Lösung verfärbte sich zu hellgelb. Nach 3 Stunden war die Debenzylierung abgeschlossen. Nach Filtration und Entfernung des Lösungsmittels i. v. konnte **64** in Form gelber Kristalle erhalten werden (Ausbeute 91 %).

Summenformel: $C_{17}H_{11}NO_3$

Molgewicht: 277,28 g/mol

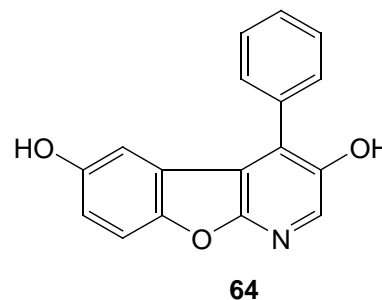
Schmelzbereich: 219-222 °C

EA: ber.: C 37,64; H 4,00; N 5,05
gef.: C 73,25; H 4,15; N 4,97

IR (KBr): 3434 (OH), 1372 (OH)

MS (EI): 277 [100 M⁺]

¹H-NMR: 400 Mhz, DMSO-d₆ [δ ppm]: 9,71 (s, 1 H, 3-OH); 9,28 (s, 1 H, 6-OH); 8,05 (s; 1 H, 2-H); 7,60-7,51 (m, 5 H, 2',3',4',5',6'-H); 7,45 (d, 1 H, ³J_{8,7} = 8,9 Hz, 8-H); 6,88 (dd, 1 H, ³J_{7,8} = 8,9 Hz, ⁴J_{7,5} = 2,7 Hz, 7-H); 6,53 (d, 1 H, ⁴J_{5,7} = 2,7 Hz, 5-H)



3-Brom-4-phenylbenzo[4,5]furo[2,3-b]pyridin-6-ol (65)

2 g (5,6 mmol) von **25** wurden nach Vorschrift 7.1.2.5.1 mit 600 mg (5,6 mmol) *p*-Benzochinon in 100 ml Dioxan-Perchlorsäure-Gemisch (20:1) bei RT gerührt. Nach 24 Stunden war mittels DC-Kontrolle die vollständige Umsetzung zu **49** und zu einer Zwischenverbindung sichtbar, die im Laufe der nächsten Tage zu **65** umgesetzt wurde. Nach 7 Tagen wurden einmalig 200 mg *p*-Benzochinon zugegeben. Nach 15 Tagen war die Umsetzung vollständig und der Ansatz wurde aufgearbeitet. **65** wurde säulenchromatographisch mit Laufmittel 3 isoliert und nach Umkristallisation in Form eines weißen amorphen Pulvers erhalten (Ausbeute 21 %).

Summenformel: $C_{17}H_{10}BrNO_2$

Molgewicht: 340,18 g/mol

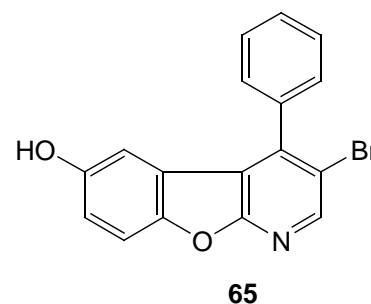
Schmelzbereich: 253-258 °C

EA: ber.: C 54,28; H 3,75; N 3,72; Br 21,24
gef.: C 54,11; H 3,86; N 3,71; Br 21,68

IR (KBr): 3435 (OH), 1377 (OH), 1024 (Br)

MS (EI): 341 [98,5 M⁺ (⁸¹Br)]; 339 [100 M⁺ (⁷⁹Br)]; 259 [9,0 M⁺-HBr]

¹H-NMR: 400 Mhz, DMSO-d₆ [δ ppm]: 9,44 (s, 1 H, 6-OH); 8,66 (s; 1 H, 2-H); 7,66-7,64 (m, 3 H, 3',4',5'-H); 7,57 (d, 1 H, ³J_{8,7} = 8,8 Hz, 8-H); 7,49-7,47 (m, 2 H, 2',6'-H); 6,96 (dd, 1 H, ³J_{7,8} = 8,8 Hz, ⁴J_{7,5} = 2,4 Hz, 7-H); 6,24 (d, 1 H, ⁴J_{5,7} = 2,4 Hz, 5-H)



3-Chlor-4-phenylbenzo[4,5]furo[2,3-b]pyridin-6-ol (66)

1,2 g (4,1 mmol) von **26** wurden nach Vorschrift 7.1.2.5.1 mit 435 mg (4,1 mmol) *p*-Benzochinon in 100 ml Dioxan-Perchlorsäure-Gemisch (15:1) bei RT gerührt. Nach 24 Stunden war mittels DC-Kontrolle die vollständige Umsetzung zu **50** und zu einer Zwischenverbindung sichtbar, die im Laufe der nächsten Tage zu **66** umgesetzt wurde. Nach 5 Tagen wurden einmalig 150 mg *p*-Benzochinon zugegeben. Nach 12 Tagen war die Umsetzung vollständig und der Ansatz wurde aufgearbeitet. **66** wurde säulenchromatographisch mit Laufmittel 3 isoliert und nach Umkristallisation in Form eines weißen amorphen Pulvers erhalten (Ausbeute 17 %).

Summenformel: C₁₇H₁₀ClNO₂

Molgewicht: 295,73 g/mol

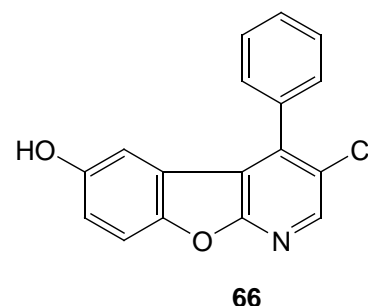
Schmelzbereich: 277-280 °C

EA: ber.: C 69,05; H 3,41; N 4,74; Cl 11,99
gef.: C 69,18; H 3,52; N 4,69; Cl 12,12

IR (KBr): 3438 (OH), 1359 (OH), 1028 (Cl)

MS (EI): 297 [33,0 M⁺ (³⁷Cl)]; 296 [20,0 M⁺]; 295 [100,0 M⁺ (³⁵Cl)]; 259 [8,0 M⁺-HCl]

¹H-NMR: 400 Mhz, DMSO-d₆ [δ ppm]: 9,45 (s, 1 H, 6-OH); 8,57 (s; 1 H, 2-H); 7,67-7,63 (m, 3 H, 3',4',5'-H); 7,57 (d, 1 H, ³J_{8/7} = 8,8 Hz, 8-H); 7,54-7,51 (m, 2 H, 2',6'-H); 6,97 (dd, 1 H, ³J_{7/8} = 8,8 Hz, ⁴J_{7/5} = 2,4 Hz, 7-H); 6,33 (d, 1 H, ⁴J_{5/7} = 2,4 Hz, 5-H)

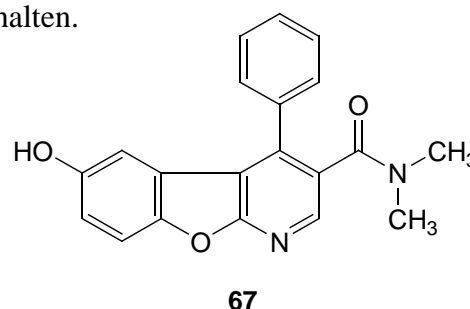
**6-Hydroxy-N,N-dimethyl-4-phenylbenzo[4,5]furo[2,3-b]pyridin-3-carbamid (67)**

20 mg **57** wurden in 5 ml trockenem Methanol gelöst und mit 10 ml Dimethylaminlösung (2 M in THF) versetzt. Der Ansatz wurde im Kühlschrank aufbewahrt, bis nach 24 Tagen durch DC-Kontrolle kein Edukt mehr nachweisbar war. Nach Entfernung des Lösungsmittels wurde der Rückstand säulenchromatographisch mit einem Laufmittelgemisch aus Chloroform/Essigester/Methanol (85/15/10) gereinigt. **67** wurde als beigefarbene amorphe Substanz in 39 % Ausbeute erhalten.

Summenformel: C₂₀H₁₆N₂O₃

Molgewicht: 332,36 g/mol

Schmelzbereich: 260-269 °C



EA:	ber.: C 68,56; H 5,18; N 8,00 gef.: C 68,13; H 5,32; N 7,88
IR (KBr):	3435 (OH), 1730 (CON(CH ₃) ₂), 1382, 1357 (OH)
MS (EI):	332 [50,9 M ⁺]; 288 [100,0 M ⁺ -NC ₂ H ₆]; 268 [4,3 M ⁺ -CONC ₂ H ₆]
¹ H-NMR:	400 Mhz, DMSO-d ₆ [δ ppm]: 9,45 (s, 1 H, 6-OH); 8,36 (s; 1 H, 2-H); 7,61-7,58 (m, 3 H, 3',4',5'-H); 7,58 (d, 1 H, ³ J _{8/7} = 8,8 Hz, 8-H); 7,53-7,50 (m, 2 H, 2',6'-H); 6,97 (dd, 1 H, ³ J _{7/8} = 8,8 Hz, ⁴ J _{7/5} = 2,6 Hz, 7-H); 6,61 (d, 1 H, ⁴ J _{5/7} = 2,6 Hz, 5-H); 2,75 (s, 3 H, 3-CON(CH ₃) ₂), 2,59 (s, 3 H, 3-CON(CH ₃) ₂)

6-Hydroxy-N-methyl-4-phenylbenzo[4,5]furo[2,3-b]pyridin-3-carbamid (68)

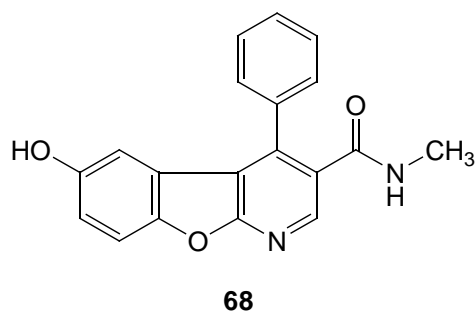
50 mg **57** wurden in 10 ml trockenem Methanol gelöst und mit 20 ml Methylaminlösung versetzt. Der Ansatz wurde für 5 Tage im Kühlschrank aufbewahrt. Nach Entfernung des Lösungsmittels verblieb ein kristalliner Rückstand, aus dem **68** durch Umkristallisieren mit Methanol in 65 % Ausbeute als hellgelbe Nadeln erhalten wurde.

Summenformel: C₁₉H₁₄N₂O₃

Molgewicht: 318,34 g/mol

Schmelzbereich: 285-290 °C

EA: ber.: C 71,69; H 4,43; N 8,80
gef.: C 71,55; H 4,41; N 8,64



IR (KBr): 3419 (OH), 1677, 1642 (CON(CH₃)₂), 1382, 1359 (OH)

MS (EI): 318 [58,1 M⁺]; 288 [100,0 M⁺-NHCH₃]; 260 [8,2 M⁺-CONHCH₃]

¹H-NMR: 400 Mhz, DMSO-d₆ [δ ppm]: 9,41 (s, 1 H, 6-OH); 8,44 (s; 1 H, 2-H); 8,24 (q br, 1 H, ³J_{NH/CH₃} = 4,7 Hz, 3-CONHCH₃); 7,57-7,55 (m, 4 H, 3',4',5'-H, 8-H); 7,47-7,45 (m, 2 H, 2',6'-H); 6,95 (dd, 1 H, ³J_{7/8} = 8,9 Hz, ⁴J_{7/5} = 2,5 Hz, 7-H); 6,45 (d, 1 H, ⁴J_{5/7} = 2,5 Hz, 5-H); 2,58 (d, 3 H, ³J_{CH₃/NH} = 4,7 Hz, 3-CONHCH₃)

6-Hydroxy-4-phenylbenzo[4,5]furo[2,3-b]pyridin-3-carbamid (69)

20 mg **57** wurden in 5 ml trockenem Methanol gelöst und mit 5 ml konzentriertem Ammoniak versetzt. Der Ansatz wurde im Kühlschrank aufbewahrt, bis nach 20 Tagen durch DC-Kontrolle kein Edukt mehr nachweisbar war. Nach Entfernung des Lösungsmittels wurde der Rückstand säulenchromatographisch mit einem Laufmittelgemisch aus Chloroform/Essigester/Methanol (85/15/10) gereinigt. **69** wurde als

weiße amorphe Substanz in 48 % Ausbeute erhalten.

Summenformel: $C_{18}H_{12}N_2O_3$

Molgewicht: 304,31 g/mol

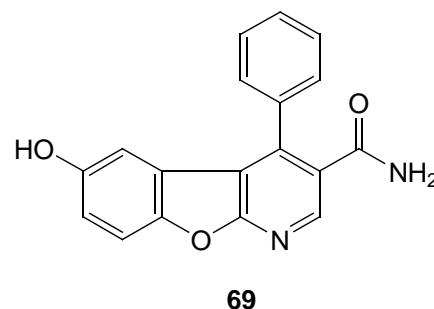
Schmelzbereich: 325-332 °C

EA: ber.: C 71,05; H 3,97; N 9,21
gef.: C 70,85; H 4,05; N 9,15

IR (KBr): 3448 (OH), 1728, 1684, 1651 ($CON(CH_3)_2$), 1384, 1355 (OH)

MS (EI): 304 [$100 M^+$]; 288 [$78,6 M^+-NH_2$]; 260 [$6,4 M^+-CONH_2$]

1H -NMR: 500 Mhz, DMSO- d_6 [δ ppm]: 9,47 (s br, 1 H, 6-OH); 8,49 (s; 1 H, 2-H); 7,76 (s; 1 H, 3- $CONH_2$); 7,59-7,55 (m, 4 H, 3',4',5'-H, 8-H); 7,51-7,48 (m, 2 H, 2',6'-H); 7,42 (s; 1 H, 3- $CONH_2$); 6,95 (dd, 1 H, $^3J_{7/8} = 8,8$ Hz, $^4J_{7/5} = 2,8$ Hz, 7-H); 6,42 (d, 1 H, $^4J_{5/7} = 2,8$ Hz, 5-H)



3-Methoxy-4-(4-methylphenyl)-benzo[4,5]furo[2,3-b]pyridin-6-ol (70)

0,6 g (2,5 mmol) von **16** wurden nach Vorschrift 7.1.2.5.1 mit 266 mg (2,5 mmol) *p*-Benzochinon in 25 ml Dioxan-Perchlorsäure-Gemisch (50:1) bei RT gerührt. Nach 24 Stunden war die Umsetzung abgeschlossen und der Ansatz wurde aufgearbeitet. **70** wurde säulenchromatographisch mit Laufmittel 4 isoliert und nach Umkristallisation in Form länglicher, schwach rosa gefärbter Plättchen erhalten (Ausbeute < 10 %).

Summenformel: $C_{19}H_{15}NO_3$

Molgewicht: 305,34 g/mol

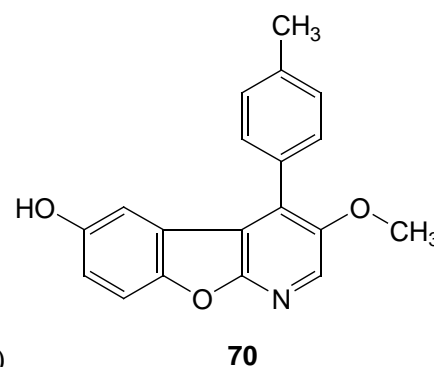
Schmelzbereich: 237-239 °C

EA: ber.: C 74,74; H 4,95; N 4,59
gef.: C 74,57; H 5,01; N 4,66

IR (KBr): 3421 (OH), 1367 (OH), 1274 (C-O-C)

MS (EI): 305 [$100 M^+$]; 290 [$66 M^+-CH_3$]

1H -NMR: 400 Mhz, DMSO- d_6 [δ ppm]: 9,33 (s, 1 H, 6-OH); 8,23 (s; 1 H, 2-H); 7,48 (d, 1 H, $^3J_{8/7} = 8,8$ Hz, 8-H); 7,39 (s, 4 H, 2',3',5',6'-H); 6,91 (dd, 1 H, $^3J_{7/8} = 8,8$ Hz, $^4J_{7/5} = 2,5$ Hz, 7-H); 6,56 (d, 1 H, $^4J_{5/7} = 2,5$ Hz, 5-H); 3,82 (s, 3 H, 3- OCH_3); 2,45 (s, 3 H, 4'- CH_3)



3-Methoxy-4-(4-methoxyphenyl)-benzo[4,5]furo[2,3-b]pyridin-6-ol (71)

1 g (3,9 mmol) von **17** wurden nach Vorschrift 7.1.2.5.1 mit 450 mg (4,2 mmol) *p*-Benzochinon in 100 ml Dioxan-Perchlorsäure-Gemisch (50:1) bei RT gerührt. Nach 24 Stunden war die Umsetzung abgeschlossen und der Ansatz wurde aufgearbeitet. **71** wurde säulenchromatographisch mit Laufmittel 4 isoliert und nach Umkristallisation in Form orangefarbener Nadeln erhalten (Ausbeute < 10 %).

Summenformel: C₁₉H₁₅NO₄

Molgewicht: 321,34 g/mol

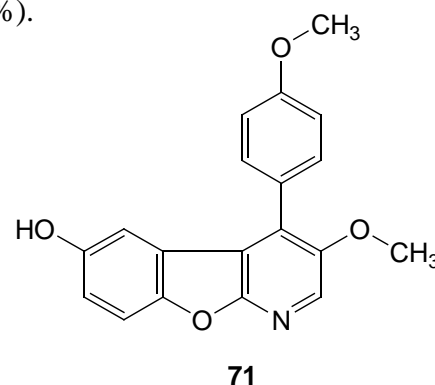
Schmelzbereich: 242-245 °C

EA: ber.: C 71,02; H 4,71; N 4,36
gef.: C 71,11; H 4,82; N 4,32

IR (KBr): 3401 (OH), 1367 (OH), 1275, 1250 (C-O-C)

MS (EI): 321 [100 M⁺]; 306 [77,9 M⁺-CH₃]; 291 [30,0 M⁺-2 CH₃]

¹H-NMR: 400 Mhz, DMSO-d₆ [δ ppm]: 9,34 (s, 1 H, 6-OH); 8,22 (s; 1 H, 2-H); 7,48 (d, 1 H, ³J_{8,7} = 8,8 Hz, 8-H); 7,46-7,43 (m, 2 H, 2',6'-H, Teil AA' des AA'BB'-Systems); 7,15-7,13 (m, 2 H, 3',5'-H, Teil BB' des AA'BB'-Systems); 6,91 (dd, 1 H, ³J_{7,8} = 8,8 Hz, ⁴J_{7,5} = 2,5 Hz, 7-H); 6,61 (d, 1 H, ⁴J_{5,7} = 2,5 Hz, 5-H); 3,87 (s, 3 H, 3-OCH₃); 3,83 (s, 3 H, 4'-OCH₃)

**3-Methoxy-4-(2-methoxyphenyl)-benzo[4,5]furo[2,3-b]pyridin-6-ol (72)**

1 g (3,9 mmol) von **18** wurden nach Vorschrift 7.1.2.5.1 mit 450 mg (4,2 mmol) *p*-Benzochinon in 100 ml Dioxan-Perchlorsäure-Gemisch (50:1) bei RT gerührt. Nach 24 Stunden war die Umsetzung abgeschlossen und der Ansatz wurde aufgearbeitet. **72** wurde säulenchromatographisch mit Laufmittel 4 isoliert und nach Umkristallisation als beigefarbenes, amorphes Pulver erhalten (Ausbeute < 10 %).

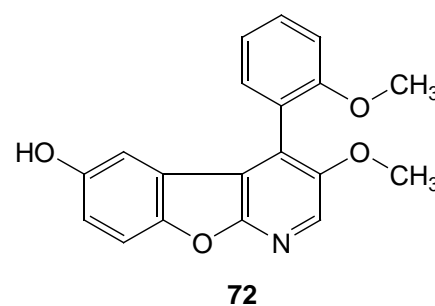
Summenformel: C₁₉H₁₅NO₄

Molgewicht: 321,34 g/mol

Schmelzbereich: 210-214 °C

EA: ber.: C 71,02; H 4,71; N 4,36
gef.: C 70,88; H 4,76; N 4,50

IR (KBr): 3428 (OH), 1367 (OH), 1276, 1246 (C-O-C)



MS (EI): 321 [100,0 M⁺]; 306 [49,0 M⁺-CH₃]; 291 [38,6 M⁺-2 CH₃]

¹H-NMR: 500 Mhz, DMSO-d₆ [δ ppm]: 9,32 (s, 1 H, 6-OH); 8,22 (s; 1 H, 2-H); 7,55 (ddd, 1 H, ³J_{4/3'} = 8,5 Hz, ³J_{4/5'} = 7,5 Hz, ⁴J_{4/6'} = 1,7 Hz, 4'-H); 7,46 (d, 1 H, ³J_{8/7} = 8,8 Hz, 8-H); 7,29 (dd, 1 H, ³J_{6/5'} = 7,5 Hz, ⁴J_{6/4'} = 1,7 Hz, 6'-H); 7,25 (dd, 1 H, ³J_{3/4'} = 8,5 Hz, ⁴J_{3/5'} = 0,9 Hz, 3'-H); 7,13 (dt, 1 H, ³J_{5/4'} = ³J_{5/6'} = 7,5 Hz, ⁴J_{5/3'} = 0,9 Hz, 5'-H); 6,90 (dd, 1 H, ³J_{7/8} = 8,8 Hz, ⁴J_{7/5} = 2,6 Hz, 7-H); 6,33 (d, 1 H, ⁴J_{5/7} = 2,6 Hz, 5-H); 3,82 (s, 3 H, 3-OCH₃); 3,66 (s, 3 H, 2'-OCH₃)

1-[6-Hydroxy-4-(4-methylphenyl)-benzo[4,5]furo[2,3-b]pyridin-3-yl]-ethanon (73)

0,5 g (2 mmol) von **19** wurden nach Vorschrift 7.1.2.5.1 mit 260 mg (2,5 mmol) *p*-Benzochinon in 35 ml Dioxan-Perchlorsäure-Gemisch (6:1) bei RT gerührt. Nach 24 Stunden konnte mittels DC-Kontrolle die vollständige Umsetzung von **19** zum Tetrahydrofluoren nachgewiesen werden. Zur Oxidation wurden im Abstand von je 7 Tagen dreimal 90 mg *p*-Benzochinon zugegeben. Nach 32 Tagen wurde der Ansatz aufgearbeitet. **73** konnte säulenchromatographisch mit Laufmittel 4 isoliert und nach Umkristallisation in Form hellgelber Plättchen erhalten werden (Ausbeute 21 %).

Summenformel: C₂₀H₁₅NO₃

Molgewicht: 317,35 g/mol

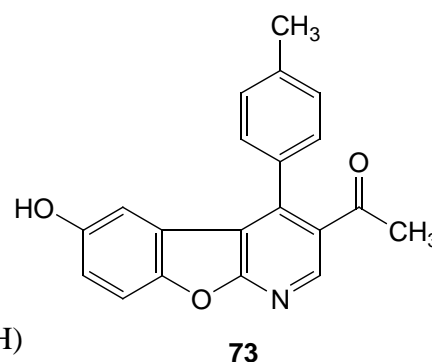
Schmelzbereich: 275-279 °C

EA: ber.: C 75,70; H 4,76; N 4,41
gef.: C 75,67; H 4,63; N 4,24

IR (KBr): 3422 (OH), 1662 (COCH₃), 1368 (OH)

MS (EI): 317 [50,0 M⁺]; 302 [100,0 M⁺-CH₃]; 274 [12,0 M⁺-COCH₃]

¹H-NMR: 400 Mhz, DMSO-d₆ [δ ppm]: 9,47 (s, 1 H, 6-OH); 8,70 (s; 1 H, 2-H); 7,58 (d, 1 H, ³J_{8/7} = 8,8 Hz, 8-H); 7,44-7,42 (m, 2 H, 2',6'-H, Teil AA' des AA'BB'-Systems); 7,37-7,35 (m, 2 H, 3',5'-H, Teil BB' des AA'BB'-Systems); 6,96 (dd, 1 H, ³J_{7/8} = 8,8 Hz, ⁴J_{7/5} = 2,5 Hz, 7-H); 6,45 (d, 1 H, ⁴J_{5/7} = 2,5 Hz, 5-H); 2,47 (s, 3 H, 4'-CH₃); 2,17 (s, 3 H, 3-COCH₃)



1-[6-Hydroxy-4-(4-methoxyphenyl)-benzo[4,5]furo[2,3-b]pyridin-3-yl]-ethanon (74)

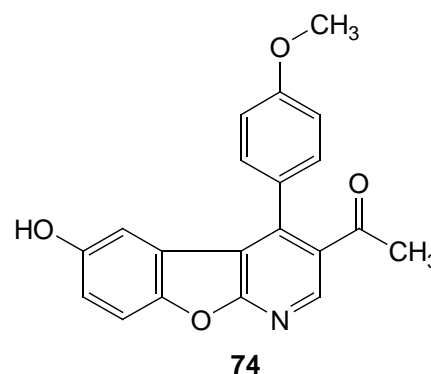
0,5 g (1,9 mmol) von **20** wurden nach Vorschrift 7.1.2.5.1 mit 245 mg (2,3 mmol) *p*-Benzochinon in 35 ml Dioxan-Perchlorsäure-Gemisch (6:1) bei RT gerührt. Nach 24 Stunden konnte mittels DC-Kontrolle die vollständige Umsetzung von **20** zum Tetrahydrofluoren nachgewiesen werden. Zur Oxidation wurden im Abstand von je 7 Tagen dreimal 80 mg *p*-Benzochinon zugegeben. Nach 30 Tagen wurde der Ansatz aufgearbeitet. **74** konnte säulenchromatographisch mit Laufmittel 4 isoliert und nach Umkristallisation in Form gelber Plättchen erhalten werden (Ausbeute 18 %).

Summenformel: C₂₀H₁₅NO₄

Molgewicht: 333,35 g/mol

Schmelzbereich: 232-236 °C

EA: ber.: C 72,06; H 4,54; N 4,20
gef.: C 71,99; H 4,70; N 4,08



IR (KBr): 3413 (OH), 1695 (COCH₃), 1369 (OH), 1257 (C-O-C)

MS (EI): 333 [75,0 M⁺]; 318 [100,0 M⁺-CH₃]; 290 [5,0 M⁺-COCH₃]

¹H-NMR: 400 Mhz, DMSO-d₆ [δ ppm]: 9,47 (s, 1 H, 6-OH); 8,67 (s; 1 H, 2-H); 7,58 (d, 1 H, ³J_{8/7} = 8,9 Hz, 8-H); 7,42-7,39 (m, 2 H, 2',6'-H, Teil AA' des AA'BB'-Systems); 7,19-7,17 (m, 2 H, 3',5'-H, Teil BB' des AA'BB'-Systems); 6,96 (dd, 1 H, ³J_{7/8} = 8,9 Hz, ⁴J_{7/5} = 2,5 Hz, 7-H); 6,53 (d, 1 H, ⁴J_{5/7} = 2,5 Hz, 5-H); 3,89 (s, 3 H, 4'-OCH₃); 2,15 (s, 3 H, 3-COCH₃)

1-[6-Hydroxy-4-(2-methoxyphenyl)-benzo[4,5]furo[2,3-b]pyridin-3-yl]-ethanon (75)

1,7 g (6,3 mmol) von **21** wurden nach Vorschrift 7.1.2.5.1 mit 830 mg (2,3 mmol) *p*-Benzochinon in 110 ml Dioxan-Perchlorsäure-Gemisch (9:1) bei RT gerührt. Nach 24 Stunden konnte mittels DC-Kontrolle die vollständige Umsetzung von **21** zum Tetrahydrofluoren nachgewiesen werden. Zur Oxidation wurden im Abstand von je 7 Tagen dreimal 280 mg *p*-Benzochinon zugegeben. Nach 45 Tagen wurde der Ansatz aufgearbeitet. **75** konnte säulenchromatographisch mit Laufmittel 4 isoliert und nach Umkristallisation in Form gelber Plättchen erhalten werden (Ausbeute 25 %).

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

Molgewicht: 333,35 g/mol

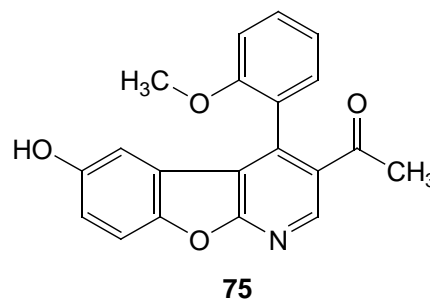
Schmelzbereich: 198-201 °C

EA: ber.: C 72,06; H 4,54; N 4,20
gef.: C 71,87; H 4,65; N 4,12

IR (KBr): 3435 (OH), 1687 (COCH₃), 1354 (OH), 1250 (C-O-C)

MS (EI): 333 [50,0 M⁺]; 318 [48,0 M⁺-CH₃]; 302 [100,0 M⁺-OCH₃]; 290 [10,0 M⁺-COCH₃]; 275 [12,0 M⁺-CH₃, -COCH₃]

¹H-NMR: 500 Mhz, DMSO-d₆ [δ ppm]: 9,45 (s, 1 H, 6-OH); 8,74 (s; 1 H, 2-H); 7,61 (ddd, 1 H, ³J_{4/3'} = 8,5 Hz, ³J_{4/5'} = 7,4 Hz, ⁴J_{4/6'} = 1,7 Hz, 4'-H); 7,56 (d, 1 H, ³J_{8/7} = 8,8 Hz, 8-H); 7,31 (dd, 1 H, ³J_{6/5'} = 7,4 Hz, ⁴J_{6/4'} = 1,7 Hz, 6'-H); 7,26 (dd, 1 H, ³J_{3/4'} = 8,5 Hz, ⁴J_{3/5'} = 0,9 Hz, 3'-H); 7,17 (dt, 1 H, ³J_{5/4'} = ³J_{5/6'} = 7,4 Hz, ⁴J_{5/3'} = 0,9 Hz, 5'-H); 6,96 (dd, 1 H, ³J_{7/8} = 8,8 Hz, ⁴J_{7/5} = 2,5 Hz, 7-H); 6,35 (d, 1 H, ⁴J_{5/7} = 2,5 Hz, 5-H); 3,67 (s, 3 H, 2'-OCH₃); 2,26 (s, 3 H, 3-COCH₃)



6-Hydroxy-4-(4-methylphenyl)-benzo[4,5]furo[2,3-b]pyridin-3-carbonsäureethylester (76)

1 g (3,5 mmol) von **22** wurden nach Vorschrift 7.1.2.5.1 mit 465 mg (4,3 mmol) *p*-Benzochinon in 50 ml Dioxan-Perchlorsäure-Gemisch (9:1) bei RT gerührt. Nach 24 Stunden konnte mittels DC-Kontrolle die vollständige Umsetzung von **22** zum Tetrahydrofluoren nachgewiesen werden. Zur Oxidation wurden im Abstand von je 7 Tagen dreimal 160 mg *p*-Benzochinon zugegeben. Nach 42 Tagen wurde der Ansatz aufgearbeitet. **76** konnte säulenchromatographisch mit Laufmittel 1 isoliert und nach Umkristallisation als beigefarbene, amorphe Substanz erhalten werden (Ausbeute 12 %).

Summenformel: $C_{21}H_{17}NO_4$

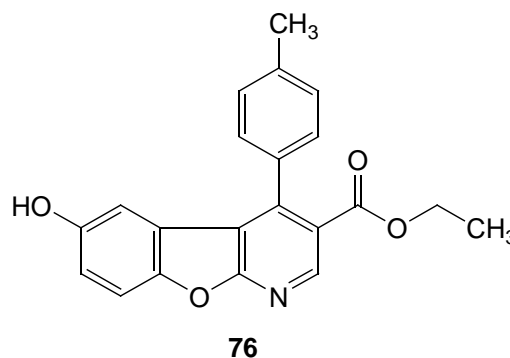
Molgewicht: 347,37 g/mol

Schmelzbereich: 236-246 °C

EA: ber.: C 72,61; H 4,93; N 4,03
gef.: C 72,45; H 4,98; N 3,97

IR (KBr): 3428 (OH), 1707 (COOC₂H₅),
1371 (OH)

MS (EI): 347 [100,0 M⁺]; 319 [16,5 M⁺-C₂H₄]; 302 [50,9 M⁺-OC₂H₅]; 184 [74,7 M⁺-COOC₂H₅, -C₇H₇]



¹H-NMR: 400 Mhz, DMSO-d₆ [δ ppm]: 9,46 (s, 1 H, 6-OH); 8,82 (s; 1 H, 2-H); 7,58 (d, 1 H, ³J_{8/7} = 8,9 Hz, 8-H); 7,41-7,39 (m, 2 H, 2',6'-H, Teil AA' des AA'BB'-Systems); 7,32-7,30 (m, 2 H, 3',5'-H, Teil BB' des AA'BB'-Systems); 6,97 (dd, 1 H, ³J_{7/8} = 8,9 Hz, ⁴J_{7/5} = 2,6 Hz, 7-H); 6,38 (d, 1 H, ⁴J_{5/7} = 2,6 Hz, 5-H); 4,05 (q, 2 H, ³J_{CH₂/CH₃} = 7,0 Hz, 3-COOCH₂CH₃); 2,46 (s, 3 H, 4'-CH₃); 0,96 (t, 3 H, ³J_{CH₃/CH₂} = 7,0 Hz, 3-COOCH₂CH₃)

6-Hydroxy-4-(4-methoxyphenyl)-benzo[4,5]furo[2,3-b]pyridin-3-carbonsäureethylester (77)

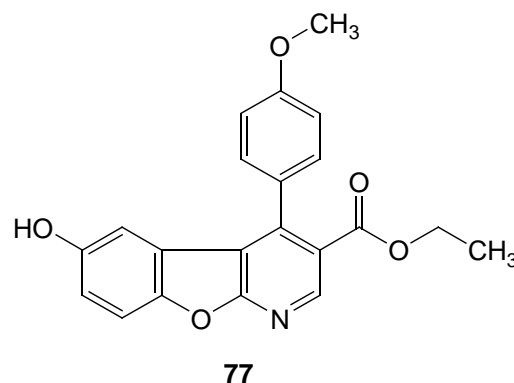
500 mg (1,7 mmol) von **23** wurden nach Vorschrift 7.1.2.5.1 mit 230 mg (2,1 mmol) *p*-Benzochinon in 50 ml Dioxan-Perchlorsäure-Gemisch (9:1) bei RT gerührt. Nach 24 Stunden konnte mittels DC-Kontrolle die vollständige Umsetzung von **23** zum Tetrahydrofluoren nachgewiesen werden. Zur Oxidation wurden im Abstand von je 7 Tagen dreimal 80 mg *p*-Benzochinon zugegeben. Nach 35 Tagen wurde der Ansatz aufgearbeitet. **77** konnte säulenchromatographisch mit Laufmittel 1 isoliert und nach Umkristallisation als beige gefärbte, amorphe Substanz erhalten werden (Ausbeute 18 %).

Summenformel: C₂₁H₁₇NO₅

Molgewicht: 363,37 g/mol

Schmelzbereich: 219-223 °C

EA: ber.: C 69,41; H 4,72; N 3,85
gef.: C 69,22; H 4,87; N 3,67



IR (KBr): 3414 (OH), 1718 (COOC₂H₅), 1372 (OH), 1248 (C-O-C)

MS (EI): 363 [100,0 M⁺]; 335 [14,3 M⁺-C₂H₄]; 318 [65 M⁺-OC₂H₅]

¹H-NMR: 400 Mhz, DMSO-d₆ [δ ppm]: 9,47 (s, 1 H, 6-OH); 8,80 (s; 1 H, 2-H); 7,58 (d, 1 H, ³J_{8/7} = 8,9 Hz, 8-H); 7,37-7,34 (m, 2 H, 2',6'-H, Teil AA' des AA'BB'-Systems); 7,16-7,12 (m, 2 H, 3',5'-H, Teil BB' des AA'BB'-Systems); 6,96 (dd, 1 H, ³J_{7/8} = 8,9 Hz, ⁴J_{7/5} = 2,5 Hz, 7-H); 6,44 (d, 1 H, ⁴J_{5/7} = 2,5 Hz, 5-H); 4,06 (q, 2 H, ³J_{CH₂/CH₃} = 7,1 Hz, 3-COOCH₂CH₃); 3,88 (s, 3 H, 4'-OCH₃); 0,99 (t, 3 H, ³J_{CH₃/CH₂} = 7,1 Hz, 3-COOCH₂CH₃)

6-Hydroxy-4-(2-methoxyphenyl)-benzo[4,5]furo[2,3-b]pyridin-3-carbonsäure-ethylester (78)

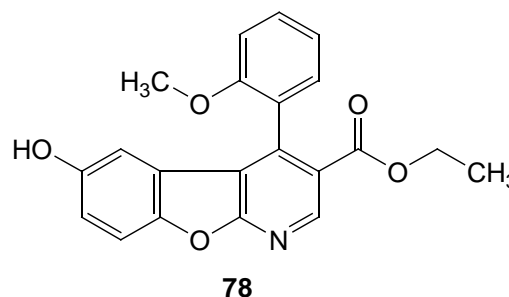
1 g (3,3 mmol) von **24** wurden nach Vorschrift 7.1.2.5.1 mit 440 mg (4,1 mmol) *p*-Benzochinon in 50 ml Dioxan-Perchlorsäure-Gemisch (9:1) bei RT gerührt. Nach 24 Stunden konnte mittels DC-Kontrolle die vollständige Umsetzung von **24** zum Tetrahydrofluoren nachgewiesen werden. Zur Oxidation wurden im Abstand von je 7 Tagen dreimal 150 mg *p*-Benzochinon zugegeben. Nach 42 Tagen wurde der Ansatz aufgearbeitet. **78** konnte säulenchromatographisch mit Laufmittel 1 isoliert und nach Umkristallisation als beigefarbene, amorphe Substanz erhalten werden (Ausbeute 20 %).

Summenformel: C₂₁H₁₇NO₅

Molgewicht: 363,37 g/mol

Schmelzbereich: 200-203 °C

EA: ber.: C 69,41; H 4,72; N 3,85
gef.: C 69,65; H 4,82; N 3,61



IR (KBr): 3424 (OH), 1718 (COOC₂H₅), 1371 (OH), 1254 (C-O-C)

MS (EI): 363 [100,0 M⁺]; 332 [10,7 M⁺-OCH₃]; 318 [28,6 M⁺-OC₂H₅]; 303 [16,4 M⁺-OC₂H₅, -CH₃]

¹H-NMR: 500 Mhz, DMSO-d₆ [δ ppm]: 9,44 (s, 1 H, 6-OH); 8,81 (s; 1 H, 2-H); 7,55 (d, 1 H, ³J_{8/7} = 8,9 Hz, 8-H); 7,54 (ddd, 1 H, ³J_{4/3} = 8,2 Hz, ³J_{4/5} = 7,4 Hz, ⁴J_{4/6} = 1,7 Hz, 4'-H); 7,27 (dd, 1 H, ³J_{6/5} = 7,4 Hz, ⁴J_{6/4} = 1,7 Hz, 6'-H); 7,21 („d“ br, 1 H, ³J_{3/4} = 8,2 Hz, 3'-H); 7,13 (dt, 1 H, ³J_{5/4} = ³J_{5/6} = 7,4 Hz, ⁴J_{5/3} = 0,9 Hz, 5'-H); 6,94 (dd, 1 H, ³J_{7/8} = 8,9 Hz, ⁴J_{7/5} = 2,6 Hz, 7-H); 6,31 (d, 1 H, ⁴J_{5/7} = 2,6 Hz, 5-H); 4,02 (q, 2 H, ³J_{CH₂/CH₃} = 7,1 Hz, 3-COOC₂H₅); 3,62 (s, 3 H, 2'-OCH₃); 0,93 (t, 3 H, ³J_{CH₃/CH₂} = 7,1 Hz, 3-COOC₂H₅)

7.1.2.6 N-Acetyl-1,4,4a,9a-tetrahydro-1-aza-9-oxafluorene**7.1.2.6.1 Allgemeine Synthesevorschrift**

Zur Darstellung von **79-82** wurden 3,7 mmol der Verbindungen **6-9** in 3 ml Dioxan gelöst und mit 0,4 g (3,7 mmol) *p*-Benzochinon versetzt. Unter Rühren wurde langsam ein Gemisch aus 10 ml Dioxan und 1 ml 70 % Perchlorsäure zugegeben, so dass die Konzentration der Perchlorsäure im Endvolumen 5 % betrug. Der Reaktionsverlauf wurde per DC überwacht. Nach 24 Stunden war kein Dihydropyridin mehr nachweisbar und der Ansatz wurde durch Eingießen in Eiswasser hydrolysiert. Die klare, braune Lösung wurde

mit Chloroform (3 x 50 ml) extrahiert, die organischen Phasen vereint, über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel i. v. entfernt. Aus dem öligen, braunen Rückstand wurden die Verbindungen **79-82** säulenchromatographisch mit Laufmittel 1 isoliert.

7.1.2.6.2 Charakterisierung der Verbindungen

(4*RS*,4*aSR*,9*aRS*)-1-Acetyl-6-hydroxy-4-methyl-1,4,4*a*,9*a*-tetrahydrobenzo[4,5]furo[2,3-*b*]pyridin-3-carbonsäureethylester (**79**)

79 wurde nach Vorschrift 7.1.2.6.1 in 65 % Ausbeute erhalten. Die Verbindung konnte aus Ether als braunes Pulver kristallisiert werden.

Summenformel: C₁₇H₁₉NO₅

Molgewicht: 317,34 g/mol

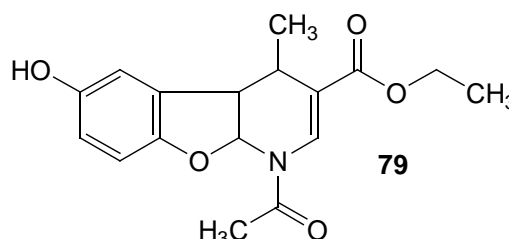
Schmelzbereich: > 360 °C

EA: ber.: C 64,35; H 5,99; N 4,42
gef.: C 64,32; H 5,67; N 4,43

IR (KBr): 3375 (OH), 1709 (COOC₂H₅), 1680 (NCOCH₃)

MS (EI): 317 [13,6 M⁺]; 302 [30,7 M⁺-CH₃]; 260 [100,0 M⁺-CH₃, -O=C=CH₂]; 232 [30,7 M⁺-CH₃, -O=C=CH₂, -C₂H₄]; 186 [6,4 M⁺-CH₃, -COCH₃, -COOC₂H₅]

¹H-NMR: 400 Mhz, CDCl₃ [δ ppm]: 8,15 (s br, 1 H, 2-H); 6,61-6,57 (m, 3 H, 5-H, 7-H, 8-H); 5,91 („s“ br, 1 H, 9a-H); 4,19 (s, 1 H, 6-OH); 4,13 (q, 2 H, ³J_{CH₂/CH₃} = 7,0 Hz, 3-COOCH₂CH₃); 3,93 („d“, 1 H, ³J_{4a/9a} = 7,8 Hz, 4a-H); 4,32 („q“ spl, 1 H, ³J_{4/CH₃} = 6,4 Hz, ³J_{4/4a} < 1 Hz, 4-H); 2,43 (s br, 3 H, N-COCH₃); 1,23 (d, 3 H, ³J_{CH₃/4} = 6,4 Hz, 4-CH₃); 1,22 (t, 3 H, ³J_{CH₃/CH₂} = 7,0 Hz, 3-COOCH₂CH₃)



(4*RS*,4*aSR*,9*aRS*)-1-(1-Acetyl-6-hydroxy-4-methyl-1,4,4*a*,9*a*-tetrahydrobenzo[4,5]furo[2,3-*b*]pyridin-3-yl)-ethanon (**80**)

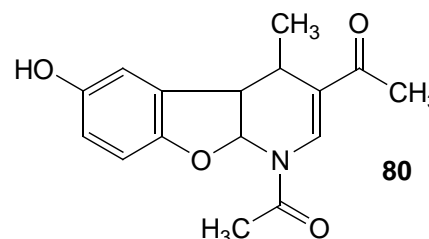
80 wurde nach Vorschrift 7.1.2.6.1 in 75 % Ausbeute erhalten. Die Verbindung konnte aus Ether als braunes Pulver kristallisiert werden.

Summenformel: C₁₆H₁₇NO₄

Molgewicht: 287,31 g/mol

Schmelzbereich: 249-252 °C

EA: ber.: C 66,88; H 5,96; N 4,88
gef.: C 66,87; H 5,82; N 4,82



- IR (KBr): 3257 (OH), 1680 (COCH₃); 1628 (NCOCH₃)
- MS (EI): 287 [20,0 M⁺]; 272 [9,0 M⁺-CH₃]; 244 [20,0 M⁺-COCH₃]; 229 [100,0 M⁺-CH₃, -COCH₃]; 186 [4,0 M⁺-CH₃, -COCH₃, -COCH₃]
- ¹H-NMR: 400 Mhz, CDCl₃ [δ ppm]: 7,66 (s, 1 H, 2-H); 6,64 (d, 1 H, ³J_{8/7} = 8,4 Hz, 8-H); 6,62 (d, 1 H, ⁴J_{5/7} = 1,6 Hz, 5-H); 6,59 (dd, 1 H, ³J_{7/8} = 8,4 Hz, ⁴J_{7/5} = 1,6 Hz, 7-H); 5,74 (d, ³J_{9a/4a} = 7,2 Hz, 9a-H); 4,22 (s br, 1 H, 6-OH); 3,71 („d“, 1 H, ³J_{4a/9a} = 7,2 Hz, 4a-H); 3,43 („q“ spl, 1 H, ³J_{4/CH₃} = 6,1 Hz, ³J_{4/4a} < 1 Hz, 4-H); 2,72 (s, 3 H, COCH₃); 2,43 (s br, 3 H, N-COCH₃); 1,65 (d, 3 H, ³J_{CH₃/4} = 6,1 Hz, 4-CH₃)

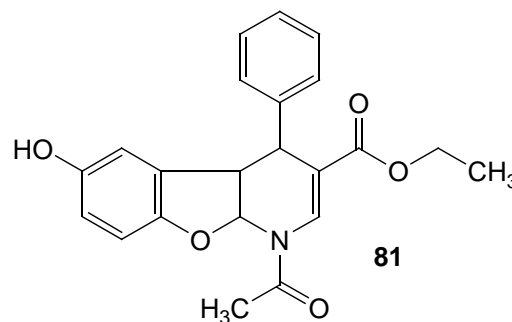
(4SR,4aSR,9aRS)-1-Acetyl-6-hydroxy-4-phenyl-1,4,4a,9a-tetrahydrobenzo[4,5]furo[2,3-b]pyridin-3-carbonsäureethylester (81)

81 wurde nach Vorschrift 7.1.2.6.1 in 55 % Ausbeute als gelbes Öl erhalten.

Summenformel: C₂₂H₂₁NO₅

Molgewicht: 379,41 g/mol

EA: ber.: C 69,65; H 5,58; N 3,69
gef.: C 69,66; H 5,46; N 3,62



IR (KBr): 3374 (OH), 1691 (COOC₂H₅), 1640 (NCOCH₃)

MS (EI): 379 [27,8 M⁺]; 350 [11,2 M⁺-C₂H₅]; 302 [34,3 M⁺-Ph]; 260 [100,0 M⁺-O=C=CH₂, -Ph]; 77 [4,3 Ph]

¹H-NMR: 400 Mhz, CDCl₃ [δ ppm]: 8,40 (s br, 1 H, 2-H); 7,35-7,19 (m, 5 H, 2',3',4',5',6'-H); 6,73 (d, 1 H, ⁴J_{5/7} = 1,4 Hz, 5-H); 6,66 (d, 1 H, ³J_{8/7} = 8,5 Hz, 8-H); 6,61 (dd, 1 H, ³J_{7/8} = 8,5 Hz, ⁴J_{7/5} = 1,4 Hz, 7-H); 6,13 („s“ br, 1 H, 9a-H); 5,10 (s, 1 H, 6-OH); 4,32 (d, 1 H, ³J_{4/4a} = 2,5 Hz, 4-H); 4,21 (dd, 1 H, ³J_{4a/9a} = 7,5 Hz, ³J_{4a/4} = 2,5 Hz, 4a-H); 4,08 (q, 2 H, ³J_{CH₂/CH₃} = 7,5 Hz, 3-COOCH₂CH₃); 2,42 (s, 3 H, N-COCH₃); 1,17 (t, 3 H, ³J_{CH₃/CH₂} = 7,5 Hz, 3-COOCH₂CH₃)

(4*SR*,4*aSR*,9*aRS*)-1-(1-Acetyl-6-hydroxy-4-phenyl-1,4,4*a*,9*a*-tetrahydrobenzo[4,5]furo[2,3-*b*]pyridin-3-yl)-ethanon (82)

82 wurde nach Vorschrift 7.1.2.6.1 in 88 % Ausbeute erhalten. Die Verbindung konnte aus Ether in Form gelber Nadeln kristallisiert werden.

Summenformel: C₂₁H₁₉NO₄

Molgewicht: 349,38 g/mol

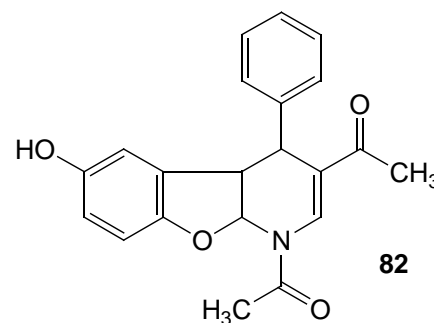
Schmelzbereich: 135-139 °C

EA: ber.: C 72,21; H 5,44; N 4,01
gef.: C 72,52; H 5,68; N 4,21

IR (KBr): 3247 (OH), 1710 (COCH₃), 1660 (NCOCH₃)

MS (EI): 349 [0,7 M⁺]; 307 [33,6 M⁺-O=C=CH₂]; 230 [100,0 M⁺-Ph, -O=C=CH₂];
77 [4,3 Ph]

¹H-NMR: 400 Mhz, DMSO-d₆ [δ ppm]: 8,96 (s br, 1 H, 6-OH); 7,63 (s, 1 H, 2-H); 7,31-7,29 (m, 5 H, 2',3',4',5',6'-H); 6,66 (d, 1 H, ⁴J_{5/7} = 2,6 Hz, 5-H); 6,59 (d, 1 H, ³J_{8/7} = 8,5 Hz, 8-H); 6,51 (dd, 1 H, ³J_{7/8} = 8,5 Hz, ⁴J_{7/5} = 2,6 Hz, 7-H); 5,65 (d, 1 H, ³J_{9/4a} = 7,32 Hz, 9a-H); 4,34 („s“, 1 H, 4-H); 3,88 („d“, 1 H, ³J_{4a/9a} = 7,3 Hz, 4a-H); 2,10 (s, 3 H, 3-COCH₃); 1,98 (s, 3 H, N-COCH₃)



7.1.2.7 Substituierte Chinoline

7.1.2.7.1 1-Acetyl-1,4-dihydrochinoline

1 g (7,74 mmol) frisch destilliertes Chinolin wurde in 50 ml trockenem THF gelöst. Nach Zugabe von 0,07 g (0,39 mmol) Kupfer-I-iodid wurde die Lösung auf $-8\text{ }^{\circ}\text{C}$ abgekühlt. Danach wurden 0,61 g (7,74 mmol) Acetylchlorid zugetropft und für 15 Minuten gerührt. Nach Zugabe von 7,7 mmol Phenylmagnesiumchlorid- bzw. Methylmagnesiumchlorid-Lösung wurde weitere 15 Minuten gerührt. Nach 30 Minuten Rühren bei RT wurden die Ansätze, wie unter 7.1.2.2.1 beschrieben, hydrolysiert und gewaschen.

(*RS*)-1-(4-Phenyl-4*H*-chinolin-1-yl)ethanon (**83a**)

83a kristallisierte nach Entfernung des Ethers am Rotationsverdampfer in Form gelber Nadeln aus. Die Ausbeute betrug 70 %.

Summenformel: $\text{C}_{17}\text{H}_{15}\text{NO}$

Molgewicht: 249,31 g/mol

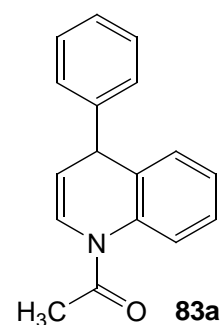
Schmelzbereich: $126\text{--}129\text{ }^{\circ}\text{C}$

EA: ber.: C 81,73; H 6,18; N 5,57
gef.: C 81,90; H 6,06; N 5,62

IR (KBr): 1659 (NCOCH_3)

MS (EI): 249 [M^+]

$^1\text{H-NMR}$: 400 Mhz, CDCl_3 [δ ppm]: 7,94 (d, 1 H, $^3\text{J}_{2/3} = 8,2\text{ Hz}$, 2-H); 7,33-6,96 (m, 9 H, aromat. H); 5,57 (dd, 1 H, $^3\text{J}_{3/2} = 8,2\text{ Hz}$, $^3\text{J}_{3/4} = 4,7\text{ Hz}$, 3-H); 4,58 (d, 1 H, $^3\text{J}_{4/3} = 4,7\text{ Hz}$, 4-H); 2,39 (s, 3 H, NCOCH_3)



(*RS*)-1-(4-Methyl-4*H*-chinolin-1-yl)ethanon (**83b**)

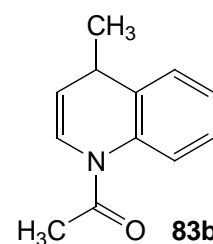
Nach Entfernung des Ethers am Rotationsverdampfer blieb **83b** als gelbes Öl im Kolben zurück. Eine Kristallisation gelang nicht. Die Ausbeute betrug 80 %.

Summenformel: $\text{C}_{12}\text{H}_{13}\text{NO}$

Molgewicht: 187,24 g/mol

IR (KBr): 1668 (NCOCH_3)

MS (EI): 188 [$\text{M}+\text{H}^+$]



$^1\text{H-NMR}$: 400 Mhz, CDCl_3 [δ ppm]: 7,84 (d, 1 H, $^3J_{2/3} = 7,4$ Hz, 2-H); 7,23-7,13 (m, 3 H, 6,7,8-H); 6,83 (d, 1 H, $^3J_{5/6} = 7,0$ Hz, 5-H); 5,45 (dd, 1 H, $^3J_{3/2} = 7,4$ Hz, $^3J_{3/4} = 5,3$ Hz, 3-H); 3,38 (dq, 1 H, $^3J_{4/\text{CH}_3} = 7,0$ Hz, $^3J_{4/3} = 5,3$ Hz, 4-H); 2,36 (s, 3 H, NCOCH_3), 1,28 (d, 3 H, $^3J_{\text{CH}_3/4} = 7,0$ Hz, 4- CH_3)

7.1.2.7.2 Produkte der Umsetzung von 83a,b mit *p*-Benzochinon

Eine Mischung von 1 g **83a** oder **83b** mit 0,5 g (4,8 mmol) *p*-Benzochinon wurde langsam mit einem Dioxan-Perchlorsäure-Gemisch (20:1) versetzt, bis eine klare Lösung entstand. Die Lösung wurde bei RT gerührt und per DC überwacht. Bis zum Abschluss der Umsetzung wurde mehrfach *p*-Benzochinon (je 0,16 g, 1,8 mmol) zugegeben. Nach vollständiger Bildung der Produkte wurde die Lösung in Eiswasser gegossen und mit 1 M Ammoniumhydroxidlösung auf einen pH von 7 eingestellt. Danach erfolgte Extraktion mit Ether (3 x 150 ml). Nach Trocknung über Na_2SO_4 wurde der Ether i. v. entfernt. Durch Trennung der verbleibenden braunen, öligen Rückstände mit präparativer Dünnschichtchromatographie (Laufmittel 1) wurden **84a,b**, **86a,b** und **90** erhalten.

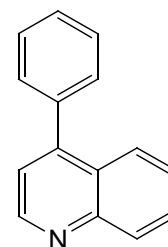
4-Phenylchinolin (84a)

84a wurde als gelbes Öl mit 40 % Ausbeute isoliert. Die experimentellen Daten entsprachen denen in der Literatur.⁹⁶

Summenformel: $\text{C}_{15}\text{H}_{11}\text{N}$

Molgewicht: 205,25 g/mol

Schmelzbereich: 215-218 °C (Pikrat)



84a

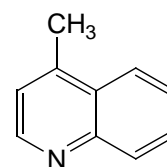
4-Methylchinolin (84b)

84b wurde als gelbes Öl mit 30 % Ausbeute isoliert. Die experimentellen Daten entsprachen denen in der Literatur.⁹⁷

Summenformel: $\text{C}_{10}\text{H}_9\text{N}$

Molgewicht: 143,19 g/mol

Schmelzbereich: 210-215 °C (Pikrat)



84b

3-(2,5-Dihydroxyphenyl)-4-phenylchinolin (86a)

86a kristallisierte aus Ether als grünliches Pulver mit einer Ausbeute von 30 % aus.

Summenformel: $C_{21}H_{15}NO_2$

Molgewicht: 313,35 g/mol

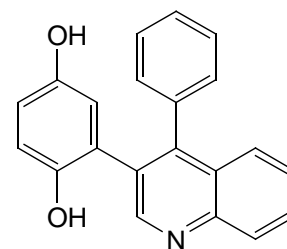
Schmelzbereich: 269-276 °C

EA: ber.: C 80,09; H 4,67; N 4,35
gef.: C 80,49; H 4,82; N 4,47

IR (KBr): 3330 (OH)

MS (EI): 313 [M^+]

1H -NMR: 400 Mhz, Aceton- d_6 [δ ppm]: 8,83 (s, 1 H, 2-H); 8,11 (dd, 1 H, $^3J_{8/7} = 8,2$ Hz, $^4J_{8/6} = 1,2$ Hz, 8-H); 7,74 (dt, 1 H, $^3J_{7/8} = ^3J_{7/6} = 8,2$ Hz, $^4J_{7/5} = 1,6$ Hz, 7-H); 7,62 (s br, 1 H, 2'-OH); 7,59 (dd, 1 H, $^3J_{5/6} = 8,2$ Hz, $^4J_{5/7} = 1,6$ Hz, 5-H); 7,53 (dt, 1 H, $^3J_{6/5} = ^3J_{6/7} = 8,2$ Hz, $^4J_{6/8} = 1,2$ Hz, 6-H); 7,30-7,35 (m, 6 H, 4-Ph-H, 5'-OH); 6,68 (d, 1 H, $^3J_{3/4'} = 8,8$ Hz, 3'-H); 6,57 (dd, 1 H, $^3J_{4/3'} = 8,8$ Hz, $^4J_{4/6'} = 2,9$ Hz, 4'-H); 6,48 (d, 1 H, $^4J_{6/4'} = 2,9$ Hz, 6'-H)

**86a****3-(2,5-Diacetoxyphenyl)-4-phenylchinolin (87a)**

1 g (3,2 mmol) **86a** wurden in 50 ml Acetanhydrid gelöst. Nach Zugabe von 10 Tropfen trockenem Pyridin wurde bei RT für 24 Stunden gerührt. Das Lösungsmittel wurde nach portionsweiser Zugaben von trockenem Ethanol i. v. entfernt. **87a** wurde dünnschichtchromatographisch (Laufmittel 6) als gelbes Öl mit 40 % Ausbeute isoliert.

Summenformel: $C_{25}H_{19}NO_4$

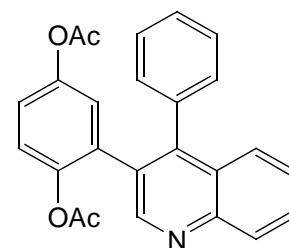
Molgewicht: 397,42 g/mol

EA (Pikrat): ber.: C 59,43; H 3,54; N 8,94
gef.: C 59,20; H 3,32; N 8,62

IR ($CDCl_3$): 1765, 1725 (CO)

MS (EI): 397 [M^+]

1H -NMR: 400 Mhz, Aceton- d_6 [δ ppm]: 8,78 (s, 1 H, 2-H); 8,09 (dd, 1 H, $^3J_{8/7} = 8,5$ Hz, $^4J_{8/6} = 1,1$ Hz, 8-H); 7,79 (dt, 1 H, $^3J_{7/8} = ^3J_{7/6} = 8,5$ Hz, $^4J_{7/5} = 1,1$ Hz, 7-H); 7,62-7,50 (m, 7 H, 2,3,4,5,6-H des 4-Phenyl, 5,6-H); 7,12 (d, 1 H, $^3J_{3/4'} = 8,9$ Hz, 3'-H); 7,07 (dd, 1 H, $^3J_{4/3'} = 8,9$ Hz, $^4J_{4/6'} = 2,8$ Hz, 4'-H); 6,95 (d, 1 H, $^4J_{6/4'} = 2,8$ Hz, 6'-H); 2,17 (s, 3 H,

**87a**

2'-OCOCH₃); 1,57 (s, 3 H, 4'-OCOCH₃)

3-(2,5-Dihydroxyphenyl)-4-methylchinolin (86b)

86a kristallisierte aus Ether als braunes Pulver mit einer Ausbeute von 50 % aus.

Summenformel: C₁₆H₁₃NO₂

Molgewicht: 251,28 g/mol

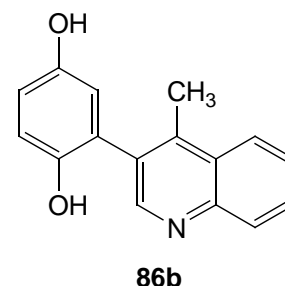
Schmelzbereich: > 350 °C (sublimiert)

EA: ber.: C 76,48; H 5,21; N 5,57
gef.: C 76,23; H 4,86; N 5,32

IR (KBr): 3361 (OH)

MS (EI): 252 [M+H⁺]

¹H-NMR: 400 Mhz, Aceton-d₆ [δ ppm]: 8,66 (s, 1 H, 2-H); 8,16 (d, 1 H, ³J_{8/7} = 7,8 Hz, 8-H); 8,03 (d, 1 H, ³J_{5/6} = 9,0 Hz, 5-H); 7,91 (s, 1 H, 2'-OH); 7,74 (t, 1 H, ³J_{7/8} = ³J_{7/6} = 7,8 Hz, 7-H); 7,67 (s, 1 H, 5'-OH); 7,62 (dd, 1 H, ³J_{6/5} = 9,0 Hz, ³J_{6/7} = 7,8 Hz, 6-H); 6,88 (d, 1 H, ³J_{3/4'} = 8,6 Hz, 3'-H); 6,80 (dd, 1 H, ³J_{4/3'} = 8,6 Hz, ⁴J_{4/6'} = 2,9 Hz, 4'-H); 6,72 (d, 1 H, ⁴J_{6/4'} = 2,9 Hz, 6'-H)



3-(2,5-Diacetoxyphenyl)-4-methylchinolin (87b)

87b wurde analog zu **87a** aus **86b** als gelbes Öl mit 30 % Ausbeute erhalten.

Summenformel: C₂₀H₁₇NO₄

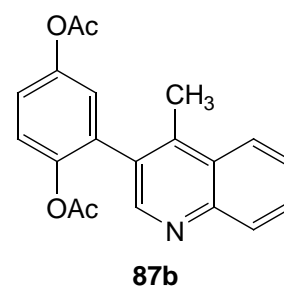
Molgewicht: 335,35 g/mol

EA (Pikrat): ber.: C 55,33; H 3,57; N 9,93
gef.: C 54,96; H 3,18; N 9,57

IR (KBr): 1763, 1720 (CO)

MS (EI): 336 [M+H⁺]

¹H-NMR: 400 Mhz, Aceton-d₆ [δ ppm]: 8,60 (s, 1 H, 2-H); 8,35 (dd, 1 H, ³J_{8/7} = 7,1 Hz, ⁴J_{8/6} = 1,3 Hz, 8-H); 8,06 (dd, 1 H, ³J_{5/6} = 7,1 Hz, ⁴J_{5/7} = 1,5 Hz, 5-H); 7,77 (ddd, 1 H, ³J_{7/8} = 7,1 Hz, ³J_{7/6} = 6,9 Hz, ⁴J_{7/5} = 1,5 Hz, 7-H); 7,66 (ddd, 1 H, ³J_{6/5} = 7,1 Hz, ³J_{6/7} = 6,9 Hz, ⁴J_{6/8} = 1,3 Hz, 6-H); 7,34 (d, 1 H, ³J_{3/4'} = 8,7 Hz, 3'-H); 7,29 (dd, 1 H, ³J_{4/3'} = 8,7 Hz, ⁴J_{4/6'} = 2,5 Hz, 4'-H); 7,22 (d, 1 H, ⁴J_{6/4'} = 2,5 Hz, 6'-H); 2,55 (s, 3 H, 4-CH₃); 2,28 (s, 3 H, 2'-OCOCH₃); 1,85 (s, 3 H, 4'-OCOCH₃)



(RS)-4-Phenyl-1,4-dihydrochinolin (88)

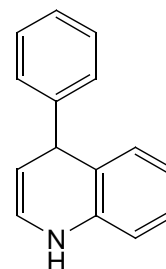
1 g (4 mmol) **83a** wurde in 50 ml Dioxan/HClO₄-Gemisch (5 %) gelöst. Die Lösung wurde 24 Stunden lang bei RT gerührt, danach in Eiswasser gegossen und mit 1 M Ammoniumhydroxidlösung auf pH 7 eingestellt. Nach dreimaliger Extraktion mit Ether (je 150 ml) wurden die organischen Phasen vereint, über Na₂SO₄ getrocknet, filtriert und am Rotationsverdampfer eingeeengt. Aus dem verbleibenden braunen Öl wurde mittels präparativer Dünnschichtchromatographie mit Laufmittel 1 **88** als gelbes Öl mit 65 % Ausbeute isoliert.

Summenformel: C₁₅H₁₃N

Molgewicht: 207,27 g/mol

IR (CDCl₃): 3317 (NH)

MS (EI): 207 [M⁺]

**88**

¹H-NMR: 400 Mhz, CDCl₃ [δ ppm]: 7,22-7,00 (m, 9 H, arom. H); 6,50 (t, 1 H, ³J_{2/3} = 4,6 Hz, 2-H); 5,96 („s“ br, 1 H, NH); 5,52 (t, 1 H, ³J_{3/4} = ³J_{3/2} = 4,6 Hz, 3-H); 3,71 („s“ br, 1 H, 4-H)

(6RS,6aSR,17bSR)-1-Acetyl-8-hydroxy-6,17-diphenyl-1,6,6a,17b-tetrahydrochinolino[2',3':4,5]benzo[6,7]oxepino[2,3-b]chinolin (90)

90 wurde neben **84a** und **86a** bei der Umsetzung von **83a** mit *p*-Benzochinon isoliert. Nach Umkristallisation aus Ether wurde **90** in Form gelber Kristalle mit 10 % Ausbeute erhalten.

Summenformel: C₃₈H₂₈N₂O₃

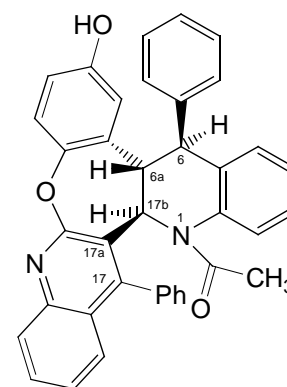
Molgewicht: 560,64 g/mol

Schmelzbereich: 275-278 °C

EA: ber.: C 81,41; H 5,03; N 5,00
gef.: C 81,05; H 4,82; N 4,75

IR (KBr): 3425 (OH), 1674 (NCOCH₃)

MS (EI): 560 (M⁺)

**90**

¹H-NMR: 400 Mhz, Aceton-d₆ [δ ppm]: 8,08 (dd, 1 H, ³J = 8,5 Hz, ⁴J = 1,2 Hz, 13-H); 7,78 (dt, 1 H, ³J = 8,5 Hz, ⁴J = 1,5 Hz, 14-H); 7,77 (d, 1 H, ³J = 7,0 Hz, 2-H des 17-Ph); 7,73-7,68 (m, 4 H, 3,4,5-H des 17-Ph, 16-H); 7,67 (s, 1 H, 8-OH); 7,54 (d, 1 H, ³J = 7,3 Hz, 6-H des 17-Ph); 7,51 (d, 1 H, ⁴J = 1,2 Hz, 7-H); 7,50 (dt, 1 H, ³J = 8,5 Hz, ⁴J = 1,2 Hz, 15-H); 7,37 (d, 1 H, ³J = 8,5 Hz, 10-H); 7,32-7,16 (m, 8 H, 2,3,4,5,6-H

des 6-Ph, 3-H des 17-Ph, 4,5-H); 7,10 (dd, 1 H, $^3J = 8,5$ Hz, $^4J = 1,2$ Hz, 9-H); 6,11 („s“, 1 H, 17b-H); 5,10 (d spl, 1 H, $^3J = 1,2$ Hz, 6-H); 4,87 („d“, 1 H, $^3J = 1,2$ Hz, 6a-H); 2,08 (s, 3 H, NCOCH₃)

7.1.2.8 Dibenzo[d,d']benzo[1,2-b;4,5-b']difuran-2,8-diol (**91**)

91 wurde in einem großen Anteil der Ansätze nach Vorschrift 7.1.2.5.1 als unerwünschtes Hauptprodukt gefunden, als in Versuchen zur Verbesserung der Ausbeuten höhere HClO₄-Konzentrationen und mehrfache molare Überschüsse von *p*-Benzochinon eingesetzt wurden. Eine verstärkte Bildung trat bei Perchlorsäurekonzentrationen über 10 % auf. Nach säulenchromatographischer Reinigung der Ansätze kristallisierte **91** aus Ether als weiße amorphe Substanz aus.

Summenformel: C₁₈H₁₀O₄

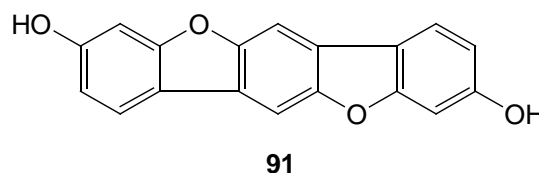
Molgewicht: 290,27 g/mol

Schmelzbereich: 298-308 °C

IR (KBr): 3411 (OH)

MS (ESI): 291 (M+H⁺)

¹H-NMR: 400 Mhz, DMSO-d₆ [δ ppm]: 9,66 (s, 2 H, 2-OH, 8-OH, mit D₂O austauschbar); 7,85 (d, 2 H, $^4J_{1/3,7/9} = 2,5$ Hz, 1,7-H); 7,78 (s, 2 H, 5,11-H); 7,62 (d, 2 H, $^3J_{4/3,10/9} = 8,8$ Hz, 4,10-H); 7,06 (dd, 2 H, $^3J_{3/4,9/10} = 8,8$ Hz, $^4J_{3/1,9/7} = 2,5$ Hz, 3,9-H)



7.2 DNA-Bindungsstudien

7.2.1 Verwendete Materialien

DMF (*Sigma-Aldrich*)

DMSO (*Sigma-Aldrich*)

Ellipticin (*Fluka*)

Ethidiumbromid (*Fluka*)

Kalbsthymus-DNA (*Fluka*)

Tris-Puffer, pH 7,4, 75 mM NaCl (*Boehringer Mannheim Biochemica*)

6-Well-Platten, MicroWell™-Plate (*Nunc*)

7.2.2 Geräte

Fluorimeter *FLUOStar Galaxy*, BMG-Lab Technologies

UV-Spektrometer *Cary Varian Model IE Spectrophotometer* mit temperierbarem *Cary 1/3-multicell-block*

7.2.3 Ethidiumbromid-Verdrängungs-Assay

Der Ethidiumbromid-Verdrängungs-Assay wurde nach Literaturvorgaben⁷⁷ durchgeführt. Die Lösungen wurden nicht in Quarzküvetten einzeln gemischt, sondern auf einer 6-Well-Platte in einem *FLUOStar Galaxy* vermessen, da diese Vorgehensweise drei Parallelbestimmungen ermöglichte.

6,2 mg Kalbsthymus-DNA wurden in 1 l Tris-Puffer (pH 7,4; 75 mM NaCl) gelöst. Aus den Testverbindungen **55-58**, Ellipticin und Ethidiumbromid wurden 2 mM Stammlösungen in DMSO hergestellt, die Ethidiumbromid-Stammlösung wurde mit Tris-Puffer zu einer $5 \cdot 10^{-6}$ M Lösung verdünnt.

Zur Messung wurden zunächst 1 ml Ethidiumbromid-Lösung und 1 ml DNA-Lösung vermischt und für 30 Minuten bei RT inkubiert. Danach wurden in 4 µl-Schritten 4-40 µl der Stammlösungen der Testverbindungen zugegeben. Nach jeder Zugabe wurde 10 Minuten inkubiert und danach bei einer Emissionswellenlänge von 545 nm die Fluoreszenzintensität bei 595 nm gemessen. Als 100 %-Wert wurde die Emission des Ethidiumbromid-DNA-Gemisches vor Zugabe der Testverbindungen verwendet. Die

Fluoreszenz der reinen Ethidiumbromid-Lösung in Tris-Puffer bildete den Nullwert.

7.2.4 UV-Photometrie

Die Testsubstanzen wurden in Form 1 mM Stammlösungen in DMF verwendet. Als Nukleinsäure wurde 1 g Kalbsthymus-DNA in 1 l Tris-Puffer (0,03 M mit 0,018 M NaCl, pH 7) gelöst und vor Verwendung für drei Tage bei 4 °C aufbewahrt.

Zunächst wurden die UV-Spektren der Substanzen aufgenommen, um verwendbare UV-Absorptionsmaxima oberhalb von 310 nm zu finden. Die Absorptionsmaxima der untersuchten Verbindungen sind in *Tabelle 14 (Kapitel 5.2.3.2)* angegeben. Bei Konzentrationen von 50 µM lagen die Absorptionen aller Verbindungen unterhalb von 0,1.

Die UV-Absorption wurde für alle Verbindungen allein und bei fünf verschiedenen DNA-Konzentrationen in einem Wellenlängenbereich von 200-400 nm bestimmt. Dazu wurden je 0,1, 0,2, 0,3, 0,5 oder 1,0 ml DNA-Lösung mit Tris-Puffer auf 9,5 ml verdünnt und mit 0,5 ml der Substanzstammlösungen versetzt, so dass die Substanzkonzentration in der DNA-Lösung 50 µM betrug. Nach einer Wartezeit von 20 Minuten wurden die Lösungen in eine Quarzküvette überführt und mit einem *Cary Varian Model IE Spektrophotometer* vermessen.

7.2.5 DNA-Schmelzkurven

Zur Aufnahme der DNA-Schmelzkurven wurden die gleichen Lösungen wie in 7.2.4 verwendet. Es wurden 200 µl der Substanzstammlösungen mit 9,3 ml Pufferlösung verdünnt und mit 500 µl DNA-Lösung versetzt. Nach 20-minütiger Inkubationszeit wurden die Lösungen in Quarzküvetten überführt, mit Teflonstopfen verschlossen und in einen temperierbaren *Cary 1/3-multicell-block* eingesetzt. Für jede Messung wurden 6 Test- und 6 Referenzküvetten verwendet. Das Thermostat wurde auf einen Temperaturanstieg von 25 auf 95 °C mit 0,5 °C/min programmiert. Nach jedem Temperaturanstieg um 1 °C wurde eine Wartezeit von 3 Minuten mit anschließender Messung der UV-Absorption bei 260 nm eingestellt. Aus den resultierenden Absorptions-Temperaturkurven wurden mit dem Programm *Origin* die ersten Ableitungen gebildet, aus denen T_m in Form des Maximums direkt abgelesen werden konnte.

7.3 Untersuchung der P-gp modulierenden Eigenschaften der synthetisierten Substanzen an Mouse-T-Lymphoma-Zellen

7.3.1 Verwendete Materialien

DMSO	<i>Carl Roth GmbH</i>
Doxorubicin	<i>Sigma-Aldrich</i>
Eppendorfgefäße	Eppendorf Reaktionsgefäße RK12, RK13, RK14, <i>Eppendorf-Vertrieb GmbH</i>
FACS-Analysenröhrchen	<i>Becton Dickinson GmbH, Vertrieb Budapest, Ungarn</i>
MTT-Reagens	<i>Sigma-Aldrich</i>
PBS	gebrauchsfertiger, unsteriler Phosphatpuffer pH 7,4, <i>Boehringer Mannheim Biochemica</i>
Rhodamin 123	<i>Molecular Probes™, Leiden, Niederlande</i>
Salzsäure	0,01 M HCl, <i>Merck</i>
SDS	Sodiumdodecylsulfat als Lösung (100 mg/ml) in 0,01 M HCl, <i>Boehringer Mannheim Biochemica</i>
Verapamil-Hydrochlorid	<i>Sigma-Aldrich</i>
96-Well-Platten	MicroWell™-Plate, <i>Nunc</i>
Zellkulturmedium	modifiziertes McCoy's 5A Medium (enthält 10 % hitzeinaktiviertes Pferdeserum, L-Glutamin, Antibiotika und 1 % Nystatin, ohne Natriumcarbonat); <i>Sigma-Aldrich</i> für die MDR-Zelllinie wurde das Medium zusätzlich mit 60 ng/ml Colchicin versetzt
Zellkulturröhrchen	PP-Röhrchen, steril, 15 und 50 ml, <i>Greiner</i>

7.3.2 Verwendete Geräte

Absaugvorrichtung	Eigenbau der Medizinischen Fakultät, Institut für Mikrobiologie, Universität Szeged, Szeged, Ungarn
Brutschrank	BC150, CO ₂ -Inkubator, 150 l, <i>SMLT-Vertrieb Worms</i>
ELISA plate-reader	<i>EL301 Strip Microplate Reader, Bio-Tek Instruments GmbH</i>

FACS	<i>FACSVantage Becton Dickinson GmbH, Vertrieb Budapest, Ungarn</i>
Wasserbad	<i>Lauda m3 Typ B, Lauda Dr. R. Wobster GmbH & Co KG</i>
Zentrifuge	<i>Labofuge 400 R mit verschiedenen Rotoren für 24 Eppendorfgefäße oder 4 Zellkulturröhrchen, Heraeus Instruments</i>

7.3.3 Herstellung von Stammlösungen

Von den verwendeten Verbindungen wurden folgende Stammlösungen hergestellt:

Testverbindungen:	5 mM in DMSO
Doxorubicin:	4 µg/ml in Zellkulturmedium
Rhodamin 123:	20 µg/ml in H ₂ O
Verapamil:	1 mg/ml in H ₂ O
MTT:	5 mg/ml in H ₂ O

7.3.4 Verwendete Zelllinien

In den Versuchen wurden die Maus-T-Lymphomzelllinie NCI-L5178Y (PAR) und die aus ihr erzeugte MDR-Zelllinie L5178YvMDR (MDR) verwendet. L5178YvMDR ging aus NCI-L5178Y durch primäre Infektion mit dem pHa MDR/A Retrovirus und nachfolgende Selektion der MDR-transfizierten Zellen durch Zugabe von 60 ng/ml Colchicin zum Nährmedium hervor. Diese Colchicin-Konzentration verhindert eine Vermehrung der nicht infizierten Zellen im Medium, während die P-gp exprimierenden Zellen wegen des MDR-Mechanismus nicht durch das Alkaloid beeinträchtigt werden. Die gleichmäßige Expression von Pgp170 innerhalb der so erzeugten L5178YvMDR-Zelllinie wurde durch Markierung mit dem monoklonalen Antikörper MRK-16-FITC und anschließende FACS-Analyse abgesichert⁸⁸.

Beide Zelllinien wurden in modifiziertem McCoy's 5A Medium unter einer fünfprozentigen CO₂-Atmosphäre bei 37 °C kultiviert. Das Medium wurde in Abhängigkeit von der Zellvermehrung alle 2-3 Tage gewechselt.

7.3.5 Bestimmung der Zellzahl

Die Anzahl der Zellen wurde mit der Methode nach Bürker bestimmt. Dazu wird ein Tropfen der Zellsuspension auf einen gerasterten Objektträger gegeben und die Anzahl der Zellen in 10 zufällig ausgewählten Quadraten ermittelt. Die Gesamtzahl der Zellen pro ml Medium kann nach der Formel

$$Z = \bar{x} \cdot 25 \cdot 10^4$$

Z Anzahl Zellen pro ml Medium
 \bar{x} Mittelwert der 10 ausgezählten Quadrate

bestimmt werden.

7.3.6 MTT-Zytotoxizitätstest

Der MTT-Test wurde in 96-Well-Platten durchgeführt. Jede Testsubstanz wurde doppelt bestimmt, so dass pro Platte vier Substanzen getestet werden konnten. Die Kavitäten der Spalte 1 dienten der Kontrolle der Eigenabsorption des Mediums und wurden daher nur mit 150 μ l Medium gefüllt. Spalte 2 wurde ebenfalls mit Medium und zum Vergleich des ungehemmten Zellwachstums mit $5 \cdot 10^4$ Zellen pro Well befüllt. Ab Reihe 3 begann die Verdünnungsreihe der Testsubstanzen. Hierzu wurden alle Wells mit 100 μ l Medium befüllt und Well 3 durch Zugabe von 2 μ l Stammlösung mit einer Substanzkonzentration von 100 mmol/l versehen. Durch schrittweise Verdünnung wurde die Konzentration bis zum Well 12 jeweils halbiert. Zu den Wells 3-12 wurden abschließend jeweils 50 μ l Medium mit $5 \cdot 10^4$ Zellen / 50 μ l gegeben.

Die so vorbereiteten Platten wurden über 48 Stunden bei 37 °C in einer fünfprozentigen CO₂-Atmosphäre inkubiert. Nach dieser Zeitspanne wurde zu allen Wells mit Ausnahme der Reihe 1 10 μ l MTT-Lösung gegeben. Die Platten wurden danach erneut für 4 Stunden inkubiert. Während dieser Zeitspanne erfolgte die Metabolisierung des MTT durch noch lebende Zellen. Um die entstandenen Formazan-Kristalle zu lösen, wurde zu allen Wells 100 μ l SDS-Lösung gegeben und erneut für 12 Stunden inkubiert.

Die Vermessung der umgesetzten Menge an Formazan erfolgte in einem *ELISA-plate-reader*. Aus den gemessenen Absorptionswerten wurden für alle Verbindungen die IC₅₀-Werte bestimmt.

7.3.7 Fluoreszenz-Aufnahme-Assay

Sowohl die PAR-Zellen als auch die MDR-Zellen wurden auf eine Zellzahl von $2 \cdot 10^6$ pro ml eingestellt. 0,5 ml dieser Suspensionen wurden in 24 für die Testreihe durchnummerierte Eppendorfgefäße gegeben. Die Gefäße 1 und 2 wurden mit PAR-Zellen, die übrigen mit MDR-Zellen befüllt. Den Proben 5-22 wurden daraufhin die zum Erreichen der Zielkonzentrationen nötigen Mengen der Substanzstammlösungen zugegeben, zu Probe 23 wurde als Kontrolle das entsprechende Volumen DMSO ohne gelöste Substanz gegeben. Probe 4 wurde mit $5 \mu\text{l}$ der Verapamil-Stammlösung versetzt und diente als Positivkontrolle⁹⁸. Nach einer Inkubationszeit von 10 Minuten wurden zu den Proben 1 und 3-24 je $10 \mu\text{l}$ der Rhodaminstammlösung gegeben. Probe 2 blieb als Vergleichswert für die Eigenfluoreszenz der Zellen unbehandelt, die Proben 3 und 24 dienten als Vergleichswerte für ungehemmte, Probe 1 für vollständig ausgeschaltete P-gp-Aktivität.

Nach 20-minütiger Inkubation bei 37°C wurden die Zellen zweimal bei $2\,000 \text{ U/min}$ zentrifugiert und mit PBS gewaschen, um im Medium gelöste Substanzen quantitativ zu entfernen. Die nach der Zentrifugation überstehende Lösung wurde jeweils abgesaugt und verworfen. Nach dem zweiten Waschschrift wurden die Zellen erneut in PBS resuspendiert, in FACS-Probenröhrchen überführt und in einem Becton-Dickinson-FACScanner analysiert. Pro Probe wurden 10^4 Zellen vermessen und anhand der Parameter SSC und FSC nur die gut erhaltenen Zellen erfasst.

Aus den ermittelten Werten für die Fluoreszenz der Zellen wurde das Fluoreszenz-Aktivitätsverhältnis FAR nach folgender Formel ermittelt:

$$FAR = \frac{MDR \text{ behandelt} / MDR \text{ unbehandelte Kontrolle}}{PAR \text{ behandelt} / PAR \text{ unbehandelte Kontrolle}}$$

7.4 Kinase-Assays

7.4.1 Kinase-Assay des CNRS

Materialien

Homogenisationspuffer: β -Glycerolphosphat (60 mM), *p*-Nitrophenylphosphat (15 mM), MOPS (25 mM; pH 7,2), EGTA (5 mM), MgCl₂ (15 mM), DTT (1 mM), Natriumvanadat (1 mM), NaF (1 mM), Phenylphosphat (1 mM), Leupeptin (10 μ g/ml), Aprotinin (10 μ g/ml), Sojabohnentrypsininhibitor (10 μ g/ml) und Benzamidin (100 μ M)

Puffer A: MgCl₂ (10 mM), EGTA (1 mM), DTT (1 mM), Tris/HCl (25 mM; pH 7,5), Heparin (50 μ g/ml)

Puffer C: Homogenisationspuffer, aber mit 5 mM EGTA, ohne NaF und Proteaseinhibitoren

CDK1/Cyclin B: Der CDK1/Cyclin B-Komplex wurde in Homogenisationspuffer aus M-Phase-Eizellen einer Seesternart (*Marthasterias glacialis*) extrahiert und durch Affinitätschromatographie gereinigt. Die Kinaseaktivität wurde in Puffer C mit Histon H1 als Substrat bestimmt.

CDK5/p25: Der CDK5/p25-Komplex wurde durch Mischung gleicher Mengen rekombinanter Säugetier-CDK5 und p25, die in *E. Coli* als GST-Fusionsproteine exprimiert wurden, gebildet und durch Affinitätschromatographie gereinigt. Seine Aktivität wurde analog zu CDK1/Cyclin B in Homogenisationspuffer bestimmt.

GSK-3 β : GSK-3 β wurde in Sf9-Insektenzellen exprimiert und aus diesen gewonnen. Nach einer 1:100-Verdünnung mit 1 mg Rinderserumalbumin pro ml und 10 mM DTT wurde die Kinaseaktivität mit dem GS-1-Peptid (5 μ l 40 μ M) als Substrat in Puffer A bestimmt.

Durchführung des Assays

Die Kinaseaktivitäten wurden je dreifach in dem jeweils für die Kinasen angegebenen Puffer bei 30 °C und einer ATP-Konzentration von 15 μ M in einem Volumen von 30 μ l bestimmt. Die Reagenzien wurden in folgender Reihenfolge zugegeben: Puffer, Substrat, Enzym, Inhibitor. Die Assays wurden durch Zugabe des radiomarkierten [γ -³²P]ATP (15 μ M, 3000 Ci/mmol; 1 mCi/ml) gestartet. Nach 10 Minuten Inkubation (GSK-3 β : 30 Minuten) bei 30 °C wurden je 25 μ l der überstehenden Lösung auf 2,5 x 3,0 cm

Abschnitte *Whatman P81* Phosphozellulosepapier getropft. Diese wurden nach 20 s fünfmal für 5 Minuten mit 0,1 % Phosphorsäure gewaschen. Die feuchten Filter wurden in 1 ml ACS Scintillationslösung (*Amersham*) überführt und danach die ^{33}P -Radioaktivität mit einem *Packard TriCarb*-Zähler bestimmt. Die Assays wurden so durchgeführt, dass weniger als 5 % des radiomarkierten Phosphats inkorporiert wurden. Da die Inhibitoren in Form 100 mM Stammlösungen in DMSO verwendet wurden, wurden Kontrollanalysen mit entsprechenden DMSO-Verdünnungen durchgeführt. Die DMSO-Konzentration überstieg in den Versuchen jedoch nie 1 %. Zur Bestimmung der maximalen Phosphataufnahme wurde Puffer C anstelle des Inhibitors eingesetzt. Die unspezifische Bindung von Phosphat wurde ohne Substrat in der Reaktionsmischung bestimmt und abgezogen.

Die Kinaseaktivität wird in pM Phosphatgruppen, die von Histon H1 während der zehnmütigen Inkubation aufgenommen werden, oder als prozentualer Teil der maximalen Kinaseaktivität angegeben. Dosis-Wirkungskurven wurden von jeder Testsubstanz erstellt und für die Berechnung der IC_{50} -Werte herangezogen. Alle Assays wurden dreifach ausgeführt.

7.4.2 $^{33}\text{Panquinase}^{\text{®}}$ -Assay der ProQuinase GmbH

Der proprietäre $^{33}\text{PanQuinase}^{\text{®}}$ -Assay wurde in einem automatisierten Verfahren der ProQuinase GmbH (Freiburg) durchgeführt. Alle Proteinkinasen wurden in Sf9-Insektenzellen als humane rekombinante GST-Fusionsproteine oder HIS-markierte Proteine über ein Baculovirus-Expressionssystem exprimiert und durch Affinitätschromatographie entweder mit GSH-Agarose (*Sigma*) oder Ni-NTH-Agarose (*Quiagen*) gereinigt. Die Reinheit und Identität der Kinasen wurde durch SDS-PAGE/Silbermarkierung und Westernblot-Analysen mit spezifischen Antikörpern überprüft.

Die Assays wurden in 96-Well-FlashPlates[™] von Perkin Elmer/NEN (Boston) mit Reaktionsvolumina von 50 μl ausgeführt. Zur Mischung der Lösungen wurden 20 μl Standardpuffer, 5 μl ATP-Lösung (in H_2O), 5 μl der Testverbindungen (in 10 % DMSO) und 20 μl einer Substrat/Enzym-Lösung in die Wells pipettiert. Die Reaktionsgemische enthielten für alle Enzyme HEPES-NaOH (60 mM, pH 7,5), MgCl_2 (3 mM), MnCl_2 (3 mM), Natriumorthovanadat (3 μM), DTT (1,2 mM), PEG20000 (50 $\mu\text{g/ml}$), $[\gamma\text{-}^{33}\text{P}]\text{ATP}$ (1 μM oder 15 μM , ca. 7×10^5 cpm bzw. $1,2 \times 10^6$ cpm pro Well). Die Lösungen wurden bei 30 °C für 80 Minuten inkubiert. Dann wurde die Reaktion durch Zugabe von H_3PO_4 (50 μl , 2 % (v/v)) gestoppt. Die Lösung wurde abgesaugt und die

Platten zweifach mit H₂O (200 µl) oder NaCl (200 µl, 0,9 % (w/v)) gewaschen. Die Aufnahme von ³³P_i wurde mit einem *Microplate-Scintillationszähler* (Microbeta, Wallac) bestimmt. Alle Assays wurden in einem *BeckmanCoulter/Sagian* Automatiksystem ausgeführt. Aus den prozentualen Restaktivitäten, die für jede Konzentration erhalten wurden, wurden die IC₅₀-Werte mit *Prism 3.03* für Windows (Graphpad Software) berechnet. Als Modell wurde „*Sigmoidal response (variable slope)*“ verwendet, die Parameter „*top*“ und „*bottom*“ wurden auf 100 % bzw. 0 % festgesetzt.

Literaturverzeichnis

- [1] Schulte, U., *Pharmazeutische Zeitung*, **2001**, 75-76
- [2] Fischer, P.M., Lane, D.P., *Current Medicinal Chemistry*, **7**, **2000**, 1213-1245
- [3] Knockaert, M., Greengard, P., Meijer, L., *Trends in Pharmacological Sciences*, **23**, **2002**, 417-425
- [4] Fischer, P.M., *Cell Cycle*, **3**, **2004**, 742-746
- [5] Loyer, P., Trembley, J.H., Katona, R., Kidd, V.J., Lahti, J.M., *Cellular Signalling*, **17**, **2005**, 1033-1051
- [6] Huwe, A., Mazitschek, R., Giannis, A., *Angewandte Chemie, International Edition*, **42**, **2003**, 2122-2138
- [7] Malumbres, M., Barbacid, M., *Nature Reviews: Cancer*, **1**, **2001**, 222-231
- [8] Delacroix, T., Berillon, L., Cahiez, G., Knochel, P., *Journal of Organic Chemistry*, **65**, **2000**, 8108-8110
- [9] Sanchez, I., Dynlacht, B.D., *Seminars in Cell & Developmental Biology*, **16**, **2005**, 311-321
- [10] Stewart, Z.A., Westfall, M.D., Pietenpol, J.A., *Trends in Pharmacological Sciences*, **24**, **2003**, 139-145
- [11] Meijer, L., Leclerc, S., Leost, M., *Pharmacology & Therapeutics*, **82**, **1999**, 279-284
- [12] Sielecki, T.M., Boylan, J.F., Benfield, P.A., Trainor, G.L., *Journal of Medicinal Chemistry*, **43**, **2000**, 1-18
- [13] Chen, X. et al., *Journal of the National Cancer Institute*, **92**, **2000**, 1999-2008
- [14] David, S.T. et al., *Science*, **291**, **2001**, 134-137
- [15] Tetsu, O., McCormick, F., *Cancer Cell*, **3**, **2003**, 233-245
- [16] Francotte, P., Graindorge, E., Boverie, S., De Tullio, P., Pirotte, B., *Current Medicinal Chemistry*, **11**, **2004**, 1757-1778
- [17] Meijer, L., Flajolet, M., Greengard, P., *Trends in Pharmacological Sciences*, **25**, **2004**, 471-480
- [18] Cohen, P., Goedert, M., *Nature Reviews Drug Discovery*, **3**, **2004**, 479-487
- [19] Lee, M., Kwon, Y.T., Li, M., Peng, J., Friedlander, R.M., Tsai, L.H., *Nature*, **405**, **2000**, 360-364
- [20] Patrick, G.N., Zukerberg, L., Nikolic, M., De La Monte, S., Dikkes, P., Tsai, L.H.,

- Nature*, 402, **1999**, 615-622
- [21] Mandelkow, E., *Nature*, 402, **1999**, 588-589
- [22] De Strooper, B., Woodgett, J., *Nature*, 423, **2003**, 392-393
- [23] Phiel, C.J., Wilson, C.A., Lee, V.M.Y., Klein, P.S., *Nature*, 423, **2003**, 435-439
- [24] Caricasole, A., Copani, A., Caruso, A., Caraci, F., Iacovelli, L., Sortino, M.A., Terstappen, G.C., Nicoletti, F., *Trends in Pharmacological Sciences*, 24, **2003**, 233-238
- [25] Mutschler, E., *Arzneimittelwirkungen*, WVG Stuttgart, 8. Auflage, **2001**
- [26] Check, E., *Nature*, 415, **2002**, 462
- [27] Leost, M., Schultz, C., Link, A., Wu, Y.Z., Biernat, J., Mandelkow, E.M., Bibb, J.A., Snyder, G.L., Greengard, P., Zaharevitz, D.W., Gussio, R., Senderowicz, A.M., Sausville, E.A., Kunick, C., Meijer, L., *European Journal of Biochemistry*, 267, **2000**, 5983-5994
- [28] Hoessel, R., Leclerc, S., Endicott, J.A., Nobel, M.E.M., Lawrie, A., Tunnah, P., Leost, M., Damiens, E., Marie, D., Marko, D., Niederberger, E., Tang, W., Eisenbrand, G., Meijer, L., *Nature: Cell Biology*, 1, **1999**, 60-67
- [29] Leclerc, S., Garnier, M., Hoessel, R., Marko, D., Bibb, J.A., Snyder, G.L., Greengard, P., Biernat, J., Wu, Y.Z., Mandelkow, E.M., Eisenbrand, G., Meijer, L., *Journal of Biological Chemistry*, 276, **2001**, 251-260
- [30] Meijer, L., Thunnissen, A.M.W.H., White, A.W., Garnier, M., Nikolic, M., Tsai, L.H., Walter, J., Cleverley, K.E., Salinas, P.C., Wu, Y.Z., Biernat, J., Mandelkow, E.M., Kim, S.H., Pettit, G.R., *Chemistry & Biology*, 7, **2000**, 51-63
- [31] Kunick, C., Lauenroth, K., Leost, M., Meijer, L., Lemcke, T., *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 14, **2004**, 413-416
- [32] Kuo, G.H., Prouty, C., DeAngelis, A., Shen, L., O'Neill, D.J., Shah, C., Connolly, P.J., Murray, W.V., Conway, B.R., Cheung, P., Westover, L., Xu, J.Z., Look, R.A., Demarest, K.T., Emanuel, S., Middleton, S.A., Jolliffe, L., Beavers, M.P., Chen, X., *Journal of Medicinal Chemistry*, 46, **2003**, 4021-4031
- [33] Krishna, R., Mayer, L.D., *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 11, **2000**, 265-283
- [34] Gottesman, M.M., Pastan, I., *Annual Review of Biochemistry*, 62, **1993**, 385-427
- [35] Dean, M., Rzhetsky, A., Allikmets, R., *Genome Research*, **2003**, 1157-1166
- [36] Richter, M., *Dissertation*, **2005**, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

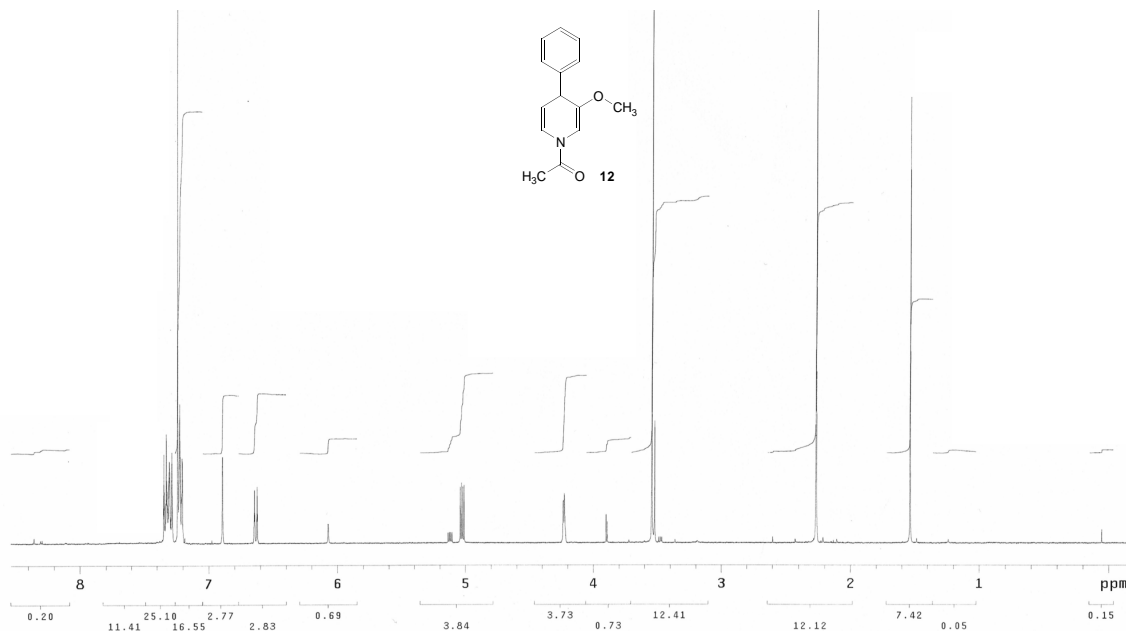
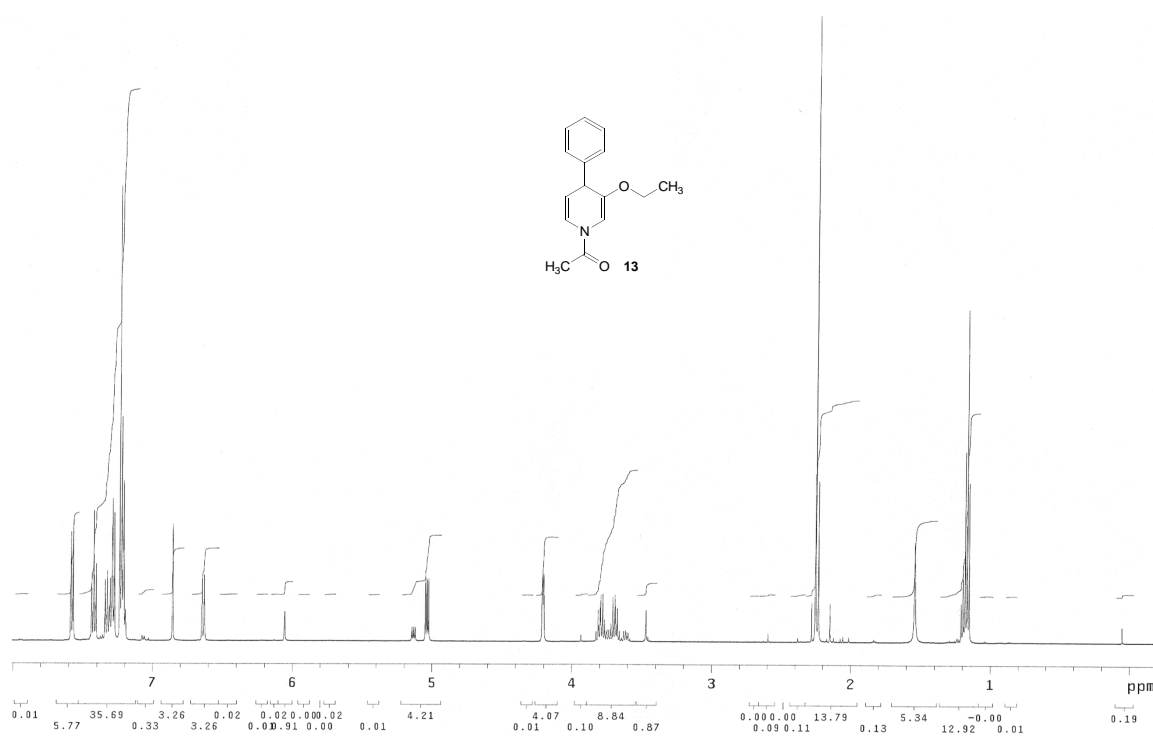
- [37] Hilgeroth, A., Kuna, K., Kuckländer, U., *Journal of Heterocyclic Chemistry*, 35, **1998**, 551-553
- [38] Kaczmarek, L., Nantka-Namirski, P., *Polish Journal of Pharmacology and Pharmacy*, 33, **1981**, 121-127
- [39] Wieczorek, J., Peczynska-Czoch, W., Mordarski, M., Kaczmarek, L., Nantka-Namirski, P., *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*, 34, **1986**, 315-321
- [40] Kaczmarek, L., Balicki, R., Nantka-Namirski, P., Peczynska-Czoch, W., Mordarski, M., *Archiv der Pharmazie*, 321, **1988**, 463-467
- [41] Peczynska-Czoch, W., *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*, 35, **1987**, 125-128
- [42] Cocker, J.D., Glaxo Laboratories limited, *Ger. Offen.*, Patent Nr. 2022024, **1970**, 1-5
- [43] Hilgeroth, A., Kuna, K., Kuckländer, U., *Heterocycles*, 48, **1998**, 1649-1658
- [44] Comins, D.L., Mantlo, N.B., *Journal of Heterocyclic Chemistry*, 20, **1983**, 1239-1243
- [45] Comins, D.L., Stroud, E.D., Herrick, J.J., *Heterocycles*, 22, **1984**, 151-157
- [46] Comins, D.L., Smith, R.K., Stroud, E.D., *Heterocycles*, 22, **1984**, 339-344
- [47] Foowler, F.W., *Journal of Organic Chemistry*, 37, **1972**, 1321-1323
- [48] Reetz, M.T., Kindler, A., *Journal of Organometallic Chemistry*, 502, **1995**, C5-C7
- [49] Kozikowski, A.P., Araldi, G.L., Ball, R.G., *Journal of Organic Chemistry*, 62, **1997**, 503-509
- [50] Kuckländer, U., Töberich, H., *Chemische Berichte*, 114, **1981**, 2238-2244
- [51] Berger, W., *WILEY-VCH Verlag Weinheim*, 20. Auflage, **1999**, Organicum
- [52] Fukuzumi, S., Fujii, Y., Suenobu, T., *Journal of the American Chemical Society*, 123, **2001**, 10191-10199
- [53] Beyer, H., Walter, W., *Lehrbuch der organischen Chemie*, S. Hirzel Verlag, 22. Auflage, **1991**
- [54] Günther, H., *NMR-Spektroskopie*, Georg Thieme Verlag, 2. verbesserte Auflage, **1983**
- [55] Hilgeroth, A., Baumeister, U., *Angewandte Chemie, International Edition*, 39, **2000**, 576-578
- [56] Hilgeroth, A., Baumeister, U., *Chemistry - A European Journal*, 7, **2001**, 4599-4603
- [57] Monks, A., Scudiero, D., Skehan, P., Shoemaker, R., Paull, K., Vistica, D., Hose, C., Langley, J., Cronise, P., Vaigro-Wolff, A., *Journal of the National Cancer Institute*,

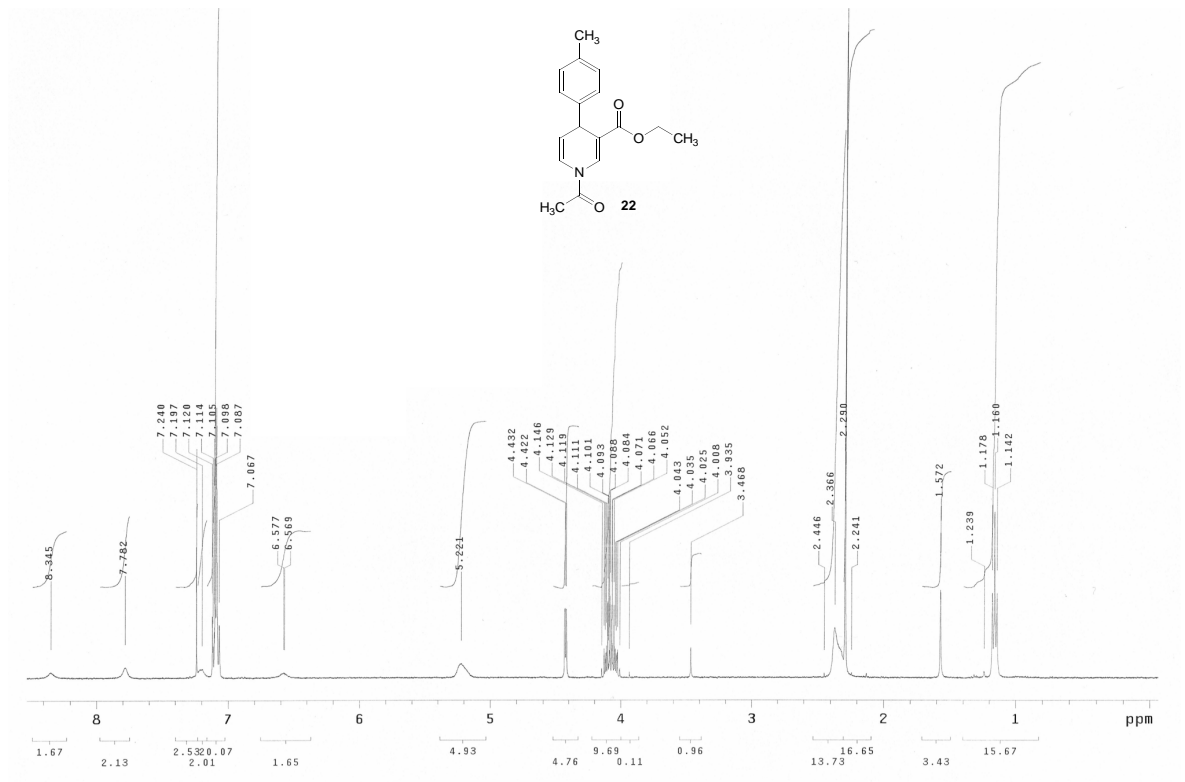
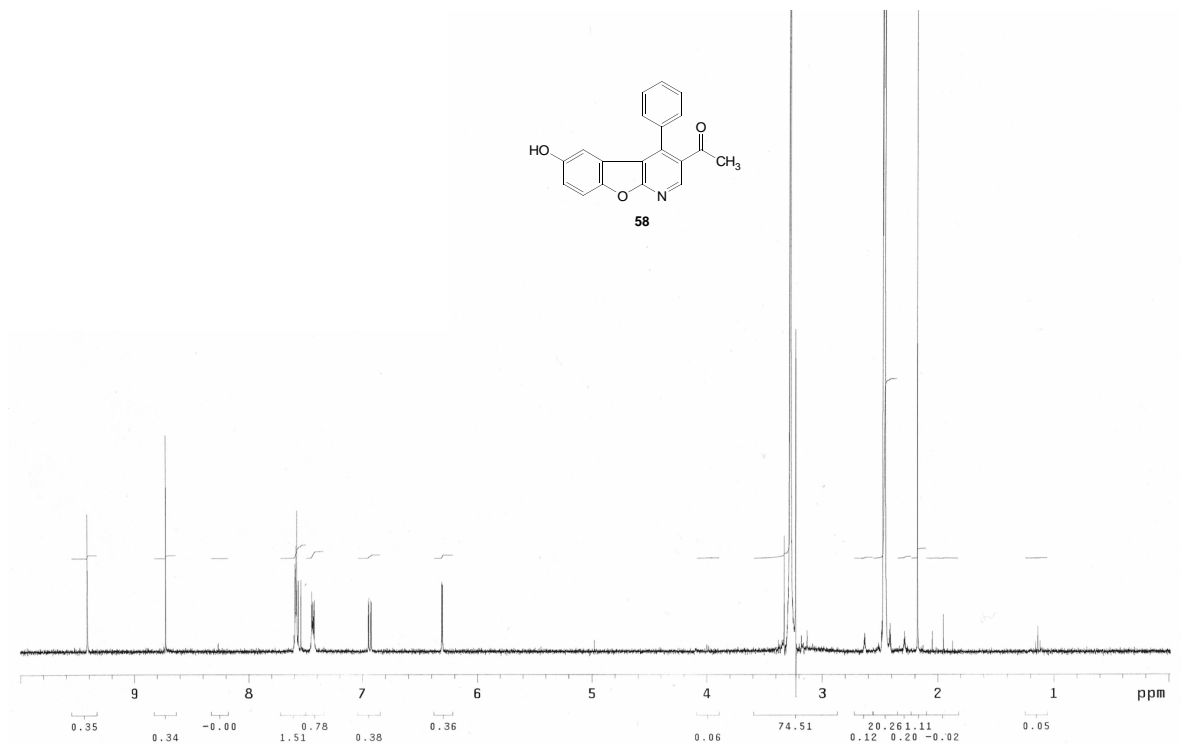
- 83, **1991**, 757-766
- [58] Rubinstein, L.V., Shoemaker, R.H., Paull, K.D., Simon, R.M., Tosini, S., Skehan, P., Scudiero, D.A., Monks, A., Boyd, M.R., *Journal of the National Cancer Institute*, **82**, **1990**, 1113-1118
- [59] Skehan, P., Storeng, R., Scudiero, D., Monks, A., McMahon, J., Vistica, D., Warren, J.T., Bokesch, H., Kenney, S., Boyd, M.R., *Journal of the National Cancer Institute*, **82**, **1990**, 1107-1112
- [60] Paull, K D., Shoemaker, R.H., Hodes, L., Monks, A., Scudiero, D.A., Rubinstein, L., Plowman, J., Boyd, M.R., *Journal of the National Cancer Institute*, **81**, **1989**, 1088-1092
- [61] Weinstein, J.N., Myers, T.G., O'Connor, P.M., Friend, S.H., Fornace, A.J., Kohn, K.W., Fojo, T., Bates, S.E., Rubinstein, L., Anderson, N.L., Buolamwini, J.K., van Osdol, W.W., Monks, A.P., Scudiero, D.A., Sausville, E.A., Zaharvitz, D.W., Bunow, B. Viswanadhan, V.N., Johnson, G.S., Wittes, R.E., Paull, K.D., *Science*, **275**, **1997**, 343-349
- [62] Nacro, K., Bienfait, B., Lee, J., Han, K.C., Kang, J.H., Benzaria, S., Lewin, N.E., Bhattacharyya, D.K., Blumberg, P.M., Marquez, V.E., *Journal of Medicinal Chemistry*, **43**, **2000**, 921-944
- [63] Stanslas, J., Hagan, D.J., Ellis, M.J., Turner, C., Carmichael, J., Ward, W., Hammonds, T.R., Stevens, M.F.G., *Journal of Medicinal Chemistry*, **43**, **2000**, 1563-1572
- [64] COMPARE-Java-Applet des NCI: <http://dtp.nci.nih.gov/docs/compare/compare.html>, letzter Zugriff: **2001**
- [65] Dimmock, J.R., Arora, V.K., Quail, J.W., Pugazhenthii, U., Allen, T.M., De Clercq, E., Kao, G.Y., *Journal of Pharmaceutical Sciences*, **83**, **1994**, 1124-1130
- [66] Dimmock, J.R., Arora, V.K., Semple, H.A., Lee, J.S., Allen, T.M., Kao, G.Y., *Pharmazie*, **47**, **1992**, 246-248
- [67] Pindur, U., Kim, Y.S., Mehrabani, F., *Current Medicinal Chemistry*, **6**, **1999**, 29-69
- [68] Zhu, G., Conner, S.E., Zhou, X., Shih, C., Li, T., Anderson, B.D., Brooks, H.B., Campbell, R.M., Considine, E., Dempsey, J.A., Faul, M.M., Ogg, C., Patel, B., Schultz, R.M., Spencer, C.D., Teicher, B., Watkins, S.A., *Journal of Medicinal Chemistry*, **46**, **2003**, 2027-2030
- [69] Safwat, H.M., Ragab, F.A., El Said, M.K., El Sayed, N.M., *Egyptian Journal of Pharmaceutical Sciences*, **32**, **1991**, 581-600
- [70] Insaf, S.S., Danks, M.K., Witiak, D.T., *Current Medicinal Chemistry*, **3**, **1996**,

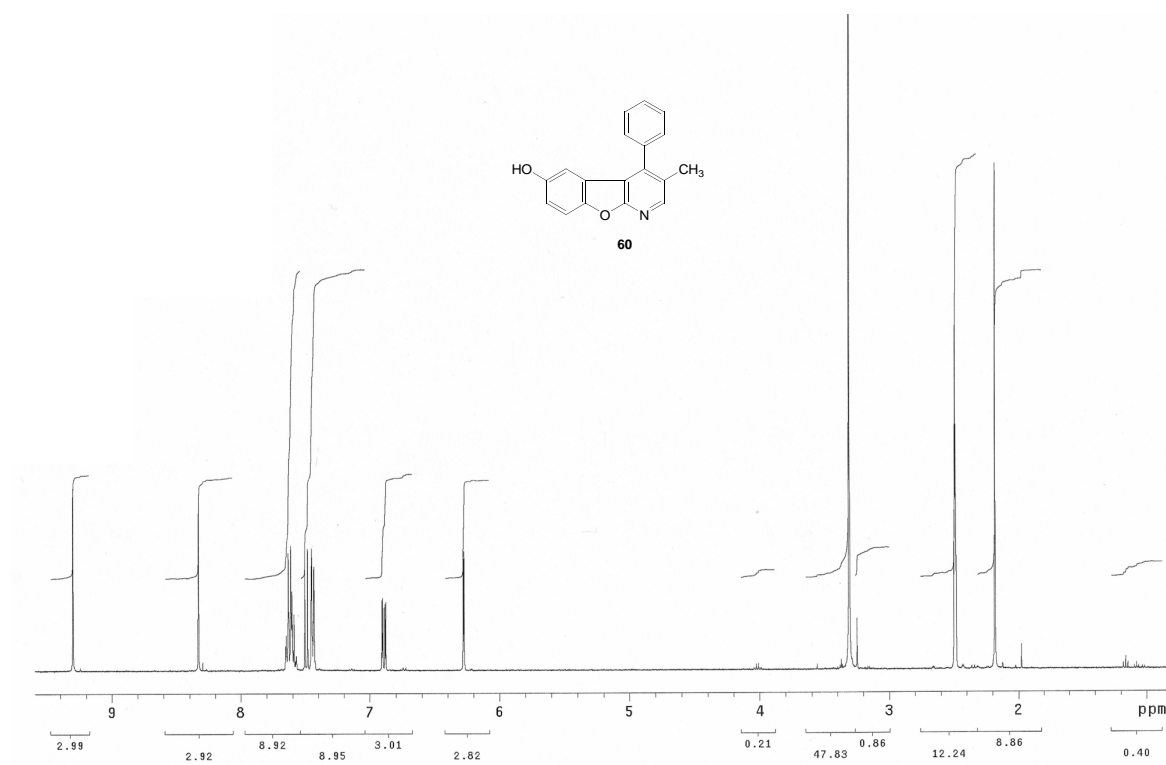
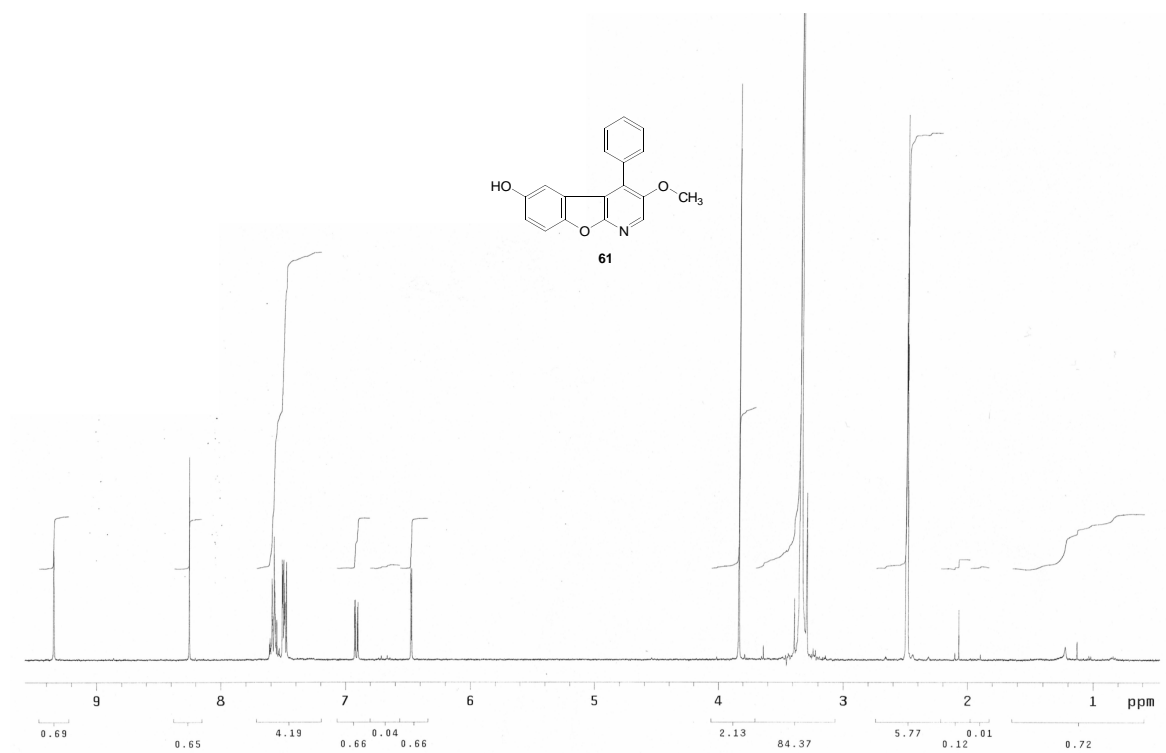
- 437-466
- [71] Fox, K.R., *Methods in Molecular Biology*, 90, **1997**, 278 ff.
- [72] Wellman, S.E., *Biopolymers*, 39, **1996**, 491-501
- [73] Boger, D.L., Chen, J.H., Saionz, K.W., *Journal of the American Chemical Society*, 118, **1996**, 1629-1644
- [74] Antonini, I., Polucci, P., Jenkins, T.C., Kelland, L.R., Menta, E., Pescalli, N., Stefanska, B., Mazerski, J., Martelli, S., *Journal of Medicinal Chemistry*, 40, **1997**, 3749-3755
- [75] LePecq, J.B., Paoletti, C., *Journal of Molecular Biology*, 27, **1967**, 87-106
- [76] Marotto, A., Kim, Y.S., Schulze, E., Pindur, U., *Pharmazie*, 57, **2002**, 194-197
- [77] Pindur, U., Marotto, A., Schulze, E., Fischer, G., *Pharmazie*, 55, **2000**, 727-732
- [78] Nuhn, P., *Naturstoffchemie*, S. Hirzel Verlag Stuttgart, **1997**, 3. neu bearbeitete Auflage
- [79] Jenkins, T.C., *Methods in Molecular Biology*, 90, **1997**, 195-218
- [80] Schultz, C., Link, A., Leost, M., Zaharevitz, D.W., Gussio, R., Sausville, E.A., Meijer, L., Kunick, C., *Journal of Medicinal Chemistry*, 42, **1999**, 2909-2919
- [81] Comins, D.L., Stroud, E.D., *Journal of Heterocyclic Chemistry*, 5, **1985**, 1419-1420
- [82] Erdtman, H., Stjernstrom, N. E., *Acta Chemica Scandinavica*, 13, **1959**, 653-658
- [83] Kunick, C., Zeng, Z., Gussio, R., Zaharevitz, D., Leost, M., Totzke, F., Schaechtele, C., Kubbutat, M.H.G., Meijer, L., Lemcke, T., *ChemBioChem*, 6, **2005**, 541-549
- [84] Sills, M.A., Weiss, D., Pham, Q., Schweitze, R., Wu, X., Jinzi, J., *Journal of Biomolecular Screening*, 7, **2002**, 191-214
- [85] Cheng, Y.C., Prusoff, W.H., *Biochemical Pharmacology*, 22, **1973**, 3099-3108
- [86] Wilson, W.D., Tanious, F.A., Fernandez-Saiz, M., Rigl, C.T., *Methods in Molecular Biology*, 90, **1997**, 219-240
- [87] Xiao, S., Lin, W., Wang, C., Yang, M., *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 11, **2001**, 437-441
- [88] Wollmann, J., Richter, M., Molnár, J., Hilgeroth, A., *ChemBioChem*, 6, **2005**, 1353-1356
- [89] Lee, J.S., Paull, K., Alvarez, M., Hose, C., Monks, A., Grever, M., Fojo, A.T., Bates, S.E., *Molecular Pharmacology*, 46, **1994**, 627-638
- [90] Herzenberg, L.A., Parks, D., Sahaf, B., Perez, O., Roederer, M., *Clinical Chemistry*,

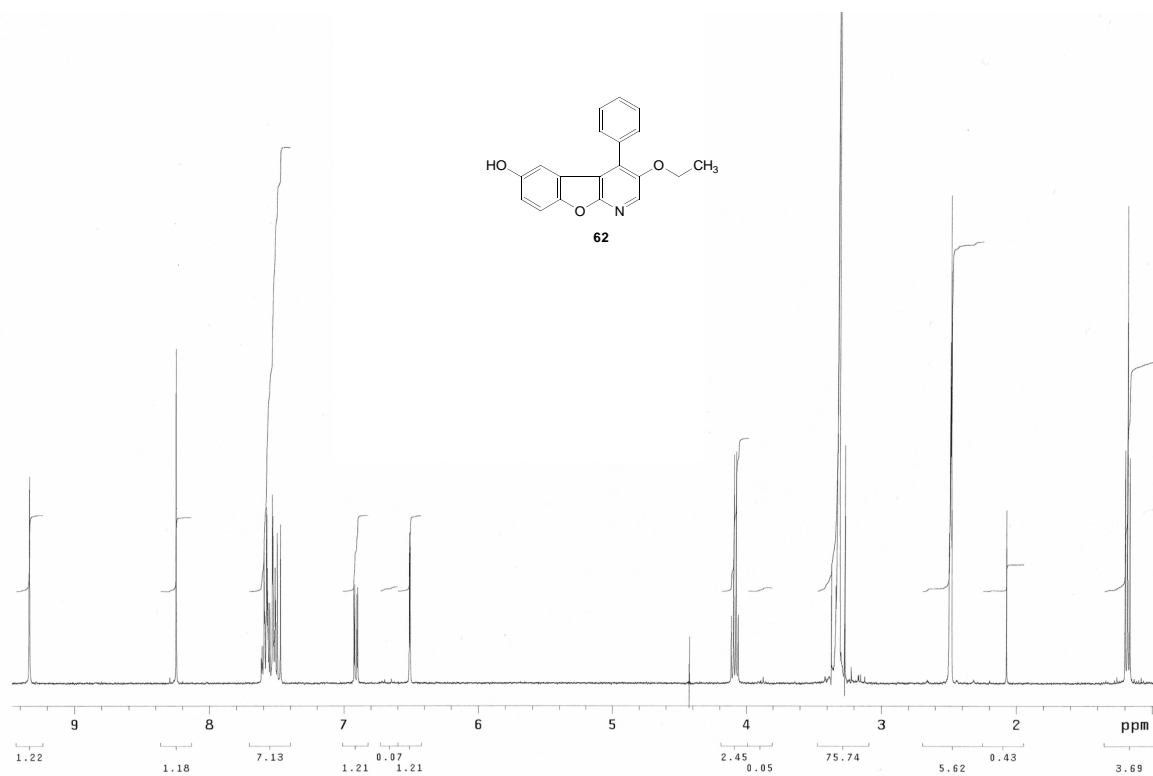
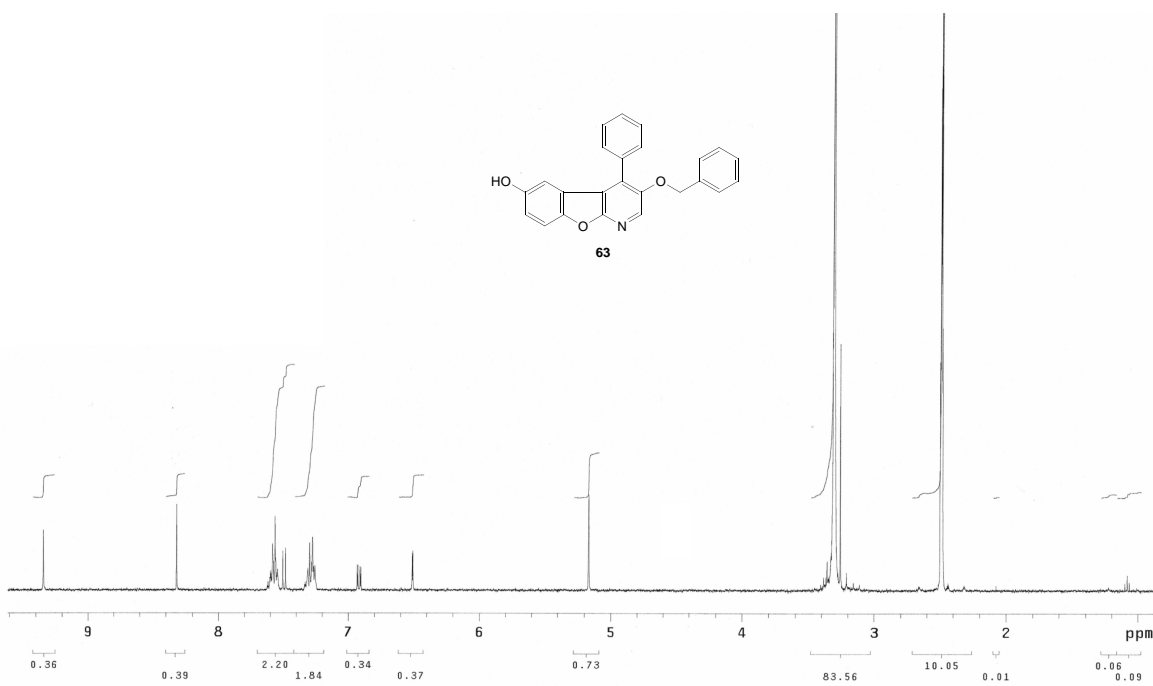
- 48, **2002**, 1819-1827
- [91] Brachwitz, K., Voigt, B., Meijer, L., Lozach, O., Schaechtele, C., Molnar, J., Hilgeroth, A., *Journal of Medicinal Chemistry*, 46, **2003**, 876-879
- [92] Ungvari, J., *Dissertation*, **2005**, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
- [93] Berger, W., *Organicum*, WILEY-VCH Verlag Weinheim, 20. Auflage, **1999**
- [94] Sattler, H.J., Schunack, W., *Chemische Berichte*, 108, **1975**, 730-734
- [95] LaForge, F.B., *Journal of the American Chemical Society*, 50, **1928**, 2477-2483
- [96] Emerson, W., Birum, G.H., Longley, R.I., *Journal of the American Chemical Society*, 75, **1953**, 1312-1313
- [97] Cumper, C.W.N., Redford, D.G., Vogel, A.I., *Journal of the Chemical Society, Abstracts*, **1997**, 1176-1182
- [98] Weaver, J.L., Szabo, G., Pine, P.S., Gottesman, M.M., Goldenberg, S., Aszalos, A., *International Journal of Cancer*, 54, **1993**, 456-461

Anhang

¹H-NMR-Spektren ausgewählter Verbindungen*(EZ,RS)*-1-(3-Methoxy-4-phenyl-4H-pyridin-1-yl)ethanon (**12**)*(EZ,RS)*-1-(3-Ethoxy-4-phenyl-4H-pyridin-1-yl)ethanon (**13**)

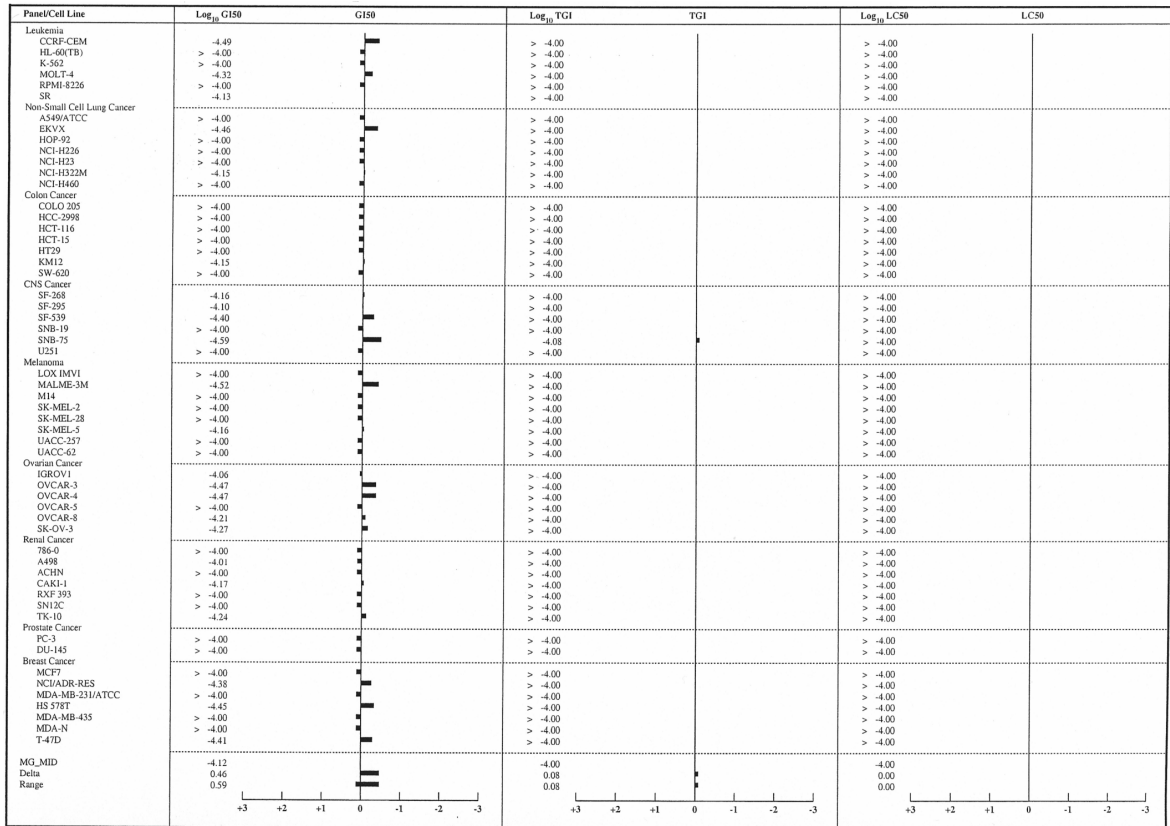
(EZ,RS)-1-Acetyl-4-(4-methylphenyl)-1,4-dihydropyridin-3-yl-carbonsäureethylester (22)**1-(6-Hydroxy-4-phenylbenzo[4,5]furo[2,3-b]pyridin-3-yl)-ethanon (58)**

3-Methyl-4-phenylbenzo[4,5]furo[2,3-b]pyridin-6-ol (**60**)3-Methoxy-4-phenylbenzo[4,5]furo[2,3-b]pyridin-6-ol (**61**)

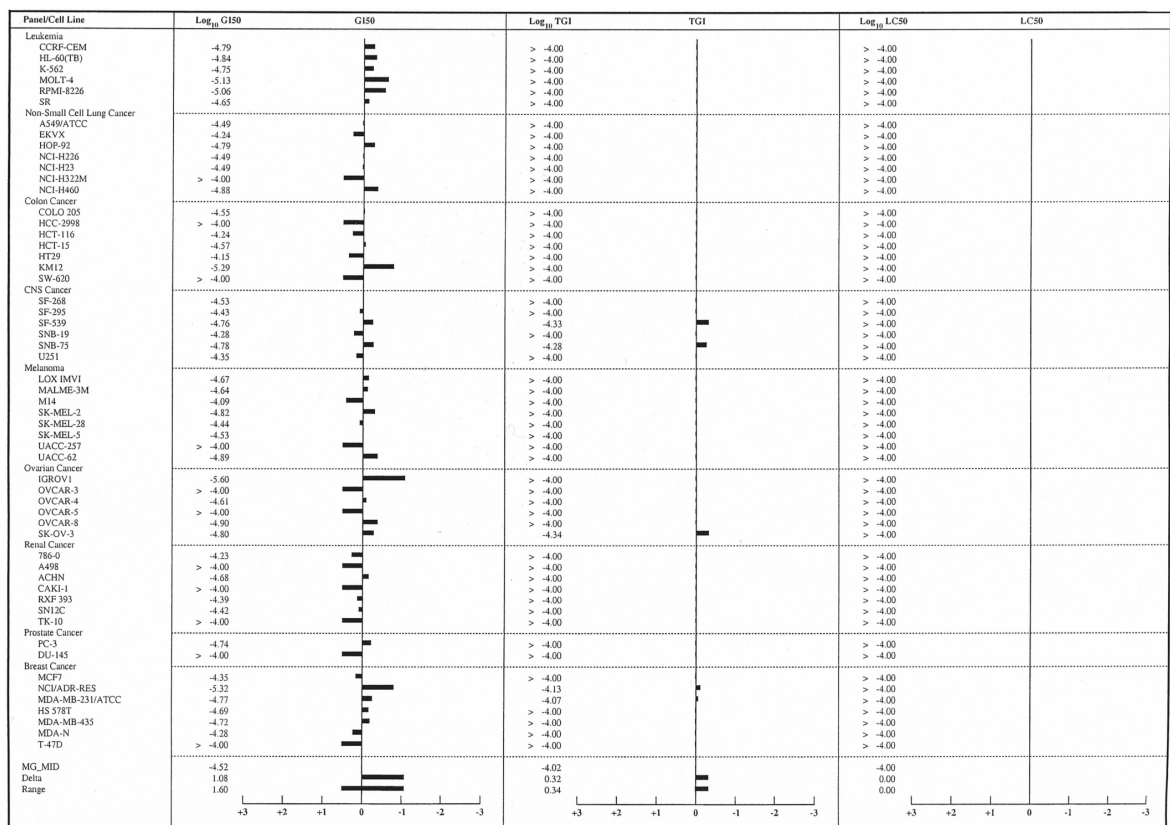
3-Ethoxy-4-phenylbenzo[4,5]furo[2,3-b]pyridin-6-ol (**62**)3-Benzyloxy-4-phenylbenzo[4,5]furo[2,3-b]pyridin-6-ol (**63**)

NCI mean graphs für IC₅₀, TGI und LC₅₀

6-Hydroxy-4-methylbenzo[4,5]furo[2,3-b]pyridin-3-carbonsäureethylester (55)



6-Hydroxy-4-phenylbenzo[4,5]furo[2,3-b]pyridin-3-carbonsäureethylester (57)



1-(6-Hydroxy-4-phenylbenzo[4,5]furo[2,3-b]pyridin-3-yl)-ethanon (**58**)

Panel/Cell Line	Log ₁₀ GI50	GI50	Log ₁₀ TGI	TGI	Log ₁₀ LC50	LC50
Leukemia						
CCRF-CEM	-4.35		> -4.00		> -4.00	
HL-60(TB)	-4.43		> -4.00		> -4.00	
K-562	-4.38		> -4.00		> -4.00	
MOLT-4	-4.72		> -4.00		> -4.00	
RPML-8226	-4.73		> -4.00		> -4.00	
SR	-4.48		> -4.00		> -4.00	
Non-Small Cell Lung Cancer						
HS49ATCC	-4.33		> -4.00		> -4.00	
EKVX	-4.62		> -4.00		> -4.00	
HOP-92	-4.74		> -4.00		> -4.00	
NCI-H226	-4.45		> -4.00		> -4.00	
NCI-H23	-4.34		> -4.00		> -4.00	
NCI-H322M	-4.46		> -4.00		> -4.00	
NCI-H460	-4.47		> -4.00		> -4.00	
Colon Cancer						
COLO 205	-4.52		> -4.00		> -4.00	
HCC-2998	-4.42		> -4.00		> -4.00	
HCT-116	-4.24		> -4.00		> -4.00	
HCT-15	-4.24		> -4.00		> -4.00	
HT29	-4.02		> -4.00		> -4.00	
RM13	-4.39		> -4.00		> -4.00	
SW-620	> -4.00		> -4.00		> -4.00	
CNS Cancer						
SF-268	-4.56		> -4.00		> -4.00	
SF-295	-4.52		> -4.00		> -4.00	
SF-539	-4.82		-4.34		> -4.00	
SNB-19	-4.43		> -4.00		> -4.00	
SNB-75	-5.59		-4.66		> -4.00	
U251	-4.28		> -4.00		> -4.00	
Melanoma						
LOX IMVI	-4.00		> -4.00		> -4.00	
MALME-3M	-4.81		-4.09		> -4.00	
M14	> -4.00		> -4.00		> -4.00	
SK-MEL-2	-4.65		> -4.00		> -4.00	
SK-MEL-28	-4.76		> -4.00		> -4.00	
SK-MEL-5	-4.65		> -4.00		> -4.00	
UACC-257	-4.19		> -4.00		> -4.00	
UACC-62	-4.69		-4.15		> -4.00	
Ovarian Cancer						
HGROV1	-5.30		-4.55		> -4.00	
OVCAR-3	-4.76		-4.08		> -4.00	
OVCAR-4	-4.82		-4.44		-4.05	
OVCAR-5	-4.15		> -4.00		> -4.00	
OVCAR-8	-4.53		> -4.00		> -4.00	
SK-OV-3	-4.85		-4.34		> -4.00	
Renal Cancer						
786-O	-4.41		> -4.00		> -4.00	
A498	-4.76		-4.05		> -4.00	
ACHN	-4.68		> -4.00		> -4.00	
CAKI-1	-4.53		> -4.00		> -4.00	
RXP 393	-4.60		> -4.00		> -4.00	
SN12C	-4.35		> -4.00		> -4.00	
TK-10	-4.54		> -4.00		> -4.00	
Prostate Cancer						
PC-3	-4.67		> -4.00		> -4.00	
DU-145	-4.49		> -4.00		> -4.00	
Breast Cancer						
MCF7	-4.32		> -4.00		> -4.00	
NCI/ADR-RES	-4.71		-4.12		> -4.00	
MDA-MB-231(ATCC)	-4.60		> -4.00		> -4.00	
HS 578T	-4.85		> -4.00		> -4.00	
MDA-MB-435	-4.19		> -4.00		> -4.00	
MDA-N	-4.40		> -4.00		> -4.00	
T-47D	-4.97		-4.09		> -4.00	
MG_MTD	-4.53		-4.05		-4.00	
Delta	1.06		0.61		0.05	
Range	1.59		0.66		0.05	

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinem Betreuer PD Dr. Andreas Hilgeroth für die interessante Aufgabenstellung und die Möglichkeit die vorliegende Arbeit in seiner Arbeitsgruppe selbständig anzufertigen. Seine hervorragende Betreuung, insbesondere die ständige Bereitschaft zur inhaltlichen und praktischen Unterstützung und die Hilfe bei der Klärung spektroskopischer Fragen trugen maßgeblich zum Gelingen der Arbeit bei.

Laurent Meijer, Olivier Lozach, Christoph Schächtele und Frank Totzke danke ich für die Durchführung der Kinase-Assays.

Professor Josef Molnár danke ich für die Möglichkeit zur Durchführung der FACS-Analysen und die herzliche Aufnahme in seine Arbeitsgruppe an der Universität Szeged in Ungarn.

Ebenso danke ich Prof. Sharples für die Einladung nach Manchester und seine Anleitung bei der Durchführung der DNA-Bindungsstudien.

Frau Woigk und Frau Leissring danke ich für die Anfertigung der Massenspektren, Frau Brandt für die Durchführung der Elementaranalysen und Frau Rudolf für die IR-Spektroskopie. Herrn Dr. Ströhl und Mitarbeitern danke ich für die Aufnahmen der unzähligen NMR-Spektren.

Außerdem danke ich Annamaria Molnár und Gabriela Spengler für ihre Hilfe beim Überleben in Ungarn sowie für die tatkräftige Unterstützung bei der Durchführung der Zellversuche und natürlich für die vielen Einladungen ins Corso Café in Szeged.

Der gesamten Arbeitsgruppe *Wirkstoffdesign und Analytik* danke ich für das wundervolle Arbeitsklima, die hervorragende Zusammenarbeit und die vielen Diskussionen über wissenschaftliche und weniger wissenschaftliche Themen, die meine Promotionszeit zu einem besonderen Lebensabschnitt machten. Besonderer Dank gebührt an dieser Stelle Frau Reißig, die immer zur Stelle war, wenn praktische Fragen einer Lösung bedurften.

Der größte Dank gebührt jedoch meiner Frau Anke, die mich während der Erstellung dieser Arbeit nach Kräften unterstützte und sich nur selten über den teils langsamen Fortschritt beklagte.

Liste der Veröffentlichungen und Vorträge

Publikationen

Brachwitz, K., Voigt, B., Meijer, L., Lozach, O., Schächtele, C., Molnár, J., Hilgeroth, A.:
Evaluation of the First Cytostatically Active 1-Aza-9-oxafluorenes as Novel Selective CDK1-Inhibitors with P-Glycoprotein Modulating Properties.
J. Med. Chem., 46, 876-879 (2003)

Hilgeroth, A., Voigt, B.:
3-Hydroquinolyl-quinolines and Bisquinolyl-anelated Oxepin as Reaction Products From p-Benzoquinone and N-Acetyl-1,4-dihydroquinolines.
Heterocycles, 60, 2223-2230 (2003)

Voigt, B., Meijer, L., Lozach, O., Schächtele, C., Totzke, F., Hilgeroth, A.:
Novel CDK-Inhibition Profiles of Structurally Varied 1-Aza-9-oxafluorenes.
Bioorg. Med. Chem. Letters, 15, 823-825 (2005).

Hilgeroth, A., Molnár, A., Molnár, J., Voigt, B.:
Correlation of Calculated Molecular Orbital Energies of Some Phenothiazine Compounds with MDR-Reversing Properties.
Eur. J. Med. Chem., 41(4), 548-551 (2006)

Vorträge

Voigt, B., Hilgeroth, A.:

CDK-Hemmprofile neuartiger 1-Aza-9-oxafluorene

Jahrestagung der Deutschen Pharmazeutischen Gesellschaft 2003, Würzburg

Voigt, B., Hilgeroth, A.:

Entwicklung selektiver 1-Aza-9-oxafluorene als Werkzeuge für die funktionale Analyse von Kinase-Inhibitoren als Alzheimer-Therapeutika

Doktorandentagung der Deutschen Pharmazeutischen Gesellschaft, 13. - 15.02.2005,
Leipzig

Voigt, B., Hilgeroth, A.:

Investigation of Cytostatic Mechanism of Novel 1-Aza-9-oxafluorenes

The European COST Action B16 Symposium on Multidrug Reversal, 13. - 14.05.2005,
Antalya

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Burkhardt Johannes Voigt
Geburtsdatum: 24.05.1977
Geburtsort: Halle/Saale
Familienstand: verheiratet

Schulbildung

1983 - 1985 Oberschule „C. G. Rochlitzer“ in Freiberg/Sachsen
1985 - 1992 Oberschule „Clara Zetkin“ in Freiberg/Sachsen
1992 - 1995 Gymnasium „Geschwister Scholl“ in Freiberg/Sachsen
1995 Abitur

Studium

1997 - 2001 Studium der Pharmazie an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg in Halle/Saale
September 1999 Abschluss des 1. Abschnitts der Pharmazeutischen Prüfung
September 2001 Abschluss des 2. Abschnitts der Pharmazeutischen Prüfung
November 2002 Abschluss des 3. Abschnitts der Pharmazeutischen Prüfung
Erteilung der Approbation als Apotheker

Berufstätigkeit

Nov. 2001 - April 2002 Wissenschaftliche Hilfskraft an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg in der Arbeitsgruppe von PD Dr. habil. Andreas Hilgeroth
Mai - Oktober 2002 Pharmaziepraktikum in der Paulus-Apotheke in Halle

Nov. 2002 - August 2005	Promotionsstudium an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg in der Arbeitsgruppe von PD Dr. habil. Andreas Hilgeroth als Stipendiat der Graduiertenförderung des Landes Sachsen-Anhalt
Mai 2004 - Juni 2004	Forschungsaufenthalt an der Universität in Manchester, Medizinische und Humanwissenschaftliche Fakultät, Institut für Pharmazie
Okt. 2004 - Nov. 2004	Forschungsaufenthalt an der Universität in Szeged, Medizinische Fakultät, Institut für Mikrobiologie
seit September 2005	Apotheker in der Apotheke im Neustadt-Centrum in Halle/Saale

Wehrdienst

1996 - 1997	Zivildienst im Pflegeheim für geistig Behinderte Kretzschmarstift in Freiberg/Sachsen
-------------	---

Erklärung

Hiermit erkläre ich gemäß §5 (2) b der Promotionsordnung der Fakultät, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe, sowie ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel und Quellen verfasst habe. Alle Stellen, die wörtlich oder inhaltlich aus Veröffentlichungen entnommen sind, habe ich als solche kenntlich gemacht.

Halle, November 2006

Burkhardt Voigt