

**Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Fakultät
für Chemie und Pharmazie der Ludwig-Maximilians-
Universität München**



**Entwicklung subtypenselektiver
Lysin-Deacetylase-Inhibitoren**

Katharina Maria Vögerl

aus

Cham

2018

Erklärung

Diese Dissertation wurde im Sinne von § 7 der Promotionsordnung vom 28. November 2011 von Herrn Prof. Dr. Franz Bracher betreut.

Eidesstattliche Versicherung

Diese Dissertation wurde eigenständig und ohne unerlaubte Hilfe erarbeitet.

München, den 05.02.2018

Katharina Maria Vögerl

Dissertation eingereicht am: 06.02.2018

1. Gutachter: Prof. Dr. Franz Bracher
2. Gutachter: Prof. Dr. Franz Paintner

Mündliche Prüfung am: 23.03.2018

Für meine Eltern

Danksagung

Mein Dank gilt an erster Stelle Herrn Professor Dr. Franz Bracher für die Bereitstellung dieses interessanten Themas sowie seine stets großzügige Unterstützung und wohlwollende Förderung dieser Arbeit.

Ebenso danke ich den Mitgliedern der Prüfungskommission, insbesondere Herrn Professor Dr. Franz Paintner für die freundliche Übernahme des Koreferats.

Ferner danke ich meinen Kooperationspartnern Herrn Professor Dr. Manfred Jung von der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg für die Durchführung aller Testungen an Lysin-Deacetylasen und Herrn Professor Dr. Wolfgang Sippl von der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg für die Anfertigung der Dockingstudien.

Den Teams der Analytikabteilungen der Chemie und Pharmazie für die Durchführung NMR- und massenspektrometrischer Messungen möchte ich ebenso meinen Dank aussprechen.

Zudem gebührt mein Dank Herrn Karl Sauvageot-Witzku für die engagierte Mitarbeit bei der Synthese, Frau Martina Stadler für die Durchführung des Agar-Diffusions-Tests und des MTT-Assays sowie Frau Anna Niedrig für die Messung von HPLC-Reinheiten.

Herrn Dr. Hans-Jürgen Krauss danke ich für die gute Zusammenarbeit bei der Studentenbetreuung und seine stete Hilfsbereitschaft.

Bedanken möchte ich mich auch bei allen aktuellen und ehemaligen Kollegen für die gute Zusammenarbeit und für die schöne gemeinsame Zeit. Besonders möchte ich mich bei Nghia Ong und Sebastian Dittrich für die Weitergabe ihres Wissens sowie die wertvollen Gespräche bedanken.

Bei meinen Freunden, meiner Familie und Philipp möchte ich mich herzlich für ihre Unterstützung und Geduld bedanken. Mein größter Dank gilt meinen Eltern. Ohne sie wäre vieles in meinem Leben nicht möglich gewesen. Abschließend möchte ich mich noch ganz besonders bei Christian für den täglichen Beistand und die Zeit, die er mir schenkt, bedanken.

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG.....	1
1.1	REVERSIBLE PROTEIN-LYSIN-ACETYLIERUNG	1
1.2	HISTON-ACETYLIERUNG UND -DEACETYLIERUNG	3
1.3	ACETYLIERUNG VON NICHT-HISTON-PROTEINEN	5
1.4	LYSIN-DEACETYLASEN (KDACS)	6
1.4.1	LYSIN-DEACETYLASE 6 (KDAC6).....	8
1.4.1.1	STRUKTURELLE ORGANISATION UND SUBZELLULÄRE LOKALISATION.....	8
1.4.1.2	MECHANISMUS DER DEACETYLIERUNG.....	9
1.4.1.3	FUNKTIONEN DER KDAC6 UND ASSOZIIERTE KRANKHEITEN	10
1.4.2	LYSIN-DEACETYLASE 8 (KDAC8).....	12
1.4.2.1	STRUKTURELLE ORGANISATION UND SUBZELLULÄRE LOKALISATION.....	12
1.4.2.2	FUNKTIONEN DER KDAC8 UND ASSOZIIERTE KRANKHEITEN	13
1.5	INHIBITOREN DER LYSIN-DEACETYLASEN	13
1.5.1	INHIBITOREN DER LYSIN-DEACETYLASE 6	17
1.5.2	INHIBITOREN DER LYSIN-DEACETYLASE 8	19
2	THEMENSTELLUNG UND SYNTHESEPLANUNG	21
2.1	THEMENSTELLUNG.....	21
2.2	SYNTHESEPLANUNG.....	24
2.2.1	SYNTHESE VON POTENZIELLEN KDAC-INHIBITOREN MIT KURZEM LINKERELEMENT	24
2.2.2	SYNTHESE VON POTENZIELLEN KDAC6-SELEKTIVEN INHIBITOREN	25
2.2.2.1	SYNTHESE VON STRUKTURANALOGA DES TUBASTATIN A – HYDROXAMSÄUREN MIT BENZYL-LINKER KOMBINIERT MIT VERSCHIEDENEN CAP-GRUPPEN	25
2.2.2.2	SYNTHESE VON STRUKTURANALOGA MIT MODIFIZIERTEM LINKER.....	26
2.2.2.3	SYNTHESE VON STRUKTURANALOGA MIT DIVERSEN POTENZIELL ZINK-BINDENDEN GRUPPEN	27
2.2.2.3.1	FUNKTIONALISIERUNG DES PHOSPHONSÄUREDITHYLESTERS 24	28
2.2.2.3.2	FUNKTIONALISIERUNG DES 4-BROMBENZYL-DERIVATS 25	29
2.2.2.3.3	FUNKTIONALISIERUNG DES 4-CYANOBENZYL-DERIVATS 26	29
2.2.2.3.4	FUNKTIONALISIERUNG DES ESTERS 27	30

3	SYNTHESEN	33
3.1	SYNTHESEN VON VERBINDUNGEN MIT DIVERSEN ZINK-BINDENDEN GRUPPEN	33
3.1.1	SYNTHESEN VON VERBINDUNGEN MIT HYDROXAMSÄURE-FUNKTION	33
3.1.1.1	HYDROXAMSÄURESYNTHES E AUSGEHEND VOM ESTER.....	34
3.1.1.2	HYDROXAMSÄURESYNTHES E UNTER VERWENDUNG VON SCHUTZGRUPPEN	35
3.1.1.2.1	HYDROXAMSÄURESYNTHES E UNTER VERWENDUNG DER BENZYL-SCHUTZGRUPPE.....	35
3.1.1.2.2	HYDROXAMSÄURESYNTHES E UNTER VERWENDUNG DER THP-SCHUTZGRUPPE.....	36
3.1.1.2.2.1	AKTIVIERUNG MITTELS EDC UND HOB T	36
3.1.1.2.2.2	AKTIVIERUNG MIT COMU	39
3.1.1.3	HYDROXAMSÄURESYNTHES E OHNE VERWENDUNG EINER SCHUTZGRUPPE.....	42
3.1.2	SYNTHESE VON STRUKTURANALOGA MIT DIVERSEN POTENZIELL ZINK-BINDENDEN GRUPPEN	43
3.1.2.1	SYNTHESE DES PHOSPHONSÄUREMONOETHYLESTERS 53 DURCH FUNKTIONALISIERUNG DES PHOSPHONSÄURED IETHYLESTERS 24	45
3.1.2.2	SYNTHESE DES (Z)-ENAMINOKETONS 30* DURCH FUNKTIONALISIERUNG DES 4-BROMBENZYL-DERIVATS 25*	46
3.1.2.3	SYNTHESEN DURCH FUNKTIONALISIERUNG DES 4-CYANOBENZYL-DERIVATS 26(*).....	47
3.1.2.3.1	SYNTHESE DES (Z)-AMIDOXIMS 31* AUS DEM 4-CYANOBENZYL-DERIVAT 26(*).....	47
3.1.2.3.2	SYNTHESE DES CARBAMATS 33 UND DES THIOHARNSTOFF-DERIVATS 34 AUS DEM 4-CYANOBENZYL-DERIVAT 26(*)	48
3.1.2.4	SYNTHESEN DURCH FUNKTIONALISIERUNG DES ESTERS 27(*)	49
3.1.2.4.1	SYNTHESE DES TRIFLUORMETHYLOXIM 36* AUS DEM ESTER 27(*).....	49
3.1.2.4.2	SYNTHESE VERSCHIEDENER POTENZIELL ZINK-BINDENDER GRUPPEN NACH HYDROLYSE DES ESTERS 27(*)	52
3.2	SYNTHESE VON STRUKTURANALOGA MIT MODIFIZIERTEM LINKER.....	54
3.2.1	SYNTHESE EINES STRUKTURANALOGONS MIT VERKÜRZTEM LINKER	54
3.2.2	SYNTHESE EINES STRUKTURANALOGONS MIT VERLÄNGERTEM LINKER	55
3.2.3	N-ARYLETHYLIERUNG VON AROMATISCHEN AMINEN UND N-HETEROCYCLEN MIT ENOLETHERN UNTER SAUREN REDUKTIVEN BEDINGUNGEN	58
3.2.3.1	EINLEITUNG/HINTERGRUND	58
3.2.3.2	OPTIMIERUNG, ANWENDUNGSMÖGLICHKEITEN UND EINSCHRÄNKUNGEN.....	62
3.3	SYNTHESE DER VERBINDUNGEN MIT DIVERSEN CAP-GRUPPEN.....	68
3.3.1	SYNTHESE VON VERBINDUNGEN MIT VERSCHIEDENEN CAP-GRUPPEN AUSGEHEND VON EINEM PHENYL-LINKERELEMENT	68
3.3.2	SYNTHESE VON STRUKTURANALOGA DES TUBASTATIN A – HYDROXAMSÄUREN MIT BENZYL-LINKER KOMBINIERT MIT VERSCHIEDENEN CAP-GRUPPEN	71
3.3.2.1	ALLGEMEINE SYNTHES E STRATEGIEN FÜR PHENOTHIAZINE UND DEREN ANALOGA.....	71

3.3.2.2	SYNTHESE VON PHENOTHIAZINEN UND ANALOGA ALS CAP-GRUPPEN	77
3.3.2.2.1	SYNTHESE VON SUBSTITUIERTEN PHENOTHIAZINEN	77
3.3.2.2.2	SYNTHESE VON 1-CHLOR-10 <i>H</i> -PHENOTHIAZIN (154).....	77
3.3.2.2.3	SYNTHESE VON OXIDIERTEN 10 <i>H</i> -PHENOTHIAZINEN.....	78
3.3.2.2.3.1	SYNTHESE VON 10 <i>H</i> -PHENOTHIAZIN-5,5-DIOXID (155)	78
3.3.2.2.3.2	SYNTHESE VON 10 <i>H</i> -PHENOTHIAZIN-5-OXID (156).....	78
3.3.2.2.4	SYNTHESE VON AZAPHENOTHIAZINEN	79
3.3.2.2.4.1	SYNTHESE VON 1-AZAPHENOTHIAZIN (159)	79
3.3.2.2.4.2	SYNTHESE VON 2-AZAPHENOTHIAZIN (164)	80
3.3.2.2.4.3	SYNTHESE VON 1,4-DIAZAPHENOTHIAZIN (167)	80
3.3.2.2.4.4	SYNTHESE VON 3-CHLOR-1,2-DIAZAPHENOTHIAZIN (171) UND 1,2-DIAZAPHENOTHIAZIN (172)	81
3.3.2.2.4.5	SYNTHESE VON 1,6-DIAZAPHENOTHIAZIN (177)	82
3.3.2.2.4.6	SYNTHESE VON 2,7-DIAZAPHENOTHIAZIN (181)	83
3.3.2.2.4.7	SYNTHESE VON 3,6-DIAZAPHENOTHIAZIN (185)	84
3.3.2.2.5	SYNTHESE DES THIAZOL-ANALOGONS 189	85
3.3.2.3	SYNTHESE VON BENZYLHYDROXAMSÄUREN MIT PHENOTHIAZINEN, PHENOTHIAZIN- ANALOGA UND STRUKTURVERWANDTEN VERBINDUNGEN ALS CAP-GRUPPEN.....	86
3.3.2.3.1	SYNTHESE DER ZIELSTRUKTUREN ÜBER EINFÜHRUNG DES BENZYL-LINKERS AM ZENTRALEN THIAZIN-, OXAZIN BZW. PYRIDON-STICKSTOFF	86
3.3.2.3.2	STRUKTURAUFKLÄRUNG VON NEBENPRODUKTEN BEI DER N-ALKYLIERUNG VON 1,2-DIAZAPHENOTHIAZIN UND SYNTHESE VON STRUKTURISOMEREN ZIELSTRUKTUREN.....	89
3.3.2.3.3	SYNTHESE EINES STRUKTURANALOGONS VON TUBASTATIN A	92
4	BIOLOGISCHE TESTUNG	95
4.1	AGAR-DIFFUSIONSTEST	95
4.1.1	ERGEBNISSE UND DISKUSSION DES AGAR-DIFFUSIONSTEST	96
4.2	TESTUNG AUF ZYTOTOXIZITÄT	97
4.2.1	ERGEBNISSE DES MTT-TESTS	97
4.2.2	DISKUSSION DER TESTERGEBNISSE AUS DEM MTT-TEST.....	100
4.3	TESTUNG AUF LYSIN-DEACETYLASE INHIBITORISCHE AKTIVITÄT	100
4.3.1	TESTERGEBNISSE DES LYSIN-DEACETYLASE ASSAYS.....	102
4.3.2	DISKUSSION DER TESTERGEBNISSE	106
4.4	ZELLULÄRE TESTUNG DER LYSIN-DEACETYLASE INHIBITORISCHEN AKTIVITÄT	110
4.4.1	TESTERGEBNISSE DER ZELLULÄREN TESTUNG MITTELS WESTERN BLOT.....	110
4.4.2	DISKUSSION DER TESTERGEBNISSE	112
4.5	DOCKINGSTUDIEN	113

4.6 CO-KRISTALLISATIONSTUDIEN	115
5 ZUSAMMENFASSUNG	117
5.1 SYNTHESE VON VERBINDUNGEN MIT DIVERSEN POTENZIELL ZINK-BINDENDEN GRUPPEN	118
5.1.1 SYNTHESE VON VERBINDUNGEN MIT HYDROXAMSÄURE-FUNKTION.....	118
5.1.2 SYNTHESE VON STRUKTURANALOGA MIT DIVERSEN POTENZIELL ZINK-BINDENDEN GRUPPEN	119
5.2 SYNTHESE VON STRUKTURANALOGA MIT MODIFIZIERTEM LINKER.....	122
5.3 N-ARYLETHYLIERUNG VON AROMATISCHEN AMINEN UND N-HETEROCYCLLEN MIT ENOLETHERN UNTER SAUREN REDUKTIVEN BEDINGUNGEN	123
5.4 SYNTHESE VON VERBINDUNGEN MIT VERSCHIEDENEN CAP-GRUPPEN AUSGEHEND VON EINEM PHENYL-LINKERELEMENT.....	124
5.5 SYNTHESE VON STRUKTURANALOGA DES TUBASTATIN A – HYDROXAMSÄUREN MIT BENZYL-LINKER KOMBINIERT MIT VERSCHIEDENEN CAP-GRUPPEN.....	126
5.5.1 SYNTHESE VON PHENOTHIAZINEN UND ANALOGA ALS CAP-GRUPPEN.....	126
5.5.2 SYNTHESE VON BENZYLHYDROXAMSÄUREN MIT PHENOTHIAZINEN, PHENOTHIAZIN-ANALOGA UND STRUKTURVERWANDTEN VERBINDUNGEN ALS CAP-GRUPPEN.....	128
5.6 BIOLOGISCHE AKTIVITÄT AN LYSIN-DEACETYLASEN	130
5.6.1 <i>IN VITRO</i> -AKTIVITÄT	130
5.6.2 ZELLULÄRE AKTIVITÄT	132
5.6.3 DOCKINGSTUDIEN UND CO-KRISTALLISATIONSTUDIEN	132
6 EXPERIMENTELLER TEIL	133
6.1 ALLGEMEINE ANGABEN.....	133
6.1.1 GERÄTE.....	133
6.1.2 GERÄTEPARAMETER UND METHODEN.....	133
6.1.3 MATERIALIEN, ARBEITSTECHNIKEN UND ZUSÄTZLICHE ANGABEN	136
6.2 ALLGEMEINE ARBEITSVORSCHRIFTEN.....	137
6.3 BESCHREIBUNG DER SUBSTANZEN	141
6.4 ARBEITSMETHODEN DER BIOLOGISCHEN TESTUNG	281
6.4.1 AGAR-DIFFUSIONSTEST	281
6.4.2 MTT-TEST.....	282
6.4.3 TESTUNG AUF LYSIN-DEACETYLASE INHIBITORISCHE AKTIVITÄT	282
6.4.3.1 TESTUNG AN DEN REKOMBINANTEN ENZYMEN KDAC1 UND KDAC6	282
6.4.3.2 TESTUNG AM REKOMBINANTEN ENZYMEN KDAC8	284

6.4.4	ZELLULÄRE TESTUNG AUF LYSIN-DEACETYLASE INHIBITORISCHE AKTIVITÄT	284
6.4.5	COMPUTERBASIERTE METHODEN	286
6.4.6	KRISTALLISATIONSMETHODEN	286
7	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	289
8	LITERATURVERZEICHNIS	295

1 EINLEITUNG

Die Entschlüsselung des humanen Genoms, gleichwohl ein Meilenstein der Wissenschaft, sollte eher der Anfang als der erdachte Schlussstein zum vollständigen Verständnis aller Lebensvorgänge sein. Wurde durch das Humangenomprojekt das menschliche Erbgut mit 20.000 bis 25.000 Genen aufgedeckt^[1], wird heute die Anzahl der menschlichen Proteine auf 80.000 bis 400.000 geschätzt^[2]. Aufgrund der Komplexität des Proteoms und der im Vergleich dazu geringeren Anzahl der Gene kann die DNA-Sequenz alleinig nicht die Informationsvielfalt für die Bildung zigtausender Proteine liefern. Neben der Fähigkeit, dass ein Gen für mehrere Proteine codieren kann, tragen auch sogenannte alternative Spleißvorgänge der mRNA noch vor der Translation zur Entstehung verschiedener Genprodukte bei^[3]. Eine weitere Diversifizierung wird durch Veränderungen an den Proteinmolekülen nach der Translation erreicht. Diese posttranslationalen Proteinmodifikationen sind essenziell für die Regulation der Proteinfunktion, da hierüber deren individuelle Eigenschaften und Interaktionen mit anderen Proteinen bzw. Molekülen beeinflusst werden. Mehrere hundert verschiedene posttranslationale Proteinmodifikationen, reversibler und irreversibler Art, wurden bis dato beschrieben. Diese Vielfalt wird zum einen über kovalente Spaltung des Peptidrückgrates durch eine Protease oder durch enzymkatalysierte kovalente Übertragung einer chemischen Gruppe von einem Cosubstrat auf ein Protein erreicht. Zu den häufigsten posttranslationalen Proteinmodifikationen zählen die Phosphorylierung, Acylierung, Alkylierung, Glycosylierung und Oxidation^[4]. Die Entschlüsselung des Proteoms zusammen mit der Identifizierung der molekularen Wechselwirkungen unter den Proteinen, dem Interaktom, soll zukünftig tiefere Einblicke in die Funktionsweise einer Zelle ermöglichen und helfen die Ursachen von Krankheiten zu ergründen.

1.1 REVERSIBLE PROTEIN-LYSIN-ACETYLIERUNG

Die Protein-Acylierung ist eine der fünf am häufigsten auftretenden posttranslationalen Proteinmodifikationen. Neben der Myristoylierung an N-terminalen Glycin-Resten und der S-Palmitoylierung an Cystein-Resten von Proteinen ist darunter die Lysin-Acetylierung sehr verbreitet^[4]. Lysine in Proteinen können sowohl an der N-terminalen α -Aminogruppe als auch an der Aminogruppe in ϵ -Position des Lysin-Restes innerhalb der Peptidkette modifiziert werden^[5]. Anders als die irreversible $N\alpha$ -Acetylierung^[6] ist die $N\epsilon$ -Acetylierung eine Proteinmodifikation reversibler Art, deren Gleichgewicht durch die beiden Enzymfamilien Lysin-Acetyltransferasen (KAT) und Lysin-Deacetylasen (KDAC) dynamisch reguliert wird

(Abb. 1). Da 1964 von Allfrey *et al.*^[7] Histone als erste Substrate der Lysin-Acetyltransferasen identifiziert wurden, werden diese Enzyme auch als Histon-Acetyltransferasen (HAT) und Histon-Deacetylasen (HDAC) bezeichnet. Zu dieser enzymatisch regulierten Acetylierung kann unter bestimmten Bedingungen auch eine nicht-enzymatische Übertragung von Acetylgruppen abhängig vom Acetyl-CoA-Level erfolgen^[8].

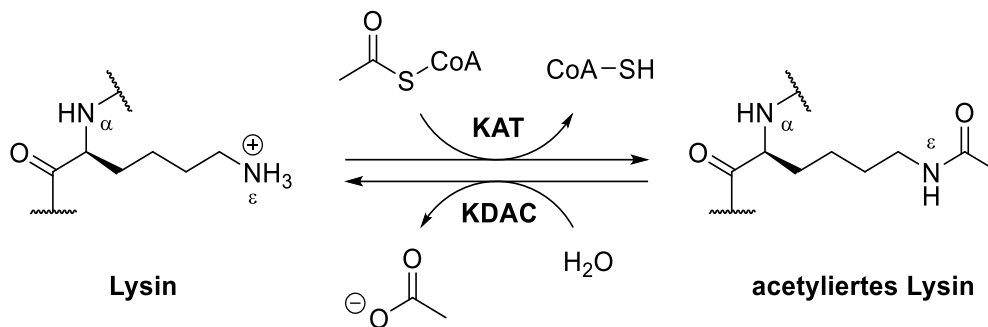


Abb. 1: Nε-Lysin-Acetylierung und -Deacetylierung.

Drei Proteinklassen sind primär an der Modulation des Acetyloms^[9], der Gesamtheit der acetylierten Proteine in den humanen Zellen, beteiligt: Die 'Writer'-Proteine, die KATs, die das Anbringen der Modifikation katalysieren, die 'Eraser'-Proteine, die KDACs, die diese Modifikation wieder abspalten sowie die 'Reader'-Proteine, die eine oder mehrere Bromodomänen besitzen, welche die Nε-acetylierten Lysine erkennen und daran binden. Das Acetylom konnte im Jahr 2009 mittels hochauflösender Massenspektrometrie mit 3600 Lysin-Acetylierungsstellen an 1750 Proteinen identifiziert werden^[10]. Darunter befinden sich nukleäre, zytoplasmatische sowie mitochondriale Proteine, die grundlegende zelluläre Funktionen wahrnehmen. Die Nε-Acetylierung kann dabei über verschiedene Mechanismen auf die Proteinfunktionen Einfluss nehmen. So wird durch das Anbringen der Acetyl-Funktion die bei physiologischem pH vorliegende positive Ladung der protonierten ε-Aminogruppe des Lysins neutralisiert, wodurch die elektrostatischen Eigenschaften beeinflusst werden. Zugleich wird dadurch die Struktur des Lysins verändert und eine neue Bindungsstelle des Proteins zu Nukleinsäuren sowie zu anderen Proteinen generiert^[11]. Zudem kann bei Lysin-beteiligter katalytischer Reaktion die enzymatische Aktivität durch die Acetylierung reguliert werden, wie z.B. die Desaktivierung des Enzyms Acetyl-CoA-Synthase^[12]. Auch kann durch den Acetylierungsstatus bei einigen Proteinen die subzelluläre Lokalisation gesteuert werden^[11]. Häufig treten Acetylierungen auch an mehreren Positionen an einem Protein auf. Diese Acetylierungsmuster sind essenziell für die Ausübung bestimmter Funktionen, wie z.B. epigenetischer Regulationsmechanismen, im Falle der Histonproteine^[4].

1.2 HISTON-ACETYLIERUNG UND -DEACETYLIERUNG

Bereits bei der erstmaligen Entdeckung der Acetylierung von Histonproteinen wurde diese Proteinmodifikation mit einer Regulierung der Transkription in Zusammenhang gebracht^[13]. Histone sind Proteinkomplexe, bestehend aus jeweils zwei Kopien der Histonproteine H2A, H2B, H3, H4, welche zusammen ein Histon-Oktamer (core particle) bilden, um das sich ein etwa 146 Basenpaare langer doppelsträngiger DNA-Abschnitt etwa 1.65 mal windet^[14] (Abb. 2). Diese strukturelle Einheit wird als Nucleosom bezeichnet. Zwischen den einzelnen Nucleosomen befinden sich Basenpaare der Linker-DNA, an das ein weiteres Histonprotein, H1, Nucleosomen-nah assoziiert ist^[15]. Durch Kompaktierung und weitere Aufspiralisierung der Nucleosomen-Kette wird die Struktur des Chromatins gebildet, aus welchem die Chromosomen bestehen. Histonproteine enthalten relativ viele basische Aminosäuren (Lysin und Arginin), deren unter physiologischen Bedingungen positiv geladene Reste sehr effektiv mit dem negativen geladenen Zucker-Phosphatrückgrat^[16] der DNA interagieren können. Darüber, aber auch über zahlreiche Wasserstoffbrücken, hydrophobe Wechselwirkungen und Salzbrücken, wird der DNA-Proteinkomplex zusammengehalten. Die Histonproteine des Oktamers zeichnen sich durch ein charakteristisches, konserviertes Strukturmotiv, die Histon-Falte (histone fold), aus. Diese besteht aus je drei α -Helices und verbindenden Schleifen, worüber die einzelnen Histone (H2A, H2B, H3, H4) miteinander in Wechselwirkung treten. Des Weiteren ragen die N-terminalen Enden der Histone aus dem Nucleosom heraus, worüber auch internucleosomale Wechselwirkungen stattfinden können^[17]. Zahlreiche posttranslationale Modifikationen (Acetylierung, Methylierung, Phosphorylierung, Ubiquitinierung, SUMOylierung, ADP-Ribosylierung, usw.) finden sowohl an den Histonproteinen im Nucleosomenkern als auch an den N-terminalen Enden statt^[18].

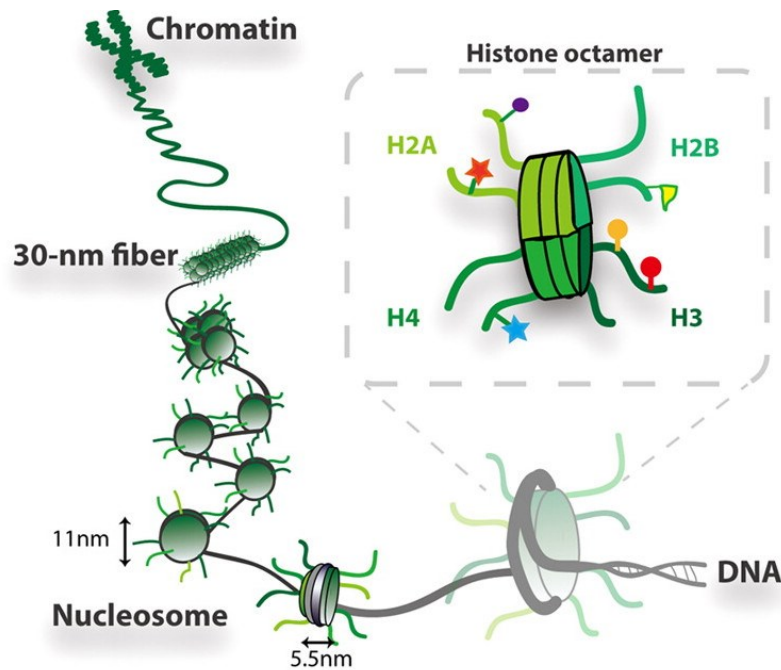


Abb. 2: Histoneproteinoktamer und DNA bilden zusammen das Nucleosom. Kettenförmig aneinandergereiht bilden diese Filamente, welche in maximal kondensierter Form das Chromatin bzw. die Chromosomen aufbauen^[19].

Die Acetylierung und Deacetylierung von Lysin in Histonen, die sich überwiegend an den N-terminalen Enden ereignet, ist entscheidend für die Modulierung der Chromatinkonformation. Eine Neutralisation der positiven Ladung des protonierten Lysins durch die Bildung der neutralen Amidbindung vermindert sowohl die Wechselwirkungen zum negativ geladenen DNA-Rückgrat als auch die internucleosomalen Wechselwirkungen und führt damit zu einer Auflockerung der Chromatinstruktur. Euchromatin ist üblicherweise durch eine ausgeprägte Acetylierung und eine leichte Zugänglichkeit für Transkriptionsfaktoren charakterisiert, so dass Gene verstärkt abgelesen werden können. Hierbei konnte der Acetylierung von Histon H4 (H4K16) eine besondere Funktion bei der transkriptionellen Aktivierung und der Regulierung der Chromatinstruktur zugeschrieben werden^[20]. Demgegenüber zeichnet sich das stark kondensierte Heterochromatin durch eine verminderte Acetylierung und eine geringe Transkriptions-Aktivität aus. Dieser Effekt wird zusätzlich zur Chromatinstruktur über bestimmte Repressor-Proteine (z.B. SMRT) vermittelt, die bevorzugt an nicht-acetylierte Histone binden^[21]. Generell kann aber eine Deacetylierung nicht mit einer Unterdrückung der Transkription verbunden werden. Vielmehr konnte bei aktiven Genen eine schnelle Umsetzungsrate von Acetylierung und Deacetylierung gezeigt werden^[21].

Im Zusammenspiel mit anderen posttranslationalen Histonmodifikationen sowie durch die Generierung einer neuen Proteinbindestelle für Bromodomänen resultiert ein großes regulatorisches Potential für viele essentielle zelluläre Prozesse, wie Gentranskription, DNA

Replikation, Reparatur und Rekombination^[18]. Mittlerweile wird daher auch von einem sogenannten „Histon-Code“ gesprochen^[22].

1.3 ACETYLIERUNG VON NICHT-HISTON-PROTEINEN

Die Acetylierung von Lysin wurde lange mit der epigenetischen Modifikation von Chromatin-assoziierten Proteinen, allen voran den Histonen, in Verbindung gebracht. Mit der Zeit konnten jedoch immer mehr Nicht-Histon-Proteine identifiziert werden, deren unterschiedlichste zelluläre Funktionen durch Acetylierung beeinflusst werden.

Darunter befinden sich insbesondere Transkriptionsfaktoren, wie etwa das Tumorsuppressor-Protein p53. Die regulatorische Funktion des Proteins p53 unterliegt einer komplexen Kombination posttranslationaler Modifikationen. Als Reaktion auf genotoxischen Stress oder DNA-Schädigungen erfolgt eine Acetylierung durch die Acetyltransferasen p300/CBP. Diese stabilisiert und aktiviert p53, da hiermit eine Ubiquitinylierung an den gleichen Lysinresten unterbunden und ein darauffolgender Abbau von p53 verhindert wird^[23]. Infolge einer gesteigerten DNA-Bindungsaffinität durch die Acetylierung fungiert p53 als Transkriptionsfaktor und vermittelt so die Hemmung des Zellwachstums, Apoptose und den Zellalterungsprozess^[24].

Mikrotubuli werden neben einer Vielzahl von posttranslationalen Modifikationen an ihren molekularen Bausteinen, dem α - und β -Tubulin, ebenfalls acetyliert^[25]. α -TAT1 und verschiedene andere Transferasen acetylieren Lys40 am α -Tubulin im Mikrotubulilumen^[26]. Daneben existiert noch eine weitere Acetylierungsstelle am β -Tubulin an Lys252. Diese Acetylierung erfolgt durch die Acetyltransferase SAN vorzugsweise an nicht-polymerisiertem β -Tubulin und verhindert den Einbau in Mikrotubuli^[25]. Vermehrt acetylierte Mikrotubuli sind in Cilien und Basalkörperchen, in langlebigen Mikrotubuli^[25], sowie bei der Differenzierung von Neuronalzellen zu finden^[26]. Die Acetylierung wird häufig mit stabilen Mikrotubuli verbunden^[27], während die direkten Effekte auf die Mikrotubuli-Stabilität und -Dynamik nicht eindeutig geklärt sind^[25].

Im Falle des molekularen Chaperon HSP90 führt die Lysin-Acetylierung zu einer verringerten Affinität des Chaperons zu seinen Klienten-Proteinen und Co-Chaperonen. Über den Acetylierungsstatus an Lys294 wird so direkt die HSP90-Aktivität reguliert^[28].

Durch viele weitere, mittlerweile mehrere hundert, bekannte Nicht-Histon-Proteine ist das enorme regulatorische Potential dieser posttranslationalen Modifikation in zahlreichen zellulären Prozessen auch außerhalb der Epigenetik unbestritten.

1.4 LYSIN-DEACETYLASEN (KDACS)

Die humanen Lysin-Deacetylasen, von denen derzeit 18 Isoformen bekannt sind, werden aufgrund ihrer Sequenzhomologie zu orthologen Hefeproteinen phylogenetisch in vier Klassen gruppiert^[29] (Abb. 3; ohne Klasse III). Die Klasse I (KDAC1, 2, 3 und 8) ist strukturell eng verwandt mit dem Hefeprotein Rpd3 (*reduced potassium dependence 3*), während die Klasse II (KDAC4, 5, 6, 7, 9 und 10) Ähnlichkeit zu dem Hda1-Protein (*histone deacetylase 1*) der Hefen besitzt. Die Klasse II wird weiter in die Unterklassen IIa (KDAC4, 5, 7 und 9) und IIb (KDAC6 und 10) unterteilt. Die Enzyme der Klasse III, die Sirtuine, deren Name sich aus der Homologie zum Enzym Sir2 (*silent information regulator 2*) ableitet, bestehen aus sieben Vertretern (Sirt1-7). Die Klasse IV umfasst schließlich nur einen Vertreter (KDAC11) mit struktureller Ähnlichkeit zu den beiden Hefeenzymen Rpd3 und Hda1^[30].

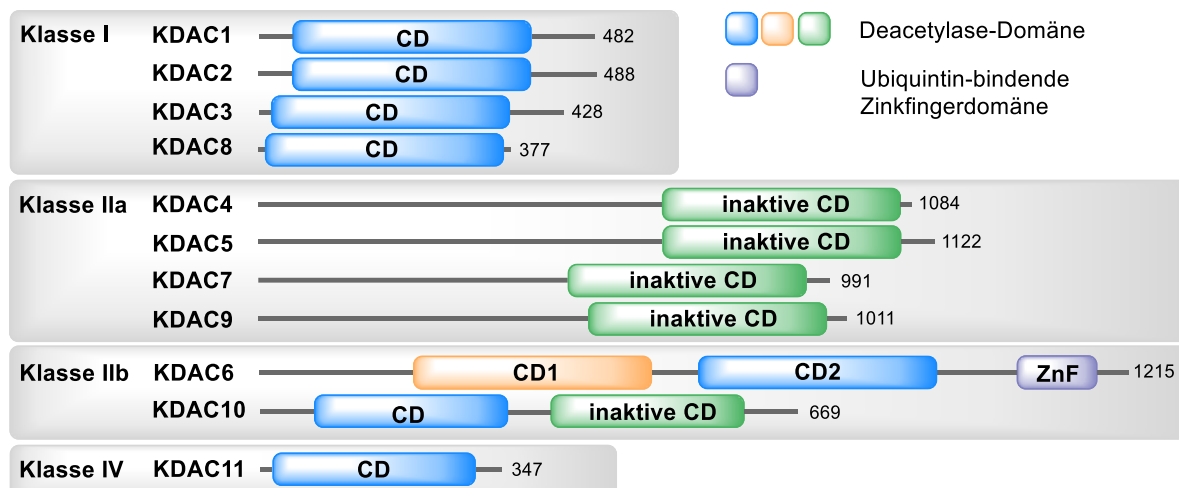


Abb. 3: Domänenorganisation der 11 Zink-abhängigen KDACS (vgl.^[31-33]).

Die Enzyme der Klassen I, II und IV katalysieren zinkabhängig die Abspaltung von Acetylgruppen von ihren Substraten, während die der Klasse III einen NAD⁺-abhängigen Mechanismus aufweisen.

Verschiedene Kristallstrukturen brachten nach und nach Erkenntnisse über die dreidimensionale Struktur und den Katalysemechanismus der Lysin-Deacetylasen. Von Finnin *et al.* wurde erstmals 1999 die Kristallstruktur des Enzyms HDLP (*histone deacetylase-like protein*), das sehr hohe Sequenzhomologie (~35%) zu KDAC1 aufweist, aus dem Bakterium *Aquifex aeolicus*, aufgeklärt^[34]. Die erste humane KDAC, von der die Kristallstruktur aufgeklärt werden konnte, war KDAC8^[35]. Dieser folgten weitere humane KDACS (1, 2, 3, 4 und 7) sowie KDAC-verwandte Proteine (HDAH und APAH)^[36] und schließlich wurden 2016 die Arbeiten

von zwei Gruppen zur Kristallstruktur der KDAC6 des Menschen sowie aus *Danio rerio* (Zebrafisch) veröffentlicht^[32, 37].

Lysin-Deacetylasen der Klasse I sind nucleäre Enzyme und vielfach Bestandteil größerer Multiproteinkomplexe. Als katalytische Untereinheiten der Corepressor-Komplexe Sin3, NuRD, CoREST (KDAC1/2)^[38] sowie SMRT/N-CoR (KDAC3)^[39] unterdrücken diese die Transkription und regulieren so die Genexpression. Eine Ausnahme stellt KDAC8 dar. Diese Isoform liegt nicht in derartigen Komplexen vor und befindet sich zudem auch im Zytoplasma^[30].

KDACs der Klasse IIa besitzen aufgrund eines fehlenden katalytischen Aminosäure-Restes im aktiven Zentrum kaum Lysin-Deacetylase-Aktivität^[40]. Enzyme dieser Klasse gehen ebenfalls größere Multiproteinkomplexe ein. So interagieren diese mit Transkriptionsfaktoren (u.a. MEF2) und Corepressor-Komplexen (SMRT/N-CoR, folglich KDAC3), wodurch die Transkription unterdrückt wird^[41]. In Abhängigkeit vom zellulären Kontext kommen Klasse IIa Enzyme im Nukleus oder Zytoplasma vor und unterliegen einem dynamischen Transport. Dadurch fungieren diese als Signaltransduktoren, deren biologische Funktion über vielerlei Wege kontrolliert wird^[30]. Während die meisten Enzyme der Klasse I ubiquitär vorhanden sind, ist das Vorkommen der Klasse IIa auf bestimmte Zelltypen begrenzt. KDAC4 z.B. befindet sich hauptsächlich in embryonalem Muskelgewebe, KDAC5, 7 und 9 dagegen überwiegend in der Herz- und Skelettmuskulatur^[41]. In Muskelzellen wird diesen KDACs auch eine Rolle bei der Differenzierung zugewiesen. Über eine spezifische Bindungsstelle binden diese an den Transkriptionsfaktor MEF2 (myocyte enhancer factor 2), wodurch dessen Funktion bei der Muskelzelldifferenzierung unterdrückt wird^[42].

Die Enzyme der Klasse IIb sind überwiegend zytoplasmatische Enzyme und besitzen als einzige Klasse zwei katalytische Domänen. Die beiden Isoformen zeigen große Unterschiede in ihrer zellspezifischen Lokalisation und biologischen Funktion. KDAC10 ist das zuletzt entdeckte Enzym der Klasse IIb und vergleichsweise wenig untersucht^[43].

Die Klasse IV mit dem einzigen Vertreter KDAC11 ist ebenfalls bisher nur wenig erforscht^[30]. KDAC11 ist primär im Nucleus lokalisiert und wurde zusammen mit KDAC6 in einem Proteinkomplex vorliegend gefunden^[44].

Da sich die vorliegende Arbeit mit selektiven Inhibitoren der Isoformen KDAC6 und 8 befasst, wird auf diese in den folgenden Kapiteln detaillierter eingegangen.

1.4.1 LYSIN-DEACETYLASE 6 (KDAC6)

1.4.1.1 STRUKTURELLE ORGANISATION UND SUBZELLULÄRE LOKALISATION

Die KDAC6 weist gegenüber anderen Isoformen einige Besonderheiten auf. Als einzige Lysin-Deacetylase enthält diese die katalytischen Tandem-Deacetylase-Domänen (CD1 und CD2), die eine klassische Arginase-Deacetylase-Faltung annehmen (Abb. 4). Beide Domänen sind katalytisch aktiv und strukturell hoch konserviert. Während CD1 schwächere Aktivität und höhere Substratspezifität aufweist, zeigt CD2 nur geringe Substratspezifität^[32, 37]. CD2 ist hauptsächlich für die Deacetylierung von α -Tubulin im Mikrotubulilumen verantwortlich und deacetyliert dieses relativ unspezifisch. Dabei wird jedoch nicht polymerisiertes Tubulin gegenüber Mikrotubuli bevorzugt^[37]. Die Linkerregion zwischen den Domänen hat wesentlichen Einfluss auf die Aktivität von KDAC6^[45] und ist an der Bindung von Dynein-Motor-Proteinen beteiligt^[46]. Zudem verfügt KDAC6 über eine C-terminale Ubiquitin-bindende Zinkfingerdomäne (ZnF), mit der das Enzym polyubiquitinierte Proteine binden kann. Neben einer N-terminalen NLS-Domäne (nuclear localization signal) existieren zusätzlich eine NES-Domäne (nuclear export signal) und eine SE14-Domäne (serine-glutamate tetradecapeptide repeat), die die zytoplasmatische Lokalisation des Enzyms regulieren^[47].

Neben dem überwiegenden Vorkommen im Zytoplasma ist KDAC6 auch im Zellkern zu finden. Dort interagiert das Enzym mit verschiedenen Proteinen, die die Transkription modulieren, z.B. SUMOyliertem p300^[48], Co-Repressoren (LCoR)^[49] und Transkriptionsfaktoren (Runx2, NF- κ B)^[50-51].

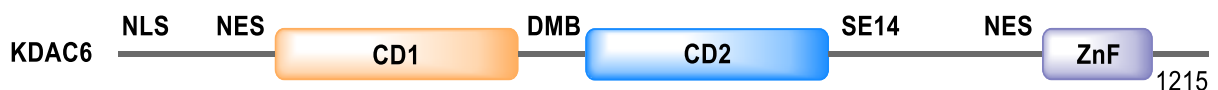


Abb. 4: Domänenorganisation der humanen KDAC6 (vgl. Hai und Christianson^[32]).

Der subzelluläre Aufenthalt sowie die Aktivität der KDAC6 werden selbst durch posttranslationale Modifikationen reguliert. So wird z.B. die Deacetylaseaktivität durch Phosphorylierung gesteigert^[52], wohingegen eine Acetylierung der NLS-Domäne durch p300 eine Verringerung der Deacetylaseaktivität gegenüber Tubulin bewirkt. Zudem führt die Acetylierung zur Aufrechterhaltung der zytoplasmatischen Lokalisation, da dadurch die Interaktion mit dem Import-Protein Importin- α verhindert wird^[53].

1.4.1.2 MECHANISMUS DER DEACETYLIERUNG

Der katalytische Mechanismus der Deacetylierungsreaktion von KDAC6 wurde von Hai und Christianson^[32] 2016 an der zweiten katalytischen Domäne (zCD2) der KDAC6 aus *Danio rerio* (Zebrafisch), welches als valides Surrogat zum humanen Enzym gilt, beschrieben. Das Zinkion wird im aktiven Zentrum von Histidin- und Asparaginsäure-Resten sowie von einem Wassermolekül koordiniert (**A**, Abb. 5). Das Zink-gebundene Wassermolekül bildet zusätzlich Wasserstoffbrückenbindungen zu zwei Histidinmolekülen (His₅₇₃ und His₅₇₄) aus. Vor Beginn der katalytischen Kaskade koordiniert das N-acetylierte Lysin des Substratproteins über die Carbonylfunktion an einen nahegelegenen Tyrosin-Rest (Tyr₇₄₅) sowie an das Zinkion, ohne dabei das gebundene Wassermolekül zu verdrängen. Es resultiert ein fünffach koordiniertes Zinkion, wodurch sich Wassermolekül und Substrat in räumlicher Nähe zueinander befinden und die Carbonylfunktion des N-acetylierten Lysins aktiviert vorliegt. His₅₇₃ fungiert zudem als Base und erhöht dadurch die Nucleophilie des Wassermoleküls (**B**). Nach dem nucleophilen Angriff des Wassermoleküls liegt ein tetraedrischer Übergangszustand vor, indem das Oxyanion durch Koordination an das Zinkion und Wasserstoffbrückenbindung zum Tyrosin-Rest (Tyr₇₄₅) stabilisiert wird (**C**). Durch die Übertragung eines Protons aus dem zweiten Histidin-Rest (His₅₇₄) und Spaltung der Amidbindung werden Acetat und die ϵ -Aminogruppe des Lysins freigesetzt (**D**). Der Ablauf unterscheidet sich demnach gegenüber dem publizierten Katalysemechanismus der KDAC8, bei dem einer der beiden Histidin-Reste sowohl die Rolle der Säure als auch der Base einnimmt^[54].

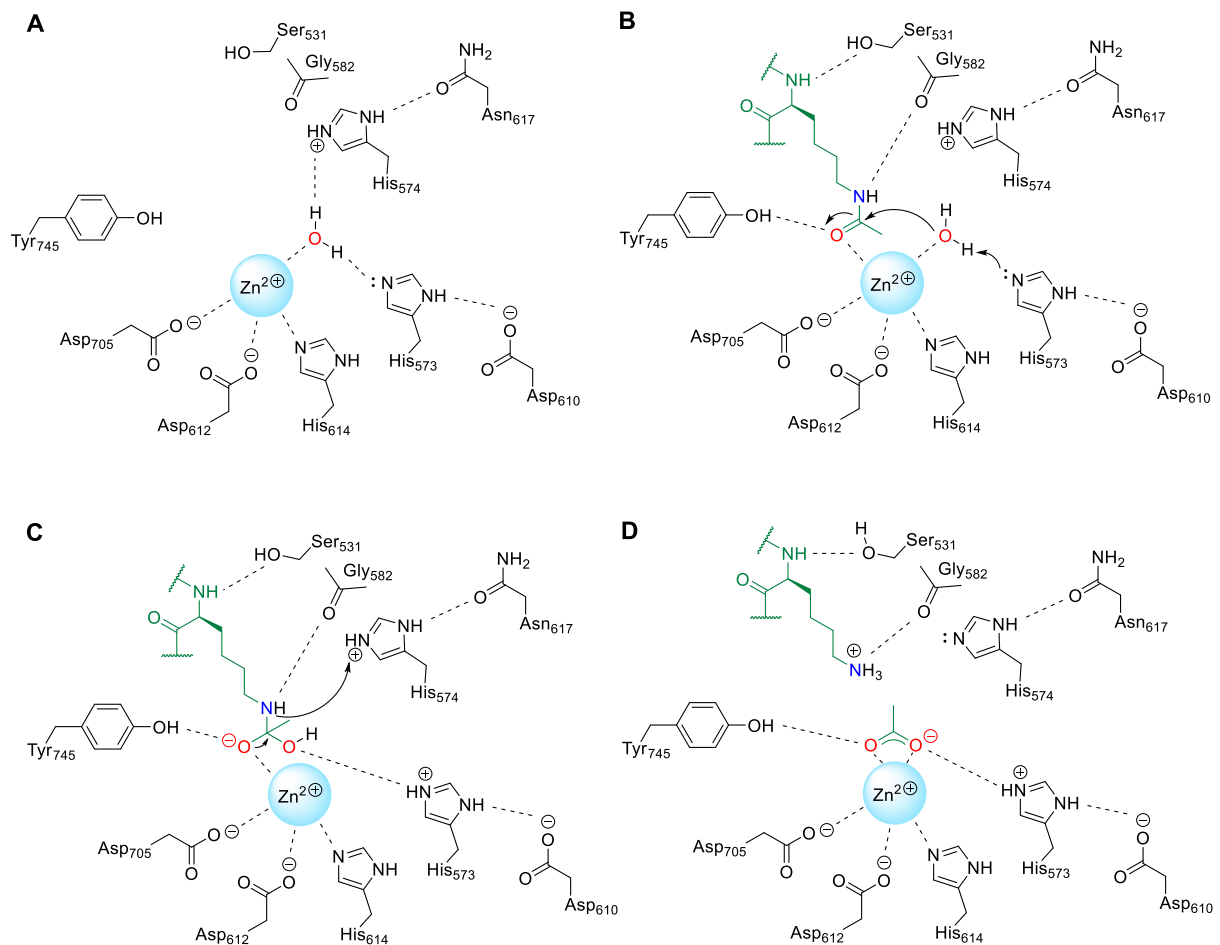


Abb. 5: Katalysemechanismus der KDAC6 in zCD2 (vgl. Hai und Christianson^[32]).

1.4.1.3 FUNKTIONEN DER KDAC6 UND ASSOZIIERTE KRANKHEITEN

Entsprechend der primär zytoplasmatischen Lokalisation wirkt KDAC6 an diversen Proteinen dieses Kompartiments und reguliert so eine Vielzahl zellulärer Prozesse. Die Proteine α -Tubulin^[55], HSP90^[56] und Cortactin^[57] stellen die hauptsächlichen Substrate der KDAC6 dar.

Am längsten bekannt und charakteristisch für KDAC6 ist die Deacetylaseaktivität gegenüber α -Tubulin. Dieses wird an Lys40 im Mikrotubulilumen von KDAC6, aber auch durch die NAD⁺-abhängige Deacetylase SIRT2 deacetyliert^[58]. Die Deacetylierung ist mit einer Depolymerisation der Mikrotubuli und einem Anstieg der Zellmotilität verbunden^[59]. Daneben beeinflusst KDAC6 auch die Aktin-abhängige Zellmotilität, indem der Acetylierungsstatus eines weiteren Zytoskelettproteins, des Cortactins, durch KDAC6 reguliert wird. Nur deacetyliertes Cortactin kann mit F-Actin interagieren und dadurch dessen Polymerisation und Verzweigung fördern^[57].

Neben der Assoziation an Mikrotubuli bindet KDAC6 auch an das molekulare Chaperon HSP90, welches wiederum mit verschiedenen Klienten-Proteinen, darunter HSF1 (heat shock transcription factor 1), verbunden ist. HSP90 ist unter anderem ein wichtiger Modulator bei der Signaltransduktion. Der Glucocorticoidrezeptor (GR) liegt im Zytoplasma zusammen mit HSP90 und Co-Chaperon Protein p23 vor. Dieser GR-Chaperonkomplex ist essenziell für die Bindung von Glucocorticoiden und die anschließende Aktivierung sowie Translokation des GR in den Zellkern, wo dieser als Transkriptionsfaktor fungiert. KDAC6 und die Deacetylaseaktivität gegenüber HSP90 ist erforderlich für die Aktivierung des GR und die sich anschließende Kaskade^[56].

KDAC6 ist zudem wesentlich bei der Eliminierung von falsch gefalteten Proteinen involviert, wobei ein Ubiquitin-Proteasom-System unabhängiger Mechanismus genutzt wird^[46]. Falsch gefaltete, polyubiquitinierte Proteine, die nicht durch Proteasome abgebaut werden können, bilden Proteinaggregate. KDAC6 ist in der Lage, diese Aggregate zu rekrutieren, indem die Ubiquitin-bindende Zinkfingerdomäne (ZnF) des Enzyms ein bestimmtes Motiv des Ubiquitins erkennt^[60]. Zugleich bindet KDAC6 an Proteine des Dynein-Motor-Komplexes (dynactin/p150^{glued})^[59] und ermöglicht so den Transport über das Mikrotubulinetzwerk hin zu den Mikrotubuli-organisierenden Zentren, wo die Bildung von Aggresomen stattfindet. Im Folgenden ist KDAC6 ebenfalls bei der Autophagie zur Verarbeitung der Aggresomen beteiligt^[61]. Hier fördert KDAC6 über die Aktivierung von Cortactin die F-Actin Neubildung an den aggregierten Proteinen und ermöglicht so über die Fusion von Autophagosomen und Lysosomen deren Beseitigung. KDAC6 liegt außerdem zusammen mit HSP90 und HSF1 vor. Die Bindung von KDAC6 an ubiquitinierte Proteine führt zur Dissoziation dieses Komplexes. Die anschließende Aktivierung von HSF1 hat wiederum die Expression weiterer Chaperone (HSP70 und HSP27) zur Folge^[62].

Ein weiteres spezifisches Substrat der KDAC6 sind die redoxregulatorischen Proteine Peroxiredoxin Prx I und Prx II, deren Hauptaufgabe es ist H_2O_2 zu reduzieren und die Zelle vor der Ansammlung freier Radikale zu schützen. Durch Acetylierung dieser antioxidativen Proteine werden deren reduzierenden Eigenschaften gesteigert, so dass über eine Hemmung der Deacetylaseaktivität der oxidative Stress der Zelle vermindert werden kann^[63].

Trotz der überwiegenden Aktivität gegenüber cytoplasmatischen Proteinen, vermittelt KDAC6 auch nukleäre Funktionen. In aktivierten T_{reg}-Zellen wandert KDAC6 in den Zellkern und reguliert den Acetylierungsstatus des Transkriptionsfaktors forkhead box p3 (Foxp3), der eine Schlüsselfunktion bei der Entwicklung und der Funktion von T_{reg}-Zellen hat. Durch Acetylierung von Foxp3 wird zum einen dessen Ubiquitin-vermittelter proteosomaler Abbau verhindert und zum anderen dessen Fähigkeit, an die DNA zu binden erhöht. Dies führt insgesamt zu einer Verstärkung des supprimierenden Effekts von T_{reg}-Zellen^[64].

Entsprechend der Beteiligung an einer großen Anzahl von zellulären Prozessen ist eine Fehlregulierung der KDAC6 auch mit diversen Krankheiten assoziiert. Eine Überexpression von KDAC6 wurde in diversen Krebszellarten wie z.B. östrogen-abhängigem Brustkrebs, Multiplen Myelom oder akuter myeloischer Leukämie nachgewiesen^[65]. Als krebsrelevante Mechanismen, in denen KDAC6 involviert ist, werden u.a. Zellmigration, Metastasierung, Angiogenese und zelluläre Stressantwort diskutiert. Bei der Immunhomöostase wirkt KDAC6 global betrachtet der T_{reg}-Zell-vermittelten Immunsuppression entgegen^[66], so dass durch KDAC6-Inhibition der immunsuppressive Effekt bei autoimmunologischen Erkrankungen und Alлотransplantaten verstärkt werden kann^[64]. Auch bei neurodegenerativen und neurologischen Erkrankungen ist KDAC6 in eine Reihe pathophysiologischer Ereignisse wie z.B. beeinträchtigtem mitochondrialem Transport, neuronalem oxidativem Stress oder Eliminierung von toxischen Proteinaggregaten verwickelt^[67-69]. In vielen Modellen zu den unterschiedlichsten Erkrankungen, wie etwa Morbus Alzheimer^[70-71], Charcot-Marie-Tooth^[72] oder Schlaganfall^[73], konnte durch eine KDAC6-Inhibition ein günstiger Effekt erzielt werden.

1.4.2 LYSIN-DEACETYLASE 8 (KDAC8)

1.4.2.1 STRUKTURELLE ORGANISATION UND SUBZELLULÄRE LOKALISATION

KDAC8 ist phylogenetisch nahe an der Grenze zu Enzymen der Klasse II und unterscheidet sich demnach strukturell von den anderen Enzymen der Klasse I. KDAC8 verfügt über keine C-terminale Proteinbindungsdomäne und wird deshalb nicht in Multiproteinkomplexen vorliegend gefunden. Ein weiterer Unterschied besteht in einer breiteren aktiven Bindungstasche mit einer größeren Öffnung zur Oberfläche. Die umgebende Proteinoberfläche ist äußerst verformbar und kann sich an verschiedene Substrate anpassen. Besonders ist auch die Phosphorylierung eines Serinrestes (Ser39) durch die Proteinkinase A (PKA) nahe dem aktiven Zentrum, wodurch die KDAC8-Aktivität vermindert wird^[35]. Als einziges Enzym der Klasse I ist KDAC8 sowohl im Zellkern als auch im Zytoplasma lokalisiert. Entgegen dem ubiquitären Vorkommen der anderen KDACs der Klasse I, zeigt KDAC8 gewebespezifische Expression und wurde in der glatten Muskulatur während der Differenzierung gefunden^[74]. Zudem assoziiert KDAC8 mit dem glattmuskulären Aktin (α -SMA) und reguliert die Kontraktilität der glatten Muskulatur^[75].

1.4.2.2 FUNKTIONEN DER KDAC8 UND ASSOZIIERTE KRANKHEITEN

Die KDAC8 wurde aufgrund der früh aufgeklärten Kristallstruktur mechanistisch und strukturell umfangreich untersucht. Die physiologischen Funktionen der KDAC8 dagegen blieben, mitunter bedingt durch die rudimentäre Substratkenntnis, weitestgehend unbekannt. Erst kürzlich wurden durch unterschiedliche Methoden einige nicht-Histon-Proteine als Substrate identifiziert^[76-77]. Darunter befinden sich der ERR- α (estrogen-related receptor alpha)^[78], SMC3 (structural maintenance of chromosome 3)^[79], p53^[80], ARID1A (AT-rich interactive domain-containing protein 1A)^[77] und Cortactin^[81]. Dagegen ist bisher umstritten, ob Histon-Proteine *in vivo* auch von KDAC8 deacetyliert werden^[82].

In den letzten Jahren wuchs zunehmend auch das Interesse an KDAC8 als selektives Target. Eine Überexpression von KDAC8 wurde in vielen Krebsarten des Erwachsenenalters nachgewiesen, wie z.B. dem T-Zelllymphom, aber auch beim Neuroblastom. Es konnte gezeigt werden, dass KDAC8 an der Pathogenese des Neuroblastoms beteiligt ist und eine erhöhte Expression mit einem besonders schweren Krankheitsverlauf einhergeht^[83]. Bei dem Cornelia de Lange Syndrom wurden Genmutationen in Proteinen des Cohesin-Komplexes (u.a. SMC3) oder in Cohesin-regulierenden Proteinen, wie KDAC8 festgestellt^[84]. Außerdem hat sich das schistosomale KDAC8 (smKDAC8) als vielversprechendes Target für die Therapie der Schistosomiasis, einer parasitären Erkrankung herausgestellt. Strukturelle Unterschiede zwischen schistosomaler und humaner KDAC8 im aktiven Zentrum ermöglichen ein selektives Eingreifen in den parasitären Organismus^[85].

1.5 INHIBITOREN DER LYSIN-DEACETYLASEN

Aufgrund vieler Krankheiten, bei denen eine Fehlfunktion von KDAC beobachtet wurde, sowie dem komplexen Netzwerk an KDAC-Interaktionen bei unzähligen zellulären Prozessen, ist die Entwicklung von KDAC-Inhibitoren ein interessantes Forschungsgebiet. Anfang der 1990er Jahre wurde der Naturstoff (*R*)-Trichostatin A (**1**) (TSA) aus dem Actinobakterium *Streptomyces hydropiscus* als erster spezifischer KDAC-Inhibitor entdeckt und dessen hemmende Wirkung auf Zellproliferation und Differenzierung beschrieben^[86] (Abb. 6). Seither wird intensiv an der Entwicklung von Inhibitoren dieses Targets geforscht. Bislang haben vier KDAC-Inhibitoren die Zulassung für den amerikanischen Markt erreicht. Ein Inhibitor davon trägt ebenfalls den Zulassungsstatus für den europäischen Markt und ein weiterer wurde für den chinesischen Markt zugelassen. Als erster Inhibitor wurde von der FDA 2006 SAHA (**2**) (Vorinostat, Zolinza®) zur Behandlung des kutanen T-Zell-Lymphoms zugelassen^[87]. SAHA (**2**)

inhibiert die Enzyme der Klasse I und II mit IC_{50} -Werten von etwa 50 nM^[88]. Große Aufmerksamkeit erhielt SAHA (**2**) kürzlich aufgrund eines möglichen neuen Einsatzgebiets in der HIV-Therapie. Der KDAC-Inhibitor **2** reaktiviert latente Viren in HIV-infizierten $CD4^+$ -T-Zellen, die durch antiretrovirale Therapie nicht erfasst werden. Durch eine geeignete Therapiestrategie nach Reaktivierung der HI-Viren soll eine vollständige Eradikation der infizierten Zellen erreicht werden^[89]. Das cyclische Peptid Romidepsin (**3**) (Istodax[®]), das aus dem Bakterium *Chromobacterium violaceum* isoliert wurde, erhielt ebenfalls von der FDA 2009 und 2011 die Zulassung zur Behandlung des kutanen und des peripheren T-Zell-Lymphoms^[90-91]. Romidepsin (**3**) agiert als Prodrug, dessen aktive Form nach intrazellulärer Spaltung der Disulfidbrücke eine Präferenz gegenüber den Enzymen der Klasse I zeigt^[92]. Mit Belinostat (**4**) (Beleodaq[®]) folgte 2014 eine weitere Zulassung zur Behandlung des peripheren T-Zell-Lymphoms für den amerikanischen Markt^[93]. Die jüngste Zulassung eines KDAC-Inhibitors erlangte 2015 Panobinostat (**5**) (Farydak[®]) durch die FDA und EMA zur Therapie des multiplen Myeloms in Kombination mit dem Proteasom-Inhibitor Bortezomib und Dexamethason^[94]. In China steht ebenfalls seit 2005 Chidamid (**6**) (Epidaza[®]), das die Isoformen KDAC1, 2, 3 und 10 hemmt, zur Behandlung des peripheren T-Zell-Lymphoms zur Verfügung^[95].

Viele weitere KDAC-Inhibitoren befinden sich in verschiedenen Phasen der klinischen Prüfung, wovon die meisten zur Behandlung maligner hämatologischer Erkrankungen und solider Tumore vorgesehen sind^[96].

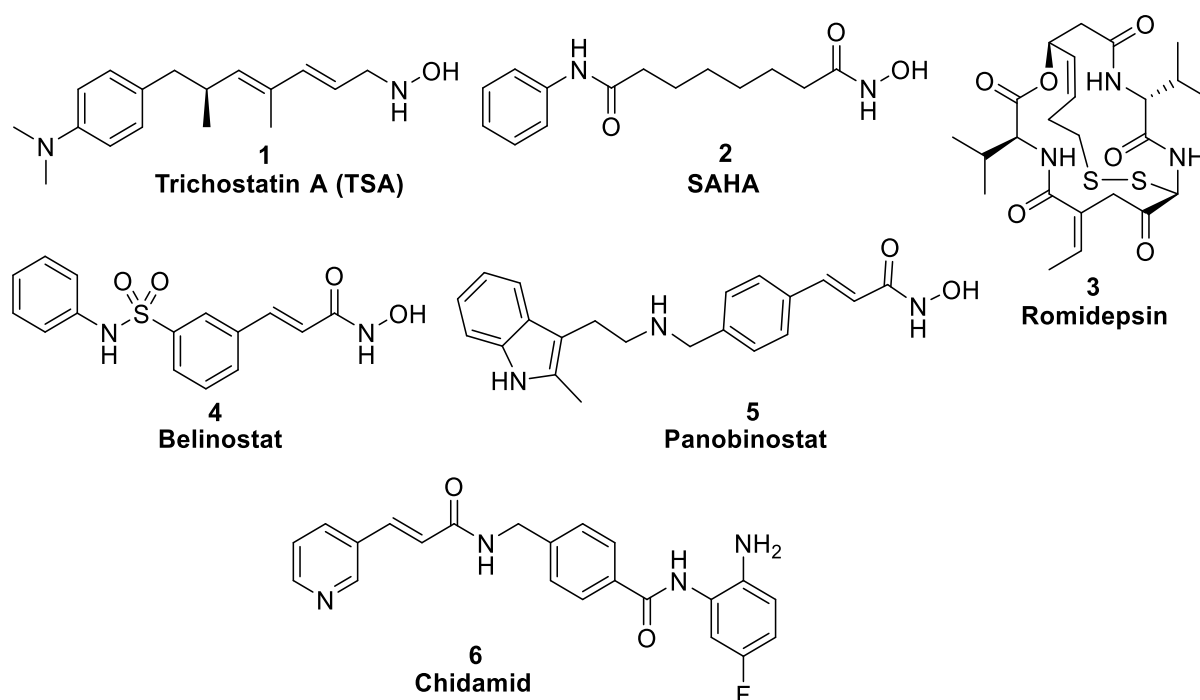


Abb. 6: Erster spezifischer KDAC-Inhibitor Trichostatin A (**1**) und KDAC-Inhibitoren mit Zulassungsstatus.

Die Inhibitoren der Zink-abhängigen KDAC verfügen über gemeinsame pharmakophore Gruppen (Abb. 7). Die Cap-Gruppe interagiert mit der Oberfläche bzw. der Randregion des aktiven Zentrums und ist hauptsächlich für die Selektivität zwischen den einzelnen Isoformen verantwortlich. Der Linker positioniert die beiden terminalen Gruppen und geht Wechselwirkungen mit dem hydrophoben Bindungskanal ein. Während auch durch den Linker zu einem gewissen Anteil Selektivität vermittelt werden kann, trägt die Zink-bindende Gruppe maßgeblich zur Bindungsaffinität bei^[97]. Je nach Struktur der Zink-bindenden Gruppe geht diese unterschiedlich viele koordinative Bindungen mit dem Zinkion und Wasserstoffbrückenbindungen zu den umliegenden Resten im aktiven Zentrum ein^[98].



Abb. 7: Allgemeiner Aufbau von Inhibitoren Zink-abhängiger KDACs.

Das Gros der KDAC-Inhibitoren beinhaltet als Zink-bindende Gruppe die Hydroxamsäure, da diese eine Reihe von Metallionen sehr potent zu komplexieren vermag. Jedoch ist deren Verwendung aufgrund geringer metabolischer Stabilität, schlechten pharmakokinetischen Eigenschaften (geringe Bioverfügbarkeit sowie kurze intravenöse Halbwertszeiten) und Toxizität nicht unumstritten. Alle von der FDA zugelassenen KDAC-Inhibitoren zeigen mutagene Effekte. Mechanistisch kann die Mutagenität der Hydroxamsäuren durch die Lossen-Umlagerung oder Hydrolyse zum mutagenen Hydroxylamin erklärt werden^[99]. Diese potenzielle Mutagenität der Hydroxamsäure-basierten KDAC-Inhibitoren stellt ein beträchtliches Hindernis für die Anwendung dieser Verbindungen in anderen Therapiegebieten außerhalb der Onkologie dar, weshalb parallel an Alternativen zu Hydroxamsäuren geforscht werden muss. Die Verwendung von computergestützten Modellen ist hierbei aber nur begrenzt möglich. Zinkionen zeigen die Eigenschaften einer harten und weichen Lewisäure. Dies erschwert die Simulation seiner Koordinationsgeometrie und Interaktionskraft mit den Heteroatomen unterschiedlicher ZBG^[100].

Verschiedene Gruppen wurden bereits auf ihre Zink-bindenden Eigenschaften evaluiert (Abb. 8). *Ortho*-Aminoanilide oder *ortho*-Hydroxyanilide inhibieren überwiegend die Isoformen der Klasse I^[101-102]. Eine Co-Kristallstruktur eines *ortho*-Aminoanilids mit KDAC2 zeigte, dass das Zinkion über das Stickstoffatom der *ortho*-Amingruppe und die Carbonylfunktion koordiniert wird^[103]. Weit fortgeschritten in der klinischen Prüfung ist MS275 (**7**) (Entinostat) von Syndax Pharmaceuticals in einer Phase III-Studie in Kombination mit dem Aromatasehemmer Exemestan zur Behandlung von fortgeschrittenem Brustkrebs (ClinicalTrials.gov 16.12.2017).

Ähnlich binden die α -Aminoamide, wie **8**, über die Aminogruppe und den Carbonylsauerstoff an das Zinkion. Diese Inhibitoren hemmen selektiv die Isoform 8 aus der Klasse I^[104]. Trifluormethylketone zeigen unterschiedliche Selektivitätsprofile gegenüber den einzelnen Isoformen^[105-107]. Das Trifluormethylketon **9** beispielsweise hat mit einem IC₅₀ von 70 nM sehr gute Affinität zu KDAC6, jedoch nur moderate Selektivität gegenüber KDAC1^[107]. Hai und Christianson^[32] konnten durch eine Co-Kristallstruktur eines Trifluormethylketons mit zKDAC6 zeigen, dass dieses als hydratisiertes geminales Diol an das Zinkion im aktiven Zentrum bindet und dass dieser Bindungsmodus den tetraedrischen Übergangszustand bei der Hydrolyse des natürlichen Substrats nachahmt. Der Prototyp für Thiole als Inhibitoren der KDAC-Enzyme ist das FDA-zugelassene Romidepsin (**3**). Thiole als potente Zink-bindende Gruppen sind bereits durch Inhibitoren des Angiotensin-Konversionsenzyms^[108] und von Matrix-Metalloproteasen^[109] bekannt, jedoch aufgrund ihrer Oxidationsempfindlichkeit auch problematisch. Als Weiterentwicklung dazu gelten Thioester-Prodrugs wie **10**^[110] oder Mercaptoacetamide^[111]. Mercaptoacetamide koordinieren in bidentater Weise an das Zinkion und bei einigen dieser Verbindungen, wie z.B. **11**, konnte KDAC6-Selektivität gezeigt werden. Es ist jedoch zu berücksichtigen, dass auch bei Verbindungen, die Thiolgruppen enthalten, mutagenes Potential festgestellt wurde^[112].

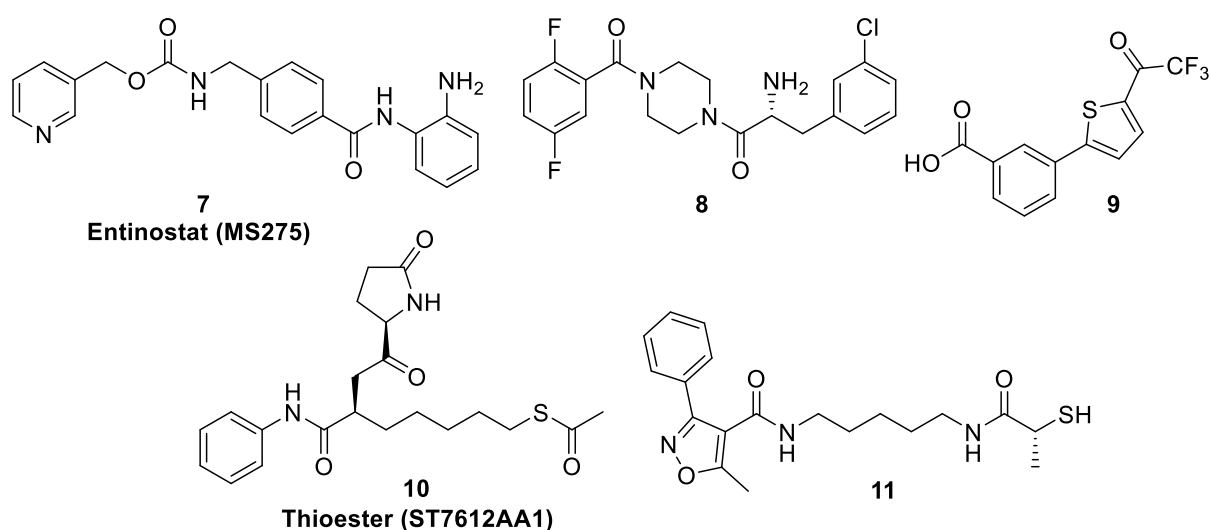


Abb. 8: KDAC-Inhibitoren mit alternativen Zink-bindenden Gruppen.

Die ersten Vertreter der KDAC-Inhibitoren, die derzeit zugelassen sind, ebenso wie viele weitere Kandidaten, die sich in klinischen Studien befinden, zeigen Wirkung gegenüber allen Isoformen und werden als sogenannte *pan*-Inhibitoren bezeichnet. Diese zeigen vermehrt schwerwiegende Nebenwirkungen, deren Hauptursache sogenannte Off-Target-Effekte sind, die auf der mangelnden Selektivität der Inhibitoren beruhen. Die Entwicklung von selektiven

KDAC-Inhibitoren ist daher von besonderer Relevanz. Diese könnten eine geringere generelle Toxizität aufweisen und neue Einsatzgebiete auch außerhalb der Krebstherapie eröffnen.

Die KDAC6 stellt hierfür ein interessantes Target dar, da selektive Inhibitoren dieses Enzyms besonders im Vergleich zu Inhibitoren der KDACs der Klasse I eine geringere allgemeine Toxizität aufweisen^[113-114]. Es konnte auch gezeigt werden, dass KDAC6-Knockout-Mäuse lebensfähig sind und sich eine Hyperacetylierung von α -Tubulin nicht schädlich auf die Entwicklung von Säugetieren auswirkt^[115]. Durch das Wirkspektrum der KDAC6 an nicht-Histonproteinen ermöglicht die Inhibition dieses Targets eine Modulation von weitestgehend transkriptionsunabhängigen Regulierungsprozessen.

1.5.1 INHIBITOREN DER LYSIN-DEACETYLASE 6

Der erste KDAC6-spezifische Inhibitor Tubacin (**12**) mit einem IC_{50} -Wert von 4 nM und einer mehr als 300fachen Selektivität gegenüber anderen KDAC-Isoformen wurde in einem multidimensionalen, chemisch-genetischen Screening identifiziert^[116-117] (Abb. 9). Da Tubacin (**12**) und der *pan*-Inhibitor SAHA (**2**) über die gleiche Zink-bindende Gruppe und den gleichen Linker verfügen, wird die Selektivität von Tubacin durch die ausladende Cap-Gruppe vermittelt. Als Pionierverbindung und nicht zuletzt wegen seiner Struktur und Eigenschaften diente dieser Inhibitor in vielen Untersuchungen als Forschungswerkzeug. Unter anderem konnte in einer Kombinationstherapie mit dem Proteasom-Inhibitor Bortezomib ein synergistischer Effekt bei der Behandlung des Multiplen Myeloms gezeigt werden, ohne dabei zytotoxisch gegenüber normalen peripheren mononukleären Blutzellen zu wirken^[118]. Mit ähnlicher Linkerstruktur wie Tubacin (**12**) wurde von Acetylon Pharmaceuticals ein potenter KDAC6-Inhibitor Ricolinostat (**13**) mit einem IC_{50} von 5 nM, jedoch mit moderater Selektivität gegenüber den Isoformen der Klasse I (10-20fach), entwickelt. Auch bei Ricolinostat (**13**) in Kombination mit Bortezomib konnte ein synergistischer Effekt durch gleichzeitiges Eingreifen in den Proteasom- und Aggreasom-abhängigen Proteinabbauweg auf Multiple Myelom-Zellen und in Xenograft-Modellen festgestellt werden^[119]. Bezüglich dieser Indikation konnte kürzlich für Ricolinostat (**13**) in Kombinationstherapie mit Bortezomib und Dexamethason in einer Phase I/II-Studie die Sicherheit, Verträglichkeit und Wirksamkeit bestätigt werden^[119]. Im Rahmen dieser Studie konnte auch gezeigt werden, dass unter Anwendung eines KDAC6-selektiven Inhibitors weniger schwerwiegende toxische Ereignisse auftreten als bei unselektiven Inhibitoren^[113]. Durch Homologie-Modelling wurde Tubastatin A (**14**) mit einer Benzyl-Linkerstruktur entwickelt. Mit einem IC_{50} -Wert von 15 nM an KDAC6 erzielte **14** sehr gute Selektivitäten (> 1000fach) gegenüber den anderen Isoformen, mit Ausnahme von KDAC8 (~57fach). Im Zellexperiment konnte durch Tubastatin A (**14**) ein neuroprotektiver Effekt gegenüber

oxidativem Stress^[117] sowie im Tiermodell des ischämischen Schlaganfalls eine Verbesserung der neuronalen Schädigung und funktionalen Defizite erzielt werden^[120]. In einem Tiermodell zur Alzheimer-Erkrankung konnte der kognitiven Beeinträchtigung entgegen gewirkt werden^[121]. In einem weiteren Tiermodell der Charcot-Marie-Tooth-Erkrankung mit einer Mutation im Hitzeschockprotein beta-1 Gen (HSPB1) konnten die Defizite im axonalen Transport durch Tubastatin A (**14**) verbessert werden^[72]. Tubastatin A (**14**) und weitere potente und selektive Tubastatin A-Analoga verstärkten den immunsuppressiven Effekt der Foxp3 enthaltenden T_{reg}-Zellen^[122]. Ein KDAC6-selektiver Inhibitor (~600fach gegenüber KDAC1) ebenfalls mit Benzyl-Linkerstruktur ist Nexturastat A (**15**) mit einem IC₅₀ von 5 nM. Dieser zeigte antiproliferative Aktivität gegen B16 Melanomzellen. HPOB (**16**), ein Inhibitor mit etwas geringerer Potenz und Selektivität (IC₅₀ 56 nM; ~50fach gegenüber KDAC1), wurde auf sein therapeutisches Potential als anti-Krebs Medikament untersucht. In Kombinationstherapie mit anderen Zytostatika (u.a. Doxorubicin) konnte HPOB (**16**) deren apoptotische Wirkung an transformierten, nicht aber an normale Zellen, verstärken^[123].

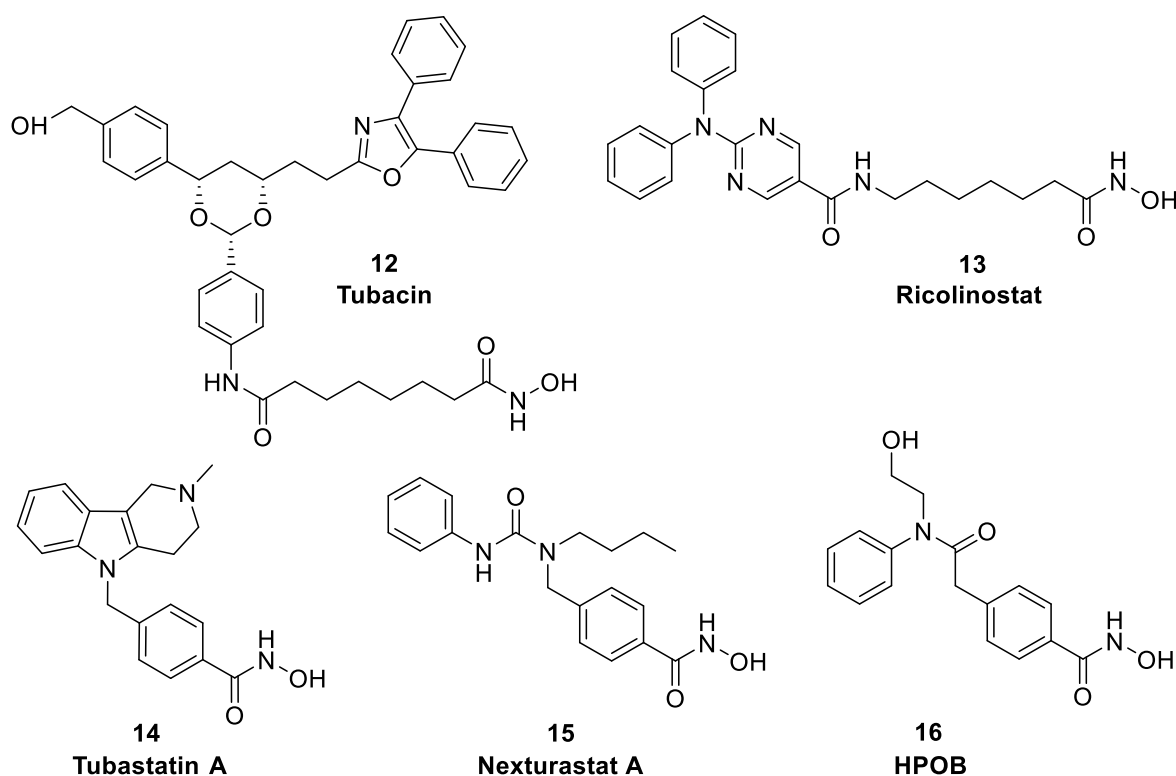


Abb. 9: Selektive KDAC6-Inhibitoren.

Hai und Christianson^[32] lieferten durch mehrere Kristallstrukturen der zweiten katalytischen Domäne (zCD2) der KDAC6 aus *Danio rerio* mit diversen Hydroxamsäure-basierten Inhibitoren wesentliche Erkenntnisse über den Bindungsmodus KDAC6-selektiver Inhibitoren. Während nicht-selektive Inhibitoren wie z.B. SAHA (**2**), Belinostat (**4**) oder Panobinostat (**5**)

über die Hydroxy- und Carbonylgruppe der Hydroxamsäure-Funktion in bidentater Weise an das Zinkion binden und dabei das assoziierte Wassermolekül verdrängen (**A**, Abb. 10), konnte bei dem KDAC6-selektiven Inhibitor HPOB (**16**) ein monodentater Bindungsmodus festgestellt werden (**B**, Abb. 10). Hier koordiniert nur die Hydroxygruppe der Hydroxamsäure an das Zinkion, wohingegen die Carbonylgruppe eine Wasserstoffbrücke zum gebundenen Wassermolekül ausbildet. Eine weitere Annäherung der Hydroxamsäure an das Zinkion wird durch die Beschaffenheit des Linkers verhindert. Durch weitere Kristallstrukturen von Miyake *et al.*^[37] mit Nexturastat A (**15**) konnte die Isoform-spezifische Gestalt der KDAC6 und deren relevanten Strukturelemente für die spezifische Inhibitor-Bindung beleuchtet werden.

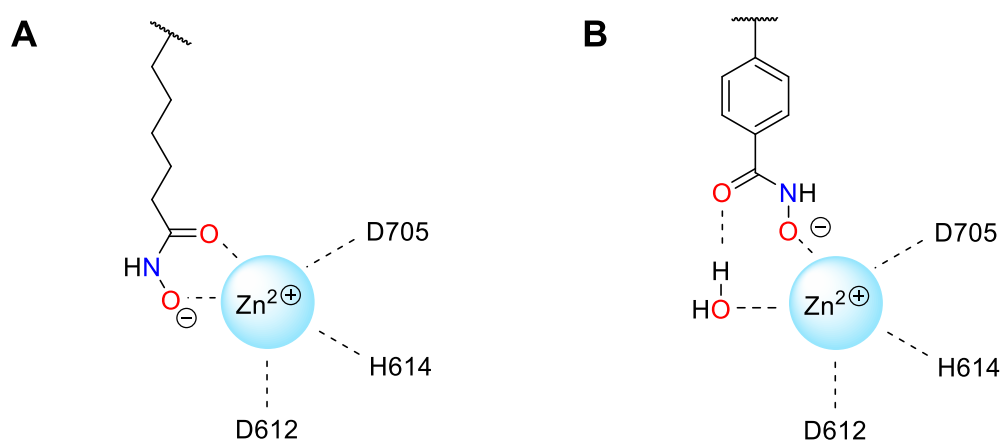


Abb. 10: Bindungsmodi von KDAC-Inhibitoren an KDAC6. **A**) bidentater Zn^{2+} -Bindungsmodus und **B**) monodentater Zn^{2+} -Bindungsmodus (vgl. Christianson *et al.*^[124]).

1.5.2 INHIBITOREN DER LYSIN-DEACETYLASE 8

Bis dato befindet sich kein selektiver KDAC8-Inhibitor in der klinischen Prüfung und auch nur wenige Daten zu präklinischen Untersuchungen liegen vor. Basierend auf den Daten aus Co-Kristallstrukturexperimenten wurde der häufig als „linkerlos“ bezeichnete Inhibitor **17** mit einem IC_{50} -Wert von 300 nM und einer mehr als 180fachen Selektivität gegenüber KDAC1 und KDAC6 entwickelt^[125] (Abb. 11). Einen KDAC8-Inhibitor mit hoher Aktivität (IC_{50} -Wert 10 nM) und gleichfalls hoher Selektivität (> 290fach) gegenüber anderen Isoformen repräsentiert PCI-34051 (**18**). Dieser zeigte Tumorselektivität und induzierte die Apoptose in T-Zell-abgeleiteten Lymphom- und Leukemiezelllinien, nicht aber in soliden und anderen hämatopoetischen Tumorzelllinien^[126]. Durch ein Screening von Triazol-basierten und durch Click-Chemie hergestellten Verbindungen wurde der etwas weniger selektive KDAC8-Inhibitor, NCC149 (**19**), mit einem IC_{50} von 70 nM identifiziert. Für diesen Inhibitor konnte die

zelluläre Selektivität durch die Acetylierung von Cohesin bewiesen und ein inhibitorischer Effekt auf T-Zelllymphom und Neuroblastom Zellen erzielt werden^[127].

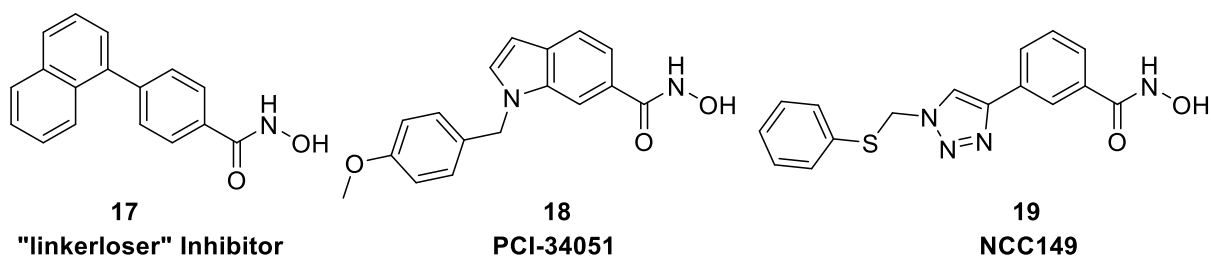


Abb. 11: Selektive KDAC8-Inhibitoren.

2 THEMENSTELLUNG UND SYNTHESEPLANUNG

2.1 THEMENSTELLUNG

Lysin-Deacetylasen sind an zahlreichen biologischen Prozessen beteiligt. Großes Interesse besteht daher an der Entwicklung von subtypenselektiven Inhibitoren, die gezielt in bestimmte zelluläre Prozesse eingreifen und dadurch sowohl bessere klinische Effekte erzielen als auch unerwünschte Nebenwirkungen reduzieren können. In Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Manfred Jung vom Institut für Pharmazeutische Wissenschaften der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg sollten neue selektive KDAC-Inhibitoren entwickelt werden.

Inspiriert war das Hauptprojekt dieser Arbeit, die Synthese KDAC6-selektiver Inhibitoren, durch den kurz zuvor publizierten und rasch prominent gewordenen Inhibitor Tubastatin A (**14**) (Abb. 12)^[117]. Dieser verfügt über ein 1,2,3,4-Tetrahydro- γ -carbolin-Strukturelement, kombiniert mit einer Hydroxamsäure als Zink-bindende Gruppe. Weitere Analoga mit anderen tricyclischen Ringsystemen als Cap-Gruppen wurden in dieser Publikation ebenfalls beschrieben, auch diese (Carbazol, 1,2,3,4-Tetrahydro- β -carbolin) zeigten nennenswerte Inhibition der KDAC6.

Da im Arbeitskreis Bracher seit langer Zeit intensiv an der Chemie oligo- und polycyclischer Heteroaromaten geforscht wird (β - und γ -Carboline, Fluorenone, Pyridoacridine, etc.), entstand die Idee, diese Expertise in der Heterocyclenchemie zu nutzen, um neue und attraktivere Cap-Gruppen für die KDAC-Inhibitoren zu entwickeln.

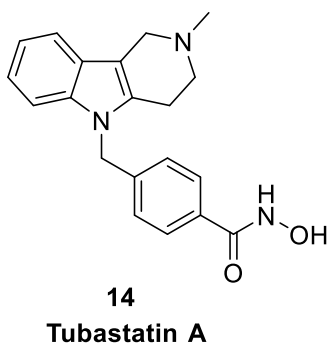


Abb. 12: Tubastatin A (**14**) als Leitstruktur für KDAC6-selektive Inhibitoren.

Wegen der zunächst fehlenden Kristallstruktur von KDAC6 basierte die Entwicklung von Tubastatin A (**14**) auf strukturellen Erkenntnissen, die aus Homologie-Modelling in Kombination mit synthetischen Ansätzen abgeleitet wurden^[117] (Abb. 13). Die Analyse von KDAC1 und KDAC6 zeigte, dass die Reste in den aktiven Zentren dieser beiden Isoformen

hoch konserviert sind, wohingegen sich die Form der aktiven Zentren beider Isoenzyme deutlich unterscheidet. Der Tunnel zum aktiven Zentrum von KDAC6 ist breiter und flacher als bei KDAC1, und auch die Ausdehnung an der Oberfläche des katalytischen Kanals ist bei KDAC6 größer. Demzufolge wurden daraus für das gängige KDAC-Inhibitor-Modell (Kapitel 1.5, Abb. 7) wichtige strukturelle Merkmale abgeleitet, die eine Isoformselektivität ermöglichen sollten. Eine große und rigide Cap-Gruppe sollte die Öffnung des katalytischen Kanals räumlich ausfüllen, um mit der Oberfläche des Isoenzyms interagieren zu können. Darüber hinaus sollte ein raumfüllender und relativ kurzer Linker die KDAC6-Selektivität fördern. Als optimierte Verbindung daraus verfügt Tubastatin A (**14**) mit einem Tetrahydro- γ -carbolin-Tricyclus über die geeignete Größe, sowie zudem durch die tertiäre Amin-Funktion über verminderte lipophile Eigenschaften. Des Weiteren erlaubt der Benzyl-Linker durch seine C(sp³)-N Verknüpfung mit der Cap-Gruppe und die daraus resultierende gewinkelte Konformation optimale Interaktionen mit der Randregion des katalytischen Zentrums.

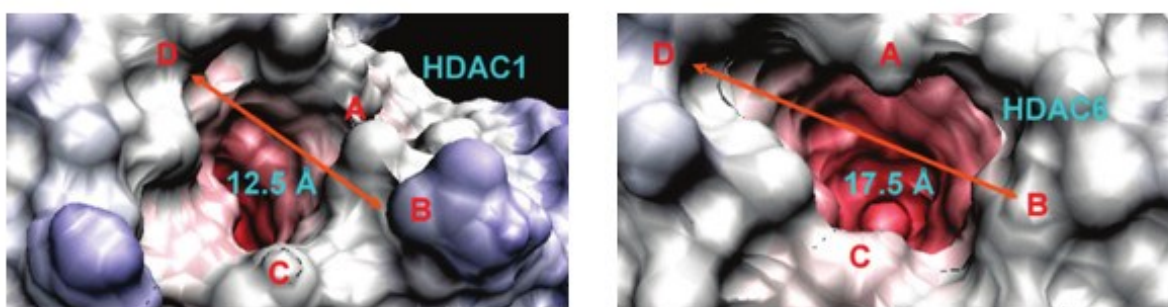


Abb. 13: Aktive Zentren von KDAC1 und KDAC6 im Homologie-Modell nach Butler *et al.*^[17] (Draufsicht). Der Durchmesser der Randregion des katalytischen Kanals wird durch orange Pfeile angegeben. Die Buchstaben A-D kennzeichnen die vier Grenzregionen, die den Rand des Kanals umgeben.

Basierend auf der Struktur von Tubastatin A (**14**) sollten strukturell andere Polycyclen eingeführt werden, um möglichst eine weitere Erhöhung der Aktivität an KDAC6 und der Selektivität gegenüber anderen KDAC-Isoformen zu erreichen. Zunächst wurde hierfür nur eine kleine Anzahl an Tricyclen ausgewählt. Die Aktivität und Selektivität der neu synthetisierten Inhibitoren wurde anschließend in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Manfred Jung in Freiburg mit Hilfe eines *in vitro* Testsystems bestimmt.

Schon zu einem sehr frühen Zeitpunkt der vorliegenden Arbeit stellte sich dabei die Verbindung **20** mit einer Phenothiazin Cap-Gruppe als sehr potenter und selektiver Inhibitor heraus, so dass im folgenden Verlauf der Arbeit die Hydroxamsäure **20** als Leitstruktur für alle weiteren strukturellen Modifikationen diente. Angesichts der fehlenden Kristallstruktur des Zielenzyms KDAC6 sollten Variationen sowohl an der Cap-Gruppe, dem Linker als auch der Zink-bindenden Gruppe (ZBG) vorgenommen werden, um dadurch den Einfluss der

verschiedenen Strukturelemente auf die Aktivität und Selektivität am isolierten Enzym ableiten zu können (Abb. 14).

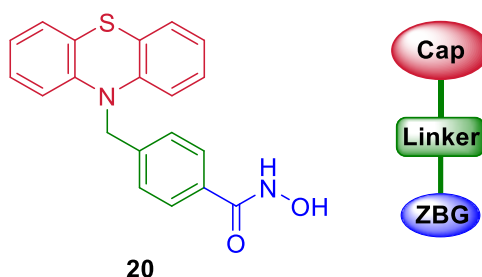


Abb. 14: Strukturanalogon von Tubastatin A mit Phenothiazin Cap-Gruppe als Ausgangspunkt für weitere Optimierungen.

Durch Modifikationen der Cap-Gruppe sollten strukturelle Unterschiede an der Oberfläche des katalytischen Kanals der unterschiedlichen KDAC-Isoformen ausgenutzt werden. Dazu wurden verschieden substituierte Phenothiazine, sowie am Schwefel oxidierte Phenothiazin-Grundstrukturen eingeführt. Ebenso sollte das Molekülgerüst der Phenothiazin-Grundstruktur variiert werden. Durch das Einbringen von ein oder zwei Stickstoffatomen an unterschiedlichen Positionen in einem oder beiden Benzolringen des Phenothiazins sollten verschiedene Aza- und Diazaphenothiazine aufgebaut werden. Zudem sollte einer der beiden Benzolringe durch einen Thiazol-Ring ersetzt werden, um auch die Rolle von Fünfring-Heteroanaloga der Phenothiazine auszuloten. Des Weiteren sollte das charakteristische Strukturelement des Tubastatin A (**14**), ein N-methylierter Tetrahydropyridinring, auf die Phenothiazin-Grundstruktur übertragen werden.

Bezüglich der Modifikation des Linkers sollte basierend auf den Erkenntnissen von Butler *et al.*^[117] dessen optimale Gestalt evaluiert werden, indem die Länge des Benzyl-Linkers um jeweils eine Methyleneinheit verlängert bzw. verkürzt werden sollte. Durch das Weglassen der Methylengruppe im Linker ist die Zielverbindung nicht mehr in der Lage, die oben erwähnte gewinkelte Struktur einzunehmen (hat dann aber Ähnlichkeit zu den in Kap. 1.5.2 beschriebenen, relativ starren KDAC8-Inhibitoren). Der homologe Arylethyl-Linker ist noch sehr viel flexibler als der Linker in den Leitsubstanzen **14** und **20**.

Schließlich sollte auch noch untersucht werden, ob sich die Hydroxamsäure-Funktion, die als eindeutig dominierende Zink-bindende Gruppe unter den publizierten KDAC-Inhibitoren auch mit einigen Nachteilen behaftet ist (vgl. Kapitel 1.5), durch andere potenziell Zink-bindende Gruppen ersetzen lässt, ohne nennenswert an Aktivität einzubüßen. Wie bereits dargelegt, wurde vereinzelt schon nach Alternativen zur Hydroxamsäure-Funktion geforscht. Die meisten erfolgreichen Verbindungen mit alternativen Zink-bindenden Gruppen zeigen jedoch Aktivität

an KDACs der Klasse I. Dieses Vorhaben, das auch zu einem Teil in der Masterarbeit von M. Morgenstern^[128] unter meiner Betreuung bearbeitet wurde, gründet in der Annahme, dass die Gesamtbindungsaffinität auch zu einem gewissen Anteil durch die Cap-Gruppe in Kombination mit einem geeigneten Linker vermittelt wird. Potenzielle Zink-bindende Elemente mit eventuell geringerer Bindungsstärke könnten, ausgehend von den optimalen Elementen (Phenothiazin-Cap und Benzyl-Linker), gegebenenfalls tolerierbar sein bzw. durch Ausnutzen der strukturellen Unterschiede in den aktiven Zentren der einzelnen Isoformen bestenfalls zu einem größeren Selektivitätsunterschied führen. Zudem wurde der Einfluss von literaturbekannten Zink-bindenden Gruppen, in Verbindung mit den genannten Elementen untersucht.

Parallel war in einem Teilprojekt geplant, auch KDAC-Inhibitoren zu entwickeln, die ein verkürztes, relativ starres Linkerelement aufweisen, ähnlich wie es auch in KDAC8-selektiven Inhibitoren anzutreffen ist (z.B. **17**; vgl. Kap. 1.5.2). Auch diese sollten in ihren Cap-Gruppen variiert werden. Dieser Verbindungstyp knüpft somit an die von KrennHrubec *et al.*^[125] und Wagner *et al.*^[129] beschriebenen selektiven Inhibitoren mit kurzer Linkerstruktur an (exemplarisch **17** und **21**, Abb. 15), die auch ähnlicher Art bei unserem Kooperationspartner in der Entwicklung sind^[130] (exemplarisch Verbindung **22**, Abb. 15).

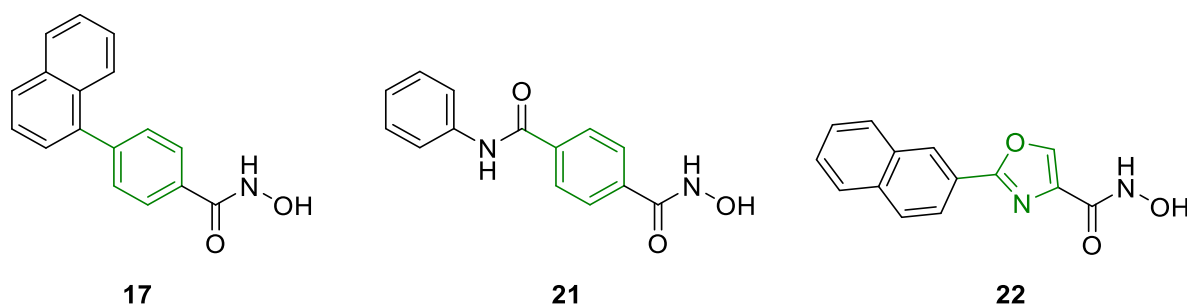


Abb. 15: KDAC-Inhibitoren mit kurzem und relativ starrem Linkerelement (grün markiert).

2.2 SYNTHESEPLANUNG

2.2.1 SYNTHESE VON POTENZIELLEN KDAC-INHIBITOREN MIT KURZEM LINKERELEMENT

Für die Darstellung von Verbindungen mit kurzem, relativ starrem Linkerelement, sollte eine Syntheseroute angewendet werden, mit der verschiedene polycyclische Cap-Gruppen aufgebaut und zugleich mit einem Phenyl-Linker verknüpft werden können (Abb. 16). Ausgehend von Anilinen **A** mit verschiedenen (hetero-)aromatischen Resten in *ortho*-Position sollte der Phenyl-Linker über eine Amidbindung mit einem geeigneten Synthesebaustein **B** angehängt werden. In einer anschließenden Cyclodehydratisierungsreaktion sollten die

unterschiedlichen Polycyclen **D** aufgebaut werden. Anschließend sollten aus den Carbonsäureestern **D** in einer effizienten Methode die Zink-bindenden Hydroxamsäuren **E** gebildet werden. Für die Einführung der Hydroxamsäurefunktion boten sich zwei Herangehensweisen an. Zum einen die direkte Synthese ausgehend von den Carbonsäureestern **D** mit Hydroxylamin im Alkalischen oder zum anderen die Umsetzung nach Hydrolyse zu den Carbonsäuren. Die Carbonsäuren sollten sich nach geeigneter Aktivierung mit Hydroxylamin in die Hydroxamsäuren **E** überführen oder mit O-geschütztem Hydroxylamin zu O-geschützten Hydroxamsäuren umsetzen lassen. Die freien Hydroxamsäuren **E** sollten anschließend nach Entfernung der Schutzgruppe erhalten werden. Wegen der literaturbekannten Schwierigkeiten, freie Hydroxamsäuren effektiv aufzureinigen, war es für die finalen Schritte von größter Bedeutung, dass diese möglichst quantitativ und ohne Bildung unerwünschter Neben- und Begleitprodukte ablaufen.

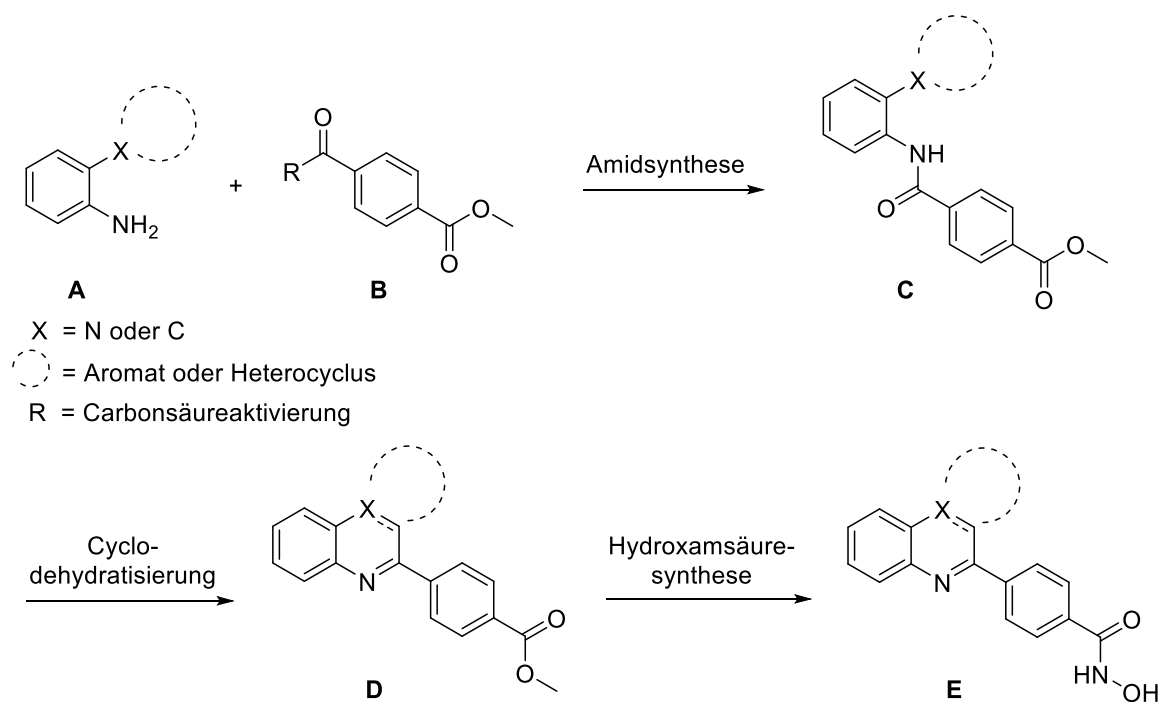


Abb. 16: Geplante Synthese von potenziellen KDAC-Inhibitoren mit Phenyl-Linkerelement in Analogie zu bekannten Inhibitoren mit kurzer, relativ starrer Linkerstruktur (vgl. Kap. 2.1).

2.2.2 SYNTHESE VON POTENZIELLEN KDAC6-SELEKTIVEN INHIBITOREN

2.2.2.1 SYNTHESE VON STRUKTURANALOGA DES TUBASTATIN A – HYDROXAMSÄUREN MIT BENZYL-LINKER KOMBINIERT MIT VERSCHIEDENEN CAP-GRUPPEN

Die Synthese von Strukturanaloga des Tubastatin A (**14**) sollte in Anlehnung an die publizierte Synthese der Hydroxamsäure **14** in wenigen Schritten erfolgen (Abb. 17). Hierzu sollte in einer N-Benzylisierung ein geeignetes Benzylhalogenid **B** mit Ester-Funktion in *para*-Position an

kommerziell erhältliche oder selbst synthetisierte Tricyclen **A** angehängt werden. Die so erhaltenen Carbonsäureester **C** sollten dann in einer etablierten Synthese in Hydroxamsäuren **D** überführt werden.

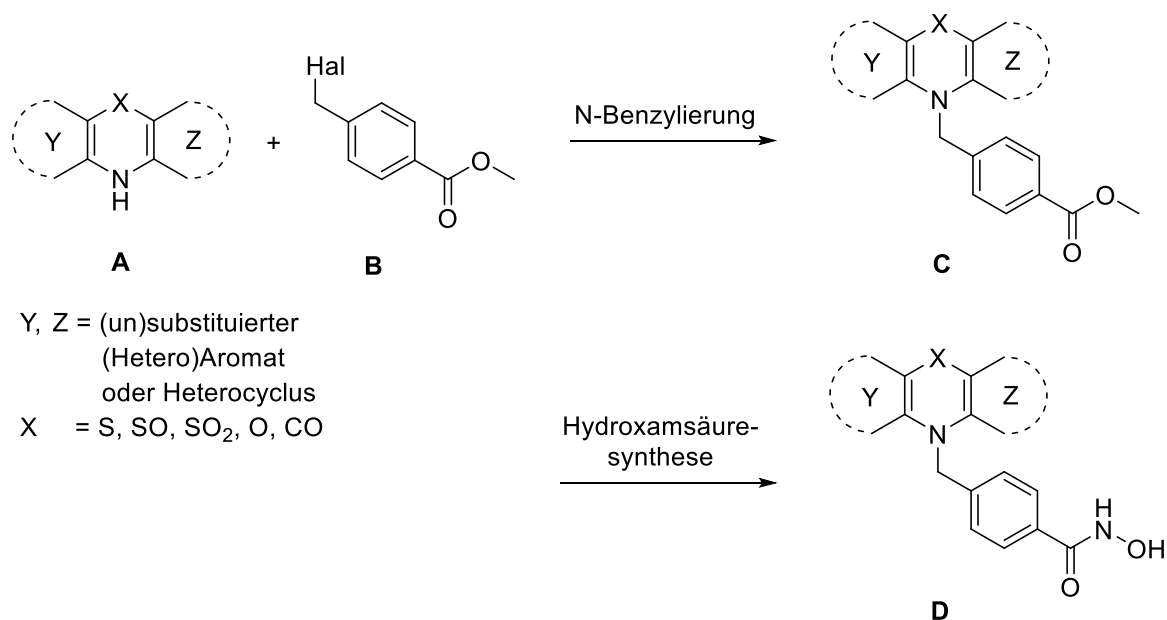


Abb. 17: Geplante Synthese von Strukturanaloga des Tubastatin A (**14**).

2.2.2.2 SYNTHESE VON STRUKTURANALOGA MIT MODIFIZIERTEM LINKER

Zur Untersuchung des Einflusses des Linkers auf die biologische Aktivität der Verbindungen war geplant, den Standardtyp aus dem Tubastatin A (**14**) und unserer selbst entdeckten Leitstruktur **20** mit einer Benzylgruppe jeweils um eine Methyleneinheit zu verlängern bzw. zu verkürzen (Abb. 18). Der Phenyl-Linker sollte in einer N-Arylierungsreaktion mit einem geeigneten Phenylhalogenid **A** mit Ester-Funktion in *para*-Position an die 10*H*-Phenothiazin-Grundstruktur **23** angehängt werden. Für die Einführung des Phenylethyl-Linkers hingegen war eine neuartige reduktive N-Phenylethylierung mit dem Enoetherbaustein **B** angedacht. Die Carbonsäureester **D** sollten durch anschließende Hydroxamsäurebildung mit einer etablierten Methode zu den gewünschten Zielverbindungen **D** führen.

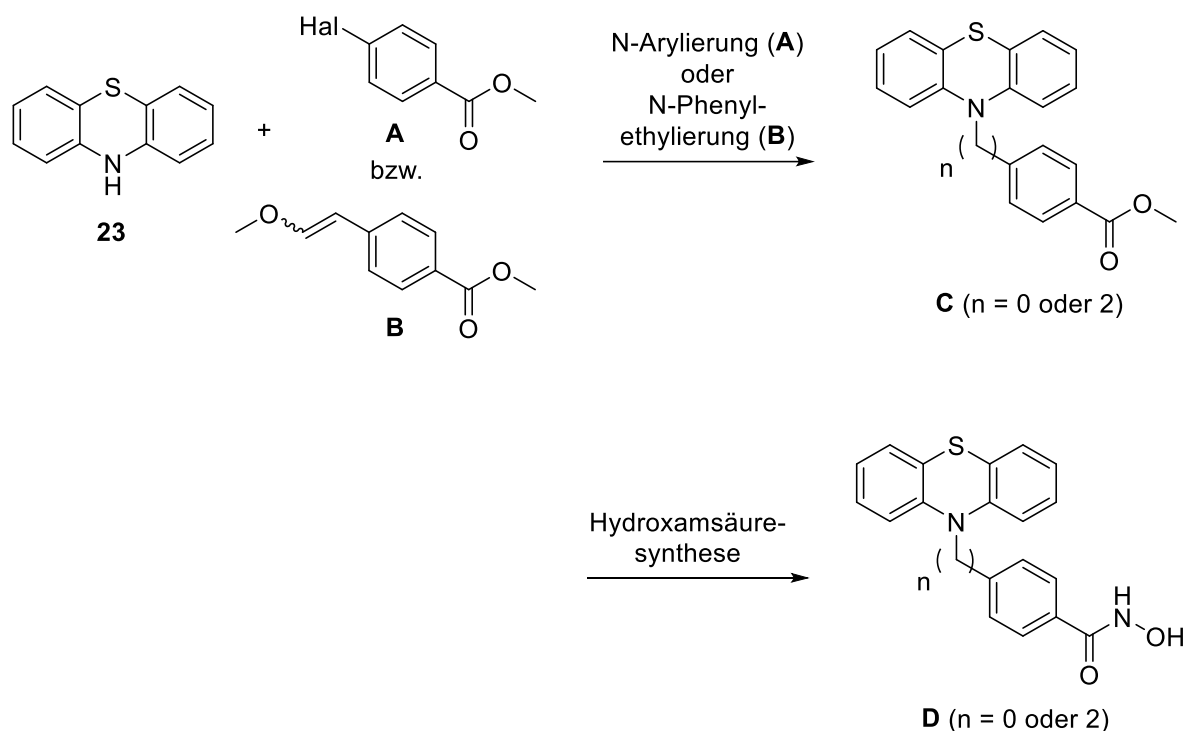


Abb. 18: Geplante Synthese von Strukturanaloga der Leitstruktur **20** mit modifiziertem Linker.

2.2.2.3 SYNTHESE VON STRUKTURANALOGA MIT DIVERSEN POTENZIELL ZINK-BINDENDEN GRUPPEN

Die Modifizierung der Zink-bindenden Gruppe an Position 1 des Benzyl-Linkers in der Leitstruktur **20** erforderte die Verwendung von Synthesebausteinen **A** mit unterschiedlichen Resten R. Ausgehend von den Zwischenstufen **24-27** sollte dann die Funktionalisierung zu den diversen potenziell Zink-bindenden Gruppen erfolgen (Abb. 19). Die anvisierten funktionellen Gruppen waren einerseits literaturbekannte Zink-bindende Gruppen, andererseits wurden einige auch von uns neu entwickelt (siehe nachfolgende Ausführungen).

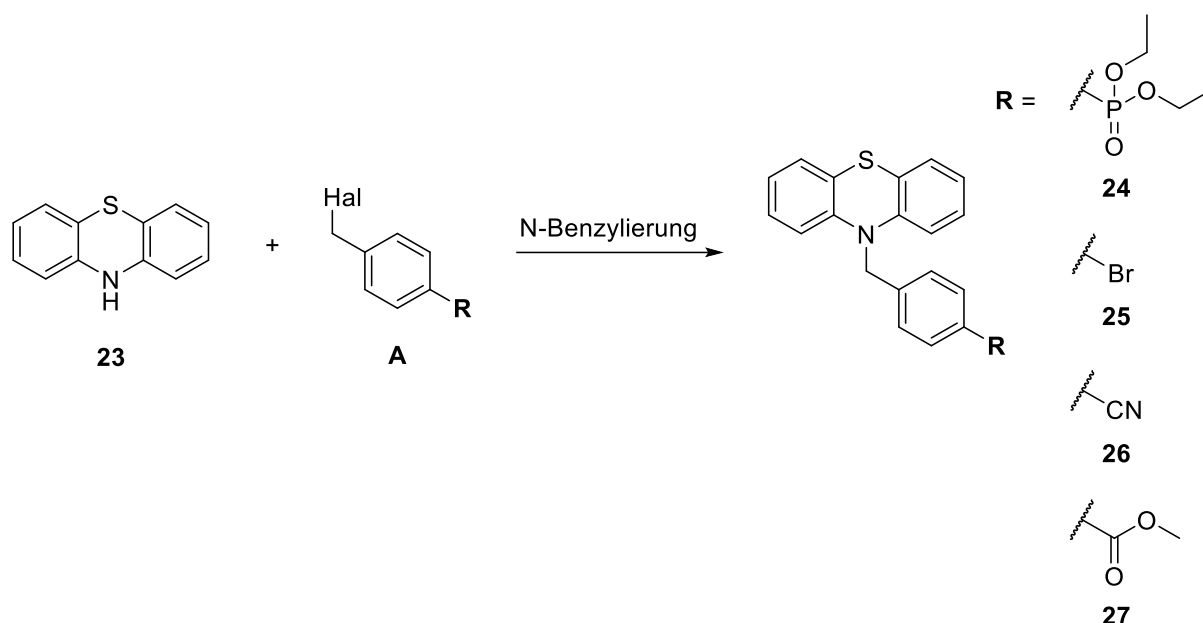


Abb. 19: Geplante Synthese der Zwischenstufen **24-27** als Ausgangspunkt für die weitere Funktionalisierung zu potenziell Zink-bindenden Gruppen.

2.2.2.3.1 FUNKTIONALISIERUNG DES PHOSPHONSÄUREDIEHTHYLESTERS **24**

Durch Hydrolyse sollte aus dem Phosphonsäurediethylester **24** die polare Metallionen-komplexierende Funktionalität des Phosphonats **28** freigesetzt werden (Abb. 20). Kapustin *et al.*^[131] beschreiben Phosphor-basierte SAHA-Analoga (Phosphoramidat, Phosphonat, Phosphinat) als Inhibitoren der KDAC8. In einem kürzlich durchgeführten computerbasierten virtuellen Screening wurde gezielt nach Alternativen zur Hydroxamsäure gesucht, um Therapeutika für neurodegenerative Erkrankungen zu entwickeln. Dabei wurden ebenfalls Phosphonate als potenzielle KDAC-Inhibitoren der Klasse IIa identifiziert^[132].

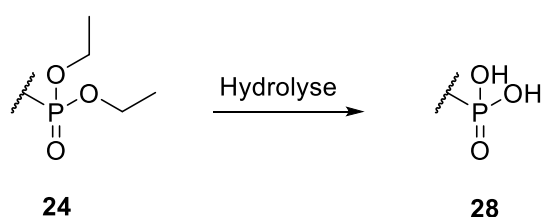


Abb. 20: Hydrolyse des Phosphonsäurediethylesters **24** zum Phosphonat **28**.

2.2.2.3.2 FUNKTIONALISIERUNG DES 4-BROMBENZYL-DERIVATS 25

Ausgehend vom 4-Brombenzyl-Derivat **25** sollte in einer Stille-Kupplung ein Isoxazolring **29** eingeführt werden, um diesen durch nachfolgende katalytische Hydrierung zum (Z)-Enaminoketon **30** zu spalten (Abb. 21). Diese funktionelle Gruppe ist bisher nicht als Strukturelement von Inhibitoren Zink-haltiger Proteine beschrieben, allerdings war angesichts der Ähnlichkeit zu *ortho*-Aminoaniliden (siehe Kap. 1.5) und der Z-Anordnung zweier potenzieller Liganden eine Affinität zu Zinkionen denkbar.

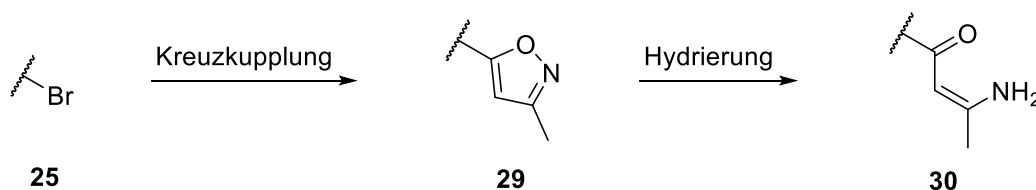


Abb. 21: Geplante Synthese eines potenziell Zink-bindenden Enaminoketons **30** aus dem 4-Brombenzyl-Derivat **25**.

2.2.2.3.3 FUNKTIONALISIERUNG DES 4-CYANOBENZYL-DERIVATS 26

Das 4-Cyanobenzyl-Derivat **26** ermöglicht mehrere Funktionalisierungen (Abb. 22). Neben der Umsetzung zum (Z)-Amidoxim **31** gestattet die Reduktion zum Amin **32** die weitere Überführung zum Carbamat **33** sowie zum Thioharnstoff-Derivat **34**. Die Funktionalität des Carbamats kommt in Santacruzamate A vor, einem Cytotoxin aus einem Cyanobakterium der Gattung *Symploca*. Dieses hat strukturelle Ähnlichkeit zu SAHA (**2**) und wurde 2013 von Pavlik *et al.*^[133] als wirksamer und selektiver KDAC-Inhibitor mit submikromolarer Aktivität gegenüber KDAC6 sowie subnanomolarer Aktivität gegenüber KDAC2 beschrieben. Später, im Jahr 2015, wurde die publizierte äußerst starke KDAC2-inhibitorische Aktivität angezweifelt und im Zuge dessen ein Santacruzamate A-Analogon mit *N*-Ethylharnstoff-Funktion synthetisiert. Dieses Analogon hemmte selektiv das Wachstum maligner Zellen in submikromolaren Konzentrationen^[134]. Beide möglicherweise Zink-bindenden Funktionen sollten daher mit dem *N*-Benzyl-Phenothiazin-Motiv unserer Leitstruktur **20** kombiniert werden.

Amidoxime hatten lange Zeit keine Aufmerksamkeit hinsichtlich einer möglichen Inhibition der KDAC erlangt^[135], obgleich diese funktionelle Gruppe als mono- und bidentater Ligand für etliche unterschiedliche Metallionen, einschließlich Zinkionen, bekannt ist^[136]. Erst kürzlich (2017) und bereits nach Abschluss der praktischen Tätigkeit zu dieser Arbeit wurde die Hydroxamsäure als Zink-bindende Gruppe in dem sehr potenten und KDAC6-selektiven

Inhibitor Nexturastat A (**15**) (siehe Kap. 1.5.1) auch durch eine Amidoxim-Gruppe ersetzt. Dieses Nexturastat A-Analogon zeigte jedoch keine Aktivität an KDAC6^[137].

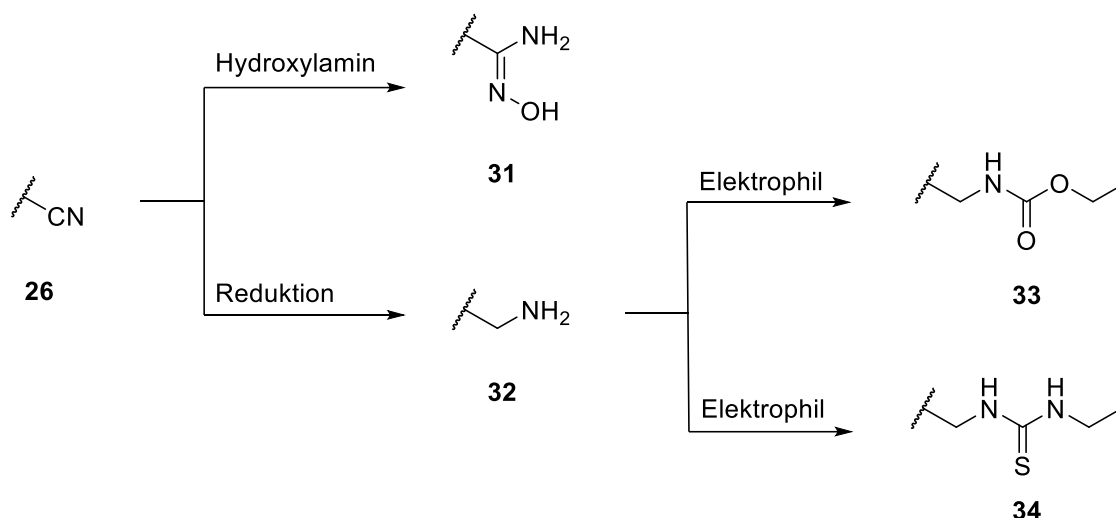


Abb. 22: Geplante Funktionalisierungen des 4-Cyanobenzyl-Derivats **26**.

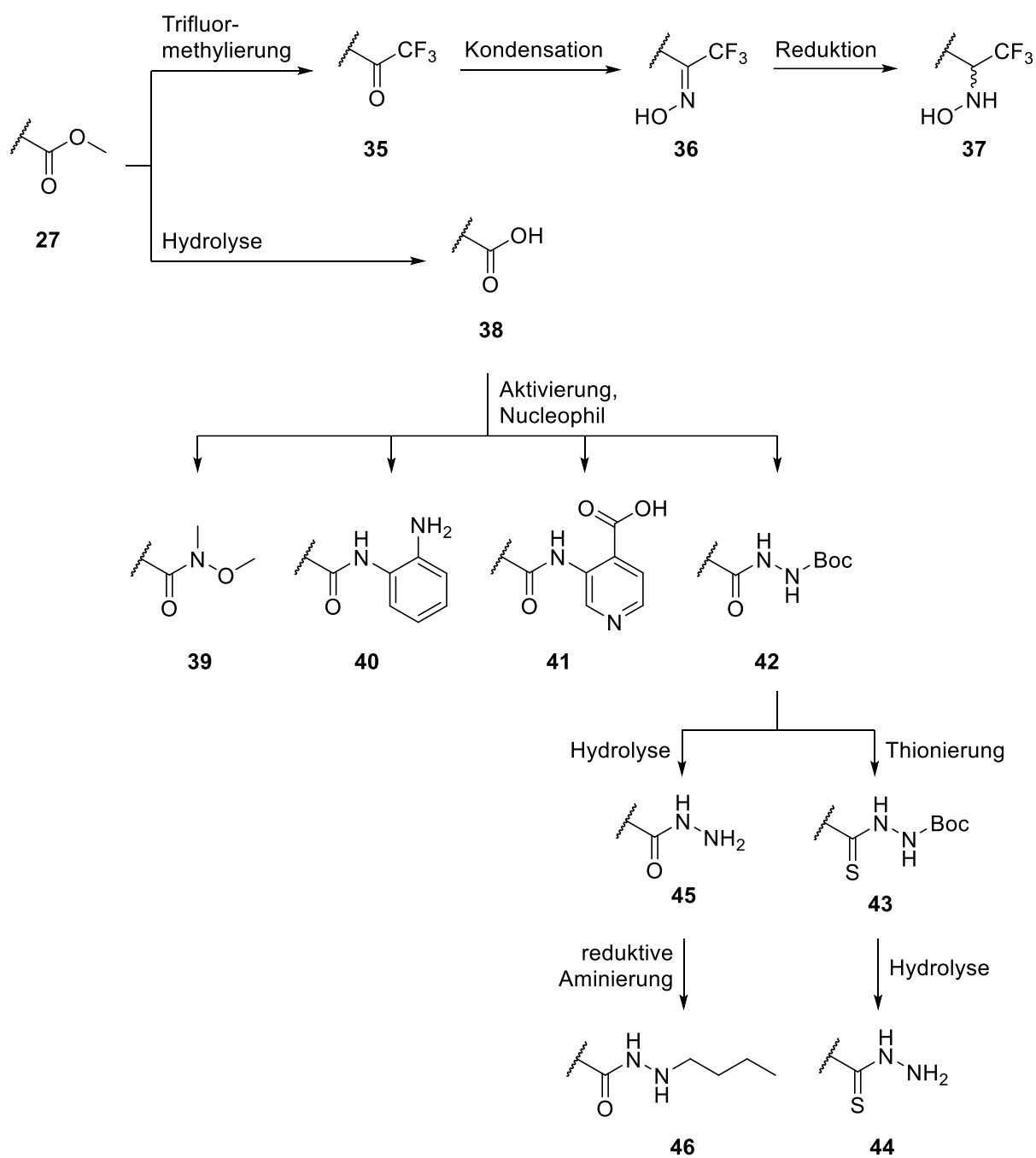
2.2.2.3.4 FUNKTIONALISIERUNG DES ESTERS **27**

Der Ester **27** sollte als zentraler Baustein für eine Vielzahl von Funktionalisierungen zum Aufbau alternativer Zink-bindender Gruppen dienen (Abb. 23).

Zanda *et al.*^[138] beschrieben erstmals, dass peptidische Amidgruppen durch Trifluorethylamine ersetzt werden können und synthetisierten partiell modifizierte $\Psi[\text{CH}(\text{CF}_3)\text{NH}]$ -Peptide. In Anlehnung an die Arbeiten von Hoffmann *et al.*^[139] zur Synthese von Trifluorethylaminen für die Entwicklung neuer Leitstrukturen entstand die Idee, den Carbonyl-Sauerstoff der Hydroxamsäure durch eine Trifluormethylgruppe auszutauschen. Diese bioisostere Funktionalität der Hydroxamsäure **37** könnte sich hinsichtlich der metabolischen Stabilität der Hydroxamsäure überlegen zeigen, da auch den Peptiden mit Trifluorethylamin-Partialstruktur eine erhöhte proteolytische Stabilität zugewiesen werden konnte^[138]. In einer Syntheseroute sollte daher ausgehend vom Ester **27** zuerst mittels Ruppert-Prakash Reagenz das Trifluormethylketon **35** gebildet werden. Trifluormethylketone besitzen ebenfalls KDAC-inhibitorisches Potenzial und KDAC6-selektive Vertreter wurden bereits gefunden (siehe Kapitel 1.5). Nach Kondensation des Trifluormethylketons **35** mit Hydroxylamin zum (*E*)-Trifluormethyloxim **36** sollte dieses zum Trifluorethylhydroxylamin **37** reduziert werden.

In einer zweiten Syntheseroute sollte der Ester **27** zur Carbonsäure **38** hydrolysiert werden, um dann nach Aktivierung mit diversen Nucleophilen umgesetzt werden zu können (**39-42**) (Abb. 23).

Mit der zweifach methylierten Hydroxamsäure **39** sollte eine potenzielle Zink-Koordination auch ohne die Möglichkeit zur Ausbildung einer O-deprotonierten Hydroxamsäure-Funktion evaluiert werden, da in einzelnen Röntgenkristallstrukturanalysen die neutrale Form der Hydroxamsäure im aktiven Zentrum angenommen wurde^[34-35, 98]. Ein Vorteil der substituierten Hydroxamsäure **39** wäre eine unkompliziertere Handhabung aufgrund der geringeren Polarität und Labilität bei der Synthese bzw. Aufreinigung. Das *ortho*-Aminoanilid ist eine bekannte Zink-bindende Gruppe bei den KDAC-Inhibitoren und sollte daher in Kombination mit der Phenothiazin Cap-Gruppe und dem Benzyl-Linker in der Zielverbindung **40** untersucht werden. In Anlehnung daran erschien auch eine Zink-Komplexierung durch die 3-Aminoisonicotinsäure **41** denkbar, da hier wie bei der Hydroxamsäure eine Koordination an das Zinkion über den Carbonyl- und Hydroxyl-Sauerstoff stattfinden könnte. Carbonsäurehydrazide bilden mit einer Reihe von zweiwertigen Metallionen Komplexe^[140]. Wang *et al.*^[141] beschrieb das KDAC-inhibitorische Potenzial eines *N*-Butylhydrazids mit moderater Selektivität für Isoenzyme der Klasse I. Dagegen wurde vor kurzem (2016), nach erfolgter Synthese des hier dargestellten Hydrazids **45**, das unsubstituierte Hydrazid als Zink-bindende Gruppe für eine selektive KDAC6-Inhibition im niedrigen μM -Bereich identifiziert^[100]. Auch Thiohydrazide stellen bekannte Metallchelatoren dar. Als prominentes Beispiel ist hier Dithizon, welches auch zur Bestimmung von Zinkionen verwendet wird, zu nennen^[142]. Zur Synthese der genannten Zielverbindungen sollte nach Umsetzung der Carbonsäure **38** zum Boc-geschützten Hydrazid **42** mit Lawessons Reagenz in die entsprechende Thiocarbonylverbindung **43** überführt werden. Die Entschützung von **42** und **43** sollte das Hydrazid **45** sowie das Thiohydrazid **44** liefern. Anschließend sollte durch reduktive Aminierung das Hydrazid **45** zum *N*-Butylhydrazid **46** funktionalisiert werden.

Abb. 23: Geplante Funktionalisierung des Esters **27** zu einer Vielzahl potenziell Zink-bindender Gruppen.

3 SYNTHESEN

Der Syntheseteil ist in mehrere Themengebiete aufgliedert und basiert auf dem allgemeinen Aufbau Zink-abhängiger KDAC-Inhibitoren (Cap-Linker-ZBG) sowie Strukturelementen bekannter KDAC-Inhibitoren und der selbst entwickelten Leitstruktur **20**. Die einzelnen Elemente Cap-Gruppe, Linker und Zink-bindende Gruppe werden in den einzelnen Abschnitten weiter untersucht und im Detail beschrieben.

Der erste Abschnitt beschäftigt sich mit der Synthese der am häufigsten verwendeten Zink-bindende Gruppe, der Hydroxamsäure. In diesem Kapitel werden zudem noch die Synthesen von potenziell Zink-bindenden Gruppen ausgehend von der Leitstruktur **20** beschrieben.

Diesem schließt sich ein Abschnitt über die Variationen des Linkerelements, ausgehend von der Leitstruktur **20**, und einer im Zuge dessen entwickelten neuen Methode zur Arylethylierung von Anilinen und N-Heterocyclen an.

Zuletzt wird im dritten Abschnitt die Synthese unterschiedlicher Cap-Gruppen beschrieben und durch Kombination dieser mit Linker-Elementen und der Hydroxamsäure-Funktion als Zink-bindende Gruppe die Synthese von weiteren Inhibitoren vorgestellt.

3.1 SYNTHESEN VON VERBINDUNGEN MIT DIVERSEN ZINK-BINDENDEN GRUPPEN

3.1.1 SYNTHESEN VON VERBINDUNGEN MIT HYDROXAMSÄURE-FUNKTION

Die Einführung der Hydroxamsäure-Funktion stellte in der vorliegenden Arbeit den finalen und oftmals auch kritischsten Schritt in einer Synthesesequenz dar. Typischerweise erfolgt die Darstellung der Hydroxamsäure durch Umsetzung von Hydroxylamin oder *O/N*-geschütztem Hydroxylamin mit einer aktivierten Carbonsäure oder direkt mit einem Ester. Obwohl einige Methoden zur Herstellung von *O*-geschützten Hydroxamsäuren gut funktionieren, stellt die finale Herstellung der freien Hydroxamsäuren häufig ein Problem dar und die Ausbeuten sind oftmals nur mäßig^[143]. Aufgrund ihrer labilen und sehr polaren Eigenschaften wird die Hydroxamsäurefunktion, wenn möglich, erst am Ende der Syntheseroute eingeführt beziehungsweise im letzten Schritt aus ihrer geschützten Form freigesetzt. Bedingt durch die diversen Cap-Gruppen wurden im Laufe der Arbeit verschiedene Versuche unternommen, eine praktikable Methode zur Einführung der Hydroxamsäurefunktion zu finden. Die vollständigen Synthesen zu den Zielverbindungen, die vereinzelt hier schon erwähnt werden, werden in Kap. 3.3 im Detail dargestellt.

3.1.1.1 HYDROXAMSÄURESYNTHESE AUSGEHEND VOM ESTER

Eine einfache und effiziente Methode stellt die direkte Synthese ausgehend von einem Ester mit Hydroxylamin unter basischen Bedingungen ($\text{pH} > 10$) dar. Hydroxylamin als Reinstoff zersetzt sich bei Anwesenheit von Luftsauerstoff sehr schnell, oberhalb von $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ sogar explosionsartig. Wegen dieser Instabilität ist Hydroxylamin nur in Salzform bzw. wässriger Lösung (50 wt. %) unter Schutzatmosphäre erhältlich. In Anlehnung an die Methode des EU-Patents von Methylgene^[144] wurde – allerdings erfolglos – versucht, einen Ester des Typs **A** bei Raumtemperatur unter alkalischen Bedingungen direkt in die Hydroxamsäure zu überführen (Abb. 24, Tab. 1: *i*). Auch bei erhöhter Temperatur und in einem alternativen Lösungsmittelgemisch, in dem der Ester gelöst vorlag (Abb. 24, Tab. 1: *ii*) konnte das gewünschte Produkt nicht dargestellt werden. Ebenso erfolglos verlief der Versuch in Anlehnung an eine Methode von Diedrich *et al.*^[145] die Hydroxamsäure ausgehend vom Ester des Typs **B** unter Mikrowellenbedingungen (Abb. 24, Tab. 1: *iii*) herzustellen. Nach 5 h war noch eine große Menge an Ester vorhanden und unter den entstandenen Verbindungen konnte kein Produkt detektiert werden. Einer Publikation von Ho *et al.*^[146] nach soll durch Zugabe von geringen Mengen Kaliumcyanid die umgesetzte Menge an Ester zur Hydroxamsäure gesteigert werden. Im Falle der Modellreaktion mit dem Ester **C** (Abb. 24, Tab. 1: *iv*) war diese Methode auch nicht zielführend. Neben nicht umgesetztem Ester konnte keine Verbindung isoliert werden, die der Hydroxamsäure zuzuordnen war, so dass dieser Syntheseweg aufgegeben wurde.

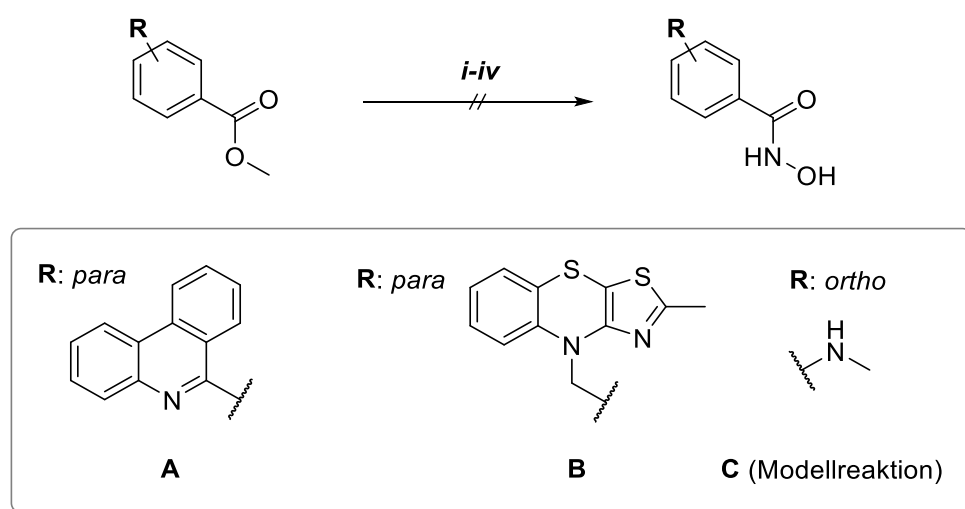


Abb. 24: Versuche zur Synthese von Hydroxamsäuren ausgehend von Methylestern.

Exp.	R	Reagenz	Lösungsmittel	Base	Bedingung /Zeit	Ausbeute [%]
<i>i</i>	A	H ₂ NOH*HCl (18.2 eq.)	MeOH/THF (1:1)	KOH (22.2 eq.)	RT, 45 min	0
<i>ii</i>	A	H ₂ NOH*HCl (18.2 eq.)	1,4-Dioxan/H ₂ O (2:1)	KOH (22.2 eq.)	80 °C, 18 h	0
<i>iii</i>	B	H ₂ NOH*HCl (10 eq.)	MeOH	NaOMe (7.5 eq.)	MW, 55 °C, 145 W, 5 h	0
<i>iv</i>	C	H ₂ NOH, 50 wt. % in H ₂ O (18.9 eq.) KCN (0.13 eq.)	MeOH/THF (1:1)	–	RT, 33 h	0

Tab. 1: Versuche zur Synthese von Hydroxamsäuren ausgehend von Methylestern.

3.1.1.2 HYDROXAMSÄURESYNTHESSE UNTER VERWENDUNG VON SCHUTZGRUPPEN

3.1.1.2.1 HYDROXAMSÄURESYNTHESSE UNTER VERWENDUNG DER BENZYLSCUTZGRUPPE

Remiszewski *et al.*^[147] verwendeten eine O-Benzyl-geschützte Hydroxamsäure in ihrer Synthese. In einem One-Pot-Verfahren wird zuerst der Ester alkalisch hydrolysiert und anschließend mit einem Carbodiimid unter Zusatz von 1-Hydroxybenzotriazol (HOBt) aktiviert und mit O-Benzylhydroxylaminhydrochlorid in die geschützte Hydroxamsäure überführt. Die Abspaltung der Schutzgruppe erfolgt mittels katalytischer Hydrierung. Vorteil der Benzylschutzgruppe ist, dass bei der hydrogenolytischen Abspaltung Toluol als ein leicht flüchtiges Produkt entsteht, das sich im Vakuum leicht entfernen lässt. Im Idealfall sollte dadurch nach Abfiltrieren des Katalysators und Einrotieren des Filtrates die saubere Hydroxamsäure erhalten werden. In Anlehnung an diese Methode konnten aus den Estern des Typs **A** und **D** die entsprechenden Benzyl-geschützten Hydroxamsäuren synthetisiert werden (Abb. 25). Die hydrogenolytische Entschützung gelang zwar prinzipiell, jedoch wurden auch einige Nebenprodukte gebildet und die anschließende Aufreinigung erwies sich als unpraktikabel, so dass diese Syntheseroute ziemlich bald verworfen wurde.

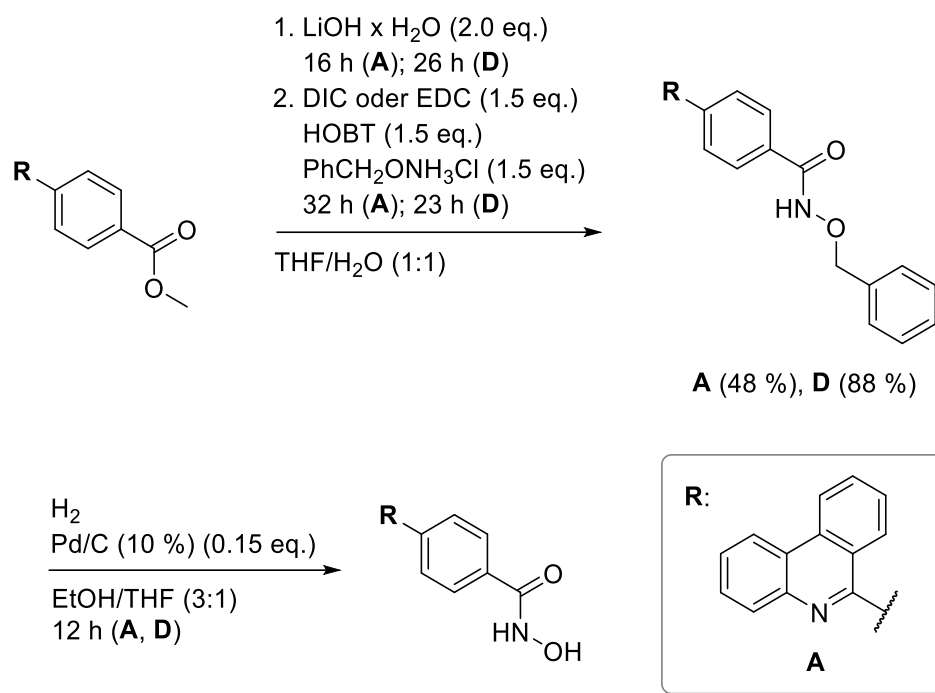


Abb. 25: Versuche zur Synthese von Hydroxamsäuren über O-Benzyl-geschützte Hydroxamsäuren und anschließende Entschützung.

Nikam *et al.*^[148] berichten ebenfalls von einer unsauberen Entschützung von O-Benzylhydroxamsäuren und einer Überhydrierung zum entsprechenden primären Amid. Die Autoren entwickelten eine effiziente Methode *via* katalytischer Hydrierung unter Verwendung eines partiell vergifteten Katalysators (Pd/BaSO₄, Rosenmund-Katalysator) und konnten gute bis exzellente Ausbeuten ohne Bildung der entsprechenden primären Amide verzeichnen. Nach Abspaltung der Schutzgruppe führen die Autoren aber dennoch eine Säulenchromatographie durch, was darauf hindeutet, dass die Entschützung, obgleich ohne Überhydrierung zum primären Amid, nicht sauber abgelaufen ist. Um aber eine zusätzliche Säulenchromatographie nach Entschützung zu umgehen, wurde eine alternative, leichter spaltbare Schutzgruppe gewählt (siehe nachfolgendes Kapitel 3.1.1.2.2).

3.1.1.2.2 HYDROXAMSÄURESYNTHESE UNTER VERWENDUNG DER THP-SCHUTZGRUPPE

3.1.1.2.2.1 AKTIVIERUNG MITTELS EDC UND HOBT

Die THP-Schutzgruppe eignet sich zum Schützen von Alkoholen, Phenolen, aber auch Hydroxamsäuren. Es entsteht formal ein Acetal, welches basenstabil ist, sich aber mit Säuren leicht entschützen lässt. Dabei entsteht 2-Dihydropyran, sowie bei Anwesenheit von Wasser 2-Tetrahydropyranol, das in der sauren Umgebung weiter zum 5-Hydroxypentanal gespalten

wird, welches wiederum zu Nebenreaktionen führen kann^[149]. Wie bei Thaler *et al.*^[150] beschrieben wurden nach alkalischer Hydrolyse der Ester des Typs **A** und **E** die gebildeten Carbonsäuren durch Aktivierung mit EDC und HOBt in die O-Tetrahydropyranyl (THP)-geschützten Hydroxamsäuren überführt (Abb. 26). Die Hydroxamsäuren wurden nach Spaltung der THP-Schutzgruppe durch Salzsäure in 1,4-Dioxan aus Dichlormethan in Form ihrer Hydrochloride erhalten. Die gewünschten Produkte konnten durch das Ausfällen analysenrein dargestellt werden, so dass eine weitere Aufreinigung nicht erforderlich war. Mit dieser Methode wurden die Zielverbindungen des Typs **A** und **E** aus Kapitel 3.3.1 erfolgreich hergestellt.

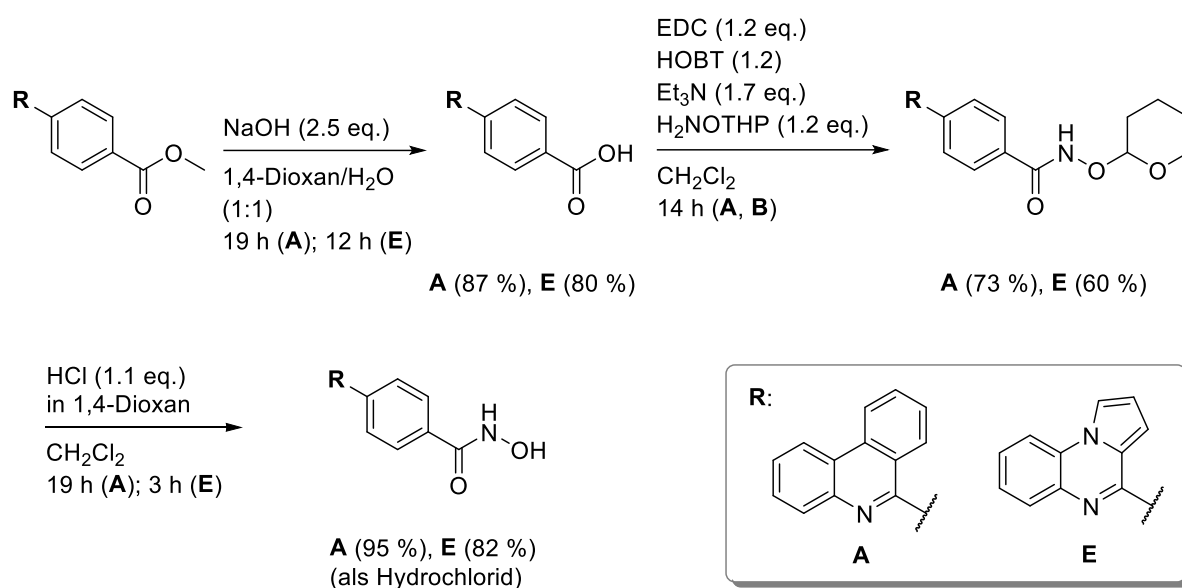


Abb. 26: Synthese der Hydroxamsäuren des Typs **A** und **E** über Bildung der THP-geschützten Hydroxamsäuren und anschließende Entschützung.

Bei der Knüpfung von Amidbindungen werden zu den Kupplungsreagenzien aus der Gruppe der Carbodiimide häufig Zusätze von Verbindungen auf Benzotriazol-Basis, wie das zuvor erwähnte HOBt, verwendet. Diese Additive erhöhen bei der Peptidsynthese die Ausbeute, unterdrücken die unerwünschte Bildung von *N*-Acylharnstoffen **IV** und verringern die Epimerisierungsrate^[151]. Der Mechanismus verläuft zunächst über die Aktivierung der Carbonsäure **I** mit dem Carbodiimid **II** zum O-Acylisoharnstoff **III**. HOBt **V** reagiert mit **III** unter Abspaltung des Harnstoffs **VII** zum aktivierten Ester **VIII**. Diese reaktive Spezies bildet nachfolgend unter Wiederfreisetzung von HOBt **V** mit dem Amin **IX** das Amid **X** (Abb. 27)^[152-153]. Das enthaltene HOBt muss in der Regel mittels Säulenchromatographie gegebenenfalls durch vorangegangene wässrig-alkalische Extraktion abgetrennt werden.

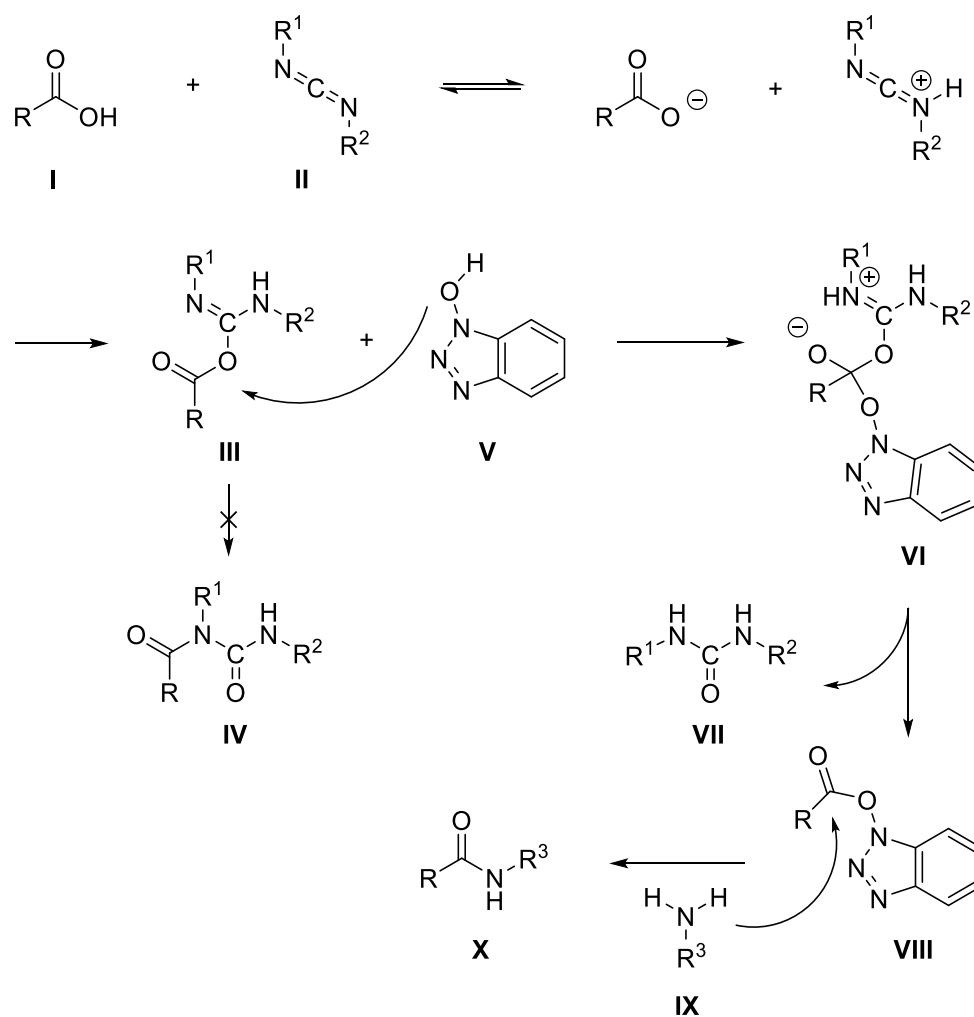


Abb. 27: Mechanismus der Aktivierung durch Carbodiimid zusammen mit 1-Hydroxy-1H-benzotriazol (HOBT).

HOBT **V** kann jedoch mit dem Carbodiimid **II** zur Bildung eines Nebenprodukts, dem 1,3-Diazetidin **XIV**, führen (Abb. 28)^[152, 154].

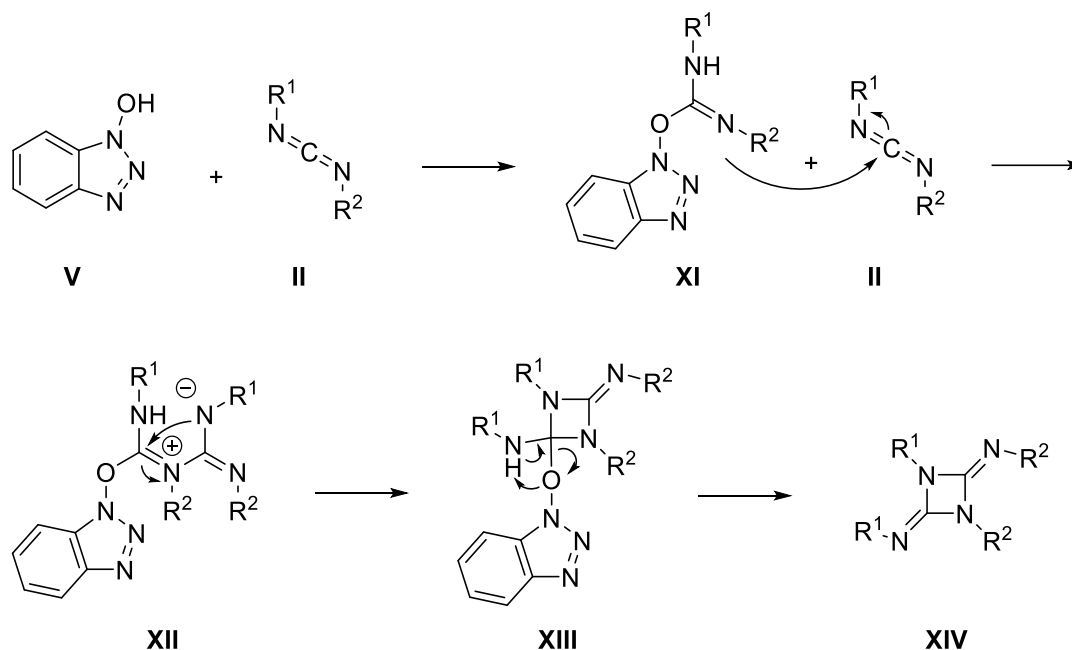


Abb. 28: Unerwünschte Bildung eines Diazetidin-Nebenprodukts **XIV** unter Verwendung von Carbodiimid **II**/HOBT **V**.

3.1.1.2.2 AKTIVIERUNG MIT COMU

Da sich auch die Aufreinigung der beiden THP-geschützten Hydroxamsäuren des Typs **A** und **E** (Abb. 26) durch nicht identifizierbare Begleit- und Nebenprodukte als mühsam erwies, wurde nach einem alternativen Kupplungsreagenz gesucht. Häufige Verwendung finden die Kupplungsreagenzien aus der Gruppe der Uronium/Aminium-Salze^[155] (HBTU (**II**), HATU, u.v.a.), die strukturell ebenfalls auf dem Benzotriazol-System basieren^[156]. Dessen Vertreter zeigen mitunter höhere Kupplungseffektivität als HOBt/Carbodiimid Kombinationen, können jedoch durch direkte Reaktion mit dem Amin **I** zur Bildung von Guanidin-Nebenprodukten **III** führen (Abb. 29)^[153].

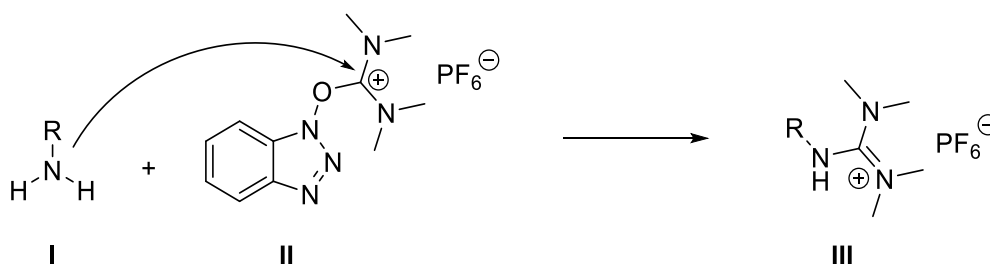


Abb. 29: Bildung von Guanidin-Nebenprodukten **III** unter Verwendung von Uronium/Aminium-Salzen (hier HBTU).

Daher wurde für die weiteren Synthesen das erst kürzlich von El-Faham *et al.*^[157] entwickelte Uronium-Salz COMU (**II**) verwendet (Abb. 30). Dieses besteht aus einer Ethyl(hydroxyimino)cyanoacetat (Oxya)-Teilstruktur (grün) und einer *N*-(Dimethylamino)-methylmorpholin Funktionalität (rot). Anstelle eines Benzotriazol-aktivierten Esters, wie bei den Benzotriazol-basierten Reagenzien, wird ein Oxya-aktivierter Ester **VII** gebildet, der mit dem Amin **VIII** zum Produkt **X** reagiert.

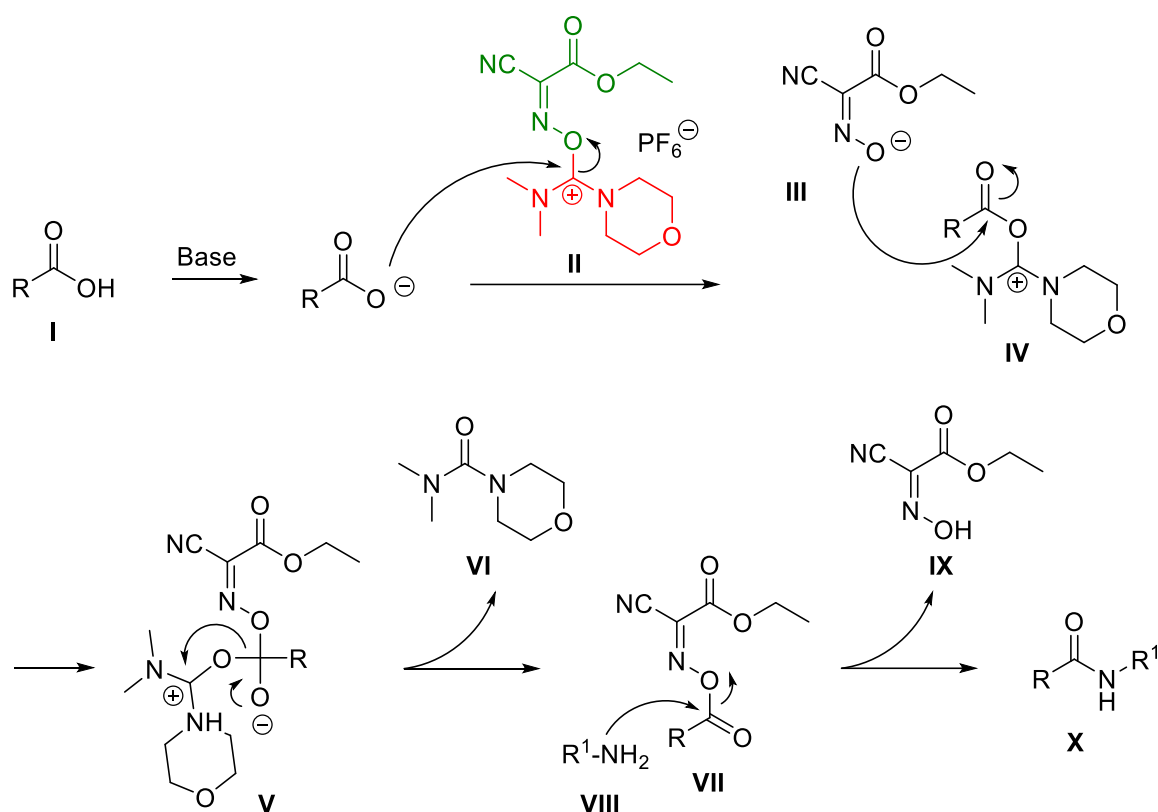


Abb. 30: Neu entwickeltes Uronium-Salz COMU^[157] und dazugehöriger Aktivierungsmechanismus.

COMU zeichnet sich des Weiteren durch eine verbesserte Löslichkeit in organischen Lösungsmitteln, sowie einer leichteren Entfernung seiner Begleitprodukte (**VI**, **IX**) bei der wässrigen Aufarbeitung aus, was die Aufreinigung mittels Säulenchromatographie erleichtert^[158-159]. Grund hierfür ist, dass (anders als bei Benzotriazol-basierten Reagenzien) alle in stöchiometrischen Mengen anfallenden Begleitprodukte gut wasserlöslich sind und nicht das lipophile Rohprodukt verunreinigen. In zahlreichen Synthesen hat sich COMU inzwischen hinsichtlich der Kupplungseffizienz und der Unterdrückung der Epimerisierung dem vorherigen Standard HATU im Bereich der Peptidsynthese überlegen gezeigt^[160]. Jedoch ist die Anwendung von COMU nicht nur auf die Herstellung von Peptiden begrenzt, sondern wurde in den vergangenen Jahren auch erfolgreich bei der Bildung von anderen Amidbindungen eingesetzt. Nicht unberücksichtigt gelassen werden darf jedoch die geringe hydrolytische

Stabilität^[160]. In einem unverschlossenen Gefäß ist in DMF gelöstes COMU nach 5 h fast vollständig hydrolysiert^[161].

In Anlehnung an eine Synthesevorschrift von El-Faham *et al.*^[157] erfolgte die Synthese der THP-geschützten Hydroxamsäuren des Typs **F** und **G** (Abb. 31). Das Protokoll verwendet typischerweise 2.0 eq. Base, wobei laut den Autoren ein Äquivalent bedingt durch die Basizität des Morpholins ebenso gute Ergebnisse liefert. Die Möglichkeit zur Verringerung der Basenanteile ist bei der Peptidsynthese von Bedeutung, da Base zu Epimerisierungen während der Synthese führen kann. Um der geringen hydrolytischen Stabilität von COMU Rechnung zu tragen, wurden je 1.5 eq. des Kupplungsreagenzes und *O*-(Tetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)hydroxylamin verwendet. Unverbrauchtes Kupplungsreagenz wurde während der Aufarbeitung im Zuge der Flüssig-Flüssig-Extraktion (Wasser-Dichlormethan) hydrolysiert. Die Hydrolyseprodukte sowie Synthesenebenprodukte von COMU wurden somit in der wässrigen Phase aufgenommen und entfernt, während die THP-geschützten Hydroxamsäuren in der organischen Phase verblieben und anschließend säulenchromatographisch aufgereinigt werden konnten. Die analysenreinen geschützten Hydroxamsäuren wurden gelöst in Dichlormethan mit einer Lösung aus Salzsäure in 1,4-Dioxan entschützt. Die gewünschten Produkte konnten als Hydrochlorid (Typ **F**) bzw. bedingt durch die Löslichkeitsunterschiede von THP-geschützten und freigesetzten Hydroxamsäuren des Typs **G** durch Ausfällen erhalten werden. Nach Waschen des Feststoffes waren keine zusätzlichen Aufreinigungsschritte notwendig. Auf diesem Syntheseweg konnten einige der Zielstrukturen des Typs **F** und **G** aus Kapitel 3.3.1 und 3.3.2 erfolgreich hergestellt werden.

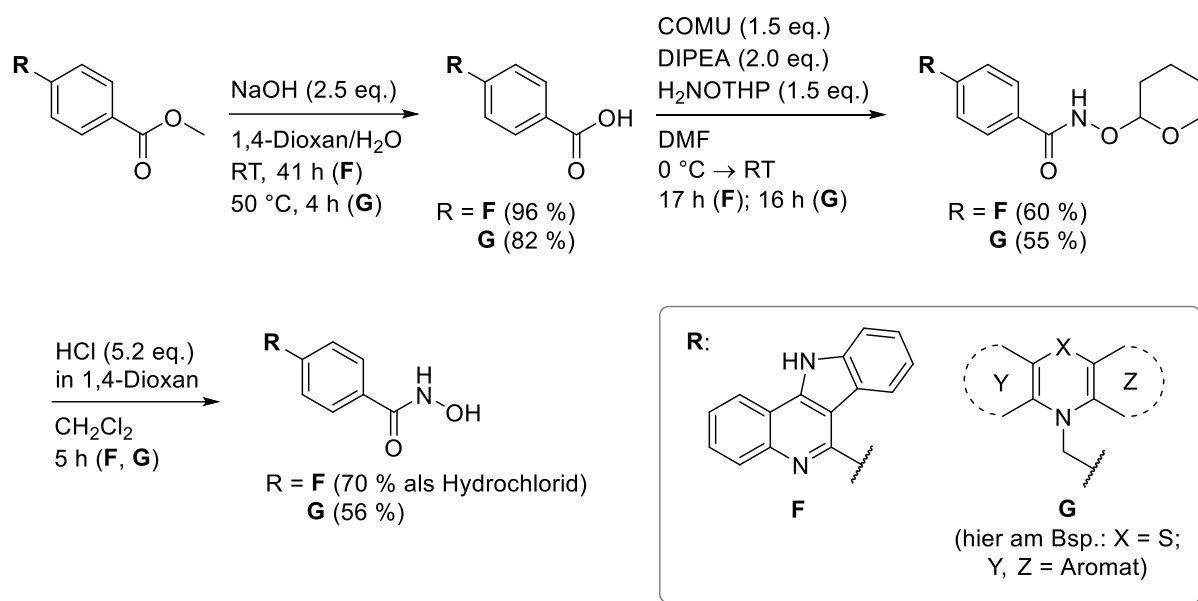


Abb. 31: Hydroxamsäuresynthese mit THP-geschütztem Hydroxylamin – Entwickelte Methode zur Herstellung der Zielstrukturen aus Kapitel 3.3.

Bei einigen Zielverbindungen gelang jedoch beim Entschützungs-schritt, trotz Anwendung von Ultraschall und Eiskühlung, keine Ausfällung der Hydroxamsäure aus Dichlormethan, so dass in diesen Fällen doch eine zusätzliche säulenchromatographische Aufreinigung erforderlich war. Aus diesem Grund wurde angesichts der Vielzahl an geplanten Variationen der Cap-Gruppe und der dadurch schwer vorhersehbaren Löslichkeitsunterschiede nach einer noch praktikableren alternativen Methode gesucht.

3.1.1.3 HYDROXAMSÄURESYNTHES OHNE VERWENDUNG EINER SCHUTZGRUPPE

Eine Methode von Panguluri *et al.*^[162] erwies sich als erfolgsversprechend. Hierbei wurden COMU-vermittelt α -geschützte Amino/Peptid-Hydroxamsäuren direkt aus den dazugehörigen Carbonsäuren ebenfalls unter Zusatz von DIPEA in DMF dargestellt. Bislang wurde COMU nicht zur Synthese von geschützten oder freien Hydroxamsäuren nicht-peptidischer Substrate verwendet. Daher wurde für die Synthese der Zielstrukturen (Abb. 32) die Äquivalentenverhältnisse aus der Methode zur Synthese der THP-geschützten Hydroxamsäuren (Kapitel 3.1.1.2.2.2) beibehalten. Ähnlich zu der verwendeten Methode unseres Kooperationspartners aus Freiburg wurde der Anteil an Hydroxylamin verdoppelt^[130].

Dabei wurde das Hydroxylamin *in situ* durch Basenzugabe aus seinem Hydrochlorid freigesetzt. Die Begleitprodukte der COMU-vermittelten Bindungsknüpfung lassen sich aufgrund ihrer guten Wasserlöslichkeit durch einfache wässrige Aufarbeitung entfernen.

Hierbei kam es jedoch bei einigen Synthesen zur Präzipitation, was die Extraktion behinderte. Daher wurde grundsätzlich dazu übergegangen nach Entfernung des Lösungsmittels aus dem Reaktionsansatz zuerst eine Säulenchromatographie durchzuführen und anschließend die noch verbliebenen COMU-Begleitstoffe wässrig auszuwaschen. Die Aufreinigung der ungeschützten Hydroxamsäuren mittels Säulenchromatographie über Kieselgel erwies sich aufgrund der polaren Eigenschaften der Hydroxamsäuren als problematisch. Wiederholte Reaktionskontrolle mittels DC zeigte, dass die Carbonsäuren in der Regel vollständig in ihre aktivierte Form überführt werden konnten. Mit der frisch hergestellten Hydroxylamin-Lösung konnten diese aktivierten Carbonsäuren jedoch nicht vollständig in die gewünschten Hydroxamsäuren überführt werden und in gewissen Anteilen entstand die freie Carbonsäure wieder. Diese erschwerte zusätzlich die säulenchromatographische Aufreinigung des Produkts, da Carbonsäuren und Hydroxamsäuren annähernd gemeinsam eluieren. Eine schärfere Auftrennung zwischen Carbonsäuren und Hydroxamsäuren konnte, sofern dies für die Cap-Gruppe geeignet war, durch Zusatz von Essigsäure zum Laufmittel erreicht werden. Auf diesem Syntheseweg konnten die meisten der Zielverbindungen des Typs **G** aus Kapitel 3.3.2 hergestellt werden.

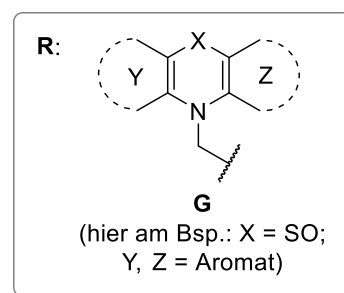
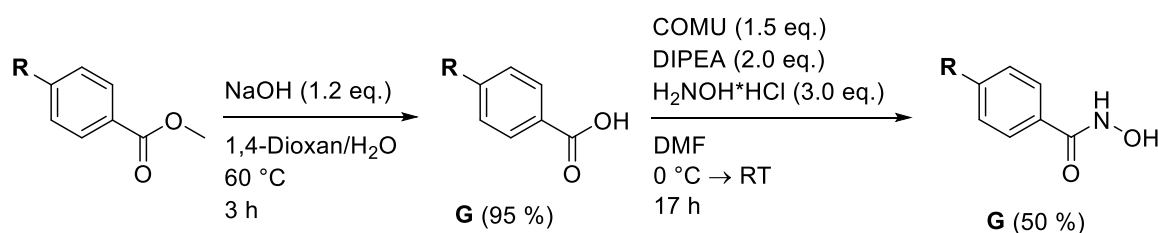


Abb. 32: Hydroxamsäuresynthese mit freiem Hydroxylamin – Entwickelte Methode zur Herstellung der Zielstrukturen aus Kapitel 3.3.

3.1.2 SYNTHESE VON STRUKTURANALOGA MIT DIVERSEN POTENZIELL ZINK-BINDENDEN GRUPPEN

Die Hydroxamsäure-Funktion ist die am besten untersuchte Zink-bindende Gruppe bei den KDAC-Inhibitoren und wird am häufigsten verwendet. Obwohl diese Verbindungen hoch

potente Inhibitoren darstellen, ist die Hydroxamsäure-Funktion aus den dargelegten Gründen (Kapitel 1.5) nicht notwendigerweise die ideale Zink-bindende Gruppe bei der Entwicklung von neuen KDAC-Inhibitoren. Daher wurden auch innerhalb dieser Dissertation ausgehend von der Leitstruktur **20** Alternativen zur Hydroxamsäure-Funktion untersucht.

Die Syntheserouten zur Einführung von potenziell Zink-bindenden Gruppen wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit sowie in der Masterarbeit von Martin Morgenstern^[128] unter meiner Betreuung verfolgt. Da Details zur Herangehensweise, zu den verwendeten Methoden und die Beschreibung der Verbindungen in dieser Masterarbeit dargelegt sind, soll hier nur eine Zusammenfassung der zielführenden Synthesen zu den getesteten Verbindungen gegeben werden. Die synthetisierten Verbindungen aus der Masterarbeit sind entsprechend gekennzeichnet (*), manche Verbindungen wurden im Verlauf beider Arbeiten (*) synthetisiert.

Um Modifizierungen der Zink-bindenden Gruppe der Leitstruktur **20** (Kapitel 2.1) durchführen zu können, wurden verschiedene Benzyl-Linker mit unterschiedlichen Resten **R** in *para*-Position eingeführt (Abb. 33 und Tab. 2). Dies gelang durch N-Alkylierung des 10*H*-Phenothiazins (**23**) mit geeignet funktionalisierten Benzylbromiden **47-50** unter Verwendung der starken Basen NaH bzw. LiHMDS. Die N-alkylierten Verbindungen **25***, **26(*)** und **27(*)** konnten in guten bis sehr guten Ausbeuten dargestellt werden, bei Verbindung **24** mit dem Phosphonsäurediethylester-Rest dagegen konnte nur eine Ausbeute von 43 % erzielt werden.

Die derivatisierten Benzylbromide waren mit Ausnahme der Verbindung **47** (mit Phosphonsäurediethylester-Rest) kommerziell erhältlich. Die Herstellung des Benzylbromids **47** wird im folgenden Kapitel 3.1.2.1 im Zuge der Synthese der Verbindung mit Phosphonsäuremonoethylester-Rest dargestellt.

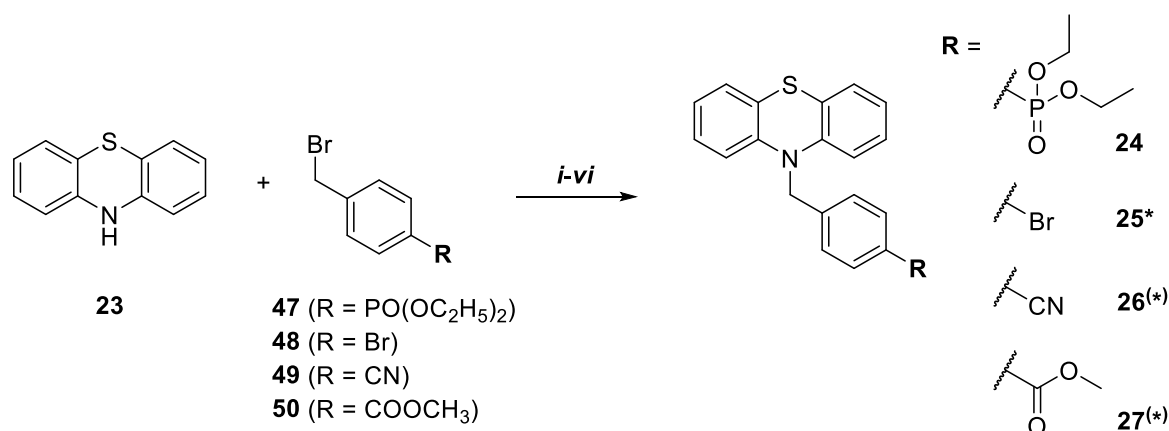


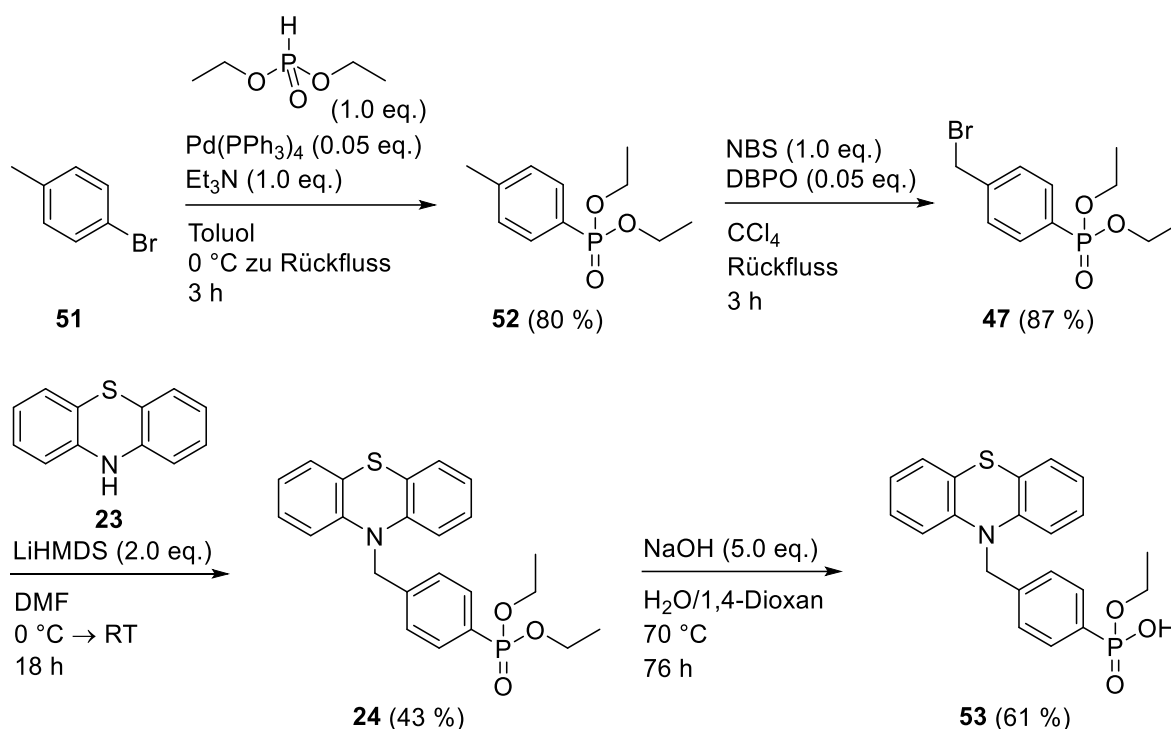
Abb. 33: Synthese der Zwischenstufen **24, 25***, **26(*)** und **27(*)** als Ausgangspunkt für weitere Funktionalisierungen.

Exp.	Benzyl- halogenid	N-alkylierte Verbindung	R	Base	Temperatur /Zeit	Ausbeute [%]
<i>i</i>	47 (1.7 eq.)	24	PO(OC ₂ H ₅) ₂	LiHMDS (2.0 eq.)	0 °C → RT 18 h	43
<i>ii</i>	48 (1.0 eq.)	25*	Br	LiHMDS (1.0 eq.)	0 °C → RT → 50 °C, 68 h	85
<i>iii</i>	49 (1.4 eq.)	26	CN	NaH (2.0 eq.)	0 °C → RT 24 h	68
<i>iv</i>	49 (1.7 eq.)	26*	CN	LiHMDS (1.0 eq.)	0 °C → RT → 50 °C, 23 h	72
<i>v</i>	50 (1.7 eq.)	27	COOCH ₃	LiHMDS (2.0 eq.)	0 °C → RT → 50 °C, 93 h	70
<i>vi</i>	50 (1.7 eq.)	27*	COOCH ₃	LiHMDS (1.0 eq.)	0 °C → RT → 50 °C, 17 h	81

Tab. 2: N-Alkylierung zu den Zwischenstufen **24**, **25***, **26(*)** und **27(*)**.

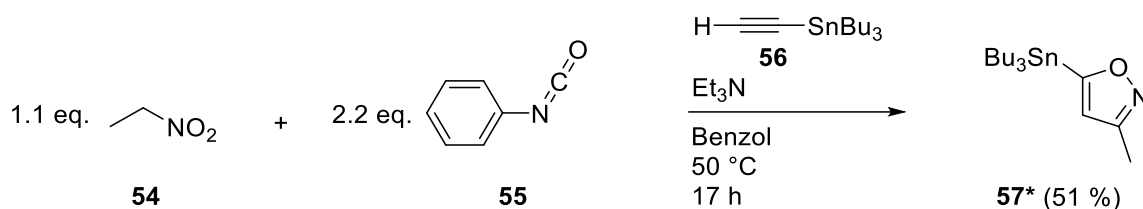
3.1.2.1 SYNTHES DES PHOSPHONSÄUREMONOETHYLESTERS **53** DURCH FUNKTIONALISIERUNG DES PHOSPHONSÄUREDIETHYLESTERS **24**

Nach Liu *et al.*^[163] wurde das Benzylbromid **47** mit Phosphonsäurediethylester-Rest in *para*-Position in zwei Syntheseschritten hergestellt (Abb. 34). Ausgehend von 4-Bromtoluol (**51**) wurde durch eine Palladium-katalysierte Kreuzkupplung mit Diethylphosphit der Phosphonsäurediethylester-Rest in 80 % Ausbeute auf den Benzolring übertragen. Das resultierende Diethylphosphonat **52** wurde anschließend mit *N*-Bromsuccinimid (NBS) unter Zusatz des Radikalstarters Dibenzoylperoxid (DBPO) an der Benzylfunktion bromiert und **47** in sehr guter Ausbeute erhalten. Daran schloss sich die bereits erwähnte N-Alkylierung zur Verbindung **24** (Kapitel 3.1.2) an. Im finalen Schritt sollte der Phosphonsäurediethylester **24** durch alkalische Hydrolyse zum Phosphonat **28** umgesetzt werden. Trotz verwendeter höherer Temperatur, verglichen mit der häufig durchgeführten Carbonsäuremethylesterspaltung, und langer Reaktionszeit gelang nur die partielle Hydrolyse einer der beiden Ethylesterfunktionen in Verbindung **24** mit 61 % Ausbeute. Da eine potenziell Metall-bindende Funktionalität auch mit dem Phosphonsäuremonoethylester **53** gegeben war, wurde dieser auf seine Zink-Bindungsaffinität getestet.

Abb. 34: Synthese der potenziell Zink-bindenden Verbindung **53** mit Phosphonsäuremonoethylester-Funktion.

3.1.2.2 SYNTHESE DES (Z)-ENAMINOKETONS **30*** DURCH FUNKTIONALISIERUNG DES 4-BROMBENZYL-DERIVATS **25***

Zur Darstellung des (Z)-Enaminoketons **30*** sollte mittels einer Stille-Kreuzkupplungs-Reaktion ein Isoxazolring eingeführt und dieser anschließend reduktiv gespalten werden. Der dazu benötigte Synthesebaustein 3-Methyl-5-(tributylstannyl)isoxazol (**57***) wurde nach Sakamoto *et al.*^[164] durch eine 1,3-dipolare Cycloaddition dargestellt. Dabei wurde das Nitriloxid *in situ* aus Nitroethan (**54**) und Phenylisocyanat (**55**) gebildet und mit Tributylethynylstannan (**56**) zum Isoxazol **57*** in einer Ausbeute von 51 % umgesetzt (Abb. 35).

Abb. 35: Synthese des 3-Methyl-5-(tributylstannyl)isoxazols **57*** nach Sakamoto *et al.*^[164].

In der nachfolgenden Stille-Reaktion^[164] wurde das 3-Methyl-5-(tributylstannyl)isoxazol (**57***) Pd-katalysiert mit dem 4-Brombenzyl-Derivat **25*** (Kapitel 3.1.2) gekuppelt (Abb. 36). In

Anlehnung an eine Methode zur Synthese von Canthin-4-onen von Tremmel und Bracher^[165] wurde anschließend der Isoxazol-Ring in **29*** durch katalytische Hydrierung über Palladium reduktiv zum (Z)-Enaminoketon geöffnet und die Zielverbindung **30*** in 88 % Ausbeute erhalten. Die erwartete Z-Konfiguration von **30*** wurde in einem 1D-NOESY-Experiment bestätigt. Durch Einstrahlen der Resonanzfrequenz des olefinischen CH-Protons der Enaminoketon-Gruppe konnte ein NOE-Effekt der räumlich nahe gelegenen CH₃-Protonen sowie der Protonen des *para*-disubstituierten Benzolrings gezeigt werden. Dagegen konnte eine Korrelation zu den NH₂-Protonen durch diese Anregung nicht beobachtet werden.

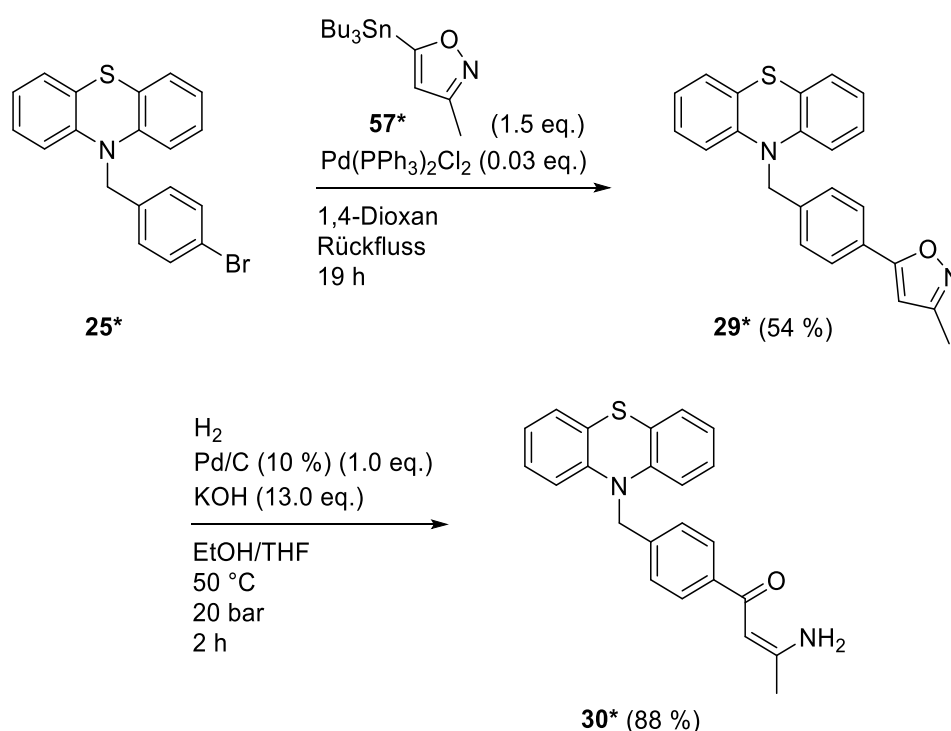


Abb. 36: Synthese des (Z)-Enaminoketons **30***.

3.1.2.3 SYNTHESEN DURCH FUNKTIONALISIERUNG DES 4-CYANOENZYL-DERIVATS **26***(*)

3.1.2.3.1 SYNTHESE DES (Z)-AMIDOXIMS **31*** AUS DEM 4-CYANOENZYL-DERIVAT **26***(*)

Yang *et al.*^[166] veröffentlichten kürzlich ein One-Pot-Verfahren zur Synthese von Amidoximen durch Pd-katalysierte Cyanierung von Arylhalogeniden mittels Kaliumhexacyanoferrat(II) und anschließende Amidoximbildung durch Hydroxylamin. Diese Methode ermöglicht prinzipiell einen Zugang zum (Z)-Amidoxim **31*** ausgehend vom dem 4-Brombenzyl-Derivat **25***. Aufgrund der berichteten moderaten Ausbeuten wurde jedoch ein einfacherer synthetischer Zugang bevorzugt (Abb. 37). Am Stickstoffatom unsubstituierte Amidoxime lassen sich generell aus Nitrilen und Hydroxylamin unter basischen Bedingungen und erhöhten

Temperaturen in Alkoholen darstellen^[136]. Demnach wurde versucht, die Zielverbindung ausgehend vom gut zugänglichen 4-Cyanobenzyl-Derivat **26**^(*) unter den genannten Reaktionsbedingungen darzustellen^[167]. Bedingt durch die unzureichende Löslichkeit des 4-Cyanobenzyl-Derivats **26**^(*) in Methanol wurde eine Umsetzung zu **31**^{*} erst in DMF und unter weiterem Zusatz von DIPEA in hinreichend guter Ausbeute erzielt. Von den zwei möglichen Konfigurationsisomeren bei Amidoximen wurde bei N-unsubstituierten Amidoximen das vorliegende *Z*-Isomer mittels Röntgenstrukturanalyse umfassend nachgewiesen^[136]. Die Konfiguration des Amidoxims in Verbindung **31**^{*} in Lösung wurde durch ein 1D-NOESY-Experiment untersucht. Dabei wurden die nahegelegenen Protonen des *para*-disubstituierten Benzolrings, sowie die NH₂- und OH-Protonen angeregt. Eine Korrelation zu räumlich nahen Protonen konnte zwischen denen des *para*-disubstituierten Benzolrings und den NH₂-Protonen, jedoch nicht den OH-Protonen sowie zwischen den NH₂- und OH-Protonen beobachtet werden, was somit die *Z*-Konfiguration bestätigte.

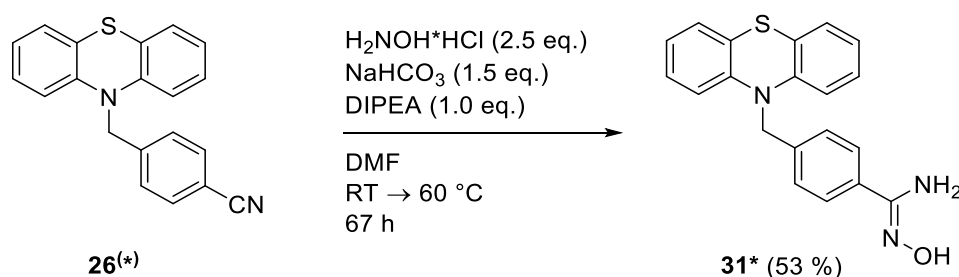
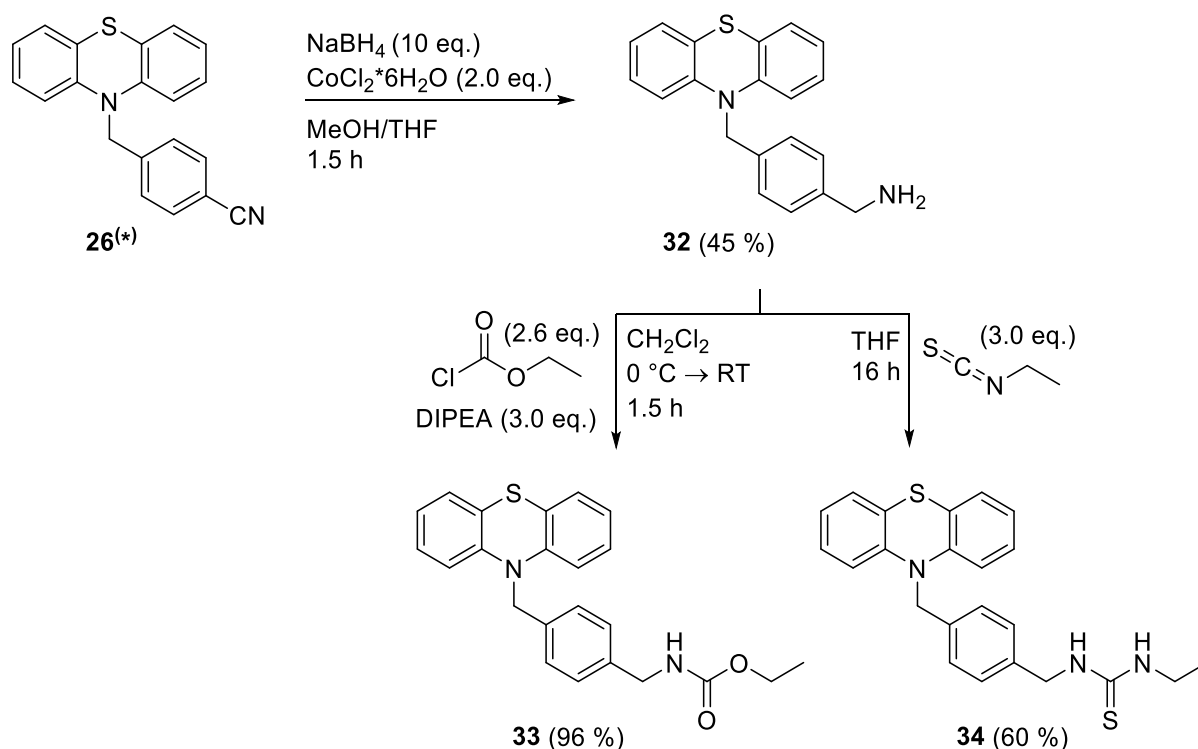


Abb. 37: Synthese des (*Z*)-Amidoxims **31**^{*}.

3.1.2.3.2 SYNTHESE DES CARBAMATS **33** UND DES THIOHARNSTOFF-DERIVATS **34** AUS DEM 4-CYANOBENZYL-DERIVAT **26**^(*)

Das 4-Cyanobenzyl-Derivat **26**^(*) diene zudem als Ausgangspunkt für weitere Funktionalisierungen (Abb. 38). Dazu wurde dieses zunächst durch Reduktion^[168] mit Natriumborhydrid und Cobalt(II)-chlorid in das primäre Amin **32** überführt. Durch anschließende Funktionalisierung der primären Aminogruppe konnten weitere Substituenten eingeführt werden. So entstand in Anlehnung an die Methode von Liu *et al.*^[134] unter Verwendung des Säurechlorids Chlorameisensäureethylester und der Base *N,N*-Diisopropylethylamin das entsprechende Carbamat **33** in einer Ausbeute von 96 %. Die Synthese des Thioharnstoff-Derivats **34** gelang in guter Ausbeute durch Umsetzung mit Ethylisothiocyanat^[134].

Abb. 38: Synthese des Carbamats **33** und des Thioharnstoff Derivats **34**.

3.1.2.4 SYNTHESEN DURCH FUNKTIONALISIERUNG DES ESTERS **27(*)**

3.1.2.4.1 SYNTHESSE DES TRIFLUORMETHYLOXIM **36*** AUS DEM ESTER **27(*)**

Da die Trifluorethylhydroxylamin-Funktion möglicherweise ein Bioisoster der Hydroxamsäure-Funktion darstellen könnte, sollte die Zielverbindung **37*** für Struktur-Aktivitäts-Untersuchungen hergestellt werden (Abb. 40). Dazu musste zunächst das Trifluormethylketon **35*** synthetisiert werden. Der Aufbau von aromatischen Trifluormethylketonen kann generell durch Acylierung metallierter Aromaten mit tertiären Trifluoracetamiden^[169] oder aus aromatischen Estern mit Trifluormethylierungsreagenzien wie dem Ruppert-Prakash Reagenz (Trifluormethyltrimethylsilan, TMS-CF_3)^[170] erfolgen. Der postulierte Mechanismus ist in Abb. 39 gezeigt^[171].

Zunächst reagiert TBAF mit TMS-CF_3 **B** und die Trifluormethylgruppe wird unter Verlust von Trimethylsilylfluorid an den Ester **A** addiert. Dies führt zur Bildung des Halbacetals **C** mit Tetrabutylammonium als Gegenion, der eigentlichen katalytischen Spezies. **C** wiederum aktiviert ein weiteres Molekül TMS-CF_3 unter Ausbildung der negativ geladenen fünffach koordinierten Siliziumspezies **D**. **D** überträgt die Trifluormethylgruppe auf ein weiteres Estermolekül **A** und die TMS-geschützte Verbindung **E** wird unter gleichzeitiger Regeneration

der katalytischen Spezies **C** gebildet. Durch wässrig-saure Hydrolyse von **E** wird das Trifluormethylketon **F** erhalten.

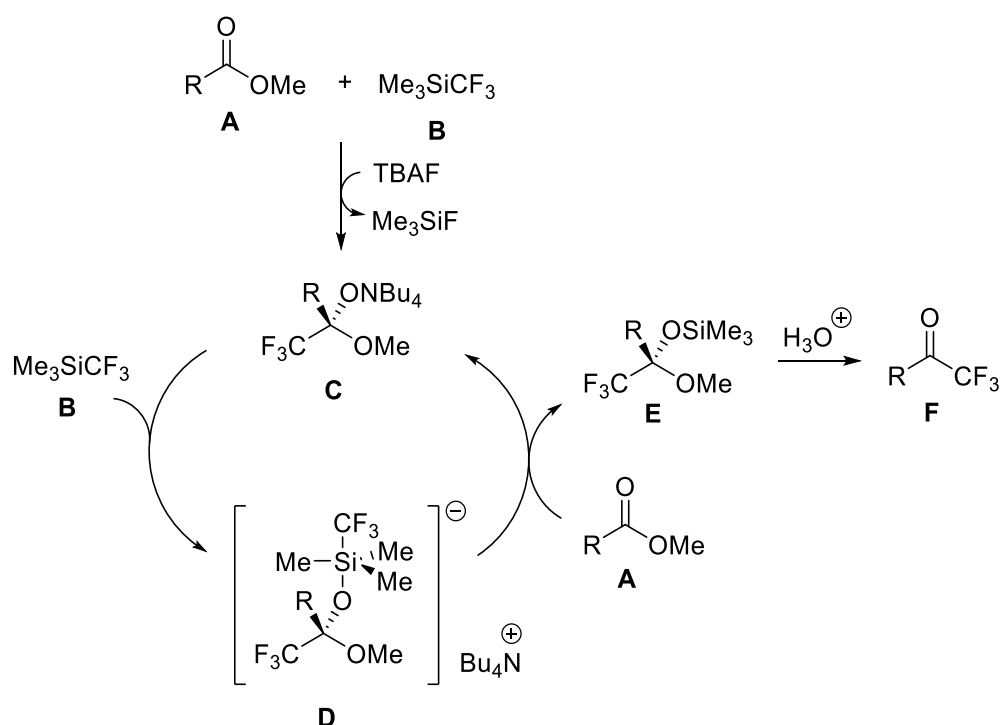


Abb. 39: Postulierter Mechanismus der Fluor induzierten nucleophilen Trifluormethylierung eines Carbonsäureesters **A** mit TMS- CF_3 **B**.^[171]

Nach der Umsetzung des Esters **27**^(*) unter den genannten Bedingungen^[172] konnte das Trifluormethylketon **35**^{*} nicht analysenrein isoliert werden (Abb. 40; Methode A: Ausbeute 46 % unter Berücksichtigung der HPLC Reinheit bei 254 nm). Alternativ dazu wurde versucht, das Trifluormethylketon **35**^{*} nach einer Methode von Fishwick *et al.*^[169] ausgehend vom 4-Brombenzyl-Derivat **25**^{*} herzustellen (Abb. 40; Methode B). Hierbei reagiert nach Brom-Lithium-Austausch mittels *n*-Butyllithium die intermediär gebildete Aryllithium-Verbindung mit *N,N*-Diethyl-2,2,2-trifluoracetamid. Jedoch konnte auch aus diesem Ansatz das Trifluormethylketon **35**^{*} nicht in analysenreiner Form erhalten werden (Ausbeute 42 % unter Berücksichtigung der HPLC Reinheit bei 254 nm). Die nachfolgende Kondensation^[173] des unsauberen Ketons **35**^{*} mit Hydroxylaminhydrochlorid und Pyridin verlief jedoch problemlos und das (*E*)-Trifluormethyloxim **36**^{*} wurde in 76 % Ausbeute hergestellt. Ebenso wie beim (*Z*)-Amidoxim **31**^{*} wurde zur strukturellen Aufklärung der Konfiguration von **36**^{*} ein 1D-NOESY-Experiment durchgeführt. Bei dieser Struktur wurden auch die nahegelegenen Protonen des *para*-disubstituierten Benzolrings und das OH-Proton angeregt. Dabei konnte ein gegenseitiger NOE-Effekt dieser Protonen beobachtet und somit auf ein Vorliegen der *E*-Konfiguration geschlossen werden.

Der darauffolgende Versuch zur Reduktion der (*E*)-Trifluormethyloximfunktion in **36*** mit BH_3 in THF und saurer Hydrolyse nach der einzig literaturbekannten Methode^[174] lieferte überraschenderweise nicht das gewünschte Trifluorethylhydroxylamin **37***. Unter diesen Reaktionsbedingungen wurde überwiegend die Benzylfunktion gespalten und 10*H*-Phenothiazin (60 %) erhalten. Als weitere Komponenten konnten das Trifluormethylketon **35*** (30 %) und nicht umgesetztes Edukt **36*** (10 %) isoliert werden. In weiteren Versuchen mit Reduktionsbedingungen, die bei verwandten funktionellen Gruppen Anwendung finden (wie beispielsweise Benzaldoxim zu *N*-Benzylhydroxylamin mit BH_3 in THF/alkalische Hydrolyse^[175], Oxim zu Amin mittels katalytischer Hydrierung (Pd/C)^[176], Oxim zu Hydroxylamin mit NaCNBH_3 bei pH 3-4^[177]) wurde nur das Trifluormethyloxim **36*** wiedererhalten und die Darstellung des Trifluorethylhydroxylamins **37*** blieb erfolglos. Aufgrund der wiederholt fehlgeschlagenen Versuche wurde dieser Reaktionsschritt nicht weiterverfolgt.

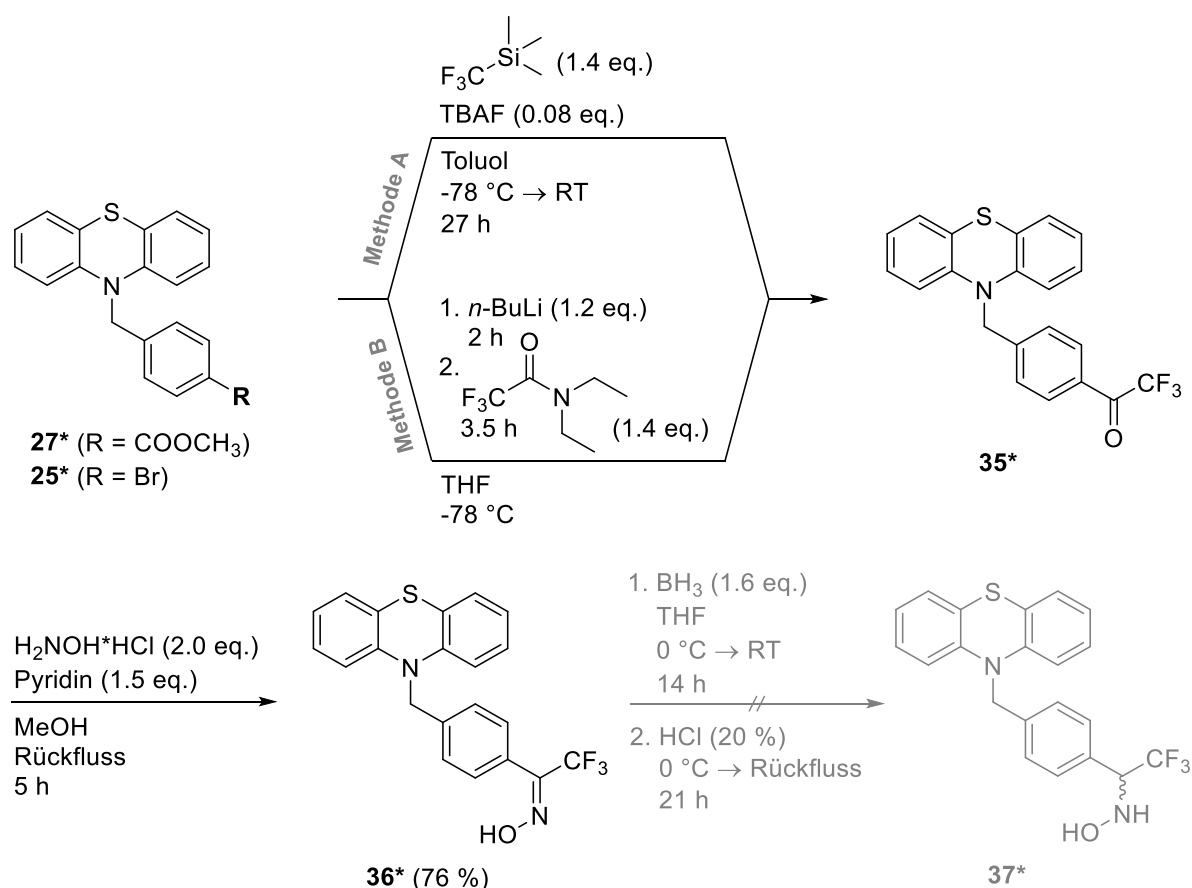


Abb. 40: Synthese des (*E*)-Trifluormethyloxims **36***. Die weitere Umsetzung zum Trifluorethylhydroxylamin **37***, einer bioisosteren Funktionalität der Hydroxamsäure, blieb erfolglos.

3.1.2.4.2 SYNTHESE VERSCHIEDENER POTENZIELL ZINK-BINDENDER GRUPPEN NACH HYDROLYSE DES ESTERS **27**(*)

Nach Hydrolyse des Esters **27**(*) zur Carbonsäure **38**(*) in sehr guten Ausbeuten konnte diese mit diversen Nucleophilen funktionalisiert und somit verschiedene potenziell Zink-bindende Gruppen aufgebaut werden (Abb. 41, Tab. 3). Durch Aktivierung von **38**(*) mit COMU und *N,N*-Diisopropylethylamin und unter Umsetzung mit verschiedenen Aminen konnten die entsprechenden Verbindungen **39***, **40** und **42**(*) in Ausbeuten von 25 bis 86 % hergestellt werden. Das Boc-geschützte Hydrazid **42**(*) stellte dabei eine Synthesezwischenstufe dar, die im Folgenden weiter funktionalisiert wurde. Nach Aktivierung der Carbonsäure **38**(*) zum intermediären Säurechlorid erfolgte die Darstellung der *N*-Acyl-3-aminoisonicotinsäure **41*** über den Ester **58*** aus zweierlei Gründen. Zum einen zeigte der 3-Aminopyridin-4-carbonsäuremethylester als Edukt verbesserte Löslichkeit im Gegensatz zur freien Carbonsäure, zum anderen konnte somit das Problem der Chemoselektivität gelöst werden. Dennoch fand nur eine geringe Umsetzung zum Ester **58*** statt und die *N*-Acyl-3-aminoisonicotinsäure **41*** wurde in einer Ausbeute von 18 % über diese beiden Syntheseschritte erhalten.

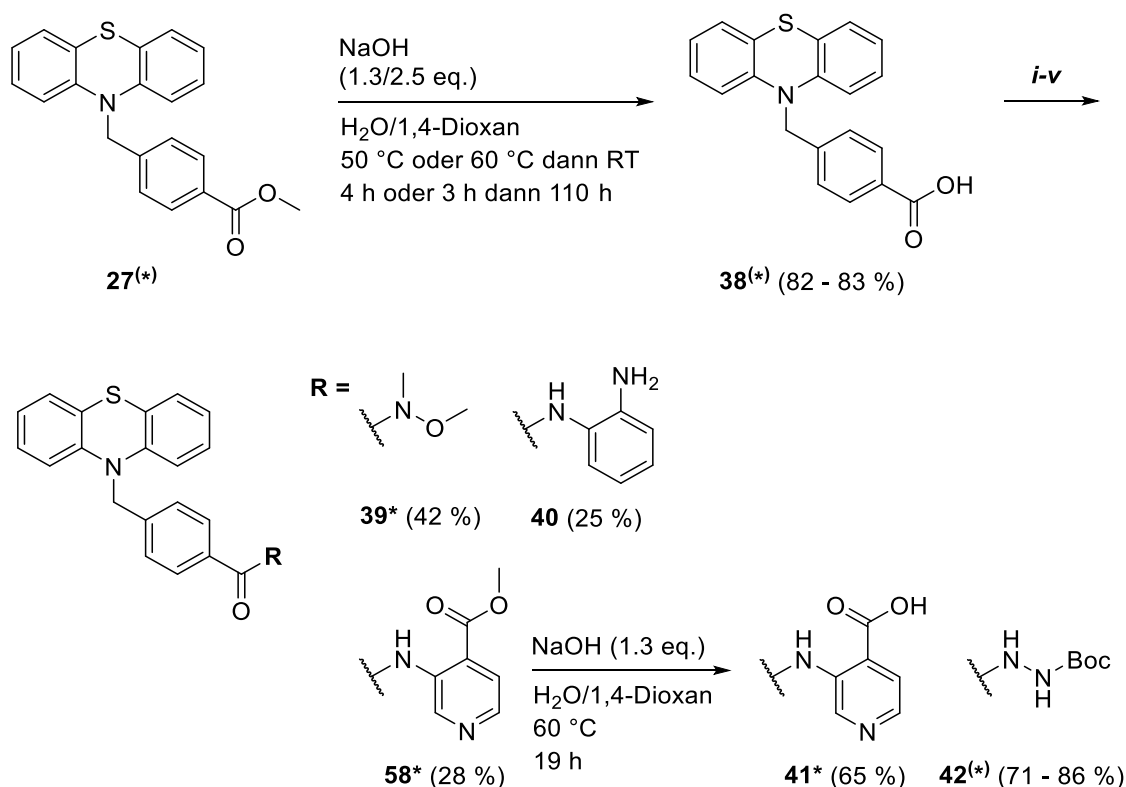
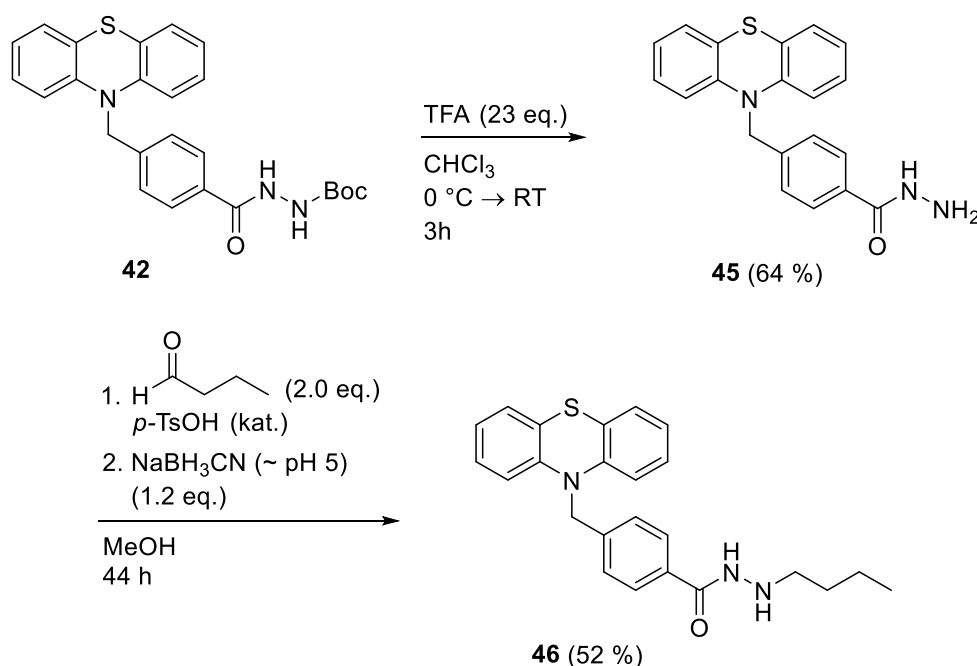


Abb. 41: Synthese verschiedener potenziell Zink-bindender Gruppen und der Synthesezwischenstufe **42**(*).

Exp.	Verb.	Aktivierung	Base	Amin	LM	Temperatur /Zeit
<i>i</i>	39*	COMU	DIPEA	<i>N,O</i> -Dimethylhydroxylamin	DMF	0 °C → RT
		(1.0 eq.)	(2.0 eq.)	HCl (1.0 eq.)		23 h
<i>ii</i>	40	COMU	DIPEA	<i>o</i> -Phenylendiamin	DMF	0 °C → RT
		(1.5 eq.)	(2.0 eq.)	(3.0 eq.)		20 h
<i>iii</i>	58*	SOCl ₂	Pyridin	3-Aminopyridin-	CH ₂ Cl ₂	0 °C → RT
		(1.2 eq.)	(6.2 eq.)	4-carbonsäuremethylester		19 h
<i>iv</i>	42	COMU	DIPEA	Boc-Hydrazin	DMF	0 °C → RT
		(1.5 eq.)	(3.0 eq.)	(1.5 eq.)		19 h
<i>v</i>	42*	COMU	DIPEA	Boc-Hydrazin	DMF	0 °C → RT
		(1.0 eq.)	(2.0 eq.)	(1.0 eq.)		16 h

Tab. 3: Synthese verschiedener potenziell Zink-bindender Gruppen und der Synthesezwischenstufe **42**(*).

Die Abspaltung der Boc-Schutzgruppe in **42** mittels Trifluoressigsäure^[178] ergab mit dem Hydrazid **45** (64 % Ausbeute) eine weitere Zink-bindende Gruppe (Abb. 42). Darüber hinaus erlaubte die primäre Hydrazid-Gruppe durch reduktive Aminierung^[141] mit *n*-Butanal und Natriumcyanoborhydrid in einer Ausbeute von 52 % eine weitere Funktionalisierung zum *N*-Butylhydrazid **46**. Beide Zink-bindenden Gruppen wurden bereits in KDAC-Inhibitoren beschrieben (vgl. 2.2.2.3).

Abb. 42: Synthese des Hydrazids **45** und des *N*-Butylhydrazids **46**.

Als weitere Variation der potenziell Zink-bindenden Gruppe wurde das Thiohydrazid **44*** synthetisiert (Abb. 43). Dazu wurde nach einer Synthesevorschrift von Molteni *et al.*^[179] die Carbonylfunktion im Boc-geschützten Hydrazid **42*** mit Hilfe des Lawessons Reagenz in das entsprechende Thioanalogon **43*** überführt. Die Thionierung gelang dabei selektiv mit 56 % Ausbeute an der Carbonylfunktion des Hydrazids. Die anschließende Entschützung mit Trifluoressigsäure ergab das Thiohydrazid **44*** in 41 % Ausbeute.

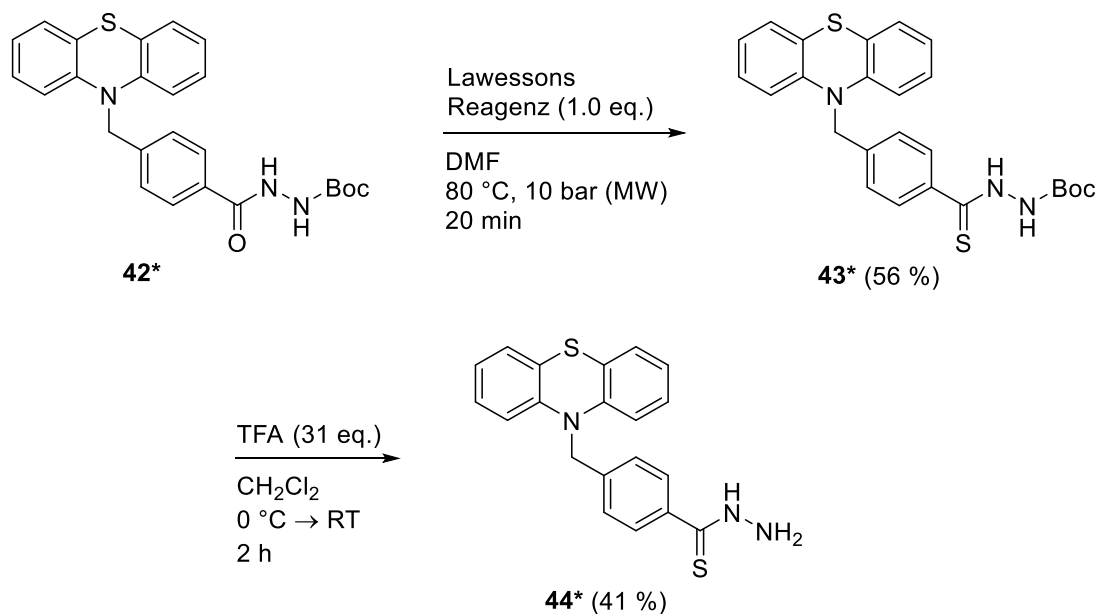


Abb. 43: Synthese des Thiohydrazids **44***.

3.2 SYNTHESE VON STRUKTURANALOGA MIT MODIFIZIERTEM LINKER

Die Untersuchungen von Butler *et al.*^[117] im Zuge der Entwicklung von Tubastatin A (**14**) legten nahe, dass sich ein Benzyl-Linker positiv auf die Selektivität und Aktivität gegenüber der Isoform KDAC6 auswirkt. Dieser verbesserte gegenüber anderen Alkyl- und Alkylaryl-Linkern die Aktivität und Selektivität. Zur Untersuchung von Struktur-Aktivitäts-Beziehungen wurden auch für die selbst entwickelte Leitstruktur **20** homologe Strukturanaloga angefertigt.

3.2.1 SYNTHESE EINES STRUKTURANALOGONS MIT VERKÜRZTEM LINKER

Zur Herstellung eines homologen Strukturanalogs wurde unter anderem eine kürzere Linkerfunktion mit der Cap-Gruppe aus der Leitstruktur **20** verknüpft. Zur Einführung eines solchen Linker-Bausteins wurde 10H-Phenothiazin (**23**) mit Lithiumhexamethyldisilazid und

4-Fluorbenzonitril (**59**), das kostengünstiger als der ursprünglich angedachte 4-Brombenzoesäuremethylester ist, umgesetzt (Abb. 44). Die N-Arylierung im Sinne einer nucleophilen aromatischen Substitution an **59** ergab das Nitril **60** in 46 % Ausbeute. Nach einer Methode von Park *et al.*^[180] wurde das Nitril **60** zur Carbonsäure **61** hydrolysiert, jedoch mit der Notwendigkeit die Zahl der Äquivalente Base deutlich zu erhöhen. Trotz erhöhtem Basenanteil und sehr langer Reaktionszeit verlief diese Hydrolyse nicht vollständig. Zusätzlich zur Carbonsäure **61** konnte das entsprechende primäre Amid **62** in 26 % Ausbeute isoliert werden. Die Methode des finalen Schritts zur Hydroxamsäure **63** wurde in Kapitel 3.1.1.3 beschrieben und gelang in nur schlechter Ausbeute. Ein Versuch zur Optimierung dieser Ausbeute wurde unterlassen, da die Hydroxamsäure **63** nur für die SAR-Studien benötigt wurde.

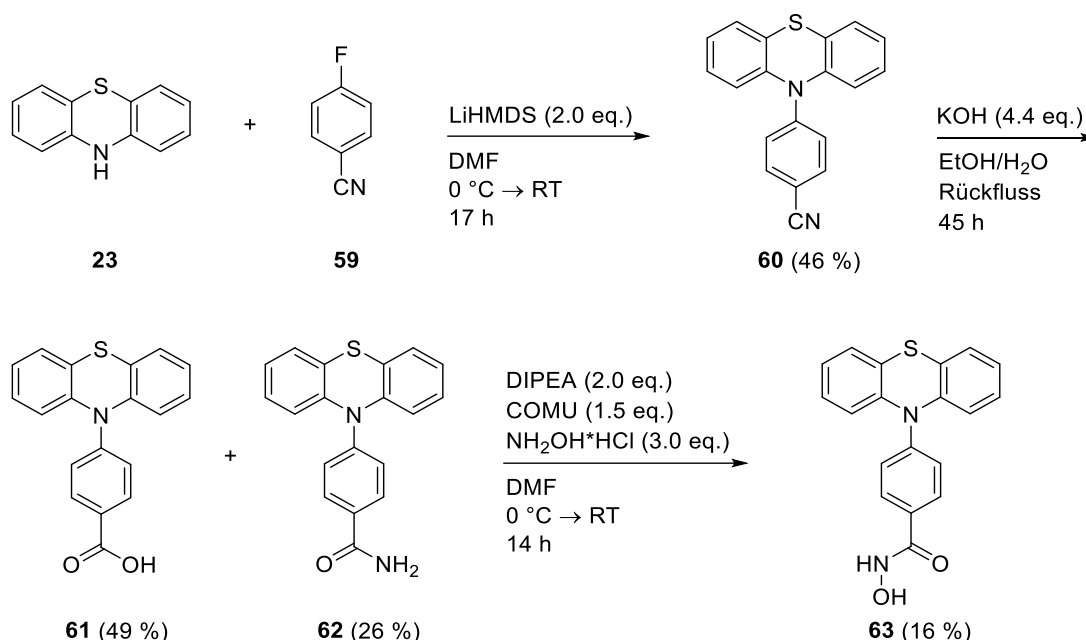


Abb. 44: Synthese des Strukturanalogons **63** mit verkürztem Linker.

3.2.2 SYNTHESE EINES STRUKTURANALOGONS MIT VERLÄNGERTEM LINKER

Die Synthese eines homologen Strukturanalogons mit einem um eine CH₂-Einheit erweiterten Linker bedurfte eines geeigneten Synthesebausteins für eine Arylethylierung. Butler *et al.*^[117] beschrieben ein prinzipiell hierfür geeignetes Linkerelement für eine N-Alkylierung, nämlich 4-(Bromethyl)benzoesäuremethylester. Dieser Ester ist jedoch nicht kommerziell erhältlich. Er könnte zwar aus der dazugehörigen Carbonsäure durch Umsetzung mit Thionylchlorid und Methanol synthetisiert werden, die erwähnte Carbonsäure wird aber auch nur von einem exotischen Lieferanten angeboten. Eine erste Überlegung war daher, die N-Arylethylierung

unter Verwendung von klassischen Mitsunobu-Bedingungen durchzuführen. Bombrun *et al.*^[181] derivatisierten auf diese Weise substituierte Indole und 9*H*-Carbazole mit diversen Alkoholen. Der für diese Synthese benötigte Alkohol wäre in zwei Syntheseschritten mit einer Gesamtausbeute von 41 % aus einem verhältnismäßig teuren Synthesebaustein (4-Vinylbenzoesäure; 18 €/mmol; Stand 09.08.2017, Sigma-Aldrich) herzustellen gewesen^[182]. Daher erschien dieser Ansatz nicht effektiv und ohne Berichte hinsichtlich der Anwendbarkeit der Mitsunobu-Reaktion am 10*H*-Phenothiazin wenig erfolgsversprechend.

Stattdessen erweckte eine andere Idee mehr Interesse, die reduktive Alkylierung von Aminen. Primäre und sekundäre aromatische Amine, darunter auch 10*H*-Phenothiazin, wurden von Righi *et al.*^[183] mit einem Dimethylacetal eines aliphatischen Aldehyds unter Verwendung von Triethylsilan und Trifluoressigsäure in einem One-Pot-Verfahren reduktiv N-alkyliert. In einer Methode aus unserem Arbeitskreis wurden von Popp^[184] unter Anwendung derselben Reaktionsbedingungen (Triethylsilan/Trifluoressigsäure) mit 1,3,5-Trioxan, einem acetalartigen cyclischen Trimer von Formaldehyd, erfolgreich aromatische Amine und N-Heterocyclen, darunter ebenfalls 10*H*-Phenothiazin, reduktiv N-methyliert. Daher wurde die Idee entwickelt, diese sauren reduktiven Bedingungen in Kombination mit einem geeigneten Synthesebaustein auf der Oxidationsstufe eines Arylacetaldehyds auf die N-Arylethylierung zu übertragen. Aufgrund der hohen Reaktivität des Phenylacetaldehyds und seiner ringsubstituierten Analoga und der damit verbundenen Neigung zur Polymerisation und Autokondensation^[185] war ein dementsprechend funktionalisierter Phenylacetaldehyd-Baustein nicht geeignet. Als stabileres Phenylacetaldehyd-Äquivalent wurde die Funktionalität des Enoethers ausgewählt. In einer Modellreaktion nach der Arbeitsvorschrift von Popp und Bracher^[184] wurde diese Methode unter Verwendung des kommerziell erhältlichen Bausteins (*E/Z*)-(2-Methoxyvinyl)benzol (**64**) erprobt und schon beim ersten Versuch 10-Phenylethyl-10*H*-phenothiazin (**65**) in 30 % Ausbeute erhalten (Abb. 45).

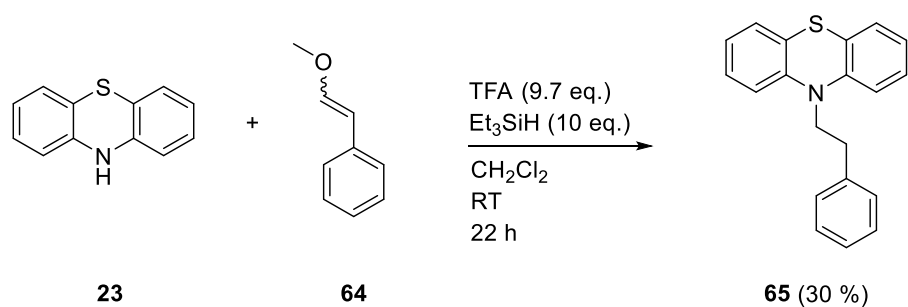


Abb. 45: Synthese von 10-Phenylethyl-10*H*-phenothiazin (**65**) mittels reduktiver Alkylierung.

Ungeachtet dieser moderaten Ausbeute wurde aufgrund des einfach zugänglichen Bausteins **67** (Abb. 46) dennoch diese Synthesestrategie gewählt. In einer Wittig-Reaktion^[186] konnte der

(*E/Z*)-Enolether **67** ausgehend vom kommerziell erhältlichen Aldehyd **66** in einer Ausbeute von 73 % hergestellt werden.

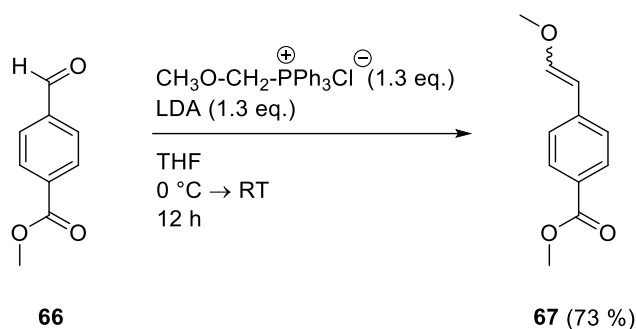


Abb. 46: Synthese des Arylethylierungsbausteins **67** über eine Wittig-Reaktion.

Der (*E/Z*)-Enolether **67** wurde dann mit 10*H*-Phenothiazin (**23**) und dem Gemisch aus Triethylsilan und Trifluoressigsäure zum Ester **68** umgesetzt (Abb. 47). Eine anfängliche wieder nur geringe Ausbeute von 25 % konnte durch einfache Absenkung der Reaktionstemperatur auf $0\text{ }^\circ\text{C}$ auf beachtliche 81 % gesteigert werden.

Die Zielverbindung **70** wurde nach Hydrolyse des Methylesters **68** zur Carbonsäure **69** unter Verwendung der in Kapitel 3.1.1.3 beschriebenen Methode in 50 % Ausbeute erhalten.

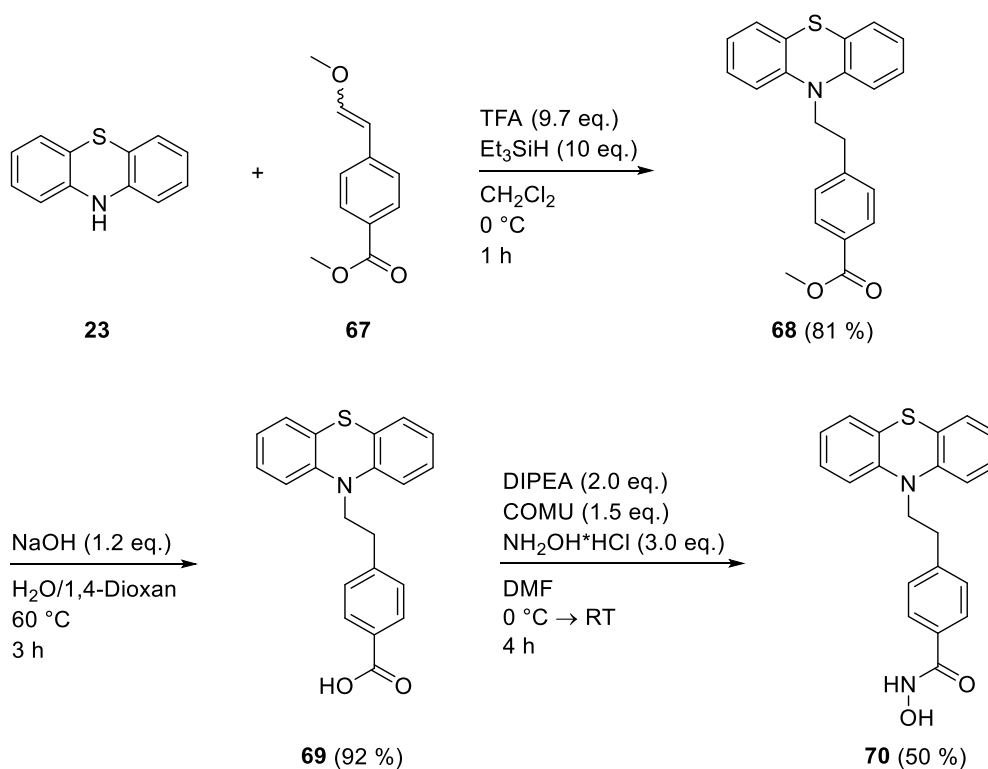


Abb. 47: Synthese des Strukturanalogons **70** mit verlängertem Linker.

Aufgrund der überaus erfolgreichen Anwendung der neu entwickelten reduktiven N-Phenylethylierung war es von großem Interesse zu erfahren, ob diese Methode auch für die Arylethylierung anderer Amine geeignet ist.

Die weitere Optimierung und systematische Prüfung auf Anwendbarkeit dieser neuen Methode zur N-Arylethylierung wird im folgenden Exkurs (Kapitel 3.2.3) beschrieben.

3.2.3 N-ARYLETHYLIERUNG VON AROMATISCHEN AMINEN UND N-HETEROCYCLEN MIT ENOLETHERN UNTER SAUREN REDUKTIVEN BEDINGUNGEN

3.2.3.1 EINLEITUNG/HINTERGRUND

Aliphatische und aromatische Amine, sowie N-Heterocyclen gehören zu den wichtigsten funktionellen Gruppen in niedermolekularen Arzneistoffen. Die N-Alkylierung von primären und sekundären Aminen sowie N-Heterocyclen findet demnach vielfache Anwendung in der Arzneistoffsynthese. Besonders häufig werden Methyl- und Benzylreste eingefügt, deren entsprechende Halogenide leicht zugänglich und sehr reaktiv für nucleophile Substitutionsreaktionen sind. Für die systematische Analyse von Struktur-Aktivitäts-Beziehungen bei der Entwicklung von neuen stickstoffhaltigen Arzneistoffen besteht aber auch regelmäßig der Bedarf Phenylethyl-Analoga herzustellen. Bei z.B. von Morphin und Oxymorphon abgeleiteten Analgetika konnten sogar deutlich verbesserte biologische Eigenschaften hinsichtlich Aktivität und Selektivität durch die Derivatisierung mit einem Phenylethyl-Rest und eine Überlegenheit gegenüber Benzyl- und Phenylpropylgruppen gezeigt werden^[187].

Die am häufigsten verwendeten Methoden zur N-Alkylierung von Aminen ausreichender Nucleophilie stellen die direkte N-Alkylierung mit Alkylhalogeniden oder –sulfonaten unter Verwendung von Hilfsbasen sowie die reduktive Alkylierung mit entsprechenden Aldehyden in Gegenwart von Reduktionsmitteln dar. Schwächer nucleophile aromatische Amine und N-Heterocyclen sind für derartige N-Alkylierungen weniger leicht zugänglich. Diese müssen normalerweise zuerst mittels starker Basen, wie beispielsweise Natriumhydrid oder, wie in dieser Arbeit, LiHMDS, deprotoniert werden, um die Reaktivität gegenüber dem Alkylhalogenid zu erhöhen^[188-189]. Dennoch lassen sich mit dieser Methode standardmäßig Methyl-, Alkyl- und Benzylreste einführen.

Im Gegensatz dazu sind N-Arylethylierungen weniger praktikabel und es sind dabei eine Reihe von möglichen Problemen zu berücksichtigen. Die N-Arylethylierung von Aminen durch reduktive Aminierung mit z.B. Phenylacetaldehyd und Natriumcyanoborhydrid wird durch die ausgeprägte Instabilität der Arylacetaldehyde beeinträchtigt und verläuft im Allgemeinen nur

in geringer Ausbeute^[190-191]. Die N-Alkylierung mit Phenylethylhalogeniden führt zur beträchtlichen Bildung eines Eliminierungsnebenprodukts. So kann unter den stark basischen Reaktionsbedingungen, die zur Deprotonierung der schwächer nucleophilen Amine und N-Heterocyclen erforderlich sind, β -Eliminierung der Phenylethylhalogenide zu Styrolen auftreten^[190]. Außerdem kann das phenylethylierte Produkt basen-vermittelt einer Fragmentierungsreaktion unterliegen^[192]. Dazu kommt, dass Phenylethylhalogenide, die zusätzliche Substituenten am Phenylring tragen, kaum kommerziell erhältlich sind. Ihre Herstellung erfordert üblicherweise mehrstufige Synthesen, ausgehend beispielsweise von substituierten Styrolen^[193-194], Arylessigsäuren^[195] oder aromatischen Aldehyden^[196].

Demzufolge wurden im Laufe der Jahre weitere Methoden zur Arylethylierung entwickelt. Aliphatische und aromatische Amine können Basen- oder Übergangsmetall-katalysiert an Styrole unter Ausbildung der anti-Markownikov Produkte **73** und **76** addiert werden (Abb. 48 und Abb. 49)^[197-199]. Dabei kann die basen-katalysierte Addition von Anilinen an Styrole ein Gemisch der mono- und di-phenylethylierten Produkte ergeben^[200]. Die Übergangsmetall-katalysierte Hydroaminierung mit einem Kupfer-Katalysator, als kostengünstigere Alternative zu den sonst verwendeten Ruthenium- und Rhodium-Katalysatoren, ist hingegen auf elektronenarme Styrole beschränkt^[201].

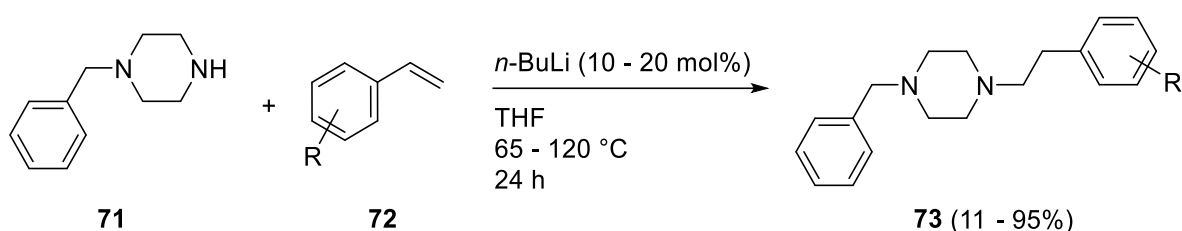


Abb. 48: Basen-katalysierte Hydroaminierung von Styrolen mit N-Benzylpiperazin nach Kumar *et al.*^[198].

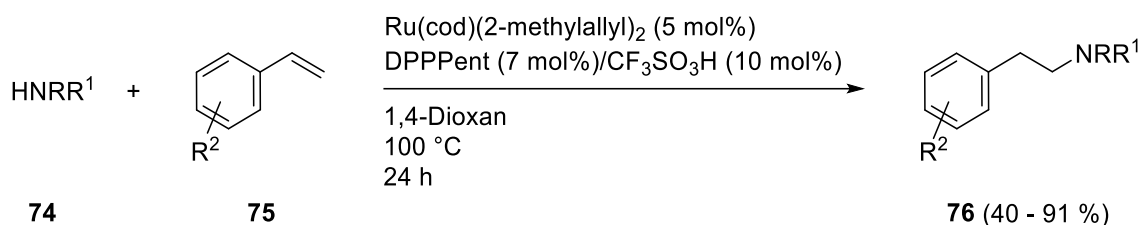
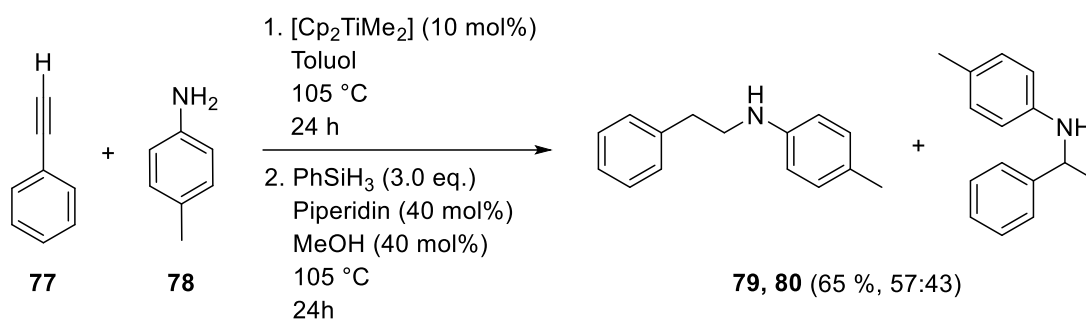


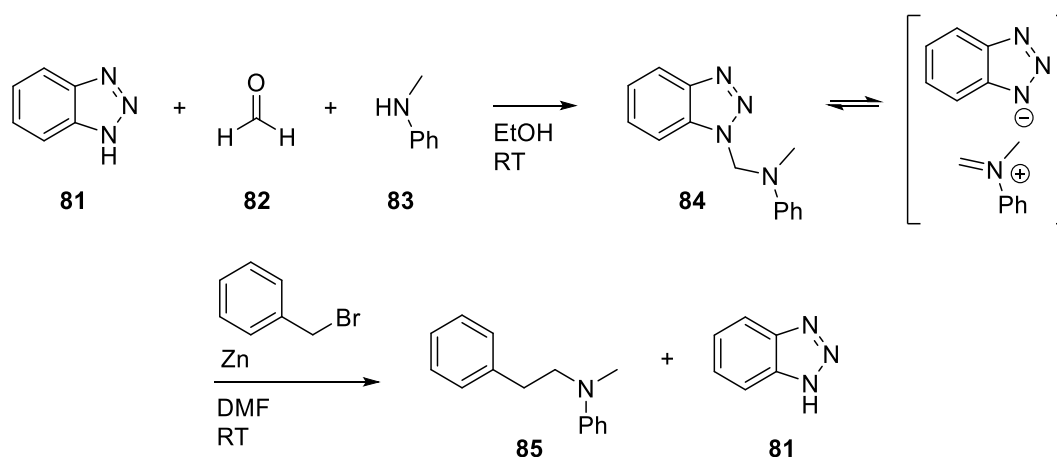
Abb. 49: Ruthenium-katalysierte Hydroaminierung von Styrolen mit Alkylaminen nach Utsunomiya *et al.*^[199].

Eine Sequenz aus Titan-katalysierter Hydroaminierung von Phenylacetylen (**77**) und anschließender Hydrosilylierung ermöglicht in einem One-Pot-Verfahren die Bildung der entsprechenden sekundären Amine **79** und **80**, jedoch als Gemisch ihrer Regioisomere^[202] (Abb. 50).

Abb. 50: Titan-katalysierte Hydroaminierungs/Hydrosilylierungs-Sequenz nach Heutling *et al.*^[202].

Arylethanoole können als Synthesebausteine bei der N-Alkylierung von aromatischen Aminen unter Verwendung eines Rutheniumkatalysators^[203] oder modifizierten Mitsunobu-Bedingungen ($\text{Ph}_3\text{P/DDQ}$, ein einziges Beispiel mit 2-Phenylethanol)^[204] dienen. Mono-Phenylethylierung von aromatischen Aminen kann des Weiteren durch Kupfer-katalysierte Kreuzkupplung mit Phenylethylboronsäure erhalten werden^[190].

Andere Methoden basieren darauf, ein Amin nacheinander mit einem C_1 -Baustein und einem Benzylrest zu substituieren. Katritzky *et al.* verwendeten hierfür in zwei unterschiedlichen zweistufigen Methoden zum einen ein (Phenylthio)methyl-Derivat^[205] und zum anderen ein *N*-(Benzotriazol-1-yl)methyl-Derivat^[206-207], wie z.B. Verbindung **84** (Abb. 51). Diese Derivate fungieren als Präkursoren von Methyleniminium-Ionen als C_1 -Bausteine und reagieren in einem zweiten Schritt mit einem metallorganischen Benzylbaustein zum Arylethylamin **85**.

Abb. 51: Formale Phenylethylierung unter Verwendung von Benzotriazol-Derivaten und Organozinkreagenzien nach Katritzky *et al.*^[207].

Nach Werner *et al.*^[208] wird dagegen in einem One-Pot-Verfahren das Tietze Iminiumsalz (*N,N*-Dimethyl(methylen)iminium-Trifluoracetat) als C_1 -Baustein verwendet. Dieses wird durch

Reaktion mit dem Amin, hier gezeigt am Beispiel des Carbazols (**86**), zu einem neuen Iminiumion **89** funktionalisiert, welches dann mit benzyllisch-metallorganischen Verbindungen umgesetzt werden kann (Abb. 52).

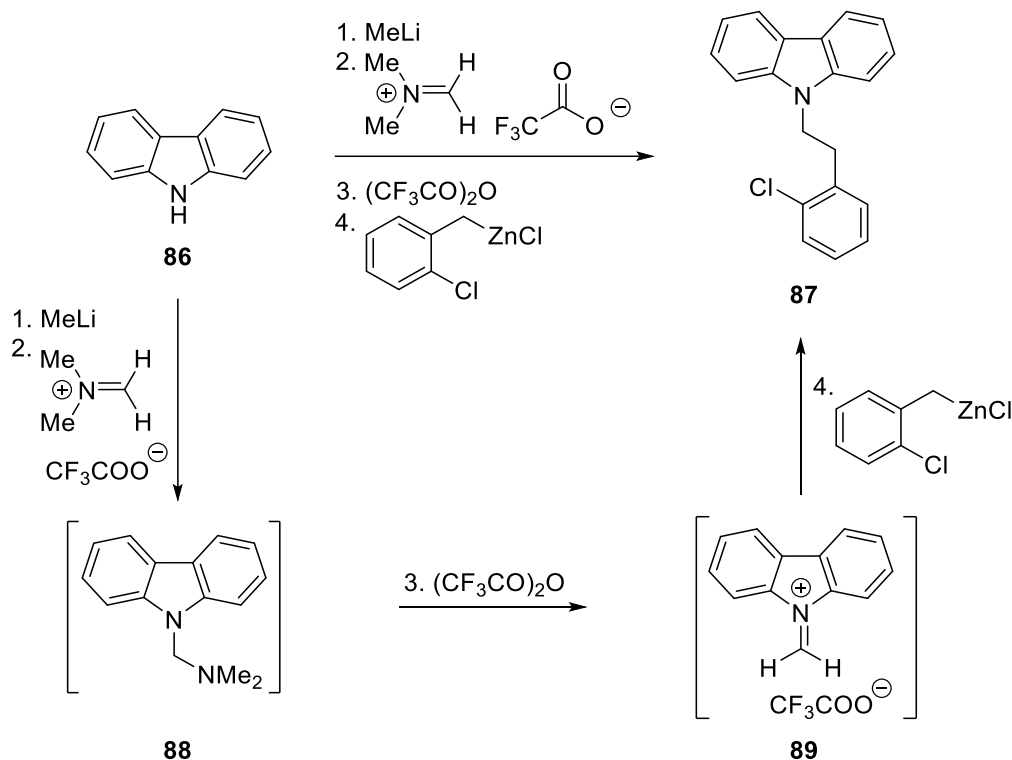


Abb. 52: One-Pot-Verfahren zur Herstellung von Phenylethylaminen über die Bildung von neuen Iminiumionen nach Werner *et al.*^[208].

Als interessante Alternative zu den bisher beschriebenen Alkylierungsmethoden hat sich die reduktive Alkylierung erwiesen. Dabei werden Amine mit Aldehyden oder Verbindungen gleicher Oxidationsstufe mittels Organosilanen unter sauren Bedingungen umgesetzt. Patel *et al.*^[209] konnte mit dieser Methode ein breites Spektrum an primären aromatischen Aminen mit verschiedenen Carbonylverbindungen (Aldehyde, Ketone) bzw. Aldehydäquivalenten (Acetal, ein einziges Beispiel) unter Verwendung von Polymethylhydrosiloxan (PMHS)/TFA umsetzen. Rigidi *et al.*^[183] gelang die reduktive Alkylierung primärer und sekundärer aromatische Amine mit Acetalen unter sauren Bedingungen und Triethylsilan. Diese Methode konnte, wie oben schon erwähnt, in unserem Arbeitskreis erfolgreich zur N-Methylierung von aromatischen Aminen und N-Heterocyclen mittels 1,3,5-Trioxan weiterentwickelt werden^[184]. Weiterführend konnte diese Methodik mit Erfolg in dieser Arbeit für die Synthese des Phenothiazin-Derivats **68** adaptiert werden, wobei ein Enoether als Aldehydäquivalent eingesetzt wurde (siehe Kapitel 3.2.2, Abb. 47).

Die erfolgreiche Anwendung der reduktiven Arylethylierung eines N-Heterocyclus mittels eines Enoletherbausteins erweckte das Interesse an einer möglichen Optimierung, der Evaluation des Anwendungsgebietes und der Eruierung etwaiger Einschränkungen dieser neuen Methode zur N-Arylethylierung.

3.2.3.2 OPTIMIERUNG, ANWENDUNGSMÖGLICHKEITEN UND EINSCHRÄNKUNGEN

Zur weiteren Optimierung und Erprobung der Anwendbarkeit wurde zunächst das kommerziell erhältliche (*E/Z*)-(2-Methoxyvinyl)benzol (**64**) verwendet (Abb. 53). In den vorangegangenen Versuchen hatte sich die Reaktionsdurchführung bei erniedrigter Temperatur als günstig hinsichtlich gebildeter Nebenprodukte und erzielter Ausbeute erwiesen (Kapitel 3.2.2, Verbindung **68**: 25 % bei Raumtemperatur vs. 81 % bei 0 °C). Weitere Versuche ergaben, dass sich eine portionsweise Zugabe des (*E/Z*)-Enolethers **64** (Tab. 4: *ii*, Reaktionskontrolle mittels DC) im Gegensatz zu einer Gesamtzugabe in einer Portion (Tab. 4: *i*) zudem positiv auf die Ausbeute und Bildung von Nebenprodukten auswirkt. Die N-Heterocyclen 10*H*-Phenothiazin (**23**) und Diphenylamin (**90**) wurden durch sequentielle Zugabe mit 1.5 bis 3.0 eq. des (*E/Z*)-Enolethers **64** nahezu vollständig umgesetzt, wohingegen bei einmaliger Zugabe von 3.0 eq. zum einen keine vollständige Umsetzung stattfand und zum anderen mehr Nebenprodukte detektiert (DC) wurden.

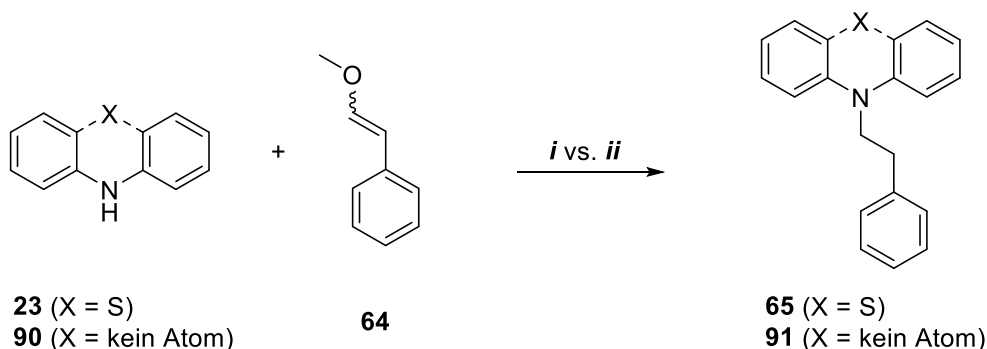


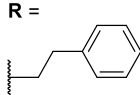
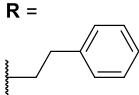
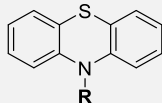
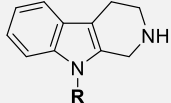
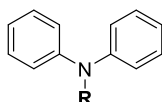
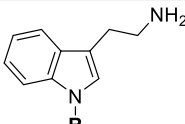
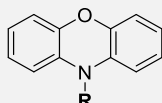
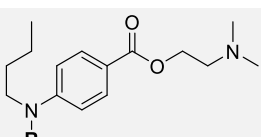
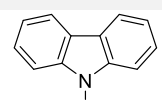
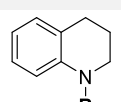
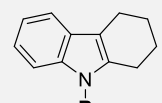
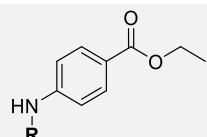
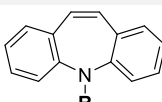
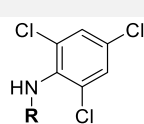
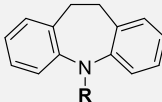
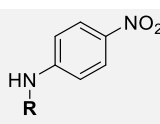
Abb. 53: Reaktionsdurchführung bei der N-Phenylethylierung.

Exp.	N-Heterocyclus	(<i>E/Z</i>)-Enolether 64 (eq.)	Zeit [h]	Ausbeute [%]
<i>i</i>	23	3.0	22	30
	90	3.0	5	34
<i>ii</i>	23	2.0	3	71
	23	1.5	2	92
	90	3.0	5	70

Tab. 4: Versuche zur Reaktionsdurchführung der N-Phenylethylierung.

Daraus ergab sich als optimierte Reaktionsdurchführung folgende Vorgehensweise: Das Amin wurde in wasserfreiem Dichlormethan unter Stickstoffatmosphäre gelöst. Unter Eiskühlung wurden ein eq. (*E/Z*)-Enolether (**64**) sowie 10 eq. Triethylsilan und 9.7 eq. Trifluoressigsäure hinzugefügt. Nach detektierter Umsetzung (DC-Kontrolle) des (*E/Z*)-Enolethers wurden weitere Äquivalente (0.50 oder 1.0 eq.) zugegeben bis das Amin abreagiert war bzw. die Umsetzung erkennbar stagnierte.

Diese Methode zur N-Phenylethylierung wurde an einer Reihe weiterer Verbindungen angewandt. Die hergestellten Verbindungen, sowie die Reaktionsparameter und Ausbeuten sind folgender Tabelle zu entnehmen (Tab. 5).

<div>R = </div>	64 (eq.)	Zeit [h]	Ausbeute [%]	<div>R = </div>	64 (eq.)	Zeit [h]	Ausbeute [%]
 65	1.5	2	92	 97	3.0	15	20
 91	3.0	5	70	 98	3.0	8	< 18
 92	2.0	4	55	 99	3.0	9	85
 93	2.0	4	54	 100	3.0	6	55
 94	3.0	9	48	 101	3.0	77	48
 95	4.0	71	80	 102	2.0	4	52
 96	3.0	8	75	 103	3.0	5	41

Tab. 5: Verbindungen, die mit der N-Phenylethylisierungsmethode erhalten werden konnten.

Die Umsetzung mit N-heterocyclischen Verbindungen (10H-Phenoxazin, Carbazol, 1,2,3,4-Tetrahydrocarbazol, 5H-Dibenz[b,f]azepin, 10,11-Dihydro-5H-dibenz[b,f]azepin) führte, ähnlich wie bei 10H-Phenothiazin, zu guten bis sehr guten Ausbeuten der entsprechenden phenylethylierten Verbindungen (Tab. 5: **92**, **93**, **94**, **95**, **96**). Bei der Umsetzung von 1,2,3,4-Tetrahydro-β-carbolin wurde chemoselektiv nur der Indol-Stickstoff, neben dem im Molekül vorhandenen aliphatischen Amin phenylethyliert und **97** in 20 %

Ausbeute erhalten. Die geringere Ausbeute ist auch dadurch zu begründen, dass **97** erst durch zusätzliche verlustreiche Ausfällung nach der Säulenchromatographie komplett aufgereinigt werden konnte. Die vom Tryptamin abgeleitete Verbindung **98** konnte zwar mittels $^1\text{H-NMR}$ strukturell bestätigt werden, jedoch war trotz wiederholter säulenchromatographischer Aufreinigung keine analysenreine Isolierung möglich. Aber auch hier war die Phenylethylierung nur am Indol und nicht an der aliphatischen Aminogruppe erfolgt. Grund für diese Chemoselektivität ist offensichtlich, dass die stärker basischen aliphatischen Amine durch praktisch komplette Protonierung durch die Trifluoressigsäure vor der Reaktion mit dem aus dem Enoether durch Protonierung gebildeten Elektrophil geschützt werden. Die Phenylethylierung der sekundären aromatischen Amine Diphenylamin, Tetracain und 1,2,3,4-Tetrahydrochinolin war ebenfalls erfolgreich und die gewünschten Produkte **91**, **99** und **100** konnten in guter bis sehr guter Ausbeute dargestellt werden. Die primären aromatischen Amine 4-Aminobenzoesäureethylester (Benzocain), 2,4,6-Trichloranilin und 4-Nitroanilin wurden mit 41 % bis 52 % in die *mono*-phenylethylierten Verbindungen (Tab. 5: **101**, **102**, **103**) überführt. In weiteren Reaktionen mit den beiden primären aromatischen Aminen Benzocain und 2,4,6-Trichloranilin zu den Verbindungen **101** und **102** konnten auch in geringeren Mengen die *di*-phenylethylierten Produkte isoliert werden. Dies steht im Gegensatz zu den Erfahrungen von Popp und Bracher^[184] mit der analogen N-Methylierung von Anilinen mit 1,3,5-Trioxan, wo die dimethylierten Produkte dominierten. Die Ursache für diesen Unterschied dürfte in der größeren sterischen Hinderung der Phenylethyl-Gruppe liegen.

Die erfolglose Umsetzung des aliphatischen Amins **104** sowie des Acridons (**105**) lag, begründet durch die Ergebnisse der Methylierung mittels des 1,3,5-Trioxan nach Popp und Bracher^[184], in unserer Erwartung (Abb. 54). Edukt **104** ist ein protonierbares aliphatisches Amin, im Acridon (**105**) ist offensichtlich durch die Konjugation zur Carbonylgruppe die Nucleophilie des Stickstoffs zu gering. Überraschend war das Reaktionsverhalten des *N*-Benzylanilins (**106**). Bei diesem war Popp die N-Methylierung noch leidlich gelungen, eine N-Phenylethylierung konnte aber nicht beobachtet werden.

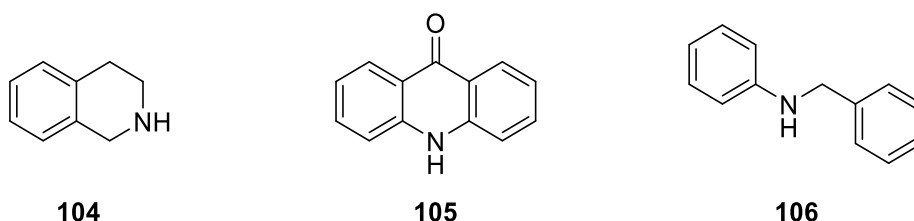


Abb. 54: Unreaktive Amine unter den Reaktionsbedingungen der N-Phenylethylierung.

Da sich gezeigt hatte, dass sich sowohl primäre als auch sekundäre aromatische Amine sowie N-Heterocyclen mit (*E/Z*)-(2-Methoxyvinyl)benzol (**64**) phenylethylieren lassen, sollten zusätzlich funktionalisierte Enoether untersucht und mit 10*H*-Phenothiazin (**23**) umgesetzt werden. Bereits in Kapitel 3.2.2 wurde beschrieben, dass der (*E/Z*)-Enoether **67** aus dem entsprechenden Aldehyd **66** einfach über eine Wittig-Reaktion dargestellt werden kann (Abb. 46). In gleicher Weise wurden die (*E/Z*)-Enoether **107-109** aus den entsprechenden Aldehyden hergestellt (Abb. 55).

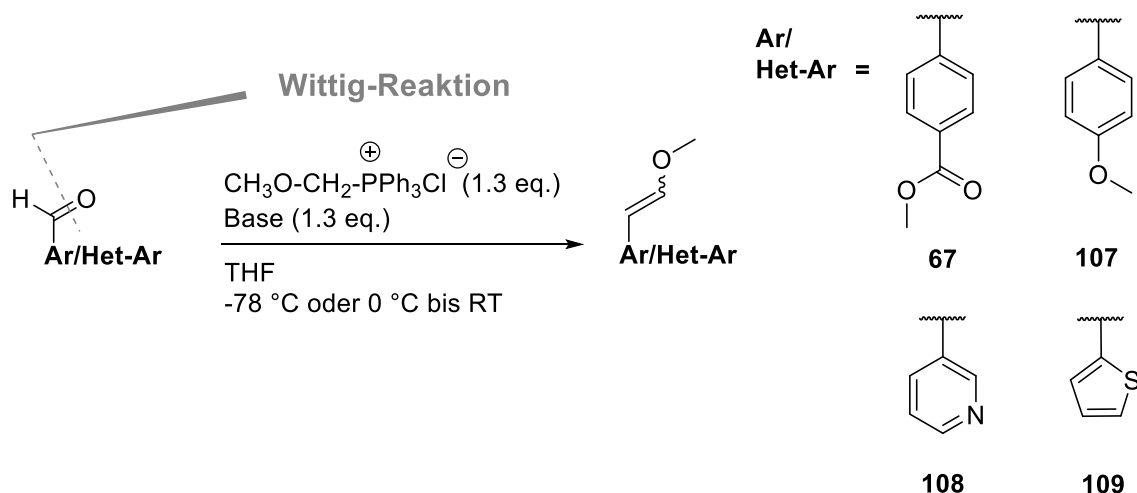


Abb. 55: Herstellung verschiedener (*E/Z*)-Enoether mittels Wittig-Reaktion.

Die Phenylethylierung von 10*H*-Phenothiazin (**23**) mit den verschiedenen funktionalisierten (*E/Z*)-Enoethern **107-109** erfolgte nach der optimierten Methode unter sequentieller Zugabe (Tab. 6, Abb. 56; Ausnahme: Verbindung **68**, siehe Kapitel 3.2.2). Sämtliche durchgeführten N-Arylethylierungen verliefen in sehr guten Ausbeuten. Exemplarisch wurde die N-Arylethylierung auch mit einem ausgewählten (*E/Z*)-Enoether an einem primären aromatischen Amin durchgeführt und bei der erhaltenen Verbindung **113** konnte sogar eine deutlich höhere Ausbeute erzielt werden als bei der entsprechenden N-Phenylethylierung (vgl. Tab. 6 und Tab. 5, 72 % vs. 41 %).

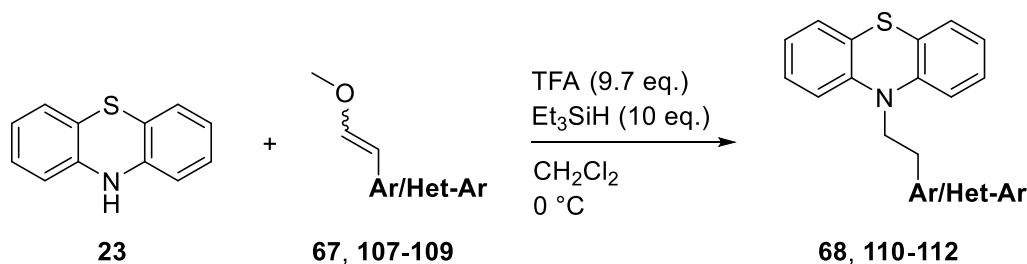
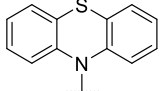
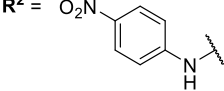
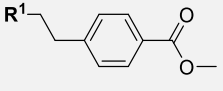
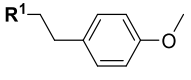
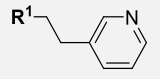
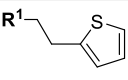
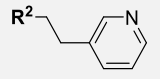


Abb. 56: N-Arylethylierung von 10*H*-Phenothiazin (**23**) mit unterschiedlichen (*E/Z*)-Enoethern.

<div> <div> $R^1 =$  </div> <div> $R^2 =$  </div> </div>	(<i>E/Z</i>)-Enolether 67 oder 107-109 (eq.)	Zeit [h]	Ausbeute [%]
 68	3.0	1	81
 110	1.5	4	68
 111	2.0	20	72
 112	1.5	3	94
 113	1.0	2	72

Tab. 6: N-Arylethylierung mit unterschiedlichen Enolethern.

Die hier entwickelte neue Methode zur (Hetero)Arylethylierung von Anilinen und N-Heterocyclen sollte das Repertoire zur Herstellung von (Hetero)Arylethylaminen wesentlich erweitern. Die verwendeten Bausteine, die (2-Methoxyvinyl)(hetero)arene, zeichnen sich im Vergleich zu anderen bekannten Bausteinen für die Arylethylierung ((Hetero)Arylethylhalogenide, (Hetero)Arylacetaldehydacetale (Hetero)Arylacetylene, (Hetero)Arylacetaldehyde, Styrole) durch leichte Zugänglichkeit und verbesserte Stabilität aus. Des Weiteren sind bei dieser Methode keine teuren oder umweltbelastenden Metallkatalysatoren erforderlich. Die unkomplizierte Reaktionsdurchführung dieser Methode unter milden Reaktionsbedingungen verbunden mit der hohen Kompatibilität mit diversen funktionellen Gruppen sowie die nachweisliche Chemoselektivität gewährleisten eine breite Anwendbarkeit im Gebiet der Medizinalchemie.

Die Ergebnisse dieses Kapitels wurden kürzlich im Journal Synthesis publiziert^[210].

3.3 SYNTHESE DER VERBINDUNGEN MIT DIVERSEN CAP-GRUPPEN

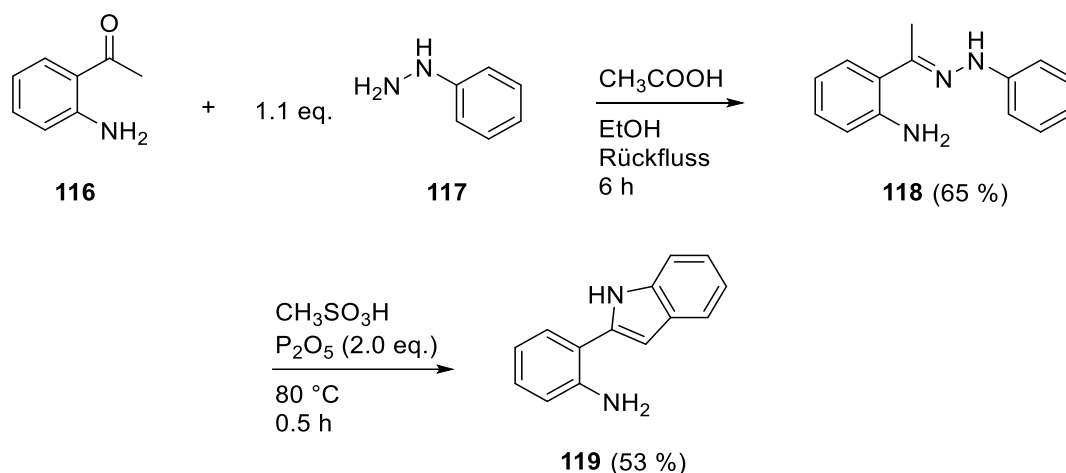
Aufbauend auf den Arbeiten zu bekannten KDAC-Inhibitoren wurde versucht, Inhibitoren mit verbesserter Aktivität und Selektivität zu entwickeln. Dabei sollten durch Kombination etablierter Linkerelemente sowie der Hydroxamsäure-Funktion als Zink-bindender Gruppe mit verschiedenen Cap-Gruppen neue Zielverbindungen synthetisiert werden.

3.3.1 SYNTHESE VON VERBINDUNGEN MIT VERSCHIEDENEN CAP-GRUPPEN AUSGEHEND VON EINEM PHENYL-LINKERELEMENT

Für die Synthese einer Reihe von Verbindungen mit kurzem, relativ starrem Linkerelement wurden unterschiedliche tri- bzw. tetracyclische Heterocyclen gewählt, welche direkt mit einem Phenylring verknüpft sind, der in *para*-Position eine Hydroxamsäure-Gruppe trägt. Diese Experimente wurden in einer sehr frühen Phase des Projekts durchgeführt und waren von der Hoffnung getragen, dass sich unter den anvisierten ungewöhnlichen, aber doch gut herstellbaren kondensierten Heteroaromaten neuartige Cap-Gruppen für potente und selektive Inhibitoren finden lassen. Dieser Ansatz wurde sehr früh wieder aufgegeben – nicht wegen Erfolglosigkeit, sondern weil sich mit dem klassischen Phenothiazin (in Verbindung **20**) sehr früh eine äußerst attraktive Cap-Gruppe für gleichermaßen potente wie auch selektive Inhibitoren in Kombination mit dem Benzyl-Linkerelement gefunden hatte (Kapitel 3.3.2).

Für die Synthese der Produkte **134**, **135** und **136** wurde eine modifizierte Bischler-Napieralski Cyclodehydratisierungsreaktion nach Movassaghi *et al.*^[211] verwendet. Diese ermöglichte den Aufbau verschiedener Heterocyclen und die Einführung des Linkers, indem Aniline mit *ortho*-ständigen (Hetero)Aromaten mit aktivierten Carbonsäuren zu den entsprechenden Amiden umgesetzt und anschließend cyclisiert wurden (Abb. 58).

Die dafür verwendeten Amine waren einerseits kommerziell erhältlich (**114**, **115**) oder wurden, wie beim 2-(2-Aminophenyl)indol (**119**), durch eine Fischer-Indol-Synthese in zwei Syntheseschritten hergestellt (Abb. 57). Nach Kiang *et al.*^[212] wurde das benötigte Hydrazon **118** durch Umsetzung von Phenylhydrazin (**117**) mit 2-Aminoacetophenon (**116**) in 65 % Ausbeute (15.3 mmol Maßstab) erhalten. Der Ringschluss zum Indol **119** verlief nach Billimoria *et al.*^[213] unter Katalyse von Phosphorpentoxid und Methansulfonsäure (Ausbeute 53 %, 8.87 mmol Maßstab).

Abb. 57: Fischer-Indol Synthese zum Amin **119**.

Zur Synthese der Amide wurden verschieden aktivierte Carbonsäuren verwendet, die mit den *o*-Arylanilinen reagierten (Abb. 58). Zum einen wurden die Amine **114** und **115** nach Aktivierung der Carbonsäure **120** mit Diisopropylcarbodiimid^[214] in guten bis sehr guten Ausbeuten zu den Amiden **122** und **123** umgesetzt. Ebenfalls in sehr guter Ausbeute verlief die Bildung des Amids **124** aus dem Amin **119** und dem Säurechlorid **121**^[144]. In der nachfolgenden Cyclodehydratisierung^[211] mit Trifluormethansulfonsäureanhydrid und 2-Chlorpyridin gelang unter milden Bedingungen der Aufbau der anellierten Heterocyclen (**125-127**) in 71-75 % Ausbeute. Die Verseifung der Esterfunktionen im nachfolgenden Schritt zu den entsprechenden Carbonsäuren (**128-130**) gelang in sehr guten bis ausgezeichneten Ausbeuten. Die Synthese der Hydroxamsäuren ausgehend von den Carbonsäuren wurde wie in Kapitel 3.1.1.2.2 beschrieben unter Verwendung der THP-Schutzgruppe durchgeführt. Die Aktivierung der Carbonsäuren **128** und **129** erfolgte durch das Carbodiimid EDC unter Zusatz von HOBT, sowie bei der Carbonsäure **130** durch COMU. Die Umsetzung der aktivierten Carbonsäuren mit dem THP-geschützten Hydroxylamin ergab die Hydroxamsäuren in ihrer geschützten Form **131-133** in guten Ausbeuten. Die anschließende Abspaltung der THP-Gruppe lieferte die Zielverbindungen **134-136** in 72-95 % Ausbeute.

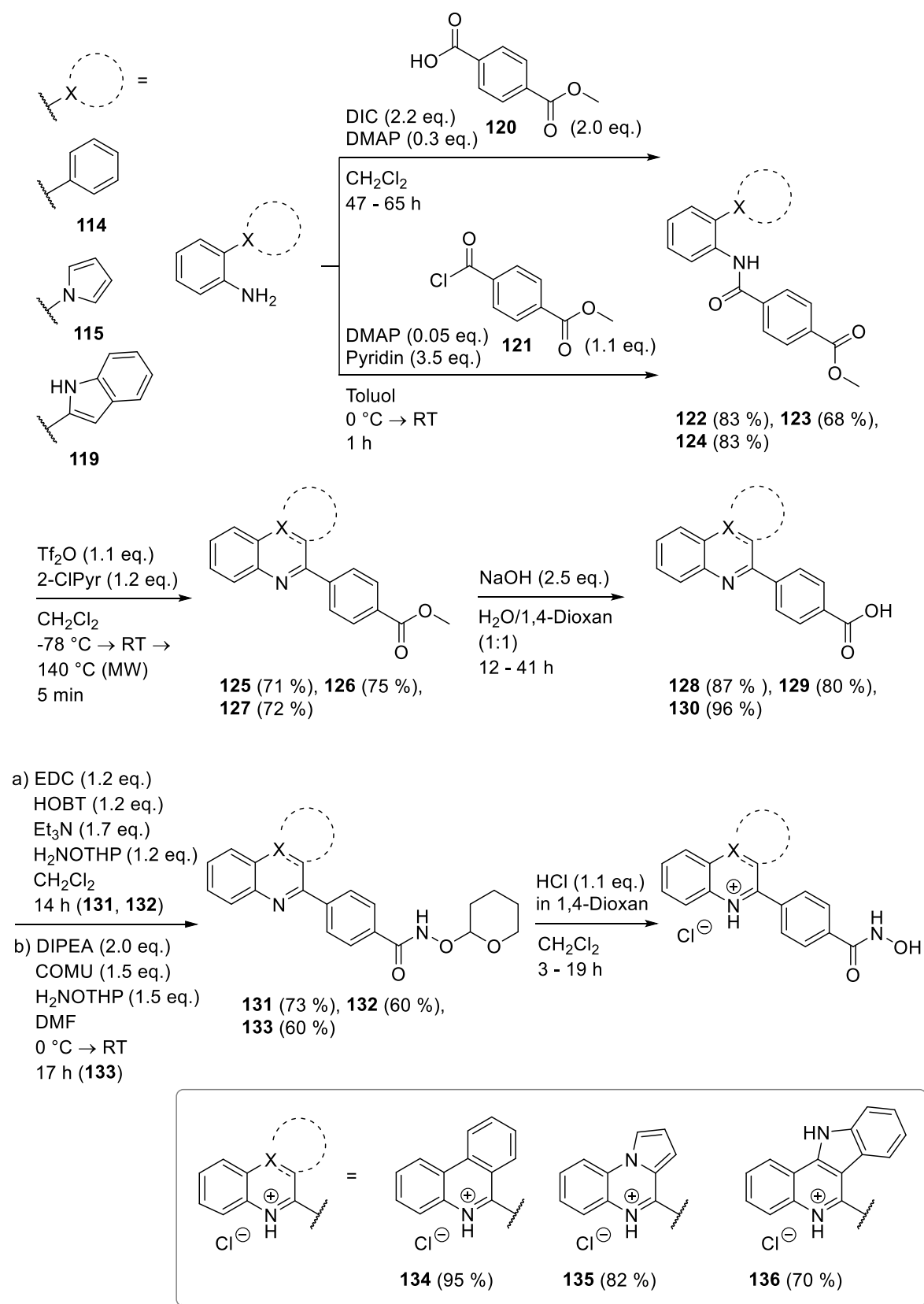


Abb. 58: Synthese der Verbindungen mit Phenyl-Linkereinheit und verschiedenen heterocyclischen Cap-Gruppen.

3.3.2 SYNTHESSE VON STRUKTURANALOGA DES TUBASTATIN A – HYDROXAMSÄUREN MIT BENZYL-LINKER KOMBINIERT MIT VERSCHIEDENEN CAP-GRUPPEN

Eine erste Untersuchung zur Synthese von Strukturanaloga des Tubastatin A (**14**) mit einer sehr kleinen Anzahl anellierter Tricyclen in Kombination mit einem Benzyl-Linkerelement brachte das Phenothiazin als sehr vielversprechende Cap-Gruppe für sehr potente und zugleich selektive KDAC6-Inhibitoren hervor. Die Synthese dieser Zielverbindungen folgte einer allgemeinen Syntheseroute und wird in Kapitel 3.3.2.3 vorgestellt.

Ermutigt durch den durchschlagenden Erfolg mit dem klassischen Phenothiazin als Cap-Gruppe wurden im Folgenden diverse Variationen dessen untersucht. Die gesamte Klasse der Phenothiazine stellt ein viel genutztes Motiv in der Wirkstoffentwicklung dar und die Bandbreite an möglichen Variationen ist immens. Begleitet von weiteren biologischen Testergebnissen wurden unterschiedliche Variationsmöglichkeiten (weitere Substituenten, Aza-Analoga, partiell hydrierte Analoga, Bioisostere) aufgegriffen.

3.3.2.1 ALLGEMEINE SYNTHESESTRATEGIEN FÜR PHENOTHIAZINE UND DEREN ANALOGA

10*H*-Phenothiazin (10*H*-Dibenzo-1,4-thiazin) wurde 1883 von August Bernthsen^[215] im Zuge der Konstitutionsaufklärung von Methylenblau und Lauths Violett erstmalig synthetisiert. Seither entwickelten sich die Phenothiazine aufgrund ihrer vielfältigen biologischen und chemischen Eigenschaften zu einer bedeutenden Substanzklasse unter den Heterocyclen. So finden sie häufig Verwendung als Bausteine in der Synthese von Arzneistoffen, aber auch in anderen Stoffgruppen mit optoelektrochemischen und photophysikalischen Eigenschaften^[216-219], in Antioxidantien^[220-222], Polymerisationsinhibitoren^[223], industriellen Farbstoffen^[224-225] und agrochemischen Verbindungen^[226]. Über viele Jahre stellten modifizierte Phenothiazine wertvolle Arzneimittel mit neuroleptischen (**137**, **138**, **139**, **140**, **141**), H₁-antihistaminischen (**141**, **142**), antitussiven (**143**) und antiemetischen (**140**, **141**, **144**) Wirkprinzipien dar (Abb. 59). Jüngere Berichte verweisen auf weitere vielversprechende antitumorale, antibakterielle, antivirale, antifungale, antinfiammatorische und Multiresistenzen aufhebende Wirkungen^[227], ebenso wie auf mögliche Anwendungsgebiete bei Morbus Alzheimer^[228], Creutzfeldt-Jakob^[229] und AIDS-assoziierten Erkrankungen^[230].

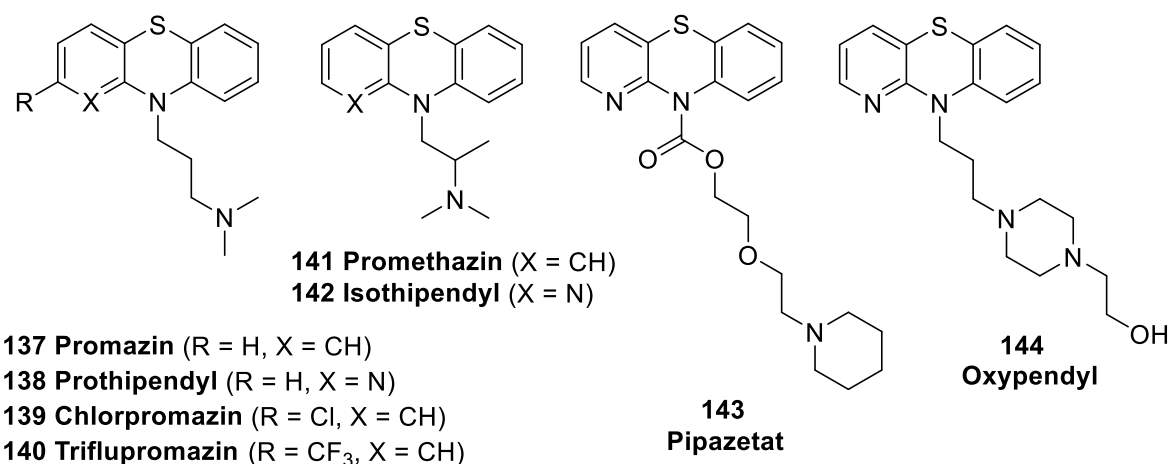


Abb. 59: Bedeutende Wirkstoffe, die den Phenothiazin-Grundkörper beinhalten.

Dementsprechend umfangreich ist die Bandbreite an entwickelten Methoden zur Synthese von (substituierten) Phenothiazinen und deren Analoga. Bezug nehmend auf Übersichtswerke^[226, 231-233] basiert ein Großteil der Synthesestrategien zum Aufbau des Ringsystems darauf, dass entweder zwei S-C-Bindungen in einem Schritt oder eine S-C-Bindung und eine N-C-Bindung (ein oder zwei Schritte) geknüpft werden. Substituierte Phenothiazine können ferner auch aus bestehenden durch nachträgliche direkte Substitutionsreaktionen gebildet werden (Abb. 60).

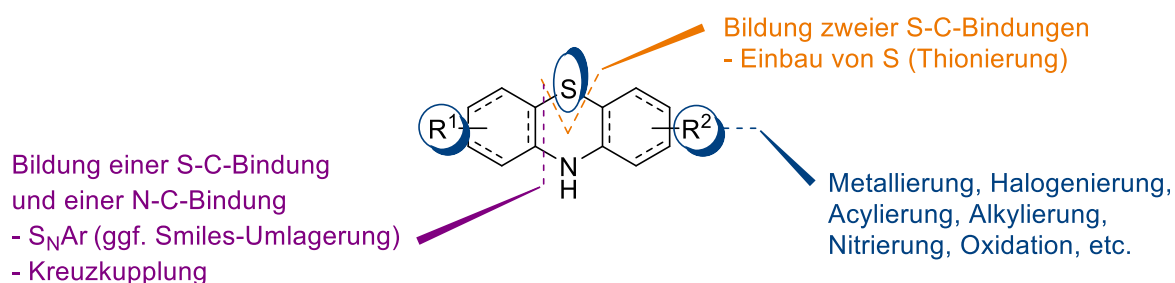


Abb. 60: Prinzipielle Herangehensweisen zum Aufbau von Phenothiazinen und deren Analoga.

Bildung von zwei S-C-Bindungen

Der Ringschluss unter Knüpfung von zwei S-C-Bindungen erfolgt ausgehend von (substituierten) Diphenylaminen bzw. Phenylazinyllaminen oder Diazinyllaminen durch Thionierung (Abb. 61).

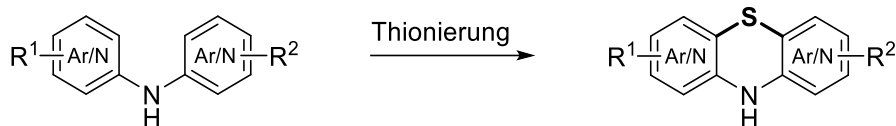


Abb. 61: Bildung von zwei S-C-Bindungen durch Thionierung.

Klassischerweise werden dazu die Amine mit elementarem Schwefel, häufig Iod-katalysiert, bei hoher Temperatur umgesetzt. Mitunter finden auch andere Thionierungsagenzien, wie z.B. Sulfurylchlorid^[234] und Thionylchlorid^[235], Verwendung. Diese Syntheseroute ermöglicht die Darstellung vieler (substituierter) Phenothiazine und ihrer Analoga, jedoch zeigt die Thionierung bei *meta*-substituierten Edukten nur geringe Regioselektivität^[226] und eine Trennung der gebildeten Regioisomere erweist sich aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit zudem oft als problematisch.

Bildung einer S-C-Bindung und einer N-C-Bindung

Variante A:

Bei der Ausbildung einer S-C-Bindung zusammen mit einer N-C-Bindung in einer Reaktion können *ortho*-Aminobenzothiole bzw. *ortho*-Aminoazinthiole mit Chinonen (auch heterocyclische und polycyclische Chinone), Halochinonen (auch Halohydrochinone), 1,3-Cyclohexandionen oder verwandten Verbindungen zu Phenothiazinonen umgesetzt werden (Abb. 62).

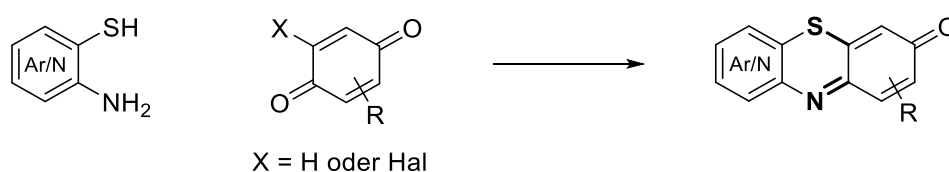


Abb. 62: Bildung von einer S-C-Bindung und einer N-C-Bindung bei der Synthese von Phenothiazinonen.

Mitunter kann durch eine anschließende Reduktion die Bildung der ansonsten schwer zugänglichen hydroxysubstituierten Phenothiazine erfolgen. Unter Verwendung einfacher Benzochinone werden allerdings nur niedrige Ausbeuten erzielt und isomere Produkte treten ebenfalls auf^[236].

Variante B:

Unter gemeinsamer Bildung von S-C- und N-C-Bindung laufen die Reaktionen zwischen *ortho*-Aminobenzothiolen bzw. *ortho*-Aminoazinthiolen und *ortho*-disubstituierten Azinen zu Azaphenothiazinen ab. Genauso reagieren *ortho*-substituierte Azinthiole mit *ortho*-substituierten Azinaminen. Dabei muss in *ortho*-Position der Azine eine entsprechend reaktive Abgangsgruppe (z.B. Halogensubstituent) vorhanden sein (Abb. 63).

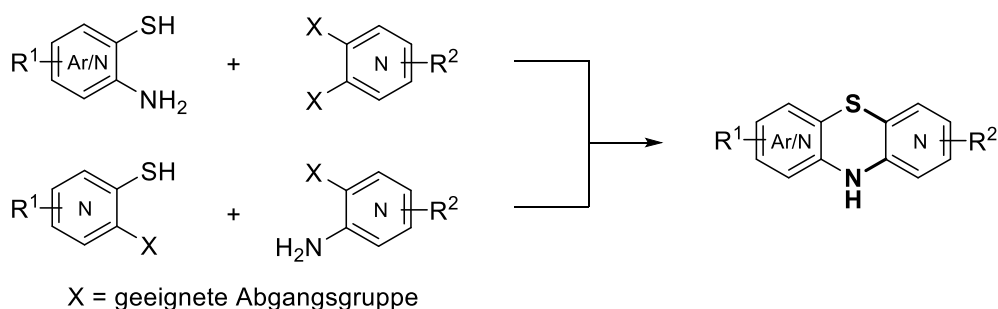


Abb. 63: Bildung von einer S-C-Bindung und einer N-C-Bindung bei der Synthese von Phenothiazin Analoga.

Variante C:

Häufig findet bei den Ringschlussreaktionen zuerst die Bildung einer S-C-Bindung und anschließend eine N-C-Bindungsknüpfung statt. In manchen Fällen werden die Sulfide auch *in situ* gebildet. Für die darauf folgende Cyclisierung wird ein Stickstoff-tragender Substituent (Azid- oder Aminogruppe) und gegebenenfalls eine gute Abgangsgruppe in *ortho*-Position des anderen aromatischen Rings benötigt (Abb. 64).

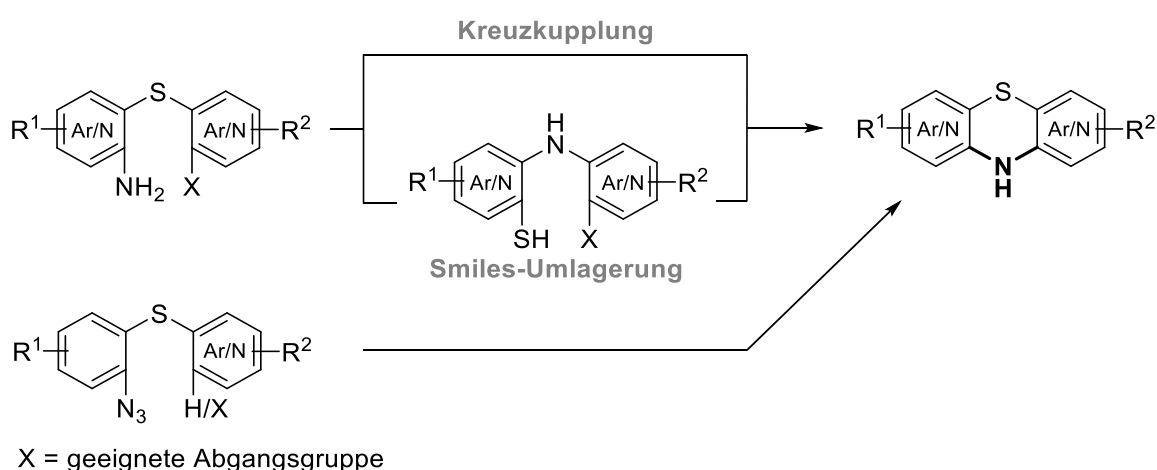


Abb. 64: Bildung der N-C-Bindung nach erfolgter S-C-Bindung zur Synthese von Phenothiazinen und Analoga.

Die Ausbildung der N-C-Bindung kann direkt über eine Kupplungsreaktion oder wie in vielen Fällen über eine Smiles-Umlagerung ablaufen, so dass der eigentliche Ringschluss dann ausgehend von einer Thiol-Struktur stattfindet.

Mechanistisch handelt es sich bei der Smiles-Umlagerung^[237-238] um eine intramolekulare nucleophile Substitution an einem aromatischen System (S_NAr), das durch elektronenziehende Gruppen in *ortho*- oder *para*-Stellung zum Reaktionszentrum aktiviert ist (Abb. 65). Dabei erfolgt eine Migration des aromatischen Systems von dem am Reaktionszentrum bindenden Heteroatom **X** zu einem stärker nucleophilen Heteroatom **Y** (häufig zwischen N-, O- und S-Atomen). Als cyclischer Übergangszustand wird ein Meisenheimer Komplex (**C**, **D**) gebildet. In den meisten Fällen verläuft die Umlagerung unter basischen Bedingungen, aber auch unter neutralen und sauren Bedingungen. **X** kann die Funktionalität eines Ethers, Sulfids, Sulfoxids, Sulfons etc. einnehmen, während das angreifende Nucleophil die konjugierte Base einer Hydroxy-, Amino-, Sulfonamidgruppe etc. ist. Als elektronenziehender Substituent fungiert üblicherweise eine Nitro- oder Sulfonylgruppe. Bei moderat elektronenziehenden Substituenten (Halogen, Trifluormethylgruppe) ist mitunter mehr als ein Substituent notwendig um eine ausreichende Aktivierung zu erreichen. Da N-Heterocyclen an sich elektronenarm sind, sind für derartige Umlagerungen meistens keine weiteren aktivierenden Gruppen erforderlich.

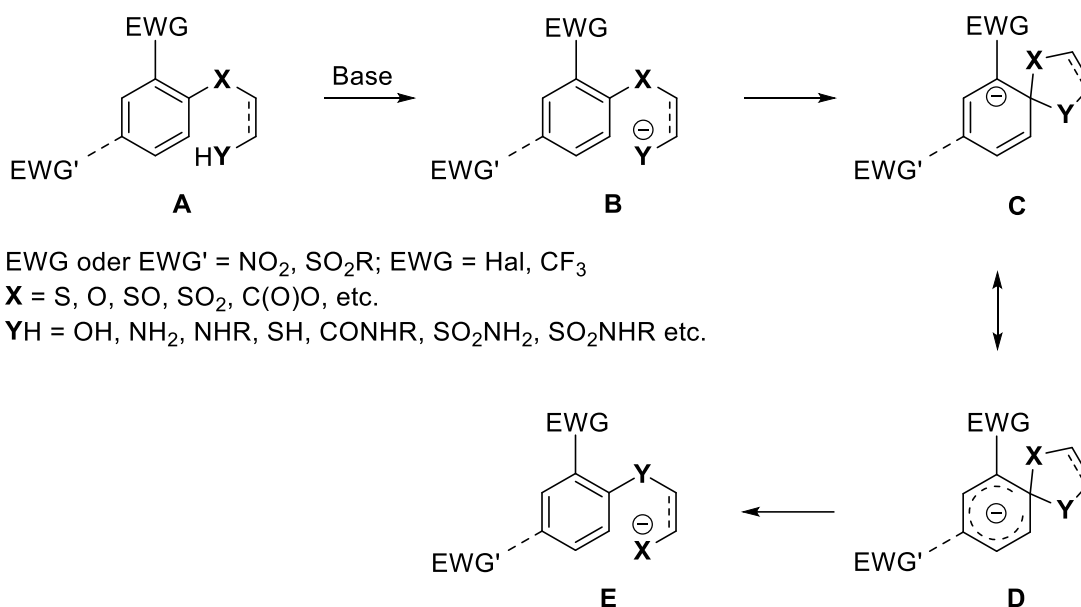


Abb. 65: Mechanismus der Smiles-Umlagerung^[237].

Die Cyclisierung mittels nucleophiler Substitution besonders unter zusätzlicher Anwendung der Smiles-Umlagerung (vom S→N Typ) ermöglicht den Zugang zu einer großen Anzahl verschieden substituierter Phenothiazine und Analoga (Abb. 66). Im ersten Schritt findet, meist

unter basischen Bedingungen, der nucleophile Angriff des Thiols unter Ausbildung des Diaryl- bzw. Diazinylsulfids **C** statt. Entsprechend des nucleophilen Charakters von **C** ist gegebenenfalls vor dem zweiten nucleophilen Angriff eine Acylierung oder Formylierung erforderlich^[239]. Eine N-Acylierung verhindert ebenfalls die Ausbildung einer Wasserstoffbrückenbindung zwischen der Nitro- und Amin-Funktion, welche die anschließende Cyclisierung gegebenenfalls beeinflussen würde^[240]. Nach Umlagerung zum intermediären Sulfid **E** erfolgt eine weitere nucleophile aromatische Substitution des Sulfidanions am Nitrogruppe tragenden C-Atom, die zum Ringschluss führt.

Trotz der häufigen anzutreffenden Cyclisierung über Smiles-Umlagerung ist die Anwendbarkeit auf entsprechend aktivierte Substrate und geeignete Substituenten limitiert^[241-242]. Der synthetische Aufwand wird durch zusätzliche Acylierungs- und Formylierungsschritte noch zusätzlich erhöht.

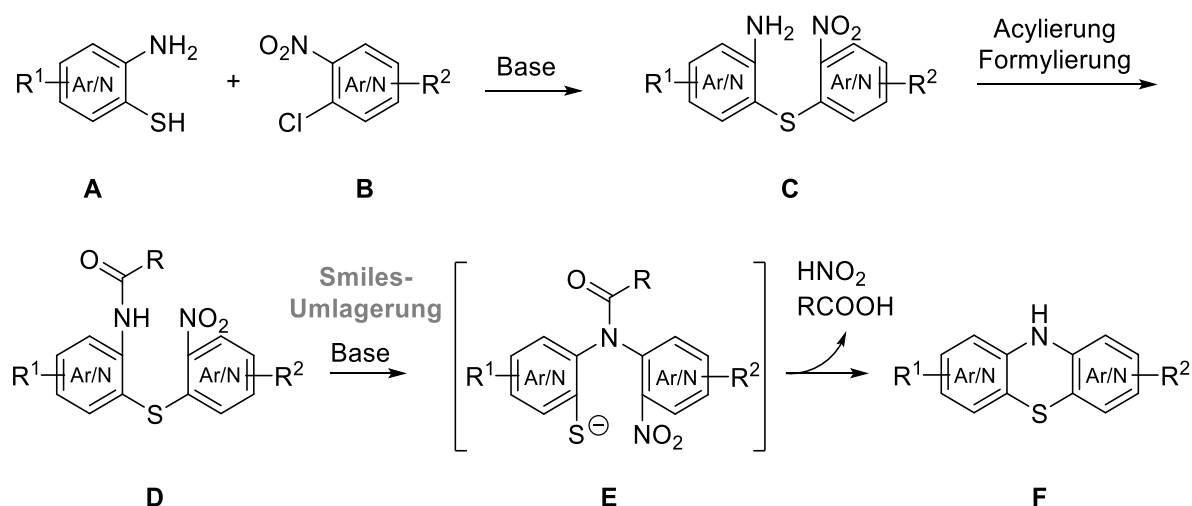


Abb. 66: Synthese zu Phenothiazinen und Analoga über Smiles-Umlagerung.

Neben nucleophilen Substitutionsreaktionen kann die N-C-Bindung auch in einer Kupplungsreaktion nach Ullman Kupfer-vermittelt geknüpft werden. Neben den verwendeten harschen Reaktionsbedingungen in älteren Methoden werden in neuen Ansätzen, zuweilen in One-Pot-Verfahren, durch Verwendung von Liganden^[243], alternativen Kupferquellen und Basen^[244] sowie niedrigeren Temperaturen Verbesserungen erzielt.

Erst kürzlich gelang mit der Hartwig-Buchwald-Reaktion unter Verwendung relativ milder Bedingungen ebenfalls in einem One-Pot-Verfahren Palladium-katalysiert die C-S- und C-N-Bindungsknüpfung ausgehend von 2-Bromthiophenol (**145**), *ortho*-Arylhalogeniden **147** und aliphatischen Aminen **146** unter Bildung von 10-substituierten Phenothiazinen **148**^[245] (Abb. 67).

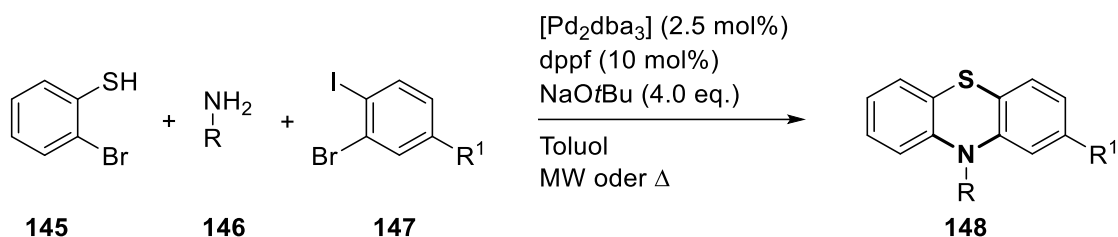


Abb. 67: Palladium-katalysierte Bildung einer C-S- und zwei C-N-Bindungen zu 10-substituierten Phenothiazinen^[245].

Direkte Substitution am Phenothiazin-Ringsystem

Substituierte Phenothiazine und Analoga können darüber hinaus über direkte Funktionalisierung von unsubstituierten oder bereits substituierten Phenothiazinen über eine Vielzahl von Substitutionsreaktionen (Lithierung und Folgereaktionen mit Elektrophilen, Halogenierung, Nitrierung, Acylierung, Alkylierung) dargestellt werden. Allerdings mangelt es bei diesen Methoden auch oftmals an Regioselektivität^[243].

3.3.2.2 SYNTHESE VON PHENOTHIAZINEN UND ANALOGA ALS CAP-GRUPPEN

3.3.2.2.1 SYNTHESE VON SUBSTITUIERTEN PHENOTHIAZINEN

Synthesen von substituierten Phenothiazinen sind seit den 1960er Jahren aufgrund der prominenten Vertreter aus der Promazin-Reihe und der anschließenden Suche nach weiteren neuen psychopharmakologischen Wirkstoffen zahlreich beschrieben. Besonders häufig wurden Substitutionen an Position 2 eingeführt und einige dieser Verbindungen sind sogar kommerziell und auch sehr kostengünstig erhältlich. Daher mussten an Position 2 substituierte Verbindungen im Rahmen dieser Arbeit nicht selbst synthetisiert werden.

3.3.2.2.2 SYNTHESE VON 1-CHLOR-10H-PHENOTHIAZIN (**154**)

Die Synthese von an Position 1 chloriertem 10H-Phenothiazin (**154**) gelang in Anlehnung an eine Methode von Sharma *et al.*^[246] in zwei Syntheseschritten *via* Smiles-Umlagerung (Abb. 68). 1,2-Dichlor-3-nitrobenzol (**149**) reagierte mit 2-Aminothiophenol (**150**) zum Diarylsulfid **151** in 43 % Ausbeute. Nachfolgende Formylierung mit Ameisensäure ergab das N-Formylderivat **152**, welches zum Teil schon unter den sauren Bedingungen durch nucleophilen Angriff des Formamid-Stickstoffs zum intermediären Thiol **153** umgelagert wurde. Daher wurde ohne weitere Auftrennung der Intermediate mit Kaliumhydroxid umgesetzt und

so entstand in der nachfolgenden Cyclisierung (unter nucleophiler Substitution der Nitrogruppe – nicht des Chlors) das 1-Chlor-10*H*-phenothiazin (**154**) in 52 % Ausbeute.

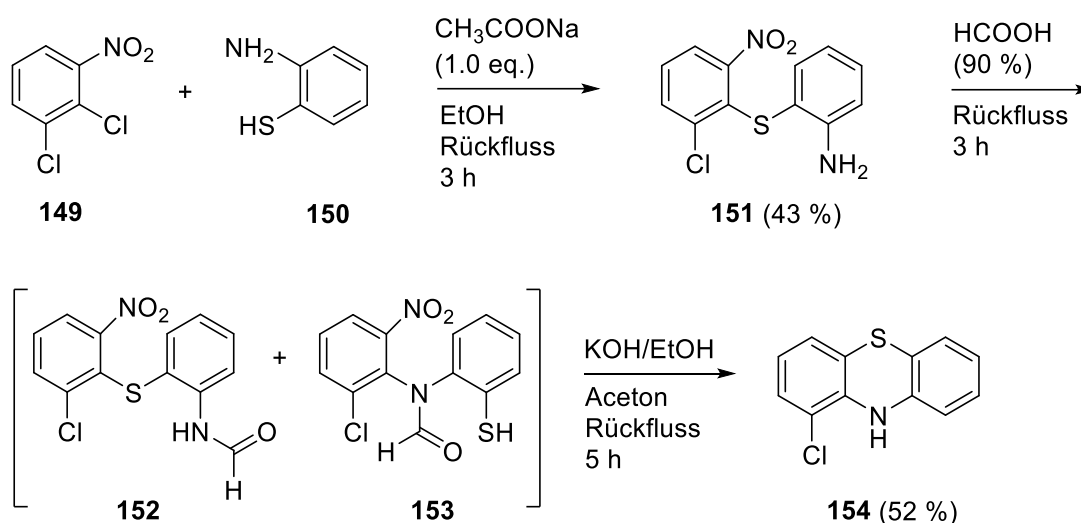


Abb. 68: Synthese von 1-Chlor-10*H*-phenothiazin (**154**) unter Smiles-Umlagerung^[246].

3.3.2.2.3 SYNTHESE VON OXIDIERTEN 10*H*-PHENOTHIAZINEN

3.3.2.2.3.1 SYNTHESE VON 10*H*-PHENOTHIAZIN-5,5-DIOXID (**155**)

In Anlehnung an eine Methode von Sharma *et al.*^[247] wurde aus dem kommerziell erhältlichen 10*H*-Phenothiazin (**23**) unter oxidativen Bedingungen mittels 30 %iger Wasserstoffperoxid-Lösung in Eisessig das 10*H*-Phenothiazin-5,5-dioxid (**155**) in befriedigender Ausbeute hergestellt (Abb. 69).

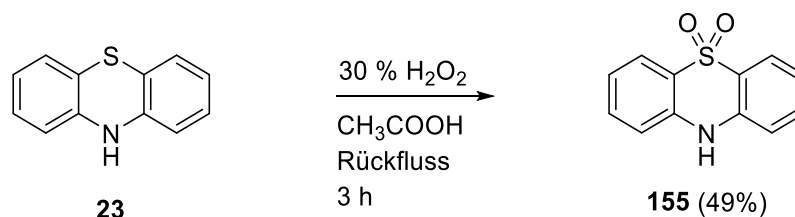


Abb. 69: Synthese von 10*H*-Phenothiazin-5,5-dioxid (**155**) angelehnt an Sharma *et al.*^[247].

3.3.2.2.3.2 SYNTHESE VON 10*H*-PHENOTHIAZIN-5-OXID (**156**)

Nach Gilman *et al.*^[248] wurde 10*H*-Phenothiazin (**23**) in Gegenwart von 30 %iger Wasserstoffperoxid-Lösung unter Zusatz von 10 % ethanolischer Kaliumhydroxid-Lösung zum

Sulfoxid **156** in sehr guten Ausbeuten von 94 % (10.0 mmol Maßstab) neben nur geringen Mengen an gebildetem Sulfon **155** oxidiert (Abb. 70).

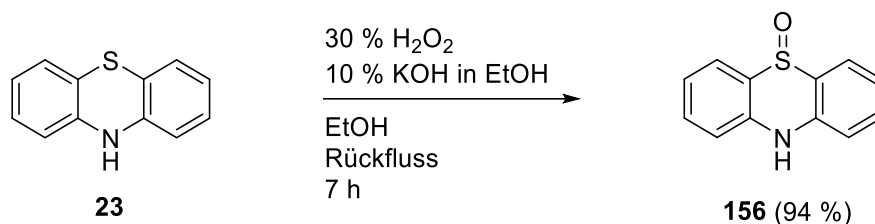


Abb. 70: Synthese des 10H-Phenothiazin-5-oxid (**156**) nach Gilman *et al.*^[248].

3.3.2.2.4 SYNTHESE VON AZAPHENOTHIAZINEN

3.3.2.2.4.1 SYNTHESE VON 1-AZAPHENOTHIAZIN (**159**)

1-Azaphenothiazin (**159**) kann durch Thionierung von *N*-Phenyl-2-pyridinamin oder unter Nutzung der Smiles-Umlagerung ausgehend von 2-Chlor-3-nitropyridin und 2-Aminothiophenol hergestellt werden. Bei der erstgenannten Methode sind im Vergleich zum phenylogenen Produkt drastischere Reaktionsbedingungen mit höheren Reaktionstemperaturen, jedoch unter Erzielung schlechterer Ausbeuten, erforderlich. Die zweite Methode verläuft zwar mit sehr guten Ausbeuten, jedoch über vier Syntheseschritte. Daher wurde zum Aufbau des 1-Azaphenothiazins (**159**) eine weitere Alternative nach Kutscher *et al.*^[249] verwendet (Abb. 71). In einem einstufigen Verfahren wurden 2-Chlorpyridin (**157**) und 2-Aminothiophenol (**150**) unter Verwendung eines hochsiedenden indifferenten Lösungsmittels und katalytischen Mengen Iod zu **159** cyclisiert. Mechanistisch wird ein Reaktionsverlauf ähnlich der Smiles-Umlagerung über die nicht isolierte Zwischenstufe **158** vermutet. Die Zugabe von 2 M Salzsäure lieferte nicht, wie beschrieben, das 1-Azaphenothiazinhydrochlorid als Präzipitat, so dass das Produkt nach Alkalisieren durch Extraktion mit Dichlormethan und Säulenchromatographie in nur mäßigen Ausbeuten (32.0 mmol Maßstab) gewonnen wurde.

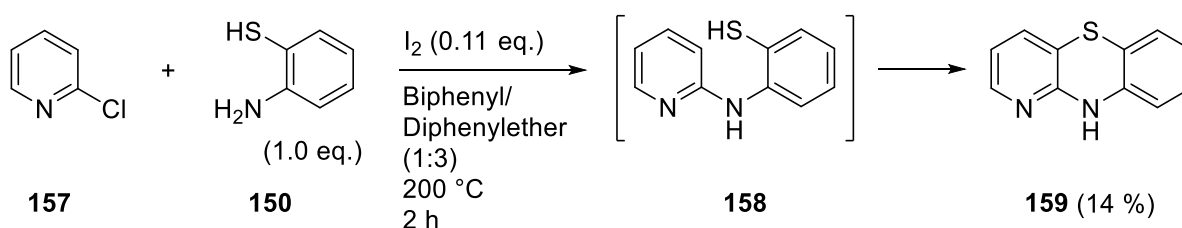


Abb. 71: Synthese von 1-Azaphenothiazin (**159**) nach Kutscher *et al.*^[249].

3.3.2.2.4.2 SYNTHESE VON 2-AZAPHENOTHIAZIN (164)

Nach Saggiomo *et al.*^[250] wurde das 2-Azaphenothiazin (**164**) über drei Stufen hergestellt (Abb. 72). Aus 2-Bromthiophenol (**160**) wurde zunächst mit Natronlauge das entsprechende Natriumsalz gebildet, das dann mit 4-Chlor-3-nitropyridin (**161**) in das 2'-Bromphenyl-3-nitro-4-pyridylsulfid (**162**) mit sehr guten Ausbeuten (41.9 mmol Maßstab) überführt wurde. Die darauffolgende Reduktion der Nitrofunktion in **162** mit Zinn(II)-chlorid in konzentrierter Salzsäure lieferte das Amin **163** in ausgezeichneter Ausbeute (33.0 mmol Maßstab). Nach Neutralisation des Reaktionsansatzes wurde das Amin anstelle von Filtration durch Extraktion mit Dichlormethan gewonnen. Anschließend wurde in einer Ullman-artigen Reaktion in der Schmelze in Gegenwart von Natriumcarbonat und katalytischen Mengen Kupfer(I)iodid intramolekular eine C-N-Knüpfung durchgeführt und mit einer Ausbeute von 60 % (28.0 mmol Maßstab) zum 2-Azaphenothiazin (**164**) cyclisiert. **164** wurde nicht wie beschrieben durch Sublimation aus der Schmelze gewonnen, sondern durch Extraktion mit Dichlormethan und anschließender Säulenchromatographie aufgereinigt.

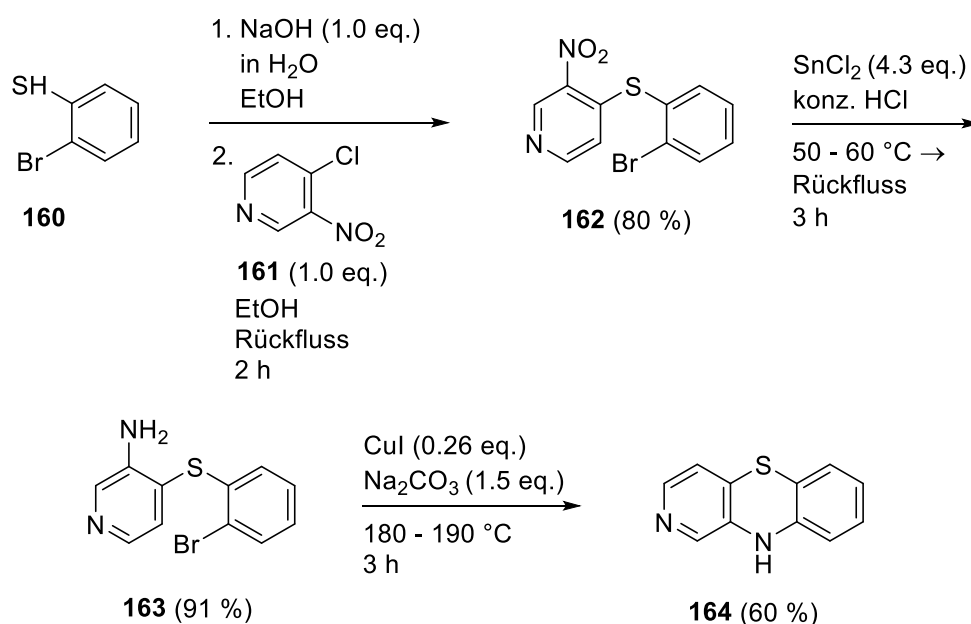


Abb. 72: Synthese von 2-Azaphenothiazin (**164**) nach Saggiomo *et al.*^[250].

3.3.2.2.4.3 SYNTHESE VON 1,4-DIAZAPHENOTHIAZIN (167)

Nach einer Methode von Okafor^[251] konnte in zwei Syntheseschritten das 1,4-Diazaphenothiazin (**167**) erhalten werden (Abb. 73). Hierzu wurde zunächst 2-Chlorpyrazin (**165**) mit Sulfurylchlorid an Position 3 mit einer Ausbeute von 68 % (22.4 mmol

Maßstab) chloriert. Das erhaltene 2,3-Dichlorpyrazin (**166**) wurde dann mit 2-Aminothiophenol (**150**) unter basischen Bedingungen zum 1,4-Diazaphenothiazin (**167**) umgesetzt. Eine Säulenchromatographie ersetzte auch hier die in der Originalliteratur beschriebene Aufreinigung durch Rekristallisation und lieferte **167** in einer Ausbeute von 66 % (7.07 mmol Maßstab).

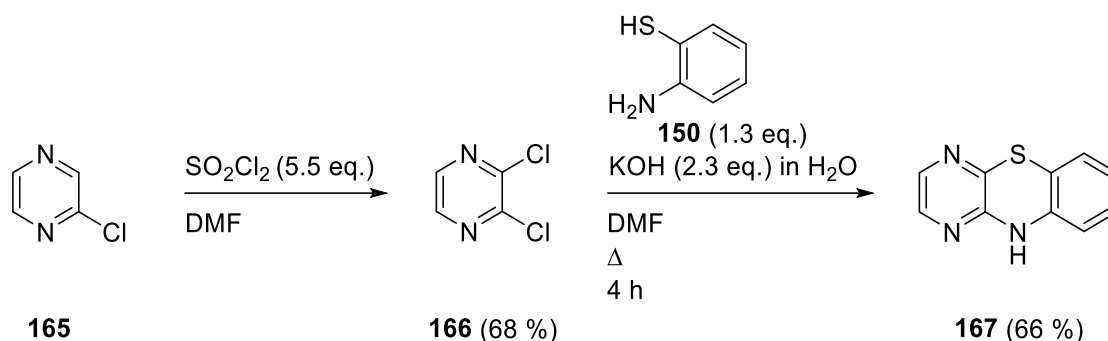


Abb. 73: Synthese von 1,4-Diazaphenothiazin nach Okafor^[251].

3.3.2.2.4.4 SYNTHESE VON 3-CHLOR-1,2-DIAZAPHENOTHIAZIN (**171**) UND 1,2-DIAZAPHENOTHIAZIN (**172**)

Die Bildung von 1,2-Diazaphenothiazin (**172**) erfolgte nach Yoneda *et al.*^[252] aus dem 3-Chlor-1,2-diazaphenothiazin (**171**) (Abb. 74). Durch diesen Syntheseweg wurde mit **171** zudem noch ein 1,2-Diazaphenothiazin mit Chlorsubstituent in Position 3 erhalten. Zur Darstellung von **171** wurde zuerst 2-Aminothiophenol (**150**) mit Kaliumhydroxid deprotoniert und mit 3,4,6-Trichlorpyridazin (**168**) selektiv zum Thioether **169** in sehr guter Ausbeute (84 %, 21.8 mmol Maßstab) umgesetzt. Die anschließende Cyclisierung mit konzentrierter Salzsäure gelang in nur schlechter Ausbeute (34 %, 16.6 mmol Maßstab). Durch Protonierung an N-2 in **169** wird die intramolekulare nucleophile Substitution durch die primäre Aminogruppe ermöglicht. Das intermediär gebildete Hydrochlorid **170** wurde ohne weitere Aufreinigung durch Neutralisation mit verdünntem Ammoniak zum 3-Chlor-1,2-diazaphenothiazin (**171**) deprotoniert. Wiederholte Säulenchromatographie wurde auch hier anstelle der in der Originalliteratur beschriebenen Rekristallisation zur Aufreinigung von **171** durchgeführt. Im finalen Reaktionsschritt beschreiben die Autoren eine katalytische Hydrierung mit Palladium/Aktivkohle (10 % Pd) bei Raumtemperatur zur hydrogenolytischen Abspaltung des Chlor-Substituenten an Position 3. Ein entsprechender Versuch mit **171** führte auch nach 44 h zu keiner Umsetzung zum Produkt **172**, so dass der Versuch abgebrochen und nach alternativen Bedingungen für die Hydrogenolyse gesucht wurde. Nach einigen Versuchen, in denen systematisch Änderungen des Reaktionsmilieus, des Drucks und der Temperatur

erfolgten, zeigte sich ein Überschuss an Base^[253], sowie eine Druck- und Temperaturerhöhung auf 50 °C und 20 bar als zielführend. Nach den optimierten Reaktionsbedingungen konnte **172** in einer Ausbeute von 65 % hergestellt werden.

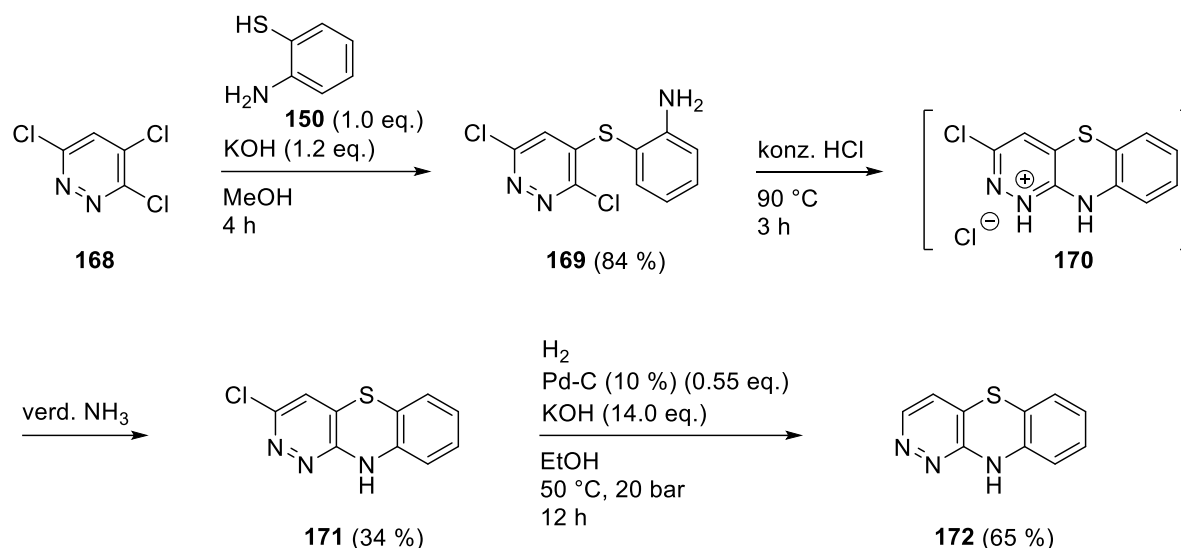


Abb. 74: Synthese von 3-Chlor-1,2-diazaphenothiazin (**171**) und 1,2-Diazaphenothiazin (**172**) nach Yoneda *et al.*^[252].

3.3.2.2.4.5 SYNTHESSE VON 1,6-DIAZAPHENOTHIAZIN (**177**)

Für 1,6-Diazaphenothiazin (**177**) ist auch eine Synthese über eine Smiles-Umlagerung beschrieben^[254], kürzer ist allerdings ein alternatives Verfahren, das ebenfalls von Rodig *et al.*^[240] beschrieben wurde (Abb. 75). Demnach wird aus 2-Chlor-3-aminopyridin (**173**) mit Natriumhydrogensulfid das 3-Aminopyridin-2-thiol (**174**) gebildet. Anstelle der berichteten Kristallisation in saurer wässriger Phase wurde **174** durch Extraktion mit Ethylacetat aus neutraler wässriger Phase in guter Ausbeute (75 %; 23.6 mmol Maßstab) gewonnen. Anschließend wurde **174** mit 2-Chlor-3-nitropyridin (**175**) unter neutralen Bedingungen zur Verbindung **176** in ausgezeichneter Ausbeute (93 %; 6.86 mmol Maßstab) weiter umgesetzt. Wie berichtet erfolgt unter neutralen Bedingungen bzw. unter Zusatz einer kleinen Menge Salzsäure die nucleophile Substitution durch die primäre Aminogruppe, wohingegen im Alkalischen das Sulfidanion nucleophil angreift. Die anschließende Cyclisierung zu 1,6-Diazaphenothiazin (**177**) wurde im Alkalischen mit einer Ausbeute von 67 % (6.12 mmol Maßstab) durchgeführt. Maßgeblich für den finalen Cyclisierungsschritt ist nach Angabe der Autoren der Zusatz von Dimethylsulfoxid, welches Wasserstoffbrücken zu den H-Atomen des sekundären Amins in **176** bildet und dadurch intramolekulare Wasserstoffbrücken zwischen dieser NH-Gruppe und der Nitrogruppe verhindert. Zudem verstärkt Dimethylsulfoxid die

Nucleophilie des Sulfidanions, da das Anion allenfalls nur schwach durch dieses Lösungsmittel solvatisiert wird.

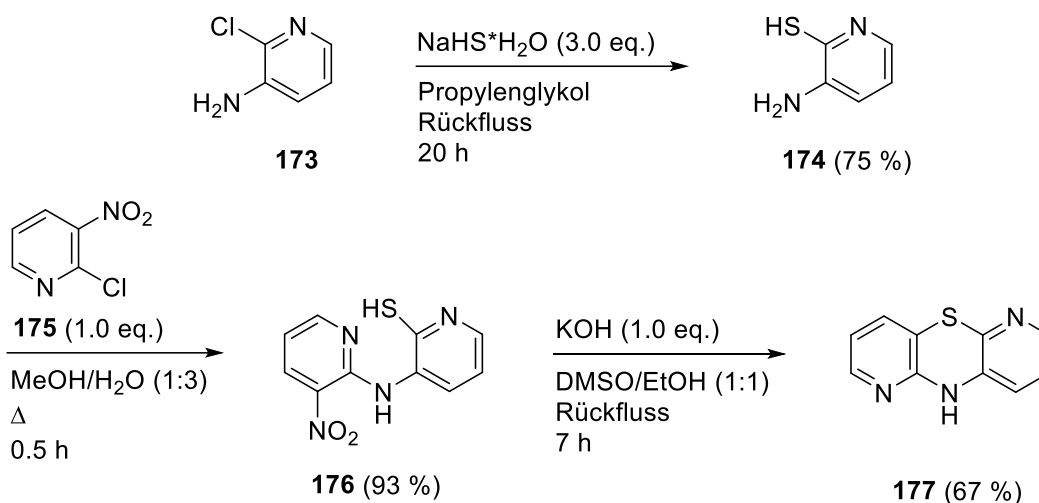


Abb. 75: Synthese von 1,6-Diazaphenothiazin (**177**) nach Rodig *et al.*^[240].

3.3.2.2.4.6 SYNTHESE VON 2,7-DIAZAPHENOTHIAZIN (**181**)

Nach einer Methode von Morak *et al.*^[255] wurde das 2,7-Diazaphenothiazin (**181**) in einer einstufigen Synthese aus 4-Chlor-3-nitropyridin (**161**) unter Umsetzung mit Natriumsulfid hergestellt (Abb. 76). Die Autoren beschreiben mechanistisch die Bildung des Natriumsalzes von 3-Nitropyridin-4-thiol (**178**) aus 4-Chlor-3-nitropyridin (**161**), welches wiederum mit weiterem Edukt **161** unter reduktiven Bedingungen zum intermediären 3-Nitro-3'-amino-4,4'-dipyridinylsulfid (**179**) reagiert. Eine anschließende Smiles-Umlagerung zum Dipyridinylamin **180** soll dann die darauffolgende Cyclisierung zum 2,7-Diazaphenothiazin (**181**) zulassen. Ebenso wie bei Morak *et al.* beschrieben, wurden nur schlechte Ausbeuten erzielt (25.2 mmol Maßstab) und die Bildung von Nebenprodukten war bekannt.

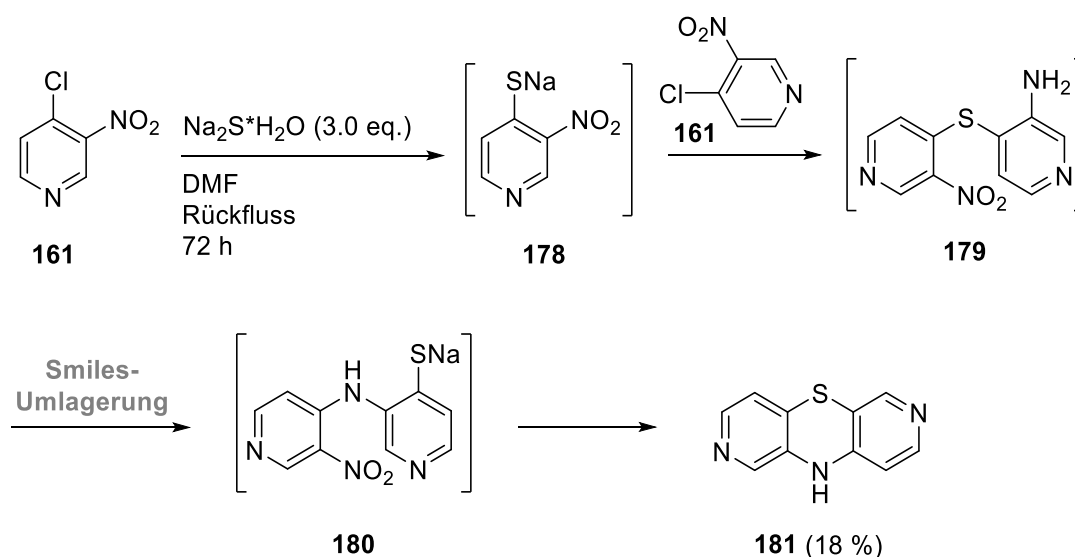


Abb. 76: Einstufensynthese zum 2,7-Diazaphenothiazin (**181**) nach Morak *et al.*^[255].

Wenngleich die Autoren über eine optimierte Synthese (Abb. 77) ausgehend von 3-Amino-4(1*H*)-pyridinthion (**183**) mit besseren Ausbeuten berichten, wurde diese nicht befolgt, da auch das Intermediat **183** erst in mehreren Stufen mit einer Gesamtausbeute von 34 % herzustellen gewesen wäre. Neben diesen von den Autoren beschriebenen Synthesen findet sich bis dato kein weiterer Zugang zu 2,7-Diazaphenothiazin (**181**) in der Literatur.

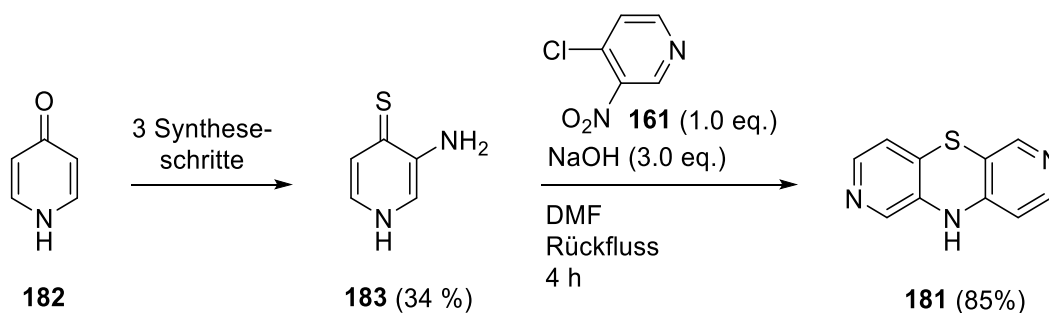


Abb. 77: Vermeintlich optimierte Synthese von 2,7-Diazaphenothiazin (**181**) nach Morak *et al.*^[255-256].

3.3.2.2.4.7 SYNTHESE VON 3,6-DIAZAPHENOTHIAZIN (**185**)

Das 3,6-Diazaphenothiazin (**185**) wurde in Analogie zur Synthesevorschrift des 1,6-Diazaphenothiazins (**177**) nach Rodig *et al.*^[240] (Kapitel 3.3.2.2.4.5) hergestellt (Abb. 78). 2-Chlor-3-aminopyridin (**173**) wurde wie zuvor beschrieben mit Natriumhydrogensulfid zum 3-Aminopyridin-2-thiol (**174**) umgesetzt. Ebenso wie bei der Synthese von 1,6-Diazaphenothiazin (**177**) erfolgte auch hier im Neutralen die nucleophile Substitution durch

die primäre Aminogruppe von **174** an 4-Chlor-3-nitropyridin (**161**) und das 3,4'-Dipyridylamin **184** wurde in sehr guten Ausbeuten erhalten. Die finale Cyclisierung zum 3,6-Diazaphenothiazin (**185**) gelang unter alkalischen Bedingungen mit einer Ausbeute von 42 %. Erst 2016 berichteten Morak *et al.*^[257] erstmalig die Synthese von unsubstituiertem 3,6-Diazaphenothiazin (**185**) über eine Smiles-Umlagerung. Mit gleicher Anzahl an Syntheseschritten wird über diesen Syntheseweg aus dem Natriumsalz von **174** zusammen mit **161** im Alkalischen zuerst das Disulfid gebildet, welches dann nach Umlagerung zum gleichen Zwischenprodukt **184** weiter zur Zielverbindung **185** cyclisiert.

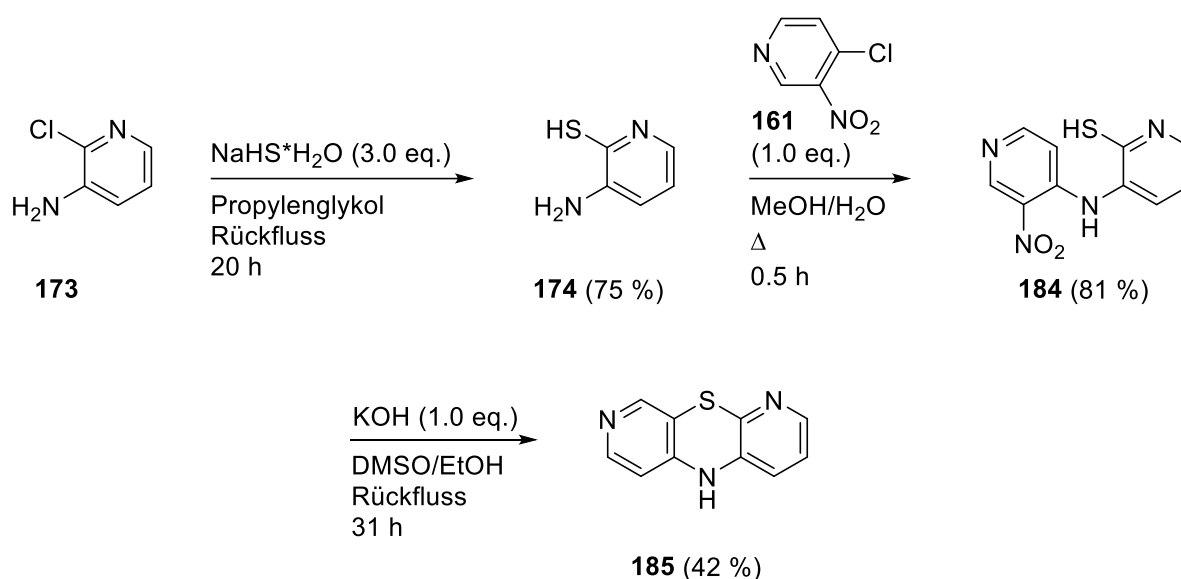


Abb. 78: Synthese von 3,6-Diazaphenothiazin (**185**) angelehnt an Rodig *et al.*^[240].

3.3.2.2.5 SYNTHESE DES THIAZOL-ANALOGONS **189**

Die Darstellung des Thiazol-Analogons **189** erfolgte nach einem französischen Patent von Casella Farbwerke Mainkur AG^[258] in einer Kondensationsreaktion aus 2-Chlor-2*H*-benzo[*b*][1,4]thiazin-3(4*H*)-on (**187**) und Thioacetamid (**188**) (Abb. 79). Säulenchromatographie ersetzte erneut das publizierte Aufreinigungsprozedere der Rekristallisation und lieferte **189** in einer mäßigen Ausbeute von 38 %. Das dazu erforderliche halogenierte Benzothiazinon **187** wurde durch Chlorierung von kommerziell verfügbarem 2,3-Dihydro-3-oxobenzo-1,5-thiazin (**186**) an Position 2 mittels Sulfurylchlorid nach einer Methode von Worley *et al.*^[259] erhalten.

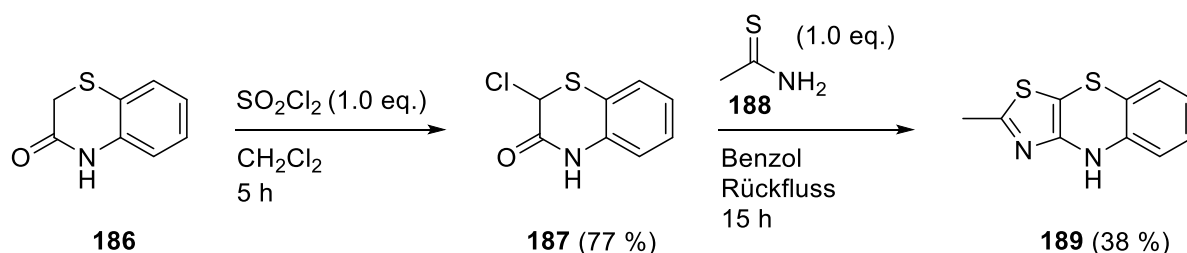


Abb. 79: Synthese des Thiazol-Analogons **189** nach FR 1401481 A^[258].

3.3.2.3 SYNTHESE VON BENZYLHYDROXAMSÄUREN MIT PHENOTHIAZINEN, PHENOTHIAZIN-ANALOGA UND STRUKTURVERWANDTEN VERBINDUNGEN ALS CAP-GRUPPEN

3.3.2.3.1 SYNTHESE DER ZIELSTRUKTUREN ÜBER EINFÜHRUNG DES BENZYL-LINKERS AM ZENTRALEN THIAZIN-, OXAZIN BZW. PYRIDON-STICKSTOFF

Zur Darstellung der Benzhydroxamsäuren mit diversen Cap-Gruppen (**20**, **239-256**) wurden hauptsächlich (un-)substituierte Phenothiazine und Phenothiazin-Analoga, sowie strukturell ähnliche Tricyclen verwendet (Abb. 80, Tab. 7). Diese wurden selbst synthetisiert (Kapitel 3.3.2.2) oder waren kommerziell erhältlich. Die N-Alkylierung der N-Heterocyclen mit 4-(Brommethyl)benzoesäuremethylester (**50**) unter Verwendung einer Base ergab die Ester **B** in befriedigenden bis sehr guten Ausbeuten (Tab. 7). Eine anschließende Hydrolyse mit Natriumhydroxid lieferte die dazugehörigen Carbonsäuren **C** in guten bis ausgezeichneten Ausbeuten, von denen ausgehend durch zwei unterschiedliche Methoden die finale Bildung der Hydroxamsäuren **E** erfolgte (Kapitel 3.1.1.2.2.2 und 3.1.1.3). Dazu wurden die Carbonsäuren **C** nach Aktivierung mit COMU zum einen direkt mit freiem Hydroxylamin umgesetzt oder zum anderen zuerst mit *O*-(Tetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)hydroxylamin die THP-geschützten Hydroxamsäuren **D** synthetisiert und anschließend unter sauren Bedingungen die THP-Gruppe abgespalten.

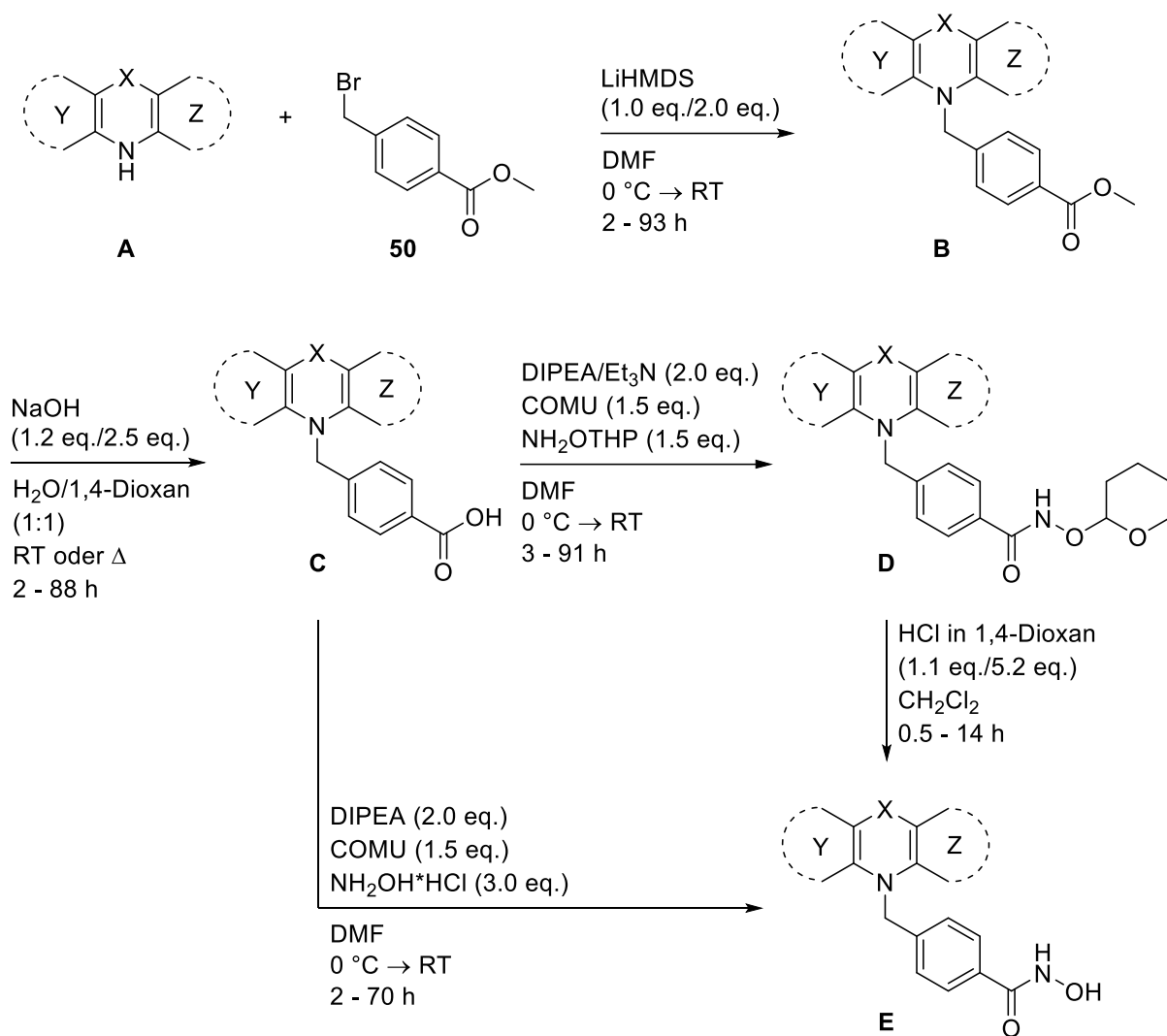
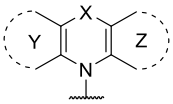
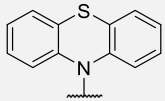
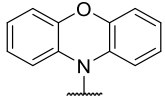
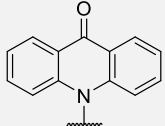
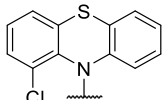
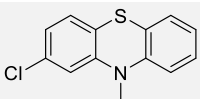
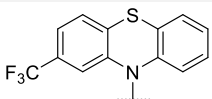
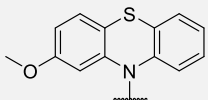
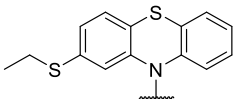
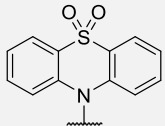
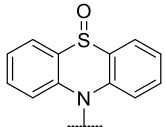
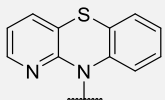
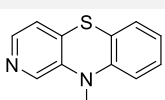
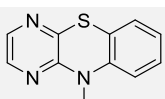
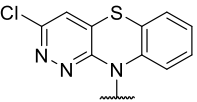
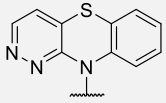
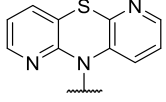
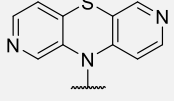
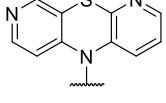
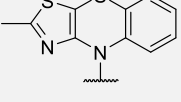


Abb. 80: Allgemeine Syntheseroute zu Benzylhydroxamsäuren.

	A	B	C	D	E
	23	27 (70 %)	38 (82 %)	232 (55 %)	20 (56 %)
	190	196 (77 %)	214 (92 %)	233 (53 %)	239 (23 %)
	191	197 (77 %)	215 (68 %)	234 (48 %)	240 (79 %)
	154	198 (63 %)	216 (80 %)	235 (56 %)	241 (46 %)
	192	199 (50 %)	217 (91 %)	–	242 (44 %)
	193	200 (67 %)	218 (79 %)	236 (67 %)	243 (16 %)
	194	201 (66 %)	219 (87 %)	–	244 (48 %)
	195	202 (70 %)	220 (87 %)	–	245 (54 %)
	155	203 (79 %)	221 (70 %)	237 (54 %)	246 (66 %)
	156	204 (76 %)	222 (95 %)	–	247 (50 %)
	159	205 (67 %)	223 (88 %)	238 (51 %)	248 (42 %) (41 %)
	164	206 (72 %)	224 (90 %)	–	249 (54 %)
	167	207 (45 %)	225 (91 %)	–	250 (38 %)

	171	208 (47 %)	226 (86 %)	–	251 (42 %)
	172	209 (47 %)	227 (85 %)	–	252 (37 %)
	177	210 (51 %)	228 (82 %)	–	253 (58 %)
	181	211 (55 %)	229 (82 %)	–	254 (60 %)
	185	212 (49 %)	230 (80 %)	–	255 (46 %)
	189	213 (52 %)	231 (84 %)	–	256 (43 %)

Tab. 7: Synthesezwischenstufen und Zielverbindungen (**20**, **239-256**) nach allgemeiner Syntheseroute.

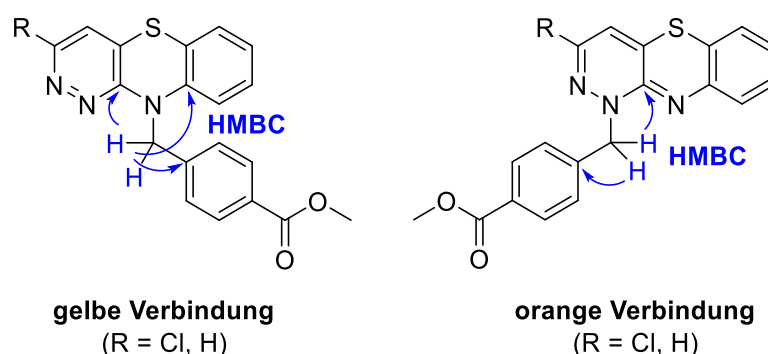
3.3.2.3.2 STRUKTURAUFKLÄRUNG VON NEBENPRODUKTEN BEI DER N-ALKYLIERUNG VON 1,2-DIAZAPHENOTHIAZIN UND SYNTHESSE VON STRUKTURISOMEREN ZIELSTRUKTUREN

Das 3-Chlor-1,2-diazaphenothiazin (**171**) und 1,2-Diazaphenothiazin (**172**) sollten nach der in Kapitel 3.3.2.3.1 beschriebenen Methode mit 4-(Brommethyl)benzoesäuremethylester (**50**) und der starken Base Lithiumhexamethyldisilazid in die N-alkylierten Verbindungen **208** und **209** umgesetzt werden (Abb. 83). Bei beiden Alkylierungsreaktionen wurde neben der gewünschten Verbindung (gelber Feststoff) jeweils auch ein orangefarbenes Nebenprodukt in erheblicher Menge erhalten. Die Nebenprodukte konnten mit Hilfe der Säulenchromatographie abgetrennt werden. ¹H-NMR- und ¹³C-NMR-Spektren dieser Verbindungen ergaben die zu erwartenden Signale für die gewünschten Ester **208** und **209**. Mit Hilfe der HRMS-ESI konnte für die beiden Nebenprodukte jeweils kein Massenunterschied zu **208** bzw. **209** festgestellt werden (Tab. 8). Aufgrund der NMR- und MS-Daten sowie des farblichen Unterschiedes wurde geschlussfolgert, dass es sich möglicherweise um Strukturisomere handelt (Abb. 83). Die exakte Strukturaufklärung gelang mit Hilfe von 2D-NMR-Experimenten. Demnach hatte die N-Alkylierung nicht nur, wie erwartet, am Thiazin-Stickstoff in **171** und **172**, sondern auch an einem der beiden Diazin-Stickstoffe (*N*-1 oder *N*-2) stattgefunden.

Reaktion	Produkt	exakte Masse $[M+H]^+$ (gefunden)	exakte Masse $[M+H]^+$ (berechnet)	Summenformel $[M+H]^+$
N-Alkylierung von 171	gelb	384.0569	384.0568	$C_{19}H_{15}O_2N_3ClS^+$
	orange	384.0568		
N-Alkylierung von 172	gelb	350.0960	350.0958	$C_{19}H_{16}O_2N_3S^+$
	orange	350.0961		

Tab. 8: Ergebnisse aus der hochaufgelösten Masse zur Strukturaufklärung der Nebenprodukte.

Anhand der HMBC Daten lässt sich erkennen, dass jeweils bei den gelben Verbindungen aus den N-Alkylierungsreaktionen die Methylenprotonen der Benzylgruppe 3J - und 2J -Kopplungen zu drei quartären C-Atomen zeigen, während jeweils die orangefarbenen Verbindungen nur 3J - und 2J -Kopplungen zu zwei quartären C-Atomen aufweisen (Abb. 81). Dies deutet bei den orangefarbenen Verbindungen auf eine N-Alkylierung an Position 1 hin, da bei einer N-Alkylierung an Position 2 lediglich mit dem Tricyclus 3-Chlor-1,2-diazaphenothiazin (**208**) zwei Kopplungen zu quartären C-Atomen möglich sind.

Abb. 81: Kopplungen im HMBC (angedeutet durch blaue Pfeile) der gelben und orangen N-Alkylierungsprodukte von 1,2-Diazaphenothiazin **171** und **172**.

Zur weiteren Strukturbestätigung wurden mittels 1D-NOESY-Experimente (Abb. 82) die Protonen der Methylenfunktion des Benzyl-Linkers aller vier Verbindungen angeregt. Bei beiden gelb gefärbten Verbindungen konnte sowohl eine Kopplung zu den Protonen des *para*-disubstituierten Benzolrings im Benzylrest als auch zum Proton an Position 9''' im Tricyclus festgestellt werden. Im Gegensatz dazu trat bei den isolierten orangefarbenen Verbindungen lediglich eine Kopplung zu den Protonen des *para*-disubstituierten Benzolrings auf.

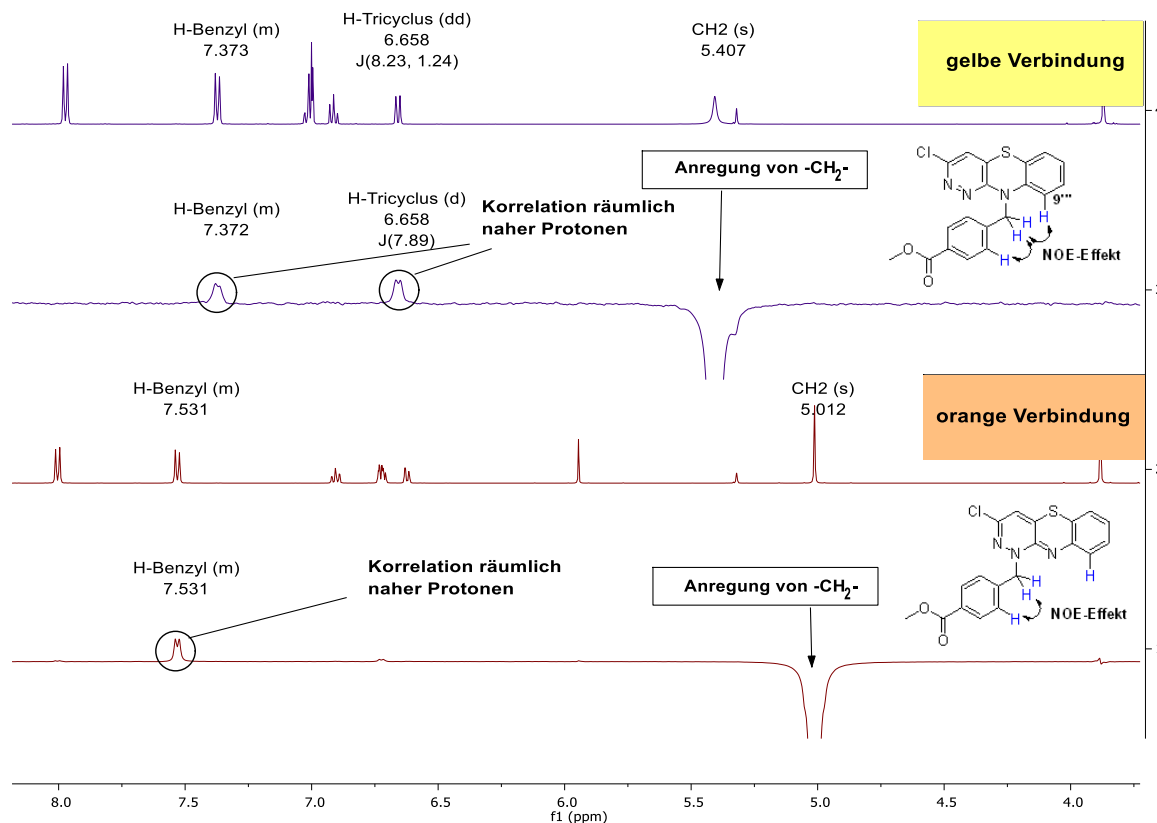
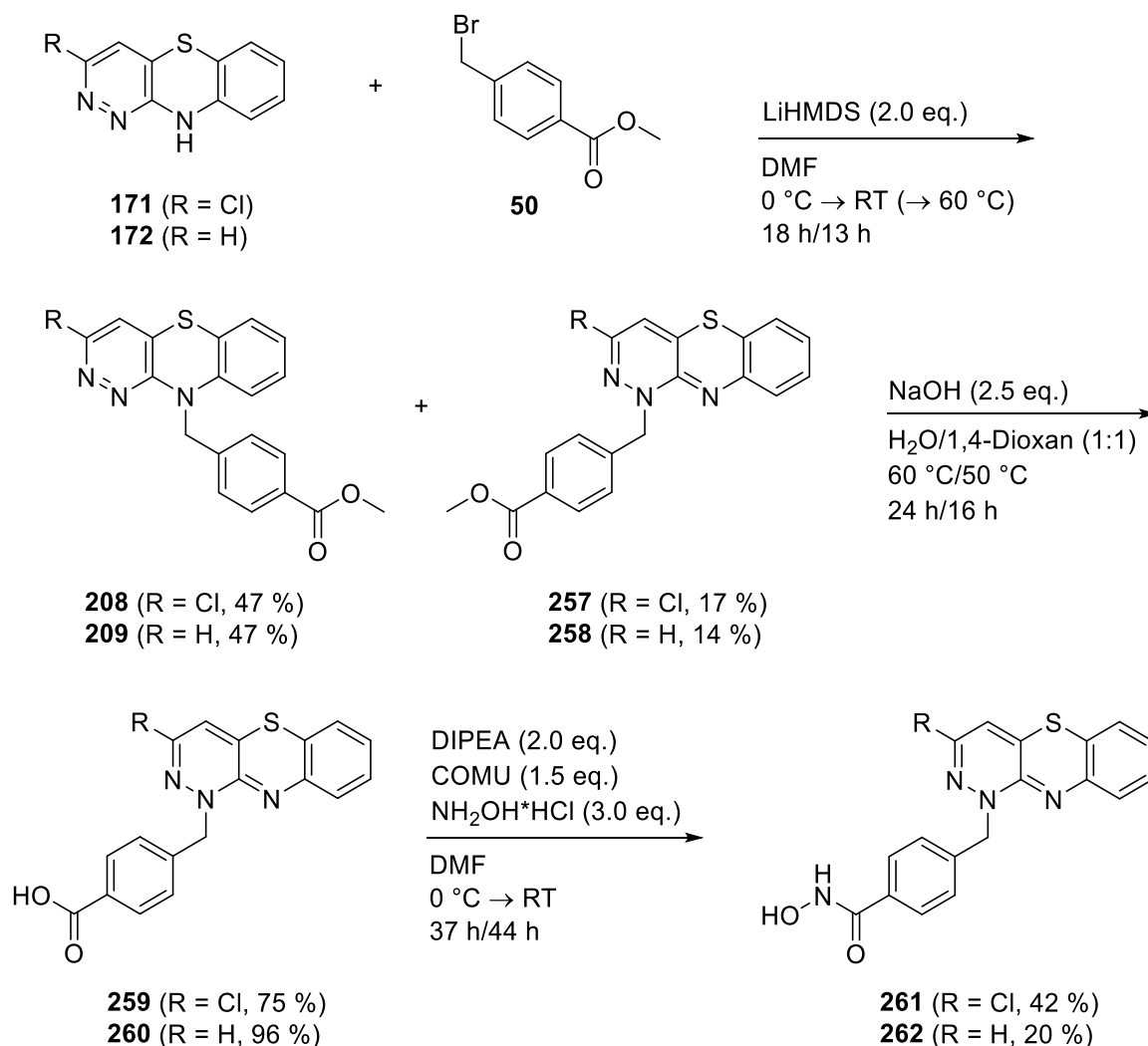


Abb. 82: 1D-NOESY-Spektren der isolierten gelben und orangen N-Alkylierungsprodukte am Beispiel **208** und **257**.

Somit resultierten aus der N-Alkylierungsreaktion neben den gewünschten Estern **208** und **209** auch die strukturisomeren Verbindungen **257** und **258**. Zu vergleichbaren Alkylierungen am Azin-Stickstoff sind nur wenige Berichte zu finden^[260-261] und derartige Nebenreaktionen konnten im Rahmen dieser Arbeit auch nur bei diesen beiden Verbindungen beobachtet werden.

Diese strukturelle Besonderheit in der Verknüpfung zwischen Cap und Linker machte diese beiden unerwarteten Nebenprodukte gleichfalls zu interessanten Bausteinen, um die Hydroxamsäure-Funktion einzuführen (Abb. 83). Deshalb wurden auch **257** und **258** durch alkalische Hydrolyse in die Carbonsäuren **259** und **260** überführt. Nach Aktivierung der Carbonsäuren mit COMU und Zugabe von Hydroxylamin wurden diese direkt in die Hydroxamsäuren **261** und **262** umgesetzt.

Abb. 83: Synthese zu den strukturisomeren Zielverbindungen **261** und **262**.

3.3.2.3.3 SYNTHESE EINES STRUKTURANALOGONS VON TUBASTATIN A

Tubastatin A (**14**), eine der Leitstrukturen dieser Arbeit, und ein zusammen mit Tubastatin A publiziertes Analogon **269** weisen einen Tetrahydro- γ - bzw. Tetrahydro- β -carbolin-Grundkörper auf. Die Synthese der analogen tricyclischen Zielverbindung **266** mit einem partiell hydrierten Pyridinring, konkret einem 2-Methyl-1,2,3,4-tetrahydro-10*H*-pyrido-[3,4-*b*][1,4]benzothiazin-Cap, erforderte die Umsetzung der 2-Azaphenothiazin-Einheit (**164**) zur *N*-Methylpyridinium-Einheit mit anschließender Reduktion zum Tetrahydropyridinring. Um als mögliche Konkurrenzreaktion die zusätzliche Methylierung des Thiazin-Stickstoffs des 2-Azaphenothiazins (**164**) zu umgehen, wurde vom Ester **206** ausgegangen (Abb. 84). In Anlehnung an eine Synthesevorschrift von Dubey *et al.*^[262] wurde dann mit Methyljodid die quartäre Pyridiniumverbindung **87** in quantitativer Ausbeute dargestellt. Die darauffolgende Reduktion zum partiell hydrierten Pyridinring des Esters **88** konnte in guter Ausbeute mit

Natriumborhydrid in Ethanol durchgeführt werden^[262]. Um zur Zielverbindung **90** mit Hydroxamsäurefunktion zu gelangen, wurde analog zur allgemeinen Syntheseroute weiter verfahren (Kapitel 3.3.2.3.1, Abb. 80).

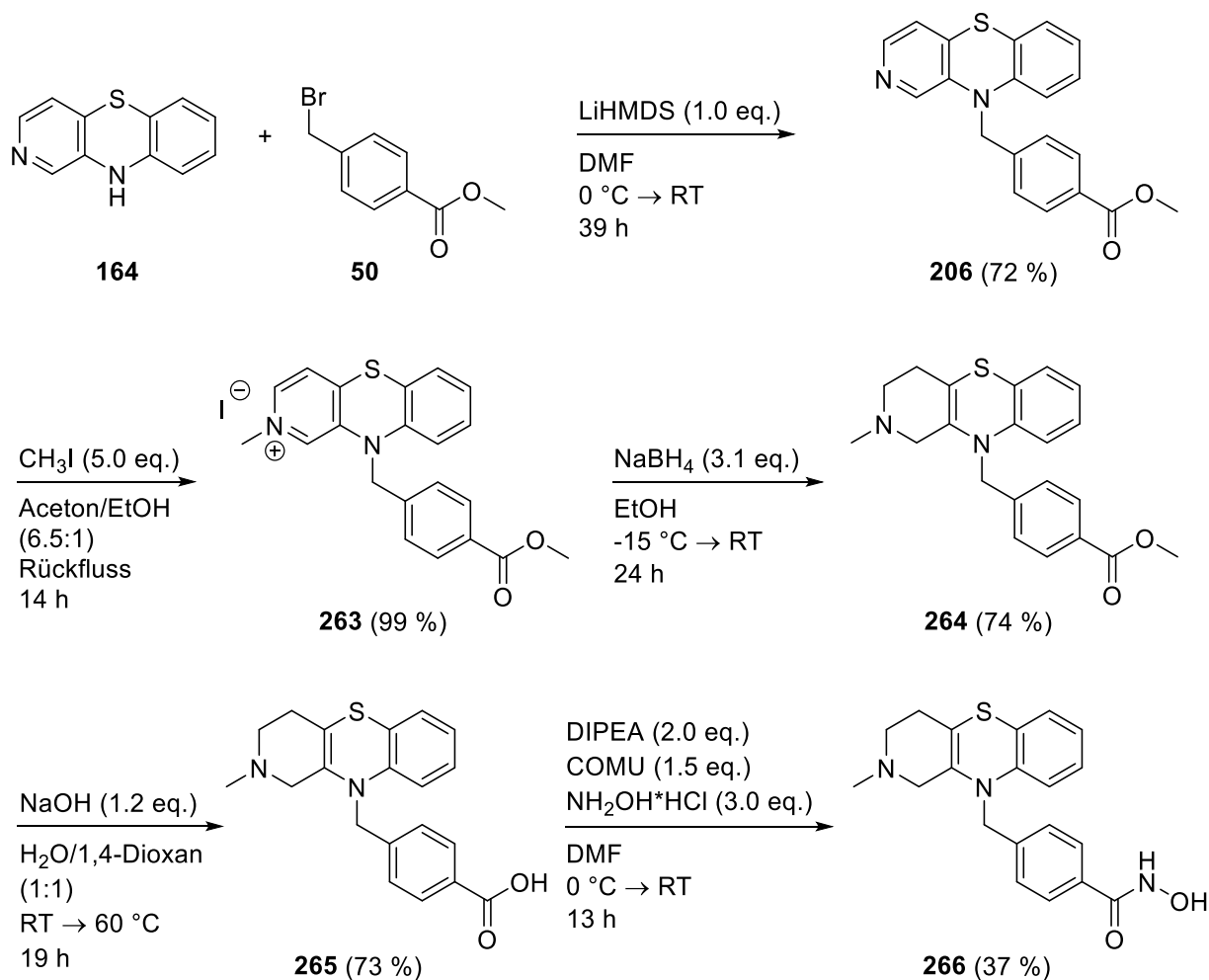


Abb. 84: Syntheseroute zur Hydroxamsäure **266** mit 2-Methyl-1,2,3,4-tetrahydro-10H-pyrido-[3,4-*b*][1,4]benzothiazin-Cap.

4 BIOLOGISCHE TESTUNG

Zur Bestimmung der biologischen Aktivität der dargestellten Zielverbindungen wurden verschiedene Testverfahren angewendet. Die Prüfung auf biologische Aktivität an Lysin-Deacetylase wurde in der Arbeitsgruppe unseres Kooperationspartners Prof. Dr. Manfred Jung an der Albert-Ludwigs-Universität in Freiburg am Institut für Pharmazeutische Wissenschaften an allen synthetisierten Zielverbindungen *in vitro*, sowie mit einigen ausgewählten Verbindungen auf zellulärer Ebene vorgenommen. Begleitet wurden diese Testungen von Dockingstudien, die in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Wolfgang Sippl am Institut für Pharmazie an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg durchgeführt wurden. Zudem wurde von Prof. Dr. David W. Christianson an der Universität in Pennsylvania am Department Chemie zur konkreten Charakterisierung der molekularen Interaktionen eine Zielverbindung in einem Co-Kristallisationsexperiment mit dem Zielprotein untersucht. Des Weiteren wurde in hausinternen Screenings von Frau Martina Stadler auf antibakterielle und antimykotische Aktivität sowie die Zytotoxizität geprüft.

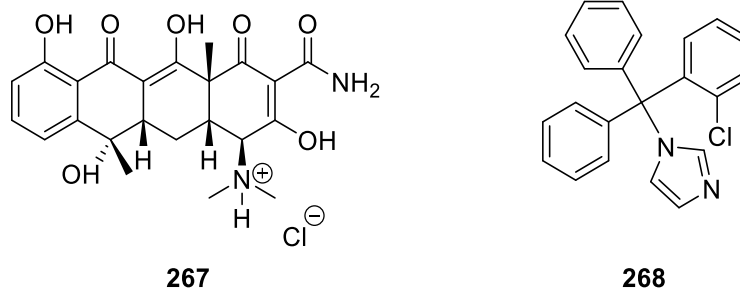
4.1 AGAR-DIFFUSIONSTEST

Alle synthetisierten Zielverbindungen wurden mit Hilfe des Agar-Diffusionstest auf ihre antimikrobielle Aktivität untersucht. Hierbei wird der Durchmesser eines Hemmhofs bestimmt, der sich bei der Anzucht von ausgesuchten Modellkeimen auf Agar-haltigem Nährboden in Anwesenheit der zu untersuchenden Verbindung ausbildet. Zu erkennen ist der Hemmhof daran, dass der Agar-Nährboden um die aufgetragene Verbindung herum klar bleibt, also kein Wachstum des Modellkeims stattfindet. Die so erhaltenen Daten (Hemmhofdurchmesser) ergeben jedoch keine quantifizierbare Aussage über die Stärke des antimikrobiellen Effekts, da die Hemmhofdurchmesser auch abhängig von der Diffusion der Verbindung im Nährboden sind. Es kann lediglich eine grundsätzliche Aktivität einer Substanz gegenüber dem Wachstum bestimmter Mikroorganismen abgeleitet werden. In Tab. 9 sind die eingesetzten Modellkeime aufgeführt.

Mikroorganismus	DSM-Nummer	Art
<i>Escherichia coli</i>	426	grammnegatives Bakterium
<i>Pseudomonas marginalis</i>	7527	grammnegatives Bakterium
<i>Streptococcus entericus</i>	14446	grammpositives Bakterium
<i>Yarrowia lipolytica</i>	1345	Hefe
<i>Candida glabrata</i>	11226	Hefe
<i>Aspergillus niger</i>	1988	Schimmelpilz
<i>Hyphopichia burtonii</i>	70663	Dermatophyt

Tab. 9: Im Agar-Diffusionstest verwendete Mikroorganismen.

Infolge der Einstufung in die Risikogruppe 2 gemäß den Technischen Regeln für Biologische Arbeitsstoffe (TRBA) wurden die beiden Modellkeime *Candida glabrata* und *Aspergillus niger* im Laufe der Arbeit nicht mehr für dieses Testsystem verwendet, so dass nicht alle Zielsubstanzen an den in Tab. 9 aufgeführten Mikroorganismen getestet wurden. Als Referenzsubstanzen dienten das Antibiotikum Tetracyclinhydrochlorid (**267**) und das Antimykotikum Clotrimazol (**268**) (Abb. 85). Die praktische Durchführung des Agar-Diffusionstest ist im Experimentellen Teil dieser Arbeit beschrieben (Kapitel 6.4.1).

Abb. 85: Im Agar-Diffusionstest verwendete Referenzsubstanzen Tetracyclinhydrochlorid (**267**) und Clotrimazol (**268**).

4.1.1 ERGEBNISSE UND DISKUSSION DES AGAR-DIFFUSIONSTEST

Mit dem Agar-Diffusionstest wurden alle Zielverbindungen mit Hydroxamsäure-Funktion sowie die Strukturanaloga mit anderen potenziell Zink-bindenden Gruppen auf ihre antimikrobielle Aktivität getestet (detaillierte Auflistung der getesteten Verbindungen siehe Tab. 10 und Tab. 11 in Kapitel 4.2.1). Keine der getesteten Verbindungen bildete einen Hemmhof bei den verwendeten Modellkeimen. Die Verbindungen besitzen somit kein Potential für eine mögliche Anwendung als Antiinfektiva. Allerdings wären von diesen bei Applikation am Menschen auch

keine unerwünschten gastrointestinalen Nebenwirkungen zu erwarten, welche mit antimikrobiellen Effekten oftmals einhergehen.

4.2 TESTUNG AUF ZYTOTOXIZITÄT

Alle synthetisierten Zielverbindungen wurden mittels eines Standardverfahrens nach T. Mosmann^[263] auf ihre Zytotoxizität untersucht. Das Prinzip dieses Verfahrens beruht auf der Umsetzung von 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT, **A**) zu einem Formazan **B** (Abb. 86). Das wasserlösliche, blassgelbe Tetrazoliumsalz **A** wird dabei unter Verbrauch von NADH bzw. NADPH zum wasserunlöslichen tiefblauen Formazan **B** reduziert. Diese Reaktion erfolgt mittels Enzymen des endoplasmatischen Retikulums und findet nur in lebenden, metabolisch aktiven Zellen statt^[264]. Die Menge des gebildeten blauen Formazans **B** kann photometrisch bestimmt werden und korreliert somit direkt mit der Zellviabilität. Der Test wurde an Zellen der humanen Leukämie Zelllinie HL-60 durchgeführt. Als Positivkontrolle wurde das nicht-ionische Detergenz Triton® X-100 verwendet. Anhand der erhaltenen Testergebnisse lässt sich nur eine generelle Aussage zur zytotoxischen Aktivität der jeweiligen Verbindung treffen, jedoch nicht zum Wirkmechanismus der zu diesem Zelltod führt. Genaue Angaben zur praktischen Durchführung sind im experimentellen Teil dieser Arbeit zu finden (Kapitel 6.4.2).

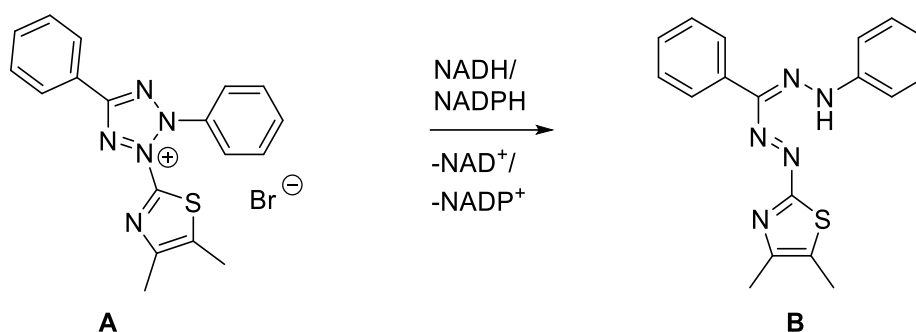
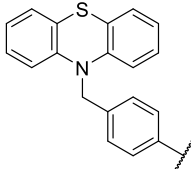
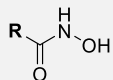
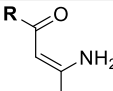
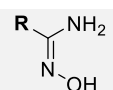
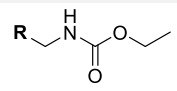
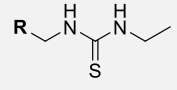
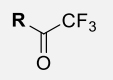
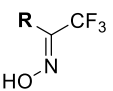
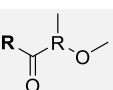
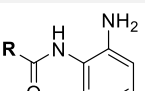
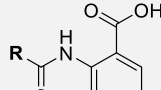
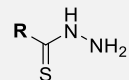
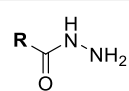
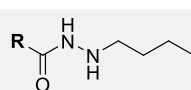



Abb. 86: Reduktion des gelben Tetrazoliumsalzes **A** zum blauen Formazan **B**.

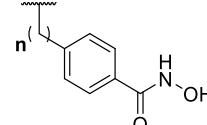
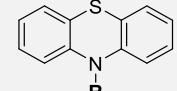
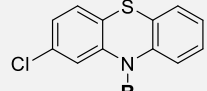
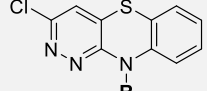
4.2.1 ERGEBNISSE DES MTT-TESTS

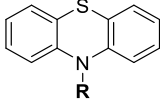
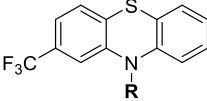
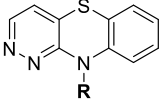
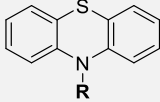
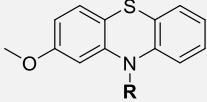
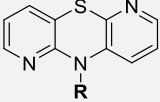
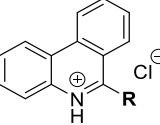
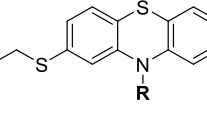
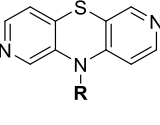
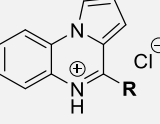
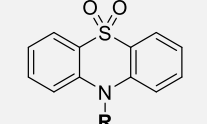
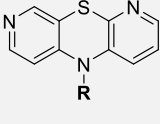
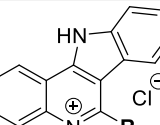
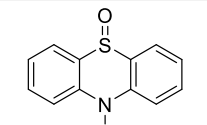
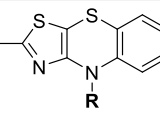
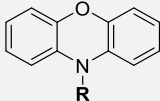
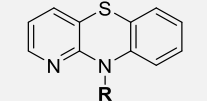
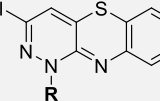
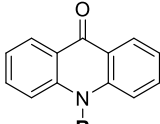
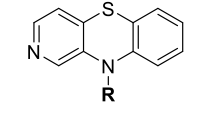
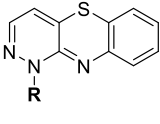
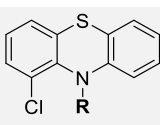
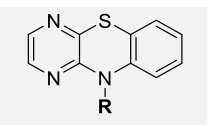
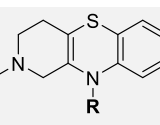
In Tab. 10 werden alle gemessenen IC₅₀-Werte der dargestellten Strukturanaloga mit diversen potenziell Zink-bindenden Gruppen gezeigt. Die Strukturanaloga mit Hydroxamsäure-Funktion wurden in gleicher Weise auf ihre Zytotoxizität geprüft. Der *pan*-KDAC-Inhibitor SAHA (**2**)

wurde als Referenzsubstanz mit untersucht. Die ermittelten IC_{50} -Werte dieser Verbindungen sind in Tab. 11 dargestellt.

<div style="display: flex; align-items: center; justify-content: center;"> <div style="margin-right: 10px;">R =</div>  <div style="margin-left: 10px;">IC_{50} [μM]</div> </div>		
 20	3.1	
 30*	n.a.	
 31*	46.0	
 33	> 50	
 34	6.5	
 35*	28.2	
 36*	12.9	
 39*	n.a.	
 40	3.5	
 41*	n.a.	
 44*	> 50	
 45	9.7	
 46	13.3	
 53	> 50	
—	—	—

Tab. 10: Durch den MTT-Test ermittelte IC_{50} -Werte der Strukturanaloga mit diversen potenziell Zink-bindenden Gruppen (n.a. = nicht auswertbar). * Verbindung aus der Masterarbeit von M. Morgenstern^[128]. Die Referenz SAHA (2) ergab einen IC_{50} > 50 μM .

<div style="display: flex; align-items: center; justify-content: center;"> <div style="margin-right: 10px;">R =</div>  <div style="margin-left: 10px;">IC_{50} [μM]</div> </div>		
 20 (n=1)	3.1	
 242 (n=1)	4.1	
 251 (n=1)	3.4	

 63 (n=0)	4.2	 243 (n=1)	4.4	 252 (n=1)	4.2
 70 (n=2)	4.3	 244 (n=1)	7.6	 253 (n=1)	6.5
 134 (n=0)	8.6	 245 (n=1)	4.2	 254 (n=1)	10.5
 135 (n=0)	7.9	 246 (n=1)	11.5	 255 (n=1)	13.1
 136 (n=0)	1.2	 247 (n=1)	21.9	 256 (n=1)	10.5
 239 (n=1)	9.3	 248 (n=1)	7.7	 261 (n=1)	4.5
 240 (n=1)	5.3	 249 (n=1)	3.0	 262 (n=1)	2.3
 241 (n=1)	5.9	 250 (n=1)	4.9	 266 (n=1)	13.3

Tab. 11: Durch den MTT-Test ermittelte IC₅₀-Werte der Verbindungen mit Hydroxamsäure-Funktion. n = Anzahl der Methylengruppen des Linkers. Die Referenz SAHA ergab einen IC₅₀ > 50 µM.

4.2.2 DISKUSSION DER TESTERGEBNISSE AUS DEM MTT-TEST

Zur Interpretation der Testergebnisse wurde der nicht-selektive Inhibitor SAHA (**2**), der eine FDA Zulassung zur Behandlung des kutanen T-Zell-Lymphoms besitzt^[87], ebenfalls im MTT-Test mit untersucht. Die Zytotoxizität von SAHA (**2**) wird durch Literaturdaten z.B. MTT-Tests an verschiedenen humanen Brustkrebszellen (IC_{50} 1.0 – 6.9 μ M, Inkubationszeit 5 d)^[265] oder MTT/MTS-Tests an HL-60 Zellen (IC_{50} 0.4 μ M, Inkubationszeit 72 h) belegt^[266-267]. Dieser Effekt konnte im Arbeitskreis-intern durchgeführten MTT-Test für SAHA (**2**) nicht bestätigt werden ($IC_{50} > 50 \mu$ M). Um mögliche zufällige Fehler auszuschließen wurde dieser Test noch zwei weitere Male wiederholt und führte zum gleichen Ergebnis. Darüber hinaus wurde im Arbeitskreis von Prof. Dr. Stefan Zahler (Pharmazeutische Biologie, Ludwig-Maximilians-Universität München) SAHA (**2**) und exemplarisch eine der synthetisierten Hydroxamsäuren, **70**, in einem CTB-Assay (CellTiter-Blue® Cell Viability Assay) an HEK-Zellen auf Zytotoxizität getestet um unsere Ergebnisse zu stützen. Hier ergab sich für SAHA ein IC_{50} -Wert von 10 μ M, aber auch die Hydroxamsäure **70** wies einen etwas niedrigeren IC_{50} -Wert von 1 μ M im Vergleich zum Arbeitskreis-intern ermittelten IC_{50} -Wert (4.3 μ M) auf. Verbindungen mit IC_{50} -Werten $\leq 5 \mu$ M, was dem Wert von Cisplatin entspricht, sind als signifikant zytotoxisch zu bewerten. Somit weisen die Hälfte aller Verbindungen mit Hydroxamsäure-Funktion eine signifikante Zytotoxizität ($\leq 5 \mu$ M) auf, während alle weiteren Hydroxamsäure-enthaltenen Verbindungen IC_{50} -Werte zwischen 5 μ M und 22 μ M hatten.

Bei den Zielverbindungen mit alternativ Zink-bindenden Gruppen konnte die stärkste Zytotoxizität bei dem *ortho*-Aminoanilid **40** mit einem IC_{50} -Wert von 3.5 μ M festgestellt werden. Bei einer Reihe weiterer Verbindungen, dem Thioharnstoff-Derivat **34**, Trifluormethyloxim **36***, Hydrazid **45** und *N*-Butylhydrazid **46**, resultierten IC_{50} -Werte $\leq 13 \mu$ M.

4.3 TESTUNG AUF LYSIN-DEACETYLASE INHIBITORISCHE AKTIVITÄT

Die synthetisierten Zielverbindungen mit Hydroxamsäure-Funktion sowie die Strukturanaloga mit anderen potenziell Zink-bindenden Gruppen wurden auf ihre biologische Aktivität gegenüber verschiedenen Lysin-Deacetylasen getestet. Dazu wurden diese in Kooperation mit Prof. Dr. Manfred Jung (Institut für Pharmazeutische Wissenschaften, Albert-Ludwigs-Universität Freiburg) in einem homogenen fluoreszenzbasierten Trypsin-Assay vermessen (Abb. 87). Dieser von unserem Kooperationspartner entwickelte und etablierte Assay^[268] ermöglicht die Bestimmung des inhibitorischen Potentials einer großen Anzahl von Substanzen innerhalb kurzer Zeit. Dazu wird die Testsubstanz zusammen mit dem synthetisch hergestellten KDAC-Substrat ZMAL^[269] und dem zu untersuchenden rekombinanten

KDAC-Enzym inkubiert. Das Substrat ZMAL (Z-(ϵ -Acetyl)lysin-7-amino-4-methylcoumarin) besteht aus einer Lysin-Einheit, die an ihrer Carboxylfunktion über eine Amidbindung mit dem Fluorophor AMC (7-Amino-4-methylcoumarin) verknüpft und an der α -Aminofunktion mit einer Cbz-Gruppe sowie der ϵ -Aminofunktion mit einer Acetylgruppe modifiziert ist. Nach erfolgter Abspaltung der Acetylgruppe durch die KDAC kann das gebildete deacetylierte Substrat ZML durch die Endopeptidase Trypsin umgesetzt werden. Dieses ist nur in der Lage den deacetylierten Metaboliten zu spalten und dadurch das Fluorophor AMC freizusetzen. ZMAL stellt kein Substrat von Trypsin dar. Freies AMC unterscheidet sich hinsichtlich seiner Fluoreszenzeigenschaften signifikant von ZMAL und kann so neben diesem detektiert werden. Die Konzentration an AMC wird fluorimetrisch bei einer Anregungswellenlänge von $\lambda_{\text{Ex}} = 390 \text{ nm}$ und einer Emissionswellenlänge von $\lambda_{\text{Em}} = 460 \text{ nm}$ vermessen. Die gemessene Konzentration korreliert somit direkt mit der KDAC-Aktivität und erlaubt dadurch die Ermittlung der IC_{50} -Werte von Inhibitoren^[270].

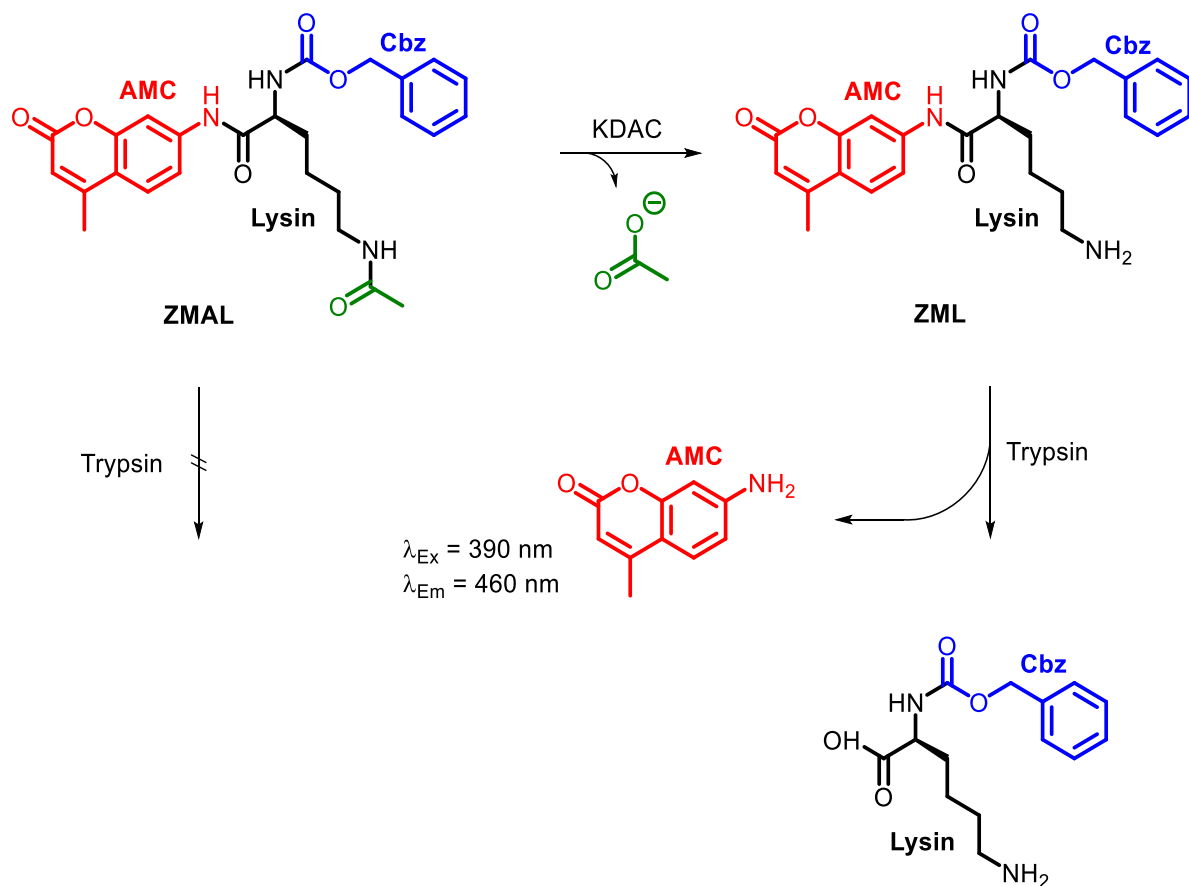


Abb. 87: Prinzip des fluoreszenzbasierten Trypsin-Assays ohne Zusatz eines Inhibitors^[271].

Zur Bestimmung der biologischen Aktivität gegenüber rekombinant hergestellter KDAC8 ist das Substrat ZMAL ungeeignet, da dieses von KDAC8 nur unzureichend deacetyliert wird. Eine Alternative dazu stellt das Substrat ZMTFAL (Z-(ϵ -Trifluoracetyl)lysin-7-amino-4-

methylcumarin)^[272-273] (Abb. 88) dar. Hier ist die Acetylgruppe an der ϵ -Aminofunktion durch die elektronenziehende Trifluoracetylgruppe ersetzt, wodurch eine bessere Umsetzung durch KDAC8 erreicht wird.

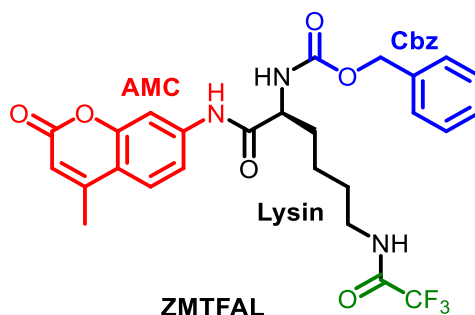


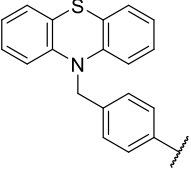
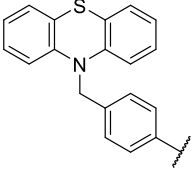
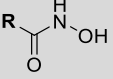
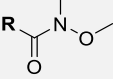
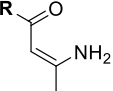
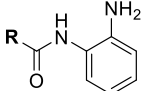
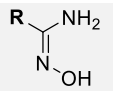
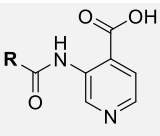
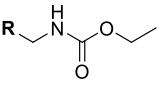
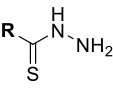
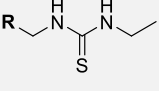
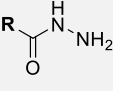

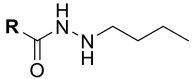
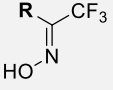
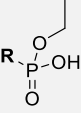
Abb. 88: ZMTFAL – Substratbeispiel für rekombinantes KDAC8.

Für die Testung einiger ausgewählter Verbindungen mit Hydroxamsäure-Funktion wurde hier der kommerziell erhältliche FLUOR DE LYS[®]-Assay (EnzoLifescience), ein dem Trypsin-Assay ähnlichem Testsystem, verwendet. Das FLUOR DE LYS[®]-Substrat enthält ein diacetyliertes Peptidsubstrat, das auf der Sequenz der Aminosäuren 379-382 von p53 (Arg-His-Lys(Ac)-Lys(Ac)) beruht. Nach erfolgter enzymatischer Umsetzung durch KDAC8 wird aus dem deacetylierten Metaboliten durch eine käuflich zu erwerbende FLUOR DE LYS[®]-Entwicklerlösung ein Fluorophor abgespalten, welches dann fluorimetrisch bei einer Anregungswellenlänge von $\lambda_{\text{Ex}} = 390 \text{ nm}$ und einer Emissionswellenlänge von $\lambda_{\text{Em}} = 460 \text{ nm}$ vermessen wird.

Details zur praktischen Durchführung dieser Assays sind bei Heltweg *et al.*^[268] sowie Heimbürg *et al.*^[274] und im experimentellen Teil dieser Arbeit dargelegt (Kapitel 6.4.3).

4.3.1 TESTERGEBNISSE DES LYSIN-DEACETYLASE ASSAYS

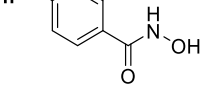
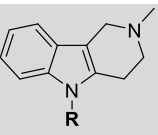
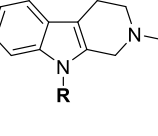
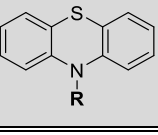
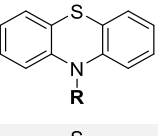
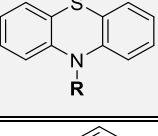
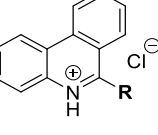
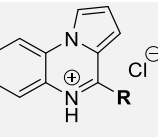
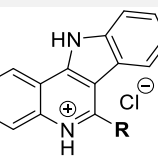
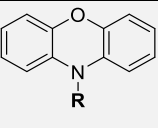
In Tab. 12 sind die Aktivitäten der Strukturanaloga mit potenziell Zink-bindenden Gruppen an den rekombinant hergestellten Enzymen KDAC1 und KDAC6 dargestellt. Hier sollten generelle Erkenntnisse über Zink-bindende Eigenschaften gewonnen bzw. der Einfluss der Zink-bindenden Gruppe auf die Isotypenselektivität untersucht werden.

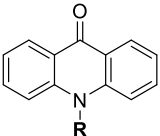
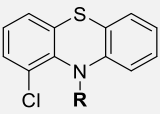
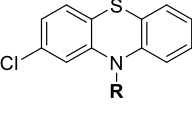
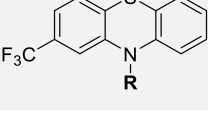
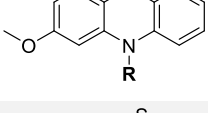
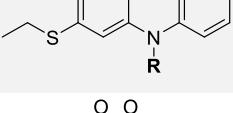
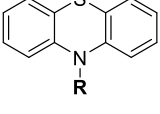
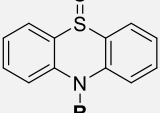
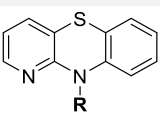
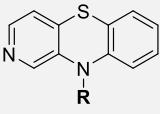
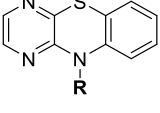
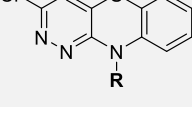
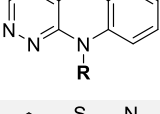
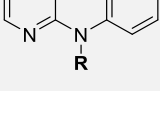
<div> <div>R = </div> <div>hKDAC1 hKDAC6</div> </div>			<div> <div>R = </div> <div>hKDAC1 hKDAC6</div> </div>		
	5.08 μ M	0.022 μ M		n.i. ^a	27 %
	n.i. ^a	8 %		1.23 μ M	41.7 μ M
	n.i. ^a	51 %		16 %	49 %
	n.i. ^b	n.i. ^b		n.i. ^b	n.i. ^b
	n.i. ^b	n.i. ^b		n.i. ^b	9.81 μ M
	n.i. ^a	24.9 μ M		0.788 μ M	n.i. ^b
	n.i. ^a	16 %		n.i. ^b	6.30 μ M

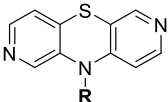
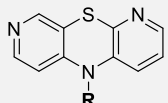
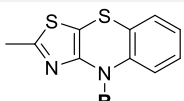
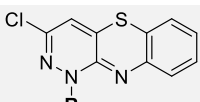
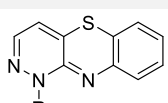
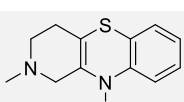
Tab. 12: Testung der Strukturanaloga mit alternativen potenziell Zink-bindenden Gruppen an hKDAC1 und hKDAC6. Die Inhibition wird als prozentualer Wert bei 50 μ M oder durch den IC₅₀-Wert angegeben, n.i.^a keine Hemmung bei 50 μ M, n.i.^b wurde definiert als < 50 % Inhibition bei 100 μ M). * Verbindung aus der Masterarbeit von M. Morgenstern^[128].

Alle synthetisierten Zielverbindungen mit Hydroxamsäure-Funktion wurden an rekombinant hergestellten Enzymen der Isoform KDAC1 und KDAC6, sowie zusätzlich bei einigen ausgewählten Verbindungen der Isoform KDAC8 auf ihre inhibitorische Aktivität getestet (Tab. 13). Dadurch sollte eine mögliche Isotypenselektivität eruiert werden. Als Referenzsubstanzen wurden die beiden KDAC6-selektiven Inhibitoren Tubacin (**12**) sowie Tubastatin A (**14**) und der nicht-selektive KDAC-Inhibitor SAHA (**2**) eingesetzt. Die rein rechnerisch ermittelten

Selektivitätsfaktoren (SF) sollen zur leichteren Abschätzung der Selektivitätsverhältnisse dienen.

$R = \text{---}(\text{---})_n\text{---}$ 	Substanz	n	hKDAC1 IC ₅₀ [μM]	hKDAC6 IC ₅₀ [μM]	hKDAC8 IC ₅₀ [μM]	SF 1/6	SF 8/6
	SAHA (2)		0.117	0.104	0.400	1	4
	Tubacin (12)		1.01	0.007	***	144	—
			1.40 ^[117]	0.004 ^[117]	1.27 ^[117]	350	318
	Tubastatin A (14)	1	1.91	0.030	0.695	64	23
			16.4 ^[117]	0.015 ^[117]	0.854 ^[117]	1093	57
	Regioisomer von Tubastatin A (269)	1	5.18 ^[117]	0.0014 ^[117]	***	3700	—
	20	1	5.08	0.022	1.48	231	67
	63	0	5.87	2.67	***	2	—
	70	2	11.7	0.136	***	86	—
	134	0	2.82	0.920	0.530	3	0.6
	135	0	---	---	***	—	—
	136	0	3.12	0.445	***	7	—
	239	1	4.28	0.067	***	64	—

	240	1	---	---	***	—	—
	241	1	5.76	0.016	***	360	—
	242	1	2.95	0.012	***	246	—
	243	1	7.49	0.025	***	300	—
	244	1	2.07	0.010	***	207	—
	245	1	7.20	0.031	***	232	—
	246	1	3.99	0.013	***	307	—
	247	1	6.81	0.077	***	88	—
	248	1	2.69	0.005	3.10	538	620
	249	1	1.25	0.007	***	179	—
	250	1	3.84	0.017	***	226	—
	251	1	1.08	0.018	***	60	—
	252	1	1.06	0.011	***	96	—
	253	1	3.39	0.014	***	242	—

	254	1	0.793	0.009	***	88	—
	255	1	3.34	0.012	2.00	278	167
	256	1	5.05	0.037	***	136	—
	261	1	4.58	0.115	***	40	—
	262	1	0.750	0.019	***	39	—
	266	1	0.981	0.032	***	31	—

Tab. 13: Testung der Zielverbindungen mit Hydroxamsäure-Funktion an hKDAC1, hKDAC6 und hKDAC8 (--- = Eigenfluoreszenz der Verbindung, keine Testung möglich, *** = nicht an diesem Enzym getestet, — = keine Berechnung möglich). n = Anzahl der Methylengruppen des Linkers. SF1/6 = $IC_{50}(KDAC1)/IC_{50}(KDAC6)$; SF8/6 = $IC_{50}(KDAC8)/IC_{50}(KDAC6)$.

4.3.2 DISKUSSION DER TESTERGEBNISSE

In einer Testreihe ganz zu Anfang des Projekts wurden sechs Verbindungen mit variierenden Cap-Gruppen in Kombination mit einem Phenyl- bzw. einem Benzyl-Linkerelement und der Hydroxamsäure als Zink-bindende Gruppe getestet (Tab. 13; **134**, **135**, **136** und **20**, **239**, **240**). Aus beiden Gruppen konnte jeweils eine Verbindung (**135** und **240**) nicht mit dem fluoreszenzbasierten Trypsin-Assay vermessen werden, da diese bei der verwendeten Anregungswellenlänge selbst fluoreszierten. Die zwei Verbindungen mit gewinkelterm aromatischem Tri- bzw. Tetracyclus kombiniert mit **Phenyl**-Linkerelement **134** und **136** zeigten messbare, aber mittelmäßige Aktivitäten an den drei KDAC-Subtypen und keine nennenswerten Selektivitäten. Daher erschienen weitere Variationen der Cap-Gruppen in Kombination mit einem kurzen Phenyl-Linkerelement über diese Syntheseroute wenig lohnenswert, so dass keine weiteren Verbindungen dieses Strukturtyps bearbeitet wurden.

Im Vergleich dazu ließ sich bei den beiden Verbindungen **20** und **239** mit den linear anellierten Tricyclen (Phenoxazin und Phenothiazin) in Verbindung mit dem **Benzyl**-Linkerelement eine außerordentlich hohe Aktivität gegenüber KDAC6 erzielen. Verbindung **20** wies mit einem IC_{50} -Wert von 22 nM an KDAC6 und 5.08 μ M an KDAC1 eine sehr gute KDAC6-Aktivität und

Selektivität (231fach) auf. Tubastatin A (**14**), das als Leitstruktur für die Entwicklung neuer Inhibitoren diente, zeigte sich in dem hier verwendeten Testsystem weniger potent und selektiv als in der Literatur beschrieben. Von Butler *et al.* wurde Tubastatin A (**14**) mit einem IC₅₀-Wert von 15 nM an KDAC6 und einer mehr als 1000fachen Selektivität gegenüber KDAC1, mit jedoch geringer KDAC8-Selektivität (57fach) publiziert^[117]. Während Tubastatin A (**14**) mit einem IC₅₀-Wert von 30 nM an KDAC6 in diesem Testsystem etwas weniger potent war, zeigte der Inhibitor gegenüber KDAC8 eine geringfügig höhere Aktivität (695 nM; 23fache Selektivität). Der inhibitorische Effekt auf KDAC1 nahm dagegen mit einem IC₅₀-Wert von 1.91 µM weitaus deutlicher zu und damit die Selektivität drastisch ab (1093fach auf 64fach). Der selektive Inhibitor Tubacin (**12**) wurde ebenfalls als Referenz in diesem Testsystem verwendet. Hier war der Selektivitätsverlust gegenüber KDAC1 jedoch nicht so stark ausgeprägt (350fach auf 144fach). Verbindung **239** mit Phenoxazin als Cap-Gruppe war mit einem IC₅₀-Wert von 67 nM an KDAC6 und 4.28 µM an KDAC1 etwas weniger potent und selektiv als **20**. Aufgrund dieser hervorragenden Testergebnisse konnte **20** schon zu einem sehr frühen Zeitpunkt als Leitstruktur für alle weiteren Untersuchungen zu Struktur-Aktivitäts-Beziehungen festgelegt werden.

Die Testreihe zu alternativen potenziell Zink-bindenden Gruppen wurde aus diesem Grund ausschließlich auf Basis des Phenothiazins mit Benzyl-Linker durchgeführt. Es zeigte sich aber hier eine sehr geringe Toleranz hinsichtlich einer Variation der stark Zink-bindenden Hydroxamsäure-Funktion (Tab. 12). Eine *N,O*-Dimethylierung der Hydroxamsäure-Funktion in **39*** führte zu einem drastischen Aktivitätsverlust. Dies steht in Einklang mit dem kürzlich beobachteten Bindungsmodus der Hydroxamsäure in der Leitstruktur **20** (Kapitel 4.6). Diese koordiniert nur über die OH-Funktion, vermutlich in der ionisierten Form des Oxyanions, an das Zinkion im aktiven Zentrum. *Ortho*-Aminoanilide^[275] und *N*-Alkylhydrazide^[141] wurden in der Literatur mit einer höheren Selektivität für Isoenzyme der Klasse I beschrieben. Diese Zink-bindenden Gruppen führten in **40** sowie **46** zu einer Inhibition der KDAC1 im niedrigen mikromolaren bzw. submikromolaren Bereich bei signifikant schwächerer Aktivität an KDAC6. Erstaunlicherweise hemmten beide Zink-bindenden Funktionen die KDAC1 sogar stärker als die Hydroxamsäure-Funktion in der Leitstruktur **20**. Anfänglich überraschend war die Aktivität des freien Hydrazids **45** an KDAC6 mit einem IC₅₀-Wert von 10 µM. Das KDAC6-selektive inhibitorische Potential von Hydraziden im zweistelligen µM-Bereich wurde im Nachhinein durch eine Veröffentlichung von Goracci *et al.* bestätigt^[100]. Eine infolgedessen erwogene Aktivitätssteigerung durch die Funktionalität des Thiohydrazids **44*** blieb jedoch weit hinter den Erwartungen zurück. Entgegen der berichteten submikromolaren Aktivität des Santacruzamate A^[133] an KDAC6 erwies sich dessen Zink-bindende Gruppe, das Carbamat, in **33** als inaktiv. Ein gleichfalls negatives Ergebnis wurde für den *N*-Ethylthioharnstoff **34**, mit

der Funktionalität eines Santacruzamate A-Analogons^[134], erhalten. Die inhibitorische Wirkung der Verbindungen **30***, **31***, **36*** und **41*** an KDAC6 war so gering, dass kein IC₅₀-Wert bestimmt wurde. Angesichts der postulierten KDAC-Inhibition durch Amidoxime, die Bioisostere der Hydroxamsäuren darstellen^[135], überraschte der fast vollständige Aktivitätsverlust des (Z)-Amidoxims **31***. Ein vergleichbares Resultat wurde jedoch kürzlich auch erhalten, als bei dem KDAC6-selektiven Inhibitor Nexturastat A (**15**) die Hydroxamsäure-Funktion durch ein Amidoxim ersetzt wurde^[137]. Das (E)-Trifluormethyloxim **36*** zeigte ebenfalls eine nur noch irrelevante Inhibition an KDAC6 und keinen Effekt an KDAC1. Trifluormethylketone vermögen laut Literatur KDACs potent^[105] und Isotypen-selektiv^[106-107] (auch KDAC6-selektiv) zu inhibieren. In Kombination mit unserem bevorzugten Strukturmotiv (Phenothiazin-Cap und Benzyl-Linker) in **35*** konnte dies zumindest nicht bestätigt werden. Der Phosphonsäuremonoethylester **53** zeigt zwar mit einem IC₅₀-Wert < 10 µM KDAC6-inhibitorische Aktivität bei gleichzeitiger Inaktivität gegenüber KDAC1, erreicht aber längst nicht die Wirkstärke der Hydroxamsäure **20**.

Die nächste Testreihe, in der das Linkerelement der Leitstruktur **20** variiert wurde, zeigte signifikante Veränderungen in der Aktivität sowie Selektivität. Die Verkürzung des Linkers von einer Benzyl- zu einer Phenyl-Einheit in **63** hatte eine Verminderung der Selektivität zur Folge. Die Aktivität an KDAC6 sank um das 120fache (IC₅₀ 2.67 µM) bei annähernd gleichbleibender Wirkstärke an KDAC1. Die Verlängerung um eine Methylen-Einheit zur Phenylethyl-Verbindung **70** resultierte an KDAC6 in einem Aktivitätsverlust um den Faktor 6 und auch in einer verminderten Selektivität gegenüber KDAC1. Dabei war der Aktivitätsverlust an KDAC6 durch die Verlängerung des Linkers nicht so gravierend wie bei der Verkürzung. Das Phenothiazin-Cap scheint durch den flexiblen Phenylethyl-Linker in **70** noch in einem gewissen Maß mit der Oberfläche des KDAC6-Enzyms interagieren zu können. Die gesteigerte Flexibilität und Drehbarkeit bewirkt aber vermutlich auch die Einbuße bei der Wirkstärke, da eine Bindung an das Enzym in diesem Fall zu einem größeren Entropieverlust führt^[137].

Schließlich wurden in einer weiteren Testreihe die Effekte einer Modifikation der Cap-Gruppen, basierend auf dem Phenothiazin Grundgerüst der Leitstruktur **20**, analysiert. Verbindungen mit zusätzlichen Substituenten an Position 1 und 2 des Phenothiazins (**241** bis **245**) zeigten ebenfalls starke inhibitorische Aktivität an KDAC6 (IC₅₀ ≤ 31 nM). Dabei hatte die Art des Substituenten lediglich einen marginalen Einfluss auf die Aktivität an KDAC6. Unterschiede im Selektivitätsprofil der einzelnen Substanzen resultierten vornehmlich durch die unterschiedlich starke Inhibition von KDAC1.

Die Verbindung mit einer oxidierten Phenothiazin-Struktur, das Sulfon **246**, wies eine leichte Steigerung der Aktivität (KDAC1 und KDAC6) und Selektivität gegenüber der Leitstruktur **20** auf. Im Gegensatz dazu verringerte sich die Aktivität des Sulfoxid **247** gegenüber dem Phenothiazin **20** sowohl hinsichtlich inhibitorischer Aktivität als auch Selektivität um den

Faktor ca. 4.

Durch die Einführung von ein oder zwei Stickstoffatomen in das Phenothiazin Grundgerüst nahm die Aktivität gegenüber KDAC6 sogar durchwegs leicht zu. Gegenüber den zuvor aufgeführten Modifikationen konnte durch diese Azaphenothiazin-basierten Verbindungen (**248** bis **255**) eine Steigerung der Inhibition an KDAC6 bis auf das 4fache erzielt werden. Indessen wurde die KDAC1 gleichsam stärker gehemmt, was jedoch mit einer uneinheitlich ausgeprägten Selektivität gegenüber dieser Isoform bei den einzelnen Verbindungen einherging. Der deutlichste Effekt wurde hingegen bei Verbindung **248** mit einem IC_{50} -Wert von 5 nM an KDAC6 und einer 538fachen Selektivität gegenüber KDAC1 erzielt. Diese Verbindung zeigte zudem noch eine sehr hohe Selektivität gegenüber KDAC8 (620fach). Eine zusätzliche Substitution am diazalogen Phenothiazin wie bei Verbindung **252** in Position 3 mit einem Chlor-Atom führte bei Verbindung **251** zu einem weiteren, geringfügigen Selektivitätsverlust. Einen zudem nachteiligen Einfluss auf die Selektivität hatte die veränderte Verknüfungsposition zwischen Cap-Gruppe und Benzyl-Linker bei den Strukturisomeren **261** und **262**. Eine Verschiebung der Verknüpfung von Position 10 (Thiazin-Stickstoff) zu N-1 des Diazaphenothiazin-Rings ergab bei Verbindungen **262** eine verbesserte Aktivität an KDAC1 bei gleichzeitig leicht abgeschwächter Aktivität an KDAC6. Im Fall des chlosubstituierten Diazaphenothiazin-Rings sank die Aktivität der strukturisomeren Verbindung **161** gegenüber KDAC1 und in noch deutlicherem Ausmaß gegenüber KDAC6.

Weitreichendere Veränderungen in der Grundstruktur wie bei Austausch eines Benzolrings des Phenothiazin durch einen Thiazolring in Verbindung **256** führten zu einer leicht verminderten Aktivität und Selektivität an KDAC6.

Sogar durch Einführung eines Tetrahydropyridin-Rings, einem charakteristischen Strukturmerkmal von Tubastatin A (**14**) und seinem Analogon (**269**), in das Phenothiazin Grundgerüst wurde keine Verbesserung bezüglich der Selektivität erreicht. Im Gegenteil, die Aktivität gegenüber KDAC6 nahm geringfügig ab, während die Aktivität an KDAC1 deutlich gesteigert wurde, so dass **266** eine der unselektivsten Verbindungen in dieser Reihe darstellt.

Insgesamt konnte mit der Mehrzahl der durchgeführten Modifikationen am Phenothiazin Grundgerüst die Aktivität der Verbindungen gegenüber der Leitstruktur **20** leicht verbessert werden (bis zu einem Faktor 4). Bezüglich der Aktivität gegenüber KDAC1 war bei einer Reihe von Verbindungen eine 200-300fache Selektivität zu erkennen. Bei der besten Verbindung dieser Reihe (**248**) konnte eine über 500fache Selektivität gegenüber KDAC1 und eine über 600fache Selektivität gegenüber KDAC8 erzielt werden.

4.4 ZELLULÄRE TESTUNG DER LYSIN-DEACETYLASE INHIBITORISCHEN AKTIVITÄT

In Kooperation mit Prof. Dr. Manfred Jung (Institut für Pharmazeutische Wissenschaften, Albert-Ludwigs-Universität Freiburg) wurden ausgewählte Verbindungen auf ihre inhibitorische Aktivität auf zellulärer Ebene untersucht. Dazu wurden die Acetylierungslevel verschiedener KDAC-Target Proteine mittels Western Blot bestimmt. Insbesondere die Analyse der Acetylierungslevel von Histon und dem Strukturprotein α -Tubulin diente dabei zudem zur Ermittlung der Subtypenselektivität auf zellulärer Ebene. Denn das cytosolische α -Tubulin wird überwiegend von der Isoform KDAC6 deacetyliert, wohingegen die Histonproteine vor allem die Substrate der Klasse I (darunter KDAC1) darstellen. Der Effekt der ausgewählten Inhibitoren auf diese Proteine wurde dabei aus einem Gesamtzellextrakt ermittelt. Dabei erfolgte zunächst eine Auftrennung der Proteine nach ihrer Größe mittels Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-Page) nach dem diskontinuierlichen Verfahren nach Laemmli^[276]. Anschließend wurden die Proteine unter Anlegen eines elektrischen Feldes auf eine Membran transferiert und mit einem primären Antikörper, der sich spezifisch gegen das nachzuweisende acetylierte Protein richtet, inkubiert. Im Folgenden wurde ein sekundärer Antikörper zugegeben, der wiederum an die Fc-Region des primären Antikörpers bindet. Durch eine zusätzliche Markierung des sekundären Antikörpers mit dem Enzym Meerrettichperoxidase konnte nach Zugabe des Substrats Luminol eine Detektion mittels Chemolumineszenzreaktion stattfinden. Dabei ist die gemessene Intensität der Chemolumineszenz proportional zur vorhandenen Menge des untersuchten Proteins.

4.4.1 TESTERGEBNISSE DER ZELLULÄREN TESTUNG MITTELS WESTERN BLOT

Aufgrund der vielversprechenden *in vitro*-Testergebnisse wurden die beiden sehr potenten und selektiven Verbindungen **248** und **255** für die weiterführende zelluläre Charakterisierung ausgewählt. Als Kontroll- und Vergleichssubstanz wurde der nicht-selektive KDAC-Inhibitor SAHA (**2**) verwendet (Abb. 89).

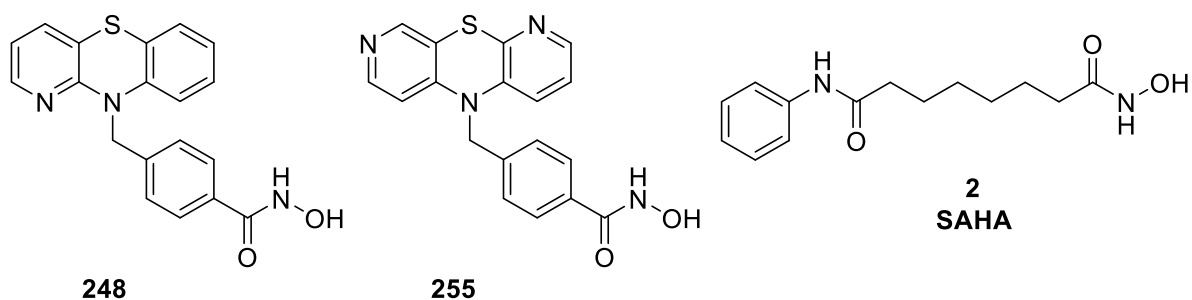


Abb. 89: Ausgewählte Inhibitoren für die zelluläre Testung der Lysin-Deacetylase inhibitorischen Aktivität.

Die Testung wurde an Zellen der promyeloischen Leukämie Zelllinie HL-60 durchgeführt. Die Zelllinie verfügt über eine ausreichende Menge der zu untersuchenden Proteine und wurde bereits für die Charakterisierung der KDAC6 Inhibition verwendet^[114, 130]. Zur Immundetektion im Anschluss an die SDS-Page wurden Antikörper gegen acetyliertes α -Tubulin sowie gegen acetyliertes Histon H3 verwendet. Als Ladekontrolle diente ein Antikörper, der sich gegen das Protein Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) richtete.

In Abb. 90 ist die Detektion von acetyliertem α -Tubulin und acetyliertem Histon H3 mittels Western Blot dargestellt. Die Analyse der Acetylierungslevel der beiden Targetproteine α -Tubulin und Histon H3 erfolgte durch Inkubation von HL-60 Zellen mit drei verschiedenen Konzentrationen (10 μ M, 1.0 μ M und 0.1 μ M) von **248**, **255** und SAHA (**2**). Die Ladekontrolle GAPDH zeigte eine gleichmäßige Verteilung der Proteinmengen in den einzelnen Probespuren. Zur präziseren Interpretation der Daten aus dem Western Blot wurden die Banden quantifiziert und die Stärke der einzelnen Banden auf die Stärke der GAPDH-Bande normiert (Tab. 14). Der Selektivitäts-Index wurde rein rechnerisch ermittelt und soll eine leichtere Abschätzung der Selektivitätsverhältnisse ermöglichen.

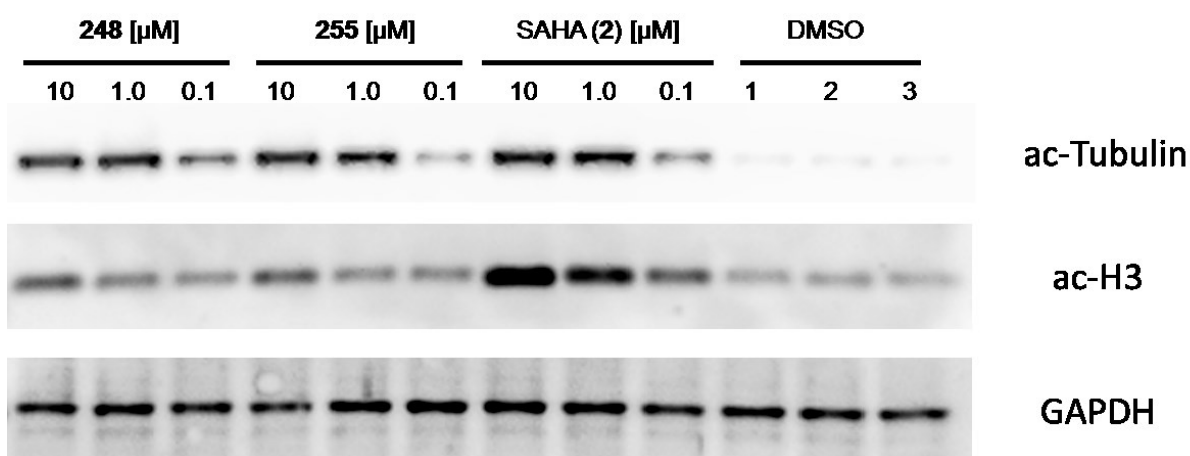


Abb. 90: Acetylierungslevel von α -Tubulin und Histon H3 nach Behandlung von HL-60 Zellen mit drei verschiedenen Konzentrationen von **248**, **255** und SAHA (**2**) unter Verwendung der Ladekontrolle GAPDH.

Verbindung	Ac-Tubulin/GAPDH	Ac-Histon H3/GAPDH	Selektivitäts-Index ^a
DMSO	1.00 ^b	1.00 ^b	
SAHA (2), 10 µM	9.52	2.80	3.40
SAHA (2), 1.0 µM	9.97	1.91	5.22
SAHA (2), 0.1 µM	3.79	1.52	2.49
248 , 10 µM	9.20	1.28	7.19
248 , 1.0 µM	9.41	1.07	8.79
248 , 0.1 µM	5.42	1.14	4.75
255 , 10 µM	10.93	1.47	7.44
255 , 1.0 µM	7.97	0.99	8.05
255 , 0.1 µM	2.16	1.05	2.06

Tab. 14: Ergebnisse der Quantifizierung aus dem Western Blot. ^bAlle Ergebnisse wurden auf DMSO normalisiert. ^aSelektivitäts-Index wurde berechnet als Quotient aus Ac- α -Tubulin/GAPDH und Ac-Histon H3/GAPDH.

4.4.2 DISKUSSION DER TESTERGEBNISSE

Die Analyse der Acetylierungslevel der beiden Targetproteine α -Tubulin und Histon H3 ergab eine deutliche konzentrationsabhängige Hyperacetylierung für den unselektiven Inhibitor SAHA (2) (Abb. 91). Lediglich die Acetylierung von α -Tubulin hatte bei der Konzentration von 1.0 µM gegenüber 10 µM leicht zugenommen. Mit Ausnahme der Konzentration von 1.0 µM bei **248** war für die beiden Verbindungen **248** und **255** ebenfalls eine konzentrationsabhängige Induktion der Acetylierung von α -Tubulin zu erkennen. Im Gegensatz dazu zeigten die beiden Verbindungen **248** und **255** nur geringe Effekte auf die Acetylierungslevel von Histon H3. Im Vergleich zu SAHA (2) war die Acetylierung des α -Tubulin bei allen Konzentrationen, mit einziger Ausnahme von Verbindung **255** bei 0.1 µM, höher als die des Histons H3 (siehe Selektivitäts-Index in Tab. 14, Kapitel 4.4.1). Somit konnte die *in vitro* gezeigte Selektivität der Substanzen auch auf zellulärer Ebene bestätigt werden.

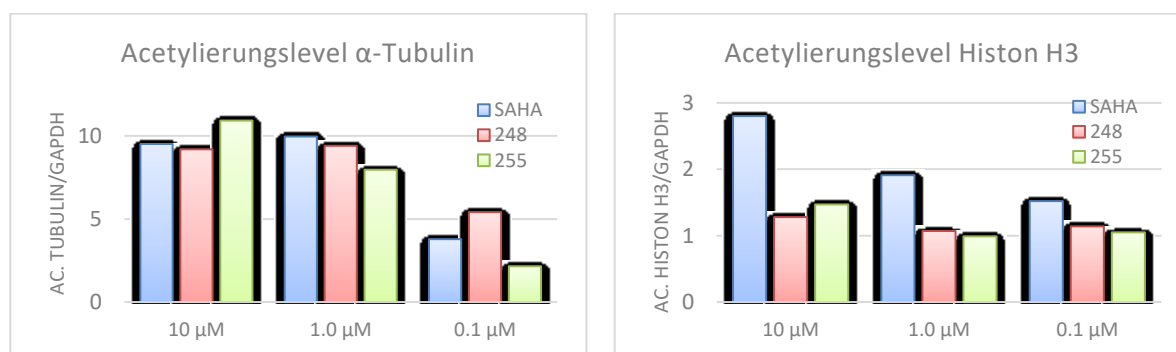


Abb. 91: Level von acetyliertem α -Tubulin (links) und acetyliertem Histon H3 (rechts) relativ zu GAPDH.

4.5 DOCKINGSTUDIEN

Zur weiteren Diskussion der Struktur-Wirkungsbeziehungen wurden an ausgewählten Verbindungen und dem publizierten KDAC6-selektiven Inhibitor, Tubastatin A (**14**) in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Wolfgang Sippl an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg Dockingstudien durchgeführt (Abb. 92). Hierzu wurden die erst kürzlich gelösten Kristallstrukturen von humanem hKDAC1^[277] und hKDAC6^[32] sowie von KDAC6 aus *Danio rerio* (zKDAC6)^[37] angewandt. Das Modell der Leitstruktur **20** in der katalytischen Domäne 2 von hKDAC6 (Abb. 92; **A**) zeigt die optimale Passform der Phenothiazin-basierten Benzylhydroxamsäuren im Bindungskanal. Die Phenothiazin Cap-Gruppe weist dabei eine ähnliche Orientierung wie der 1,2,3,4-Tetrahydro-pyrido[4,3-*b*]indolring des Tubastatin A (**14**) auf (Abb. 92; **B**). Die Hydroxamsäure koordiniert in monodentater Weise über ihre OH-Gruppe an das Zinkion im aktiven Zentrum unter Ausbildung einer zusätzlichen Wasserstoffbrückenbindung zwischen dem Carbonyl-Sauerstoff und einem an das Zinkion gebundenem Wassermolekül. Ein derartiger Bindungsmodus wurde bisher erst einmal bei dem KDAC6-selektiven Inhibitor HPOB (**16**) in zKDAC6 beobachtet^[32]. Die Methyleinheit im Benzyl-Linker ermöglicht eine komplementäre Molekülgeometrie des Phenothiazin-Caps zu der Randregion des katalytischen Kanals von hKDAC6. Der in sich leicht angewinkelte Phenothiazin-Tricyclus interagiert über π,π -Wechselwirkungen mit den aromatischen Resten H500, P501, P620 sowie über van-der-Waals-Kräfte mit L749.

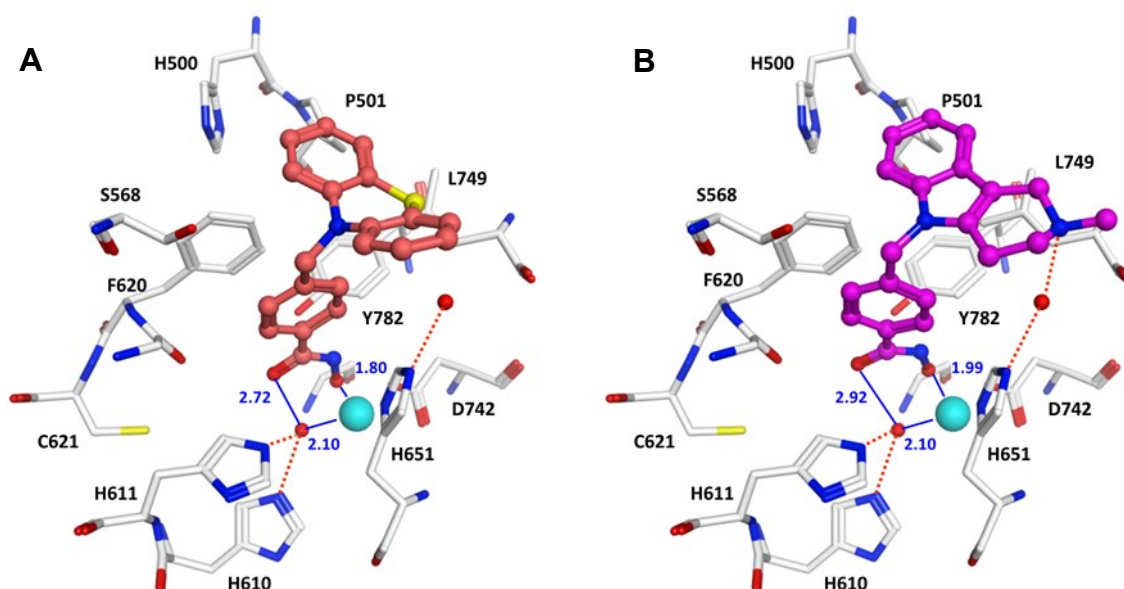


Abb. 92: Dockingmodelle mit hKDAC6; **A**) Leitstruktur **20**; **B**) Tubastatin A (**14**). Das Zinkion ist als türkise Kugel dargestellt. Kleinere rote Kugeln kennzeichnen Wassermoleküle. Die gestrichelten roten Linien zeigen Wasserstoffbrückenbindungen. Die blauen Linien geben die Abstände in Å an.

Die substituierten Phenothiazin- und Azaphenothiazin-Ringe der Analoga nehmen dabei mehr oder weniger die gleiche Orientierung wie der Phenothiazin-Ring der Leitstruktur **20** zu der Randregion des katalytischen Kanals von hKDAC6 ein. Dies ist in Übereinstimmung mit den nur geringfügig erzielten Veränderungen der hKDAC6 inhibitorischen Aktivität im Enzymassay (IC_{50} -Werte von 0.050-0.037 μ M) durch die vorgenommenen Modifikationen am Phenothiazin Grundgerüst. Die Strukturanaloga mit modifizierter Linkereinheit weisen dagegen abweichende Dockingpositionen auf. Durch die fehlende Methyleinheit im Linker (Phenyl statt Benzyl) ist Verbindung **63** nicht in der Lage eine gewinkelte Konformation einzunehmen (Abb. 93; **A**). Dadurch ist die erwähnte ideale Passform zur Koordination an das Zinkion im Bindungskanal nicht mehr gegeben. Eine zusätzliche Methyleinheit im Phenylethyl-Linker wirkt sich ebenfalls negativ aus. Im Falle von Verbindung **70** ragt der Phenothiazin-Ring über die Öffnung des Kanals hinaus, was offensichtlich die Interaktionsmöglichkeiten zu H500 und P620 verringert (Abb. 93; **B**).

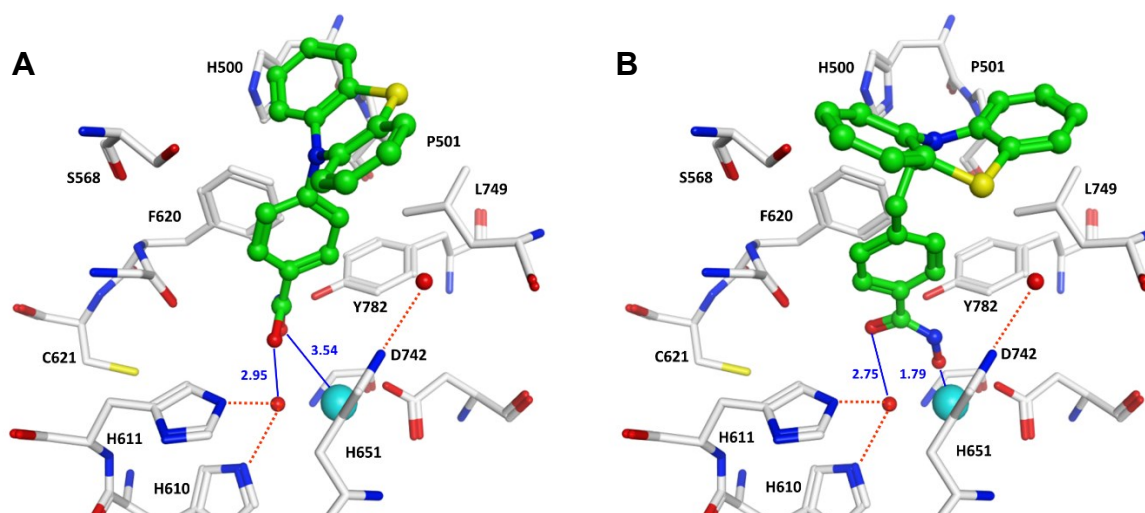


Abb. 93: Dockingmodelle mit hKDAC6; **A**) Strukturanalogon **63** mit verkürztem Linker; **B**) Strukturanalogon **70** mit verlängertem Linker. Das Zinkion ist als türkisfarbene Kugel dargestellt. Kleinere rote Kugeln kennzeichnen Wassermoleküle. Die gestrichelten roten Linien zeigen Wasserstoffbrückenbindungen. Die blauen Linien geben die Abstände in Å an.

Eine Modifikation der Zink-bindenden Gruppe der Leitstruktur **20**, die *N,O*-Dimethyl substituierte Hydroxamsäure **39*** nimmt eine ähnliche Dockingposition ein wie die Leitstruktur **20**, ist aber nicht imstande mit dem Zinkion zu koordinieren (Abb. 94; **A**). Die Substanz ist nahezu inaktiv an der KDAC6.

Aus Modellen der Verbindungen mit hKDAC1 war ersichtlich, dass aufgrund des engeren katalytischen Kanals dieses Isoenzym die Hydroxamsäuregruppe nicht so gut an das Zinkion binden kann (Abb. 94; **B**). Im Vergleich zu hKDAC6 (Abb. 92; **A**) sind hier die Abstände zum Zinkion generell größer. Zudem können keine Wasserstoffbrückenbindungen zu H140 und

Y302 ausgebildet werden. Folglich konnten durch die Dockingstudien die hKDAC6-Selektivität der synthetisierten Verbindungen auch auf struktureller Ebene erklärt werden.

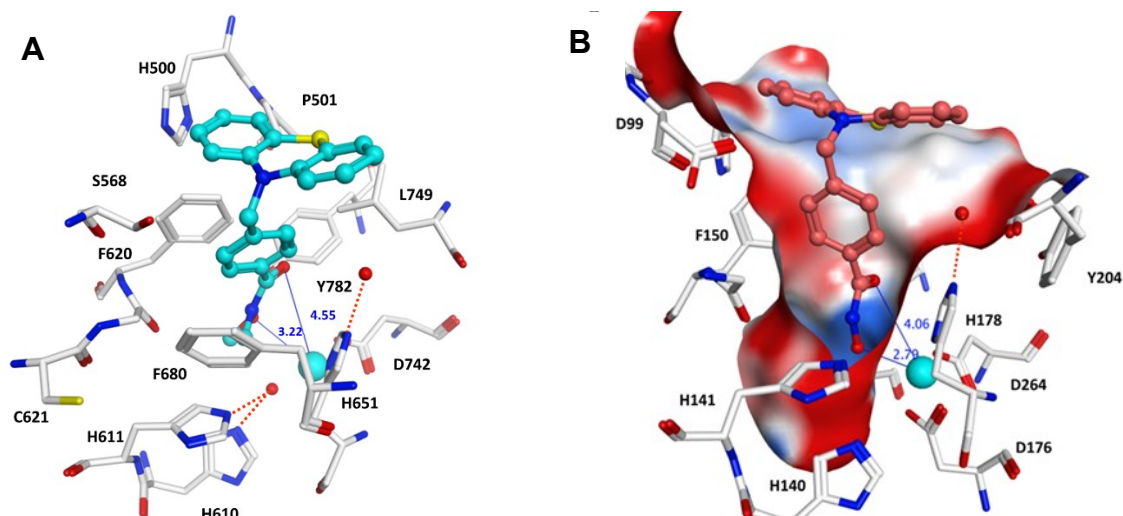


Abb. 94: Dockingmodelle; **A)** hKDAC6 mit inaktiver Verbindung **39***; **B)** hKDAC1 mit Leitstruktur **20**. Das Zinkion ist als türkisfarbene Kugel dargestellt. Kleinere rote Kugeln kennzeichnen Wassermoleküle. Die gestrichelten roten Linien zeigen Wasserstoffbrückenbindungen. Die blauen Linien geben die Abstände in Å an.

4.6 CO-KRISTALLISATIONSTUDIEN

Die dreidimensionale Struktur der KDAC6 blieb trotz intensiver Studien seit der erstmaligen Beschreibung dieses Isoenzym im Jahr 1999 lange Zeit unbekannt. Erst 2016 wurde die Kristallstruktur beider katalytischer Domänen der KDAC6 im Komplex mit verschiedenen Substraten und Inhibitoren von Hain und Christianson^[32] und Miyak *et al.*^[37] gelöst und dadurch ein tieferes Verständnis hinsichtlich Katalysemechanismus, Substratspezifität und Inhibitorselektivität geschaffen.

Zur strukturellen Untersuchung des tatsächlich im Enzym vorliegenden Bindungsmodus der Phenothiazin-basierten Benzylhydroxamsäuren wurde die potenteste und selektivste Verbindung **248** für Kristallisationsstudien ausgewählt. Die Kristallstruktur von Verbindung **248** wurde im Komplex mit der katalytischen Domäne 2 der KDAC6 aus *Danio rerio* (zKDAC6) von Prof. Dr. David W. Christianson am Department Chemie an der Universität in Pennsylvania gelöst (Abb. 95).

In der Kristallstruktur koordiniert Verbindung **248** monodentat an das Zinkion, wie dies zuvor erstmalig für den selektiven Inhibitor HPOB (**16**) im Komplex mit zKDAC festgestellt wurde. Die Hydroxamsäure bindet nur mit ihrer OH-Gruppe das Zinkion ($\text{Zn}^{2+} \cdots \text{O}$ Abstand von 2.0 Å), während die Carbonyl-Gruppe eine Wasserstoffbrückenbindung zu einem an das Zinkion

gebundenes Wassermolekül ausbildet (O---O Abstand von 2.9 Å). Das Wassermolekül bleibt über Wasserstoffbrückenbindungen an das Histidinpaar H573 und H574 (O---N Abstand 2.6 Å bzw. 2.5 Å) gebunden. Die sterisch anspruchsvolle Cap-Gruppe verhindert eine noch engere Annäherung an das Zinkion, so dass der übliche 5-gliedrige Chelatkomplex, der bei *pan*-KDAC Inhibitoren, wie z.B. bei Trichostatin A (**1**), gewöhnlich zu beobachten ist, bei Verbindung **248** nicht begünstigt ist. Die Aminosäure Tyrosin Y745 interagiert mit der NH- und OH-Gruppe der Hydroxamsäure (O---O und O---N Abstand von jeweils 2.7 Å) sowie mit der Carbonyl-Gruppe (O---O Abstand von 3.0 Å). Die aromatischen Seitenketten von F583 und F643 gehen Interaktionen mit dem aromatischen Linker ein. Die Azaphenothiazin Cap-Gruppe ist leicht gewinkelt. Die Ebenen mit den beiden aromatischen Ringen bilden einen Winkel von 163° entlang der Achse durch die beiden Heteroatome im Thiazinring, so dass der Thiazin-Stickstoff mit C-N-C Bindungswinkeln von 115° zwischen den C-Atomen des Tricyclus und des Methylenlinkers leicht pyramidal angeordnet ist. Einer der aromatischen Ringe geht van-der-Waals Wechselwirkungen mit den Seitenketten von H463, P464 und F583 ein. Mithilfe dieser Kristallisationsexperimente wurde ein weiteres Beispiel für diesen untypischen und zuvor unbeobachteten Bindungsmodus gefunden.

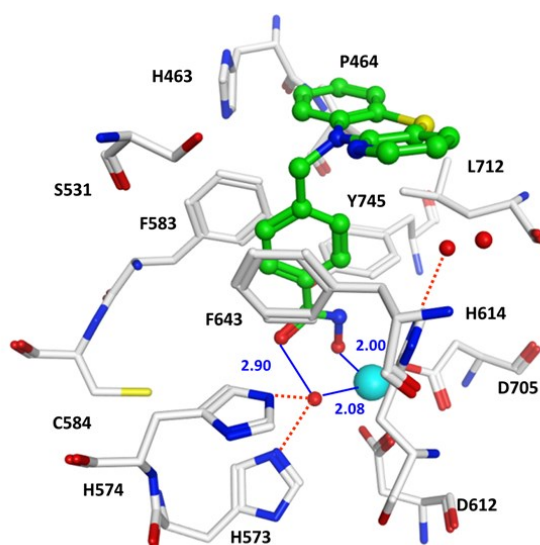


Abb. 95: Co-Kristallstruktur von zKDAC6 mit **248**. Das Zinkion ist als türkisfarbene Kugel dargestellt. Kleinere rote Kugeln kennzeichnen Wassermoleküle. Die gestrichelten roten Linien zeigen Wasserstoffbrückenbindungen. Die blauen Linien geben die Abstände in Å an.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung neuer, selektiver Inhibitoren von Lysin-Deacetylasen (KDACs). Diese Enzymfamilie ist ein wichtiger Regulator bei posttranslationalen Modifikationen diverser Proteine. Die Steuerung vieler zellulärer Prozesse macht diese Enzymfamilie zu einem wichtigen therapeutischen Target. Derzeit sind viele der klinisch relevanten KDAC-Inhibitoren jedoch nicht selektiv für einzelne Isoformen und zeigen dosisabhängige unerwünschte Nebenwirkungen. Selektive Inhibitoren könnten zum einen durch geringere Nebenwirkungen besser verträgliche Therapeutika liefern und zum anderen als molekulare Werkzeuge zur Untersuchung der Funktionen der einzelnen Isoformen neue Therapiemöglichkeiten eröffnen.

Die KDAC6 ist aufgrund ihrer vielfältigen physiologischen Funktionen als Isoform einzigartig. Folglich ist eine Dysfunktion der KDAC6 mit einer Vielzahl von Erkrankungen, darunter verschiedenen Arten von Krebs, neurodegenerativen sowie autoimmunologischen Erkrankungen assoziiert. Trotz des gesteigerten Verständnisses für die spezifischen Funktionen der KDAC6 war ein struktur-basiertes Wirkstoffdesign aufgrund der fehlenden Kristallstruktur der katalytischen Domänen bis Mitte des Jahres 2016 nur begrenzt möglich.

So war neben der Synthese von neuen Wirkstoffkandidaten ein weiteres Ziel die Entwicklung von selektiven KDAC6-Inhibitoren zur Weiterentwicklung des strukturellen Verständnisses dieser Isoform.

Das Enzym KDAC6 besitzt, wie alle anderen klassischen KDACs auch, ein essenzielles Zinkion im aktiven Zentrum. Ein generell anerkanntes Pharmakophormodell der KDAC-Inhibitoren ist in Abb. 96 (A) dargestellt.

Ausgangspunkt für die vorliegende Arbeit war der von Butler *et al.*^[117] kurz vor Beginn des Projekts publizierte KDAC6-selektive Inhibitor Tubastatin A (**14**) (Abb. 96, B), sowie Arbeiten zu anderen Inhibitoren dieser Isoform mit kürzerer Linkereinheit. Verbindungen dieses Typs zeigen mitunter auch Aktivität an KDAC8. Ausgehend von dem Phenothiazin-basierten potenten und selektiven Inhibitor **20**, der als Strukturanalogon von Tubastatin A (**14**) zu einem sehr frühen Zeitpunkt dieses Projekts hergestellt wurde, erfolgten systematische Modifikationen der Zink-bindenden Gruppe, des Linkers und der Cap-Gruppe, um daraus umfassende Struktur-Aktivitäts-Beziehungen ableiten zu können und somit noch selektivere und/oder potentere Inhibitoren zu erhalten (Abb. 96, C)

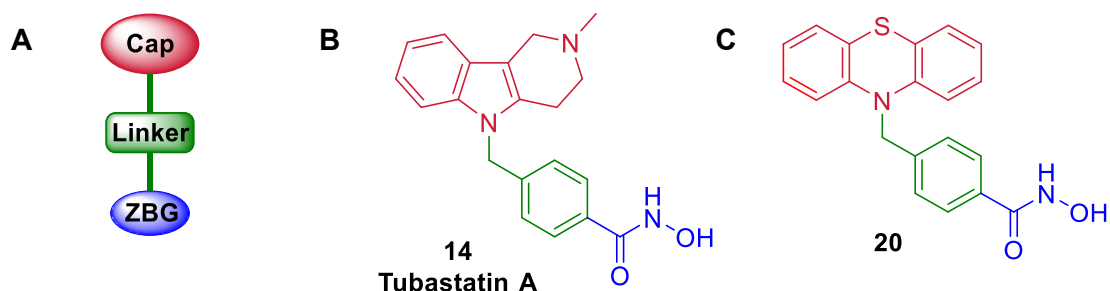


Abb. 96: **A)** Allgemeiner Aufbau von Inhibitoren Zink-abhängiger KDACs: Die Cap-Gruppe interagiert mit der Randregion des katalytischen Zentrums, diese ist mit einem Linker geeigneter Länge mit der Zink-bindenden Gruppe (ZBG) verknüpft. Durch geeignete Kombination dieser drei Strukturelemente lassen sich Subtypenselektivität und Aktivität steuern. **B)** Leitstruktur Tubastatin A (**14**), publiziert im Jahr 2010. **C)** Selbst entwickelte Phenothiazin-basierte Leitstruktur **20** als Ausgangspunkt für weitere Struktur-Aktivitäts-Untersuchungen.

5.1 SYNTHESE VON VERBINDUNGEN MIT DIVERSEN POTENZIELL ZINK-BINDENDEN GRUPPEN

5.1.1 SYNTHESE VON VERBINDUNGEN MIT HYDROXAMSÄURE-FUNKTION

Die Zink-bindende Gruppe ist für die KDAC-inhibitorische Aktivität der Verbindungen maßgeblich. Die Hydroxamsäure stellt hierbei die charakteristische Zink-bindende Gruppe bei den literaturbekannten KDAC-Inhibitoren dar und wurde auch bei der Mehrzahl der Verbindungen dieser Arbeit verwendet. Aufgrund der labilen und polaren Eigenschaften der Hydroxamsäure wurde diese immer erst am Ende der jeweiligen Synthesesequenz eingeführt. Nach einer Reihe von Versuchen erwiesen sich zwei Methoden zur Synthese der Hydroxamsäuren als zielführend (Abb. 97).

Bei einem Teil der Zielstrukturen wurde ausgehend von der Carbonsäure zuerst mit *O*-(Tetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)hydroxylamin die THP-geschützte Hydroxamsäure hergestellt und anschließend daraus die freie Hydroxamsäure durch Abspaltung der Schutzgruppe erhalten. Zur Aktivierung der Carbonsäuren wurden zwei unterschiedliche Peptidkupplungsreagenzien verwendet. Dabei erwies sich COMU, ein neuerer Vertreter aus der Gruppe der Uronium-Salze, hinsichtlich der Entfernung von Synthesebegleitprodukten und möglichen Synthesenebenprodukten als vorteilhaft gegenüber der Kombination aus HOBt und Carbodiimid. Die Maskierung der polaren Hydroxamsäure-Funktion mit dem THP-Rest ermöglichte eine leichtere Aufreinigung mittels Säulenchromatographie und anschließend die schonende und saubere Entschützung. Das Gros der Zielstrukturen konnte aber durch direkte Umsetzung der Carbonsäure mit Hydroxylaminhydrochlorid nach Aktivierung mit dem Kupplungsreagenz COMU dargestellt werden.

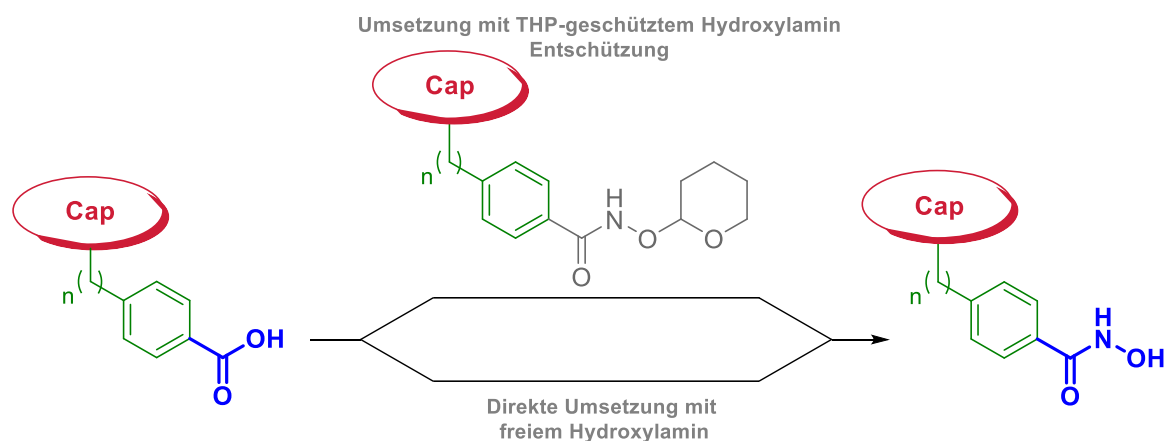


Abb. 97: Entwickelte Methoden zu den Zielstrukturen – Hydroxamsäuresynthese mit THP-geschütztem Hydroxylamin und mit freiem Hydroxylamin.

5.1.2 SYNTHESE VON STRUKTURANALOGA MIT DIVERSEN POTENZIELL ZINK-BINDENDEN GRUPPEN

Bisher stellen Verbindungen mit Hydroxamsäure-Funktion als Zink-bindende Gruppe die wirksamsten KDAC-Inhibitoren dar. Jedoch geben die geringe metabolische Stabilität, die schlechten pharmakokinetischen Eigenschaften und die Toxizität^[99] vermehrt Anlass, nach Alternativen zu dieser Gruppe zu suchen. Nicht zuletzt könnten andere Zink-bindende Gruppen in der Lage sein, strukturelle Unterschiede in den aktiven Zentren der einzelnen Isoformen besser auszunutzen und somit Einfluss auf die Selektivität zu nehmen.

Ausgehend von der Leitstruktur **20** mit den Elementen Phenothiazin-Cap und Benzyl-Linker wurde die Zink-bindende Gruppe modifiziert (Abb. 98). Die Syntheserouten zur Einführung von potenziell Zink-bindenden Gruppen wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit sowie in der Masterarbeit von Martin Morgenstern^[128] unter meiner Betreuung verfolgt. Die synthetisierten Verbindungen aus der Masterarbeit sind entsprechend gekennzeichnet (*), ebenso die Verbindungen, die im Verlauf beider Arbeiten (*) synthetisiert wurden.

Zur Darstellung der Strukturanaloga mit alternativ Zink-bindenden Gruppen wurden mittels N-Alkylierung von 10*H*-Phenothiazin (**23**) Benzyl-Linker mit vier unterschiedlichen Resten **R** in *para*-Position eingeführt. Aus diesen N-alkylierten Verbindungen (**24**, **25***, **26***, und **27***) wurden dann in verschiedenen Syntheserouten *N*-Benzylphenothiazine mit literaturbekannten, aber auch selbst entworfenen Zink-bindenden Gruppen aufgebaut.

Der Phosphonsäurediethylester **24** wurde durch partielle alkalische Hydrolyse zum Phosphonsäuremonoethylester **53** funktionalisiert.

Ausgehend vom 4-Brombenzyl-Derivat **25*** wurde mittels Stille-Kupplung ein methylysubstituierter Isoxazolring (**29***) eingeführt, welcher durch katalytische Hydrierung zum (Z)-Enaminoketon **30*** geöffnet werden konnte.

Aus der 4-Cyanobenzyl-Verbindung **26^(*)** konnte durch Umsetzung mit Hydroxylaminhydrochlorid das Analogon **31*** mit (Z)-Amidoxim-Funktion erhalten werden. Die 4-Cyanobenzyl-Verbindung **26^(*)** konnte zudem mit Natriumborhydrid und Cobalt(II)-chlorid zum primären Amin reduziert und mit Chlorameisensäureethylester bzw. Ethylisothiocyanat zum einen in das Carbamat **33** und zum anderen in den Thioharnstoff **34** überführt werden.

Ausgehend vom Ester **27^(*)** konnte mit dem Ruppert-Prakash-Reagenz das Trifluormethylketon **35*** als neues Analogon synthetisiert werden, welches durch Kondensation mit Hydroxylaminhydrochlorid in das (E)-Trifluormethyloxim **36*** überführt wurde. Die angestrebte Reduktion zum Trifluorethylhydroxylamin **37*** als Bioisoster der Hydroxamsäure-Gruppe gelang trotz zahlreicher Versuche nicht. Nach Hydrolyse des Esters **27^(*)** zur Carbonsäure **38^(*)** konnten außerdem in Folgereaktionen mit unterschiedlichen Aminen die Zielverbindungen **39***, **40** und **41***, sowie die Boc-geschützte Zwischenstufe **42^(*)** dargestellt werden. Durch Thionierung mit Lawessons Reagenz wurde aus dem Boc-geschützten Hydrazid **42^(*)** das entsprechende Thioanalogon **43*** hergestellt. Die saure Abspaltung der Boc-Schutzgruppe von **42^(*)** und **43*** führte zum Hydrazid **45** respektive Thiohydrazid **44***. Das Hydrazid **45** ließ sich ferner durch reduktive N-Alkylierung mit *n*-Butanal und Natriumcyanoborhydrid zum *N*-Butylhydrazid **46** funktionalisieren.

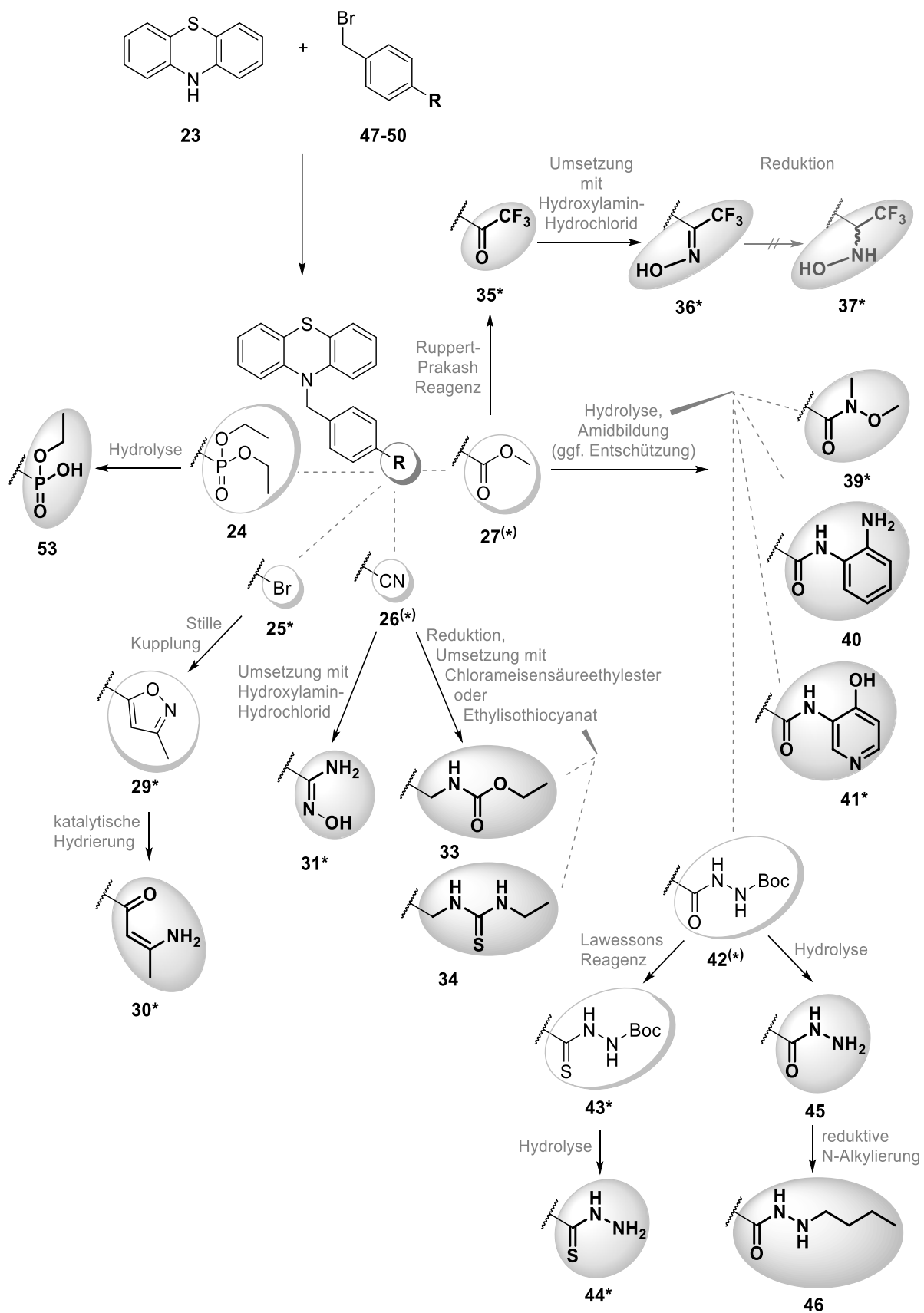


Abb. 98: Synthesen von Strukturanaloga mit alternativen Zink-bindenden Gruppen.

5.2 SYNTHESE VON STRUKTURANALOGA MIT MODIFIZIERTEM LINKER

Zur Evaluierung des Linkers in der Leitstruktur **20** wurden homologe Strukturanaloga hergestellt, um die Auswirkung der Linkerlänge auf die Isotypenselektivität aufzuzeigen (Abb. 99). Die Einführung eines kürzeren Linker-Bausteins gelang durch N-Arylierung von 10*H*-Phenothiazin (**23**) mit 4-Fluorbenzonitril **59**, gefolgt von Nitrilhydrolyse und anschließender Synthese der Hydroxamsäure **63** nach der etablierten Methode. Zur Darstellung eines Analogons mit einem um eine CH₂-Einheit verlängerten Linker wurde eine neue Synthesestrategie für die Phenylethylierung entwickelt. Ausgehend von **23** wurde unter sauren reduktiven Bedingungen mittels Trifluoressigsäure/Triethylsilan und einem entsprechend funktionalisierten Enoetherbaustein **67** der Ester **68** dargestellt. Dieser ließ sich nach bewährter Methode in die Hydroxamsäure **70** überführen.

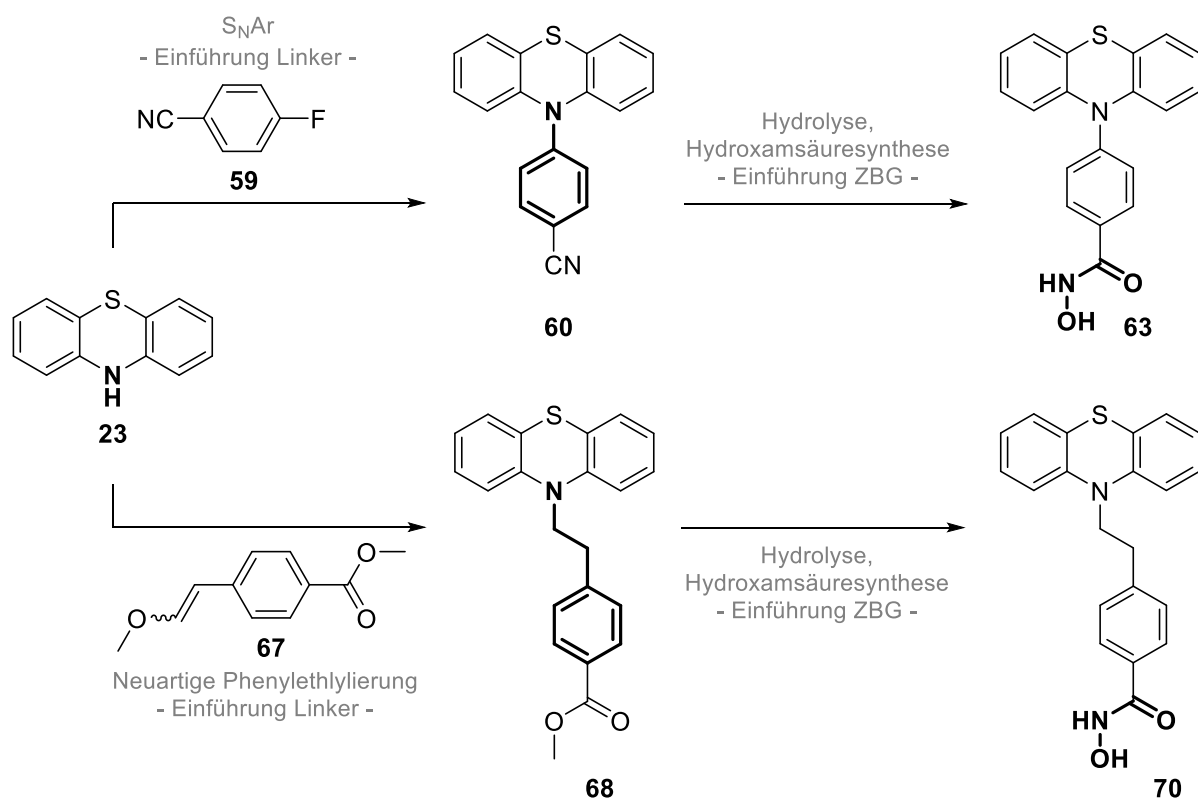


Abb. 99: Synthese von Strukturanaloga mit variierender Linkerlänge.

5.3 N-ARYLETHYLIERUNG VON AROMATISCHEN AMINEN UND N-HETEROCYCLEN MIT ENOLETHERN UNTER SAUREN REDUKTIVEN BEDINGUNGEN

Die erfolgreiche Arylethylierung zur Synthese der Zielverbindung **70** gab Anlass, die Möglichkeiten und Grenzen dieser neuen Methode zur reduktiven N-Arylethylierung von aromatischen Aminen und N-Heterocyclen mit Enolethern unter Verwendung von Triethylsilan/Trifluoressigsäure zu untersuchen (Abb. 100). Die milden Reaktionsbedingungen dieser Methode ermöglichten eine breite Anwendbarkeit verbunden mit einer hohen Kompatibilität mit diversen funktionellen Gruppen, wie etwa Halogen, Olefin, Estern oder Nitro-Gruppen (Tab. 15). Durch die Verwendung von (*E/Z*)-(2-Methoxyvinyl)benzol bzw. unterschiedlich funktionalisierten (*E/Z*)-Enolethern, die einfach über eine Wittig-Reaktion aus den entsprechenden (hetero)aromatischen Aldehyden dargestellt werden können, lassen sich diverse (Hetero)Arylethyl-Reste einführen. Diese (2-Methoxyvinyl)(hetero)arene weisen große Vorteile gegenüber bekannten Bausteinen zur Arylethylierung, wie z.B. (Hetero)arylethylhalogeniden, (Hetero)arylacetaldehydacetalen, (Hetero)arylacetylenen sowie Styrolen, auf (leicht zugänglich, stabil, mit kostengünstigen und ökologisch unbedenklichen Reagenzien einzuführen). Die dargestellte, inzwischen publizierte Methode konnte das Repertoire zur Herstellung von Arylethylaminen wesentlich erweitern^[210].

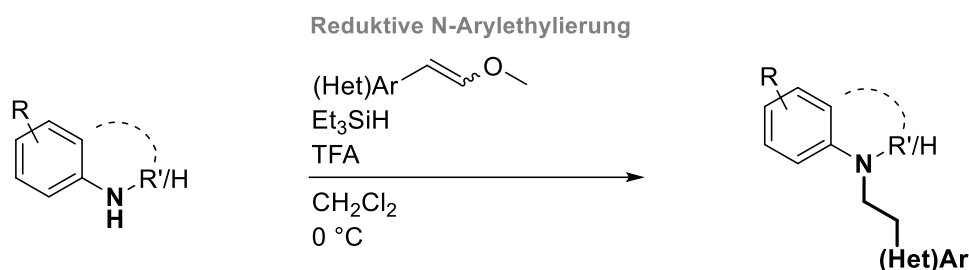
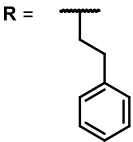
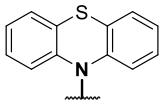
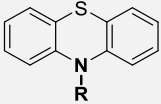
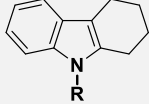
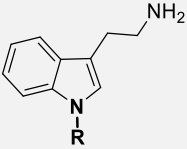
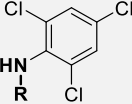
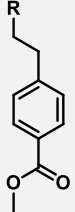
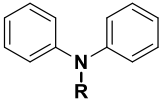
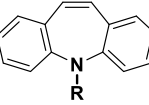
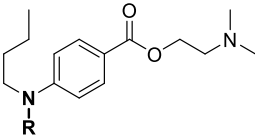
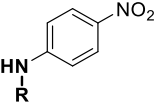
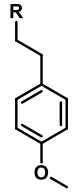
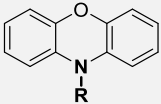
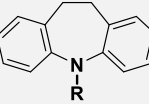
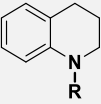
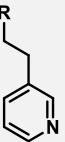
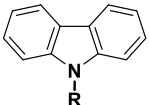
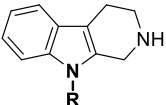
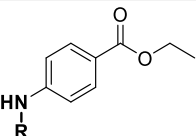
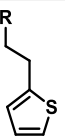


Abb. 100: N-Arylethylierung von aromatischen Aminen und N-Heterocyclen.

R = 				R = 
 65 (92 %)	 94 (48 %)	 98 (< 18 %)	 102 (52 %)	 68 (81 %)
 91 (70 %)	 95 (80 %)	 99 (85 %)	 103 (41 %)	 110 (68 %)
 92 (55 %)	 96 (75 %)	 100 (55 %)	—	 111 (72 %)
 93 (54 %)	 97 (20%)	 101 (48 %)	—	 112 (94 %)

Tab. 15: Anwendungsmöglichkeiten der Arylethylierung.

5.4 SYNTHESE VON VERBINDUNGEN MIT VERSCHIEDENEN CAP-GRUPPEN AUSGEHEND VON EINEM PHENYL-LINKERELEMENT

In einem anfänglichen Teilprojekt wurden, bevor dann sehr früh das Phenothiazin als hoch attraktive Cap-Gruppe entdeckt (und fokussiert weiterverfolgt) wurde, weitere heteroaromatische Systeme als Cap-Gruppen anvisiert, die mit einer kürzeren Linkereinheit verbunden werden sollten. In einer fünfstufigen Synthese gelang ein effektiver Zugang zu potenziellen KDAC-Inhibitoren mit variabler polycyclischer Cap-Gruppe in Kombination mit einem Phenyl-Linkerelement (Abb. 101). Ausgehend von in *ortho*-Position (hetero)aromatisch substituierten Anilinen **114**, **115** und **119** konnte der Linker durch Bildung einer Amidbindung in die Verbindungen integriert werden (**122-124**). In einer modifizierten Bischler-Napieralski Cyclodehydratisierungs-Reaktion^[211] mit Trifluormethansulfonsäureanhydrid und

2-Chlorpyridin wurden dann die tri-/tetracyclischen Cap-Gruppen (**125-127**) aufgebaut. Nach Hydrolyse der Esterfunktion wurden die Hydroxamsäuren über die THP-geschützten Intermediate hergestellt.

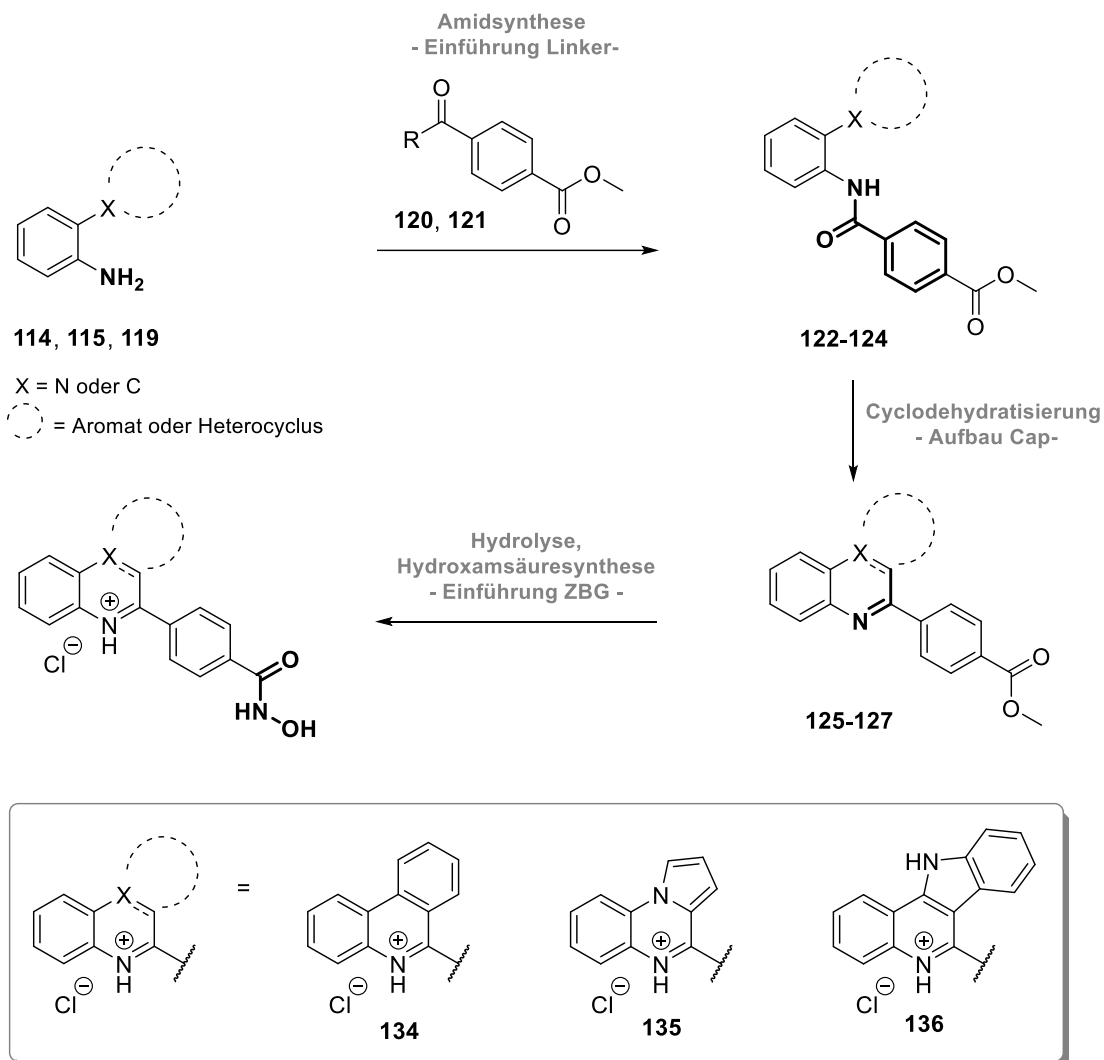


Abb. 101: Synthese der Hydroxamsäuren **134-136** mit verschiedenen heterocyclischen Cap-Gruppen und Phenyl-Linker.

5.5 SYNTHESE VON STRUKTURANALOGA DES TUBASTATIN A – HYDROXAMSÄUREN MIT BENZYL-LINKER KOMBINIERT MIT VERSCHIEDENEN CAP-GRUPPEN

5.5.1 SYNTHESE VON PHENOTHIAZINEN UND ANALOGA ALS CAP-GRUPPEN

Der Phenothiazin-Grundkörper der Leitstruktur **20** bot eine Reihe von Variationsmöglichkeiten an. Hierfür mussten zunächst modifizierte Bausteine hergestellt werden (Abb. 102).

Am Schwefel oxidierte Phenothiazine, das Sulfon **155** und Sulfoxid **156**, konnten durch Oxidation von 10*H*-Phenothiazin (**23**) gewonnen werden.

Als weitere Variationen wurden verschieden räumlich beanspruchende Reste an Position 1 und 2 des Phenothiazin-Ringsystems untersucht. An Position 2 substituierte Phenothiazine waren kostengünstig kommerziell verfügbar. Das an Position 1 chlorierte Phenothiazin **154** wurde ausgehend von 2-Aminothiophenol (**150**) und 1,2-Dichlor-3-nitrobenzol (**149**) mittels nucleophiler Substitution zu einem Diarylsulfid, gefolgt von Smiles-Umlagerung und Cyclisierung hergestellt.

Eine weitere Modifikation stellte die Einführung von Stickstoffatomen in die Phenothiazin-Grundstruktur dar. Basierend auf dem zwischenzeitlich erhaltenen, hervorragenden *in vitro*-Ergebnis des 1-Azaphenothiazins **248** wurde im Folgenden eine größere Anzahl Aza- und Diazaphenothiazine nach bzw. in Anlehnung an Literaturmethoden dargestellt.

Das 1-Azaphenothiazin (**159**) wurde in einem Schritt aus 2-Chlorpyridin (**157**) und 2-Aminothiophenol (**150**) Iod-katalysiert über eine postulierte Smiles-Umlagerung erhalten. Der Aufbau des 2-Azaphenothiazins (**164**) erfolgte ausgehend von 2-Bromothiophenol (**160**) und 4-Chlor-3-nitropyridin (**161**) unter nucleophiler aromatischer Substitution zum entsprechenden Disulfid, gefolgt von einer Reduktion der Nitro-Gruppe zum Amin und Cyclisierung durch eine Kupfer-katalysierte Ullmann-Reaktion.

Das 1,4-Diazaphenothiazin (**167**) wurde durch Chlorierung von 2-Chlorpyrazin (**165**) an Position 3 mittels Sulfurylchlorid und darauffolgender nucleophiler aromatischer Substitution durch 2-Aminothiophenol (**150**) hergestellt.

Mechanistisch ähnlich verlief der Ringschluss zum 1,2-Diazaphenothiazin (**172**). 3,4,6-Trichlorpyridazin (**168**) wurde mit 2-Aminothiophenol (**150**) zum entsprechenden Disulfid umgesetzt und im Sauren cyclisiert. Aus dem Intermediat 3-Chlor-1,2-diazaphenothiazin (**171**) wurde dann durch katalytische Hydrierung das 1,2-Diazaphenothiazin (**172**) generiert.

1,6- und 3,6-Diazaphenothiazin (**177** und **185**) wurden über die gleiche Syntheseroute in drei Schritten dargestellt. Nach Thionierung von 2-Chlor-3-aminopyridin (**173**) mit Natriumhydrogensulfid zum 3-Aminopyridin-2-thiol (**174**) und anschließender Umsetzung mit 2-Chlor-3-nitropyridin (**175**) respektive 4-Chlor-3-nitropyridin (**161**) zu den entsprechenden Dipyridylaminen wurde im Alkalischen zu **177** und **185** cyclisiert.

In einem One-Pot-Verfahren wurde 2,7-Diazaphenothiazin (**181**) aus 4-Chlor-3-nitropyridin (**161**) und Natriumsulfid erhalten.

In einer weiteren Modifikation wurde einer der Benzolringe des Phenothiazins durch einen Thiazolring ersetzt. Hierzu wurde das Benzothiazinon **186** mit Sulfurylchlorid an Position 2 chloriert und anschließend mit Thioacetamid (**188**) der Thiazolring in **189** aufgebaut.

Schließlich wurde ein charakteristisches Strukturelement des Tubastatin A (**14**) sowie seines noch potenteren und selektiveren Regioisomers **269**, ein N-methylierter Tetrahydropyridinring, in die Phenothiazin-Grundstruktur übernommen. Hierzu wurde von dem 2-Azaphenothiazin **206** ausgegangen, das bereits am Thiazin-Stickstoff den Linker trägt. Die Umsetzung mit Methyljodid zur quartären Pyridiniumverbindung und anschließende Reduktion mit Natriumborhydrid lieferte das partiell hydrierte Intermediat **264**.

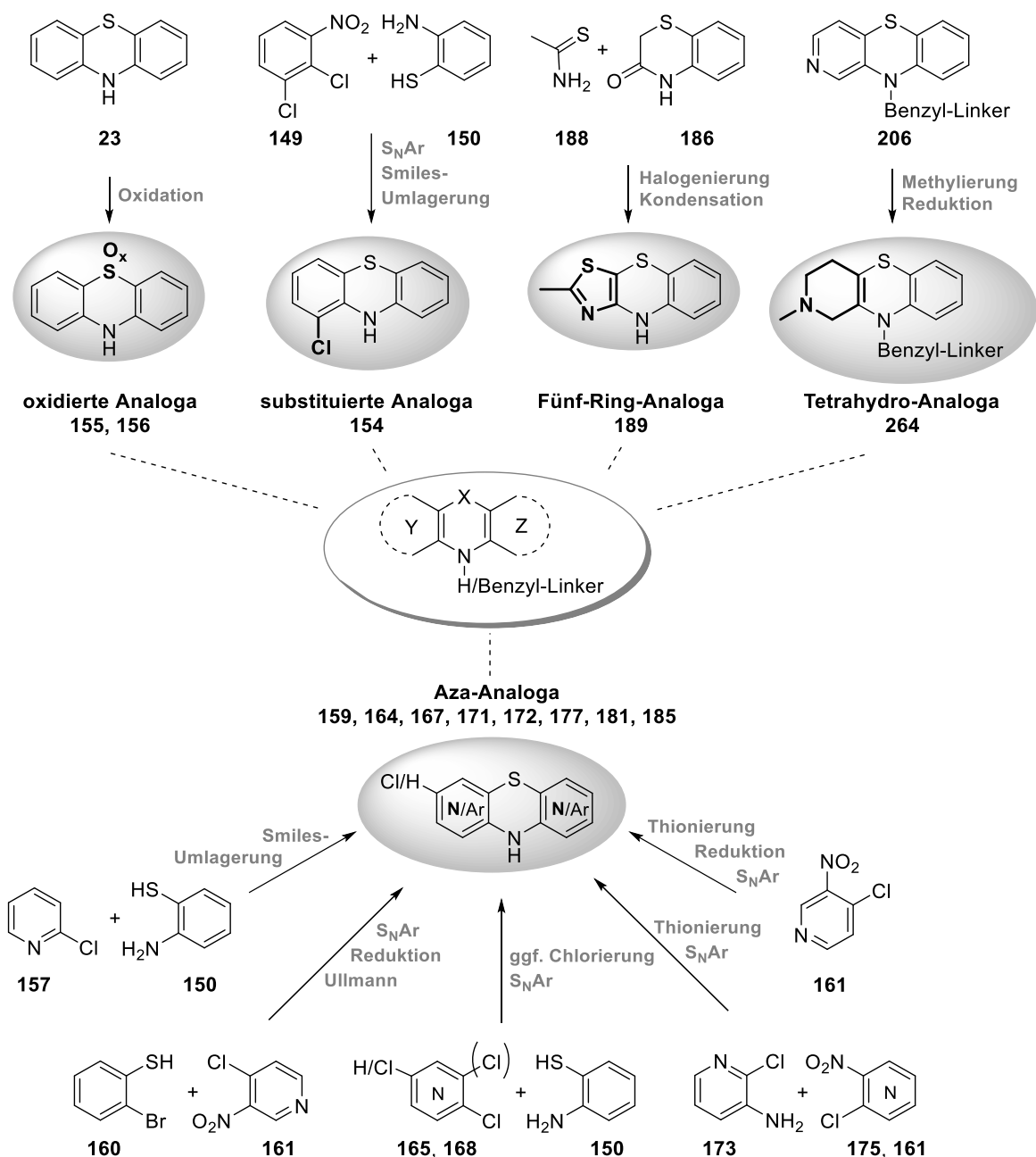


Abb. 102: Synthesen von diversen von Phenothiazin abgeleiteten Cap-Gruppen.

5.5.2 SYNTHESE VON BENZYLHYDROXAMSÄUREN MIT PHENOTHIAZINEN, PHENOTHIAZIN-ANALOGA UND STRUKTURVERWANDTEN VERBINDUNGEN ALS CAP-GRUPPEN

Ausgehend von den diversen Cap-Gruppen ((un-)substituierte Phenothiazine, Phenothiazin-Analoga und strukturell ähnliche Tricyclen) wurden in einer kurzen Syntheseroute zahlreiche neue Zielverbindungen als Strukturanaloga des Tubastatin A (**14**) beziehungsweise der im Rahmen dieser Arbeit entwickelten Leitstruktur **20** dargestellt (Abb. 103). Basierend auf den Erkenntnissen der Strukturanaloga mit modifizierter Linkereinheit und der diversen potenziell

Zink-bindenden Gruppen wurde der Benzylhydroxamsäure-Teil (Linker-ZBG) als typisches Strukturelement beibehalten. In einer N-Alkylierung mit 4-(Brommethyl)benzoesäuremethylester (**50**) wurden die verschiedenen Cap-Gruppen mit der Benzyl-Linker-Einheit substituiert. Nach Hydrolyse der Esterfunktion der Intermediate **27**, **196-213** zu den Carbonsäuren **38**, **214-231** erfolgte die Synthese der Hydroxamsäuren **20**, **239-256** wie zuvor beschrieben durch direkte Umsetzung der aktivierten Carbonsäure mit Hydroxylaminhydrochlorid oder über das THP-geschützte Intermediat mit anschließender Abspaltung der Schutzgruppe.

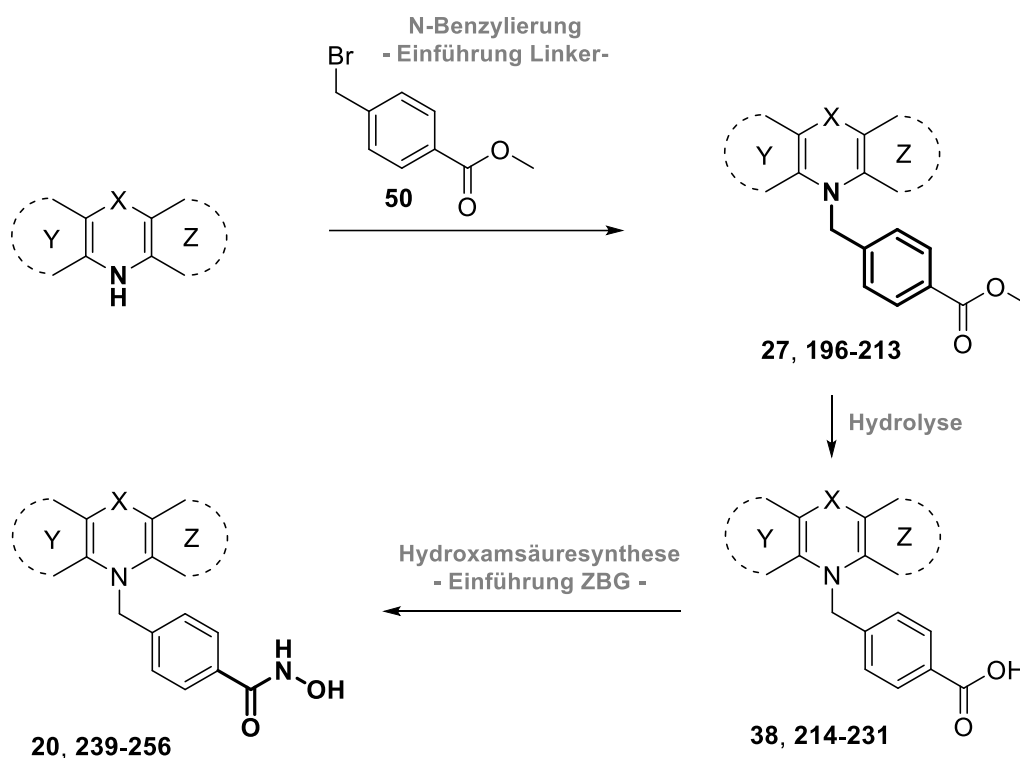
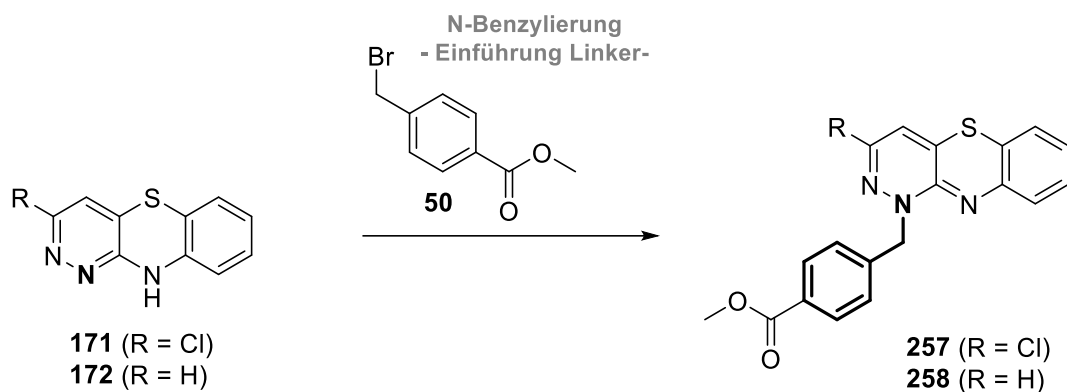


Abb. 103: Allgemeine Syntheseroute zu Benzylhydroxamsäuren mit diversen Cap-Gruppen.

Die Strukturisomere **257** und **258** fielen als Nebenprodukte bei der N-Alkylierung der Diazaphenothiazine **171** und **172** an (Abb. 104). Die erfolgte Alkylierung am Diazin-Stickstoff (*N*-2) neben der gewünschten Position am Thiazin-Stickstoff konnte mit Hilfe von 2D-NMR-Spektren und 1D-NOESY-Experimenten belegt werden. Diese Verbindungen mit strukturell andersartiger Verknüpfung zwischen Cap und Linker wurden ebenfalls in die dazugehörigen Hydroxamsäuren überführt.

Abb. 104: Entstehung von strukturisomeren Verbindungen **257** und **258**.

5.6 BIOLOGISCHE AKTIVITÄT AN LYSIN-DEACETYLASEN

5.6.1 *IN VITRO*-AKTIVITÄT

Im Lysin-Deacetylase Assay zeigte die Phenothiazin-basierte Verbindung **20** eine ausgesprochen gute Inhibition der KDAC6 (IC_{50} = 22 nM) bei hoher Selektivität (231fach) gegenüber KDAC1. Diese Verbindung übertraf damit sogar in diesem Testsystem die ursprüngliche Leitstruktur Tubastatin A (**14**) (IC_{50} = 30 nM, 64fach Selektivität) und bildete somit die Basis für fast alle folgenden Arbeiten. Beide Verbindungen zeigten aber keine besonders hohe Selektivität gegenüber KDAC8 (67fach **20** vs. 23fach **14**).

Die Bedeutung der Hydroxamsäure-Gruppe in der Leitstruktur **20** sollte analysiert werden, indem Analoga mit anderen (literaturbekannten und selbst entworfenen) Zink-bindenden Gruppen synthetisiert wurden. Keine dieser Verbindungen zeigte eine annähernd starke KDAC6-Inhibition wie die Leitstruktur **20**. Die besten Aktivitäten aus der Reihe der alternativen Zink-bindenden Gruppen erzielten noch der Phosphonsäuremonotheylester **53** und das Hydrazid **45** mit IC_{50} -Werten an KDAC6 im niedrigen mikromolaren Bereich. Die Idee, ausgehend von einer Selektivität vermittelnden Cap-Gruppe in Kombination mit einer passenden Linker-Einheit neue Zink-bindende Gruppen zu etablieren, konnte keine gleichwertige Alternative für die umstrittene Hydroxamsäure-Funktion aufzeigen.

Die Ergebnisse der Variationen der Linker-Einheit stellen die Bedeutung des Benzyl-Linkers in der Leitstruktur **20** heraus. Eine Veränderung der Linkerlänge hatte sowohl Auswirkung auf die Aktivität als auch Selektivität. Dabei wurde die Verlängerung um eine CH_2 -Einheit, mit einem Phenylethyl-Linker bei Verbindung **70**, eher toleriert. Die resultierende Aktivität lag noch im submikromolaren Bereich, bei jedoch geringerer Selektivität gegenüber KDAC1. Die Verkürzung der Linkerlänge um eine CH_2 -Einheit führte dagegen in Verbindung **63** zu einem starken Aktivitätsverlust bei fast vollständigem Verlust der Selektivität.

Ein ähnlicher Effekt war bei den Verbindungen mit Phenyl-Linker und strukturell völlig anderen tri- und tetracyclischen Cap-Gruppen zu beobachten. Diese Verbindungen zeigten submikromolare Aktivität an KDAC6 und keine nennenswerte Selektivität gegenüber KDAC1. Eine etwaige Aktivität der Verbindungen dieses Strukturtyps an der Isoform KDAC8 wurde exemplarisch an Verbindung **134** getestet. Hier konnte zwar gegenüber KDAC6 eine gesteigerte Aktivität erzielt werden, jedoch war diese nicht in der Größenordnung bekannter potenter KDAC8-Inhibitoren. Der Ansatz, eine kurze Linkereinheit mit unterschiedlich anellierten Polycyclen zu verbinden, der zu einem frühen Zeitpunkt der Arbeit verfolgt wurde, erschien daher nicht lohnenswert und wurde insbesondere wegen der sehr guten Ergebnisse der Phenothiazin-basierten Leitstruktur **20** nicht weiterbearbeitet.

Die Reihe von Verbindungen mit Modifikation der Cap-Gruppe ausgehend von Leitstruktur **20** zeigte gute Aktivitäten im niedrigen nanomolaren Bereich ($IC_{50} < 77$ nM) an KDAC6. Substitutionen in Position 1 und 2 am Phenothiazinring führten zu den Verbindungen **241-245** mit vergleichbarer inhibitorischer Aktivität ($IC_{50} < 31$ nM) und ähnlichem Selektivitätsprofil. Ein ähnliches Ergebnis zeigte eine der beiden oxidierten Formen des Phenothiazin-Ringsystems, das Sulfon **246**, während das Sulfoxid **247** leicht an Aktivität und Selektivität abnahm. Die Cap-Gruppen des Thiazol- sowie des Tetrahydropyridin-Strukturanalogs (**256** und **266**) hatten keinen Einfluss auf die Aktivität, jedoch einen negativen Effekt auf die Selektivität. Die „Hybridisierung“ mit dem charakteristischen Tetrahydropyridin-Strukturmerkmal des Tubastatin A in Verbindung **266** resultierte insgesamt in der unselektivsten Verbindung unter den Variationen der Cap-Gruppe. Durch die Einführung von ein oder zwei Stickstoffatomen in das Phenothiazin-Grundgerüst konnte die Aktivität bei allen Azaphenothiazin-Strukturanaloga (**248-255**) leicht gesteigert werden, wobei sich dagegen ein eher uneinheitliches Selektivitätsprofil unter diesen Strukturanaloga zeigte. Ungünstig auf die Selektivität wirkte sich auch die andersartige Verknüpfung zwischen Cap und Linker bei den Strukturisomeren **261** und **262** aus.

Insgesamt konnte die Aktivität der Verbindungen gegenüber der Leitstruktur **20** durch die Modifikationen am Phenothiazin-Grundgerüst überwiegend gesteigert bzw. vergleichbar gute Aktivitäten erzielt werden. Dabei hatte eine Reihe von Verbindungen eine 200-300fache Selektivität gegenüber KDAC1. Das beste Ergebnis konnte bei Verbindung **248** mit einem IC_{50} -Wert von 5 nM an KDAC6 und einer über 500fachen Selektivität gegenüber KDAC1 sowie einer über 600fachen Selektivität gegenüber KDAC8 erreicht werden.

5.6.2 ZELLULÄRE AKTIVITÄT

Die beiden Verbindungen **248** und **255** mit hervorragender Aktivität sowie Selektivität im enzymatischen Lysin-Deacetylase Assay wurden für die weitere zelluläre Untersuchung ausgewählt. An der humanen Leukämiezelllinie HL60 wurde der Einfluss dieser beiden Verbindungen auf die Acetylierungslevel von α -Tubulin und von Histon H3 bestimmt. Hier konnte eine klare konzentrationsabhängige Hyperacetylierung von α -Tubulin festgestellt werden, wohingegen die Acetylierung von Histon H3 im direkten Vergleich zu dem unselektiven pan-Inhibitor SAHA (**2**) nur geringfügig beeinflusst wurde. Somit konnte die *in vitro* gezeigte Selektivität der Substanzen auch auf zellulärer Ebene bestätigt werden.

5.6.3 DOCKINGSTUDIEN UND CO-KRISTALLISATIONSTUDIEN

Infolge der Aufklärung der Kristallstruktur beider katalytischer Domänen der KDAC6^[32, 37] im Jahr 2016 konnten durch Dockingstudien die Struktur-Aktivitäts-Beziehungen auf molekularer Ebene erläutert und die Interaktionen der Elemente Cap-Linker-ZBG näher beleuchtet werden. Abschließend konnte sogar die aktivste und selektivste Verbindung dieser Arbeit, die Hydroxamsäure **248**, mit KDAC6 aus *Danio rerio* (zKDAC6) co-kristallisiert werden. Anhand der Kristallstruktur konnten konkrete Aussagen zum Bindungsmodus dieses Phenothiazin-basierten Benzylhydroxamsäure Strukturtyps getroffen werden. Durch die sterisch anspruchsvolle Cap-Gruppe liegt Verbindung **248** so im katalytischen Kanal von zKDAC6, dass die Hydroxamsäure nur über die OH-Funktion an das Zinkion koordiniert, während die Carbonyl-Funktion eine Wasserstoffbrückenbindung zu einem Zinkion-gebundenen Wassermolekül ausbildet. Die Bindung wird zudem durch die Interaktionen der NH- und OH-Gruppe sowie der Carbonyl-Gruppe der Hydroxamsäure zur nahegelegenen Aminosäure Tyrosin verstärkt. Aromatische Seitenketten des Bindungskanals interagieren mit dem aromatischen Benzyl-Linker. Die 1-Azaphenothiazin Cap-Gruppe ist leicht gewinkelt, so dass das tertiäre Amin des Thiazinrings mit C-N-C Bindungswinkeln von 115° leicht pyramidal angeordnet ist. Diese Anordnung der Cap-Gruppe ermöglicht die Nähe zur Enzymoberfläche und die Ausbildung von van-der-Waals-Wechselwirkungen, was offensichtlich ausschlaggebend für die hohe Selektivität ist.

Zusammenfassend ist es gelungen, mit der 1-Azaphenothiazin-basierten Hydroxamsäure **248** einen hochpotenten und hochselektiven KDAC6-Inhibitor zu entwickeln und auf dem Weg dorthin auch die Struktur-Aktivitäts-Beziehungen in dieser Stoffklasse umfassend zu analysieren.

6 EXPERIMENTELLER TEIL

6.1 ALLGEMEINE ANGABEN

6.1.1 GERÄTE

Schmelzpunktbestimmung:	Büchi Schmelzpunktapparatur B-540 (Fa. Büchi)
NMR-Spektrometer:	Avance III HD 400 MHz Bruker BioSpin (400 MHz) oder Avance III HD 500 MHz Bruker BioSpin (500 MHz) mit CryoProbe™ Prodigy (beide Fa. Bruker) Jeol JNMR-GSX 400 (400 MHz) oder Jeol JNMR-GSX 500 (500 MHz) (beide Fa. Jeol)
IR-Spektrometer:	Perkin Elmer FT-IR Paragon 1000 (Fa. Perkin Elmer) oder Jasco FT/IR-410 (Fa. Jasco Inc.)
Massenspektrometer (EI):	Thermo Finnigan MAT 95 oder Thermo Q Exactive GC Orbitrap (beide Fa. Thermo Fisher Scientific)
Massenspektrometer (ESI):	Thermo Finnigan LTQ FT (Fa. Thermo Fisher Scientific)
Hochleistungsflüssigkeits - chromatographie	HP Agilent 1100 HPLC (Fa. Agilent Technologies)
Mikrowellen-Synthese:	Discover (S-Class Plus) SP (Fa. CEM)

6.1.2 GERÄTEPARAMETER UND METHODEN

Schmelzpunkt

Die Schmelzpunkte sind in Grad Celsius [°C] angegeben und nicht korrigiert.

NMR-Spektroskopie

Die bei den NMR-Daten in parts per million [ppm] angegebenen chemischen Verschiebungen δ beziehen sich auf die δ -Skala. Hierzu wurde auf das jeweils verwendete Lösungsmittel kalibriert. Die Kopplungskonstanten J werden in Hertz [Hz] angegeben. Als Lösungsmittel wurde deuteriertes Dichlormethan, deuteriertes Dimethylsulfoxid und deuteriertes Pyridin verwendet.

IR-Spektren

Feststoffe wurden als KBr-Presslinge, ölige oder zähflüssige Substanzen als Film zwischen zwei Natriumchlorid-Platten (direkt aufgetragen oder in Chloroform gelöst) vermessen.

Massenspektren

Die Massenspektren wurden durch Elektronenstoß Ionisation (EI) oder mittels Elektronenspray Ionisation (ESI) bestimmt.

Elektronenstoß Ionisation (EI) wurde bei einer Quelltemperatur von 250 °C und einer Elektronenenergie von 70 eV durchgeführt.

Direktverdampfungsproben (DEP/EI) wurden auf einem Platinfaden von 20 bis 1600 °C mit einer Rate von 120 Grad/min geheizt.

Die gekoppelte Gaschromatographie (GC/EI) wurde an einem Thermo Trace 1300 mit temperaturprogrammierbarem Injektor (Q Exactive GC) oder Varian 3400 mit split-splitlos Injektor (MAT 95) durchgeführt. Als Kapillartrennsäulen wurden 5 %-Phenyl-95 %-Methyl-Silphenylenphasen mit 0.25 mm Innendurchmesser, 0.25 µm Filmdicke und 30 m Länge (Fa. Macherey-Nagel) eingesetzt. Als Trägergas wurde Helium (Flussrate 1 mL/min) verwendet. Die Temperatur der Kopplung zum Massenspektrometer betrug 250 °C, der Injektor wurde von 50 °C (1 min isotherm) mit einer Rate von 5 °C/sec bis 250 °C (3 min isotherm) hochgeheizt (Q Exactive GC) oder hatte 250 °C (MAT 95). Der Säulenofen wurde von 50 °C (1 min isotherm) bis 300 °C (4 min isotherm) mit einer Rate von 25 °C/min oder 10 °C/min geheizt. Je 0.1-1.0 µL Probenlösung wurden mit einem Split von 1:10 oder 1:100 injiziert. Die Auflösung war auf 1000 und bei HRMS auf 5000 (MAT95) oder 50 000 (bei m/z 200, Q Exactive GC) eingestellt.

Elektrospray Ionisation (ESI) Messungen wurden an einer IonMax Ionenquelle mit ESI-Kopf durchgeführt. Die Spraykapillarenspannung betrug 4 kV, die Heizerkapillarentemperatur 250 °C und der Stickstoff Sheathgasfluss 20, der Sweepgasfluss 5 Einheiten. Die Auflösung wurde auf 100 000 bei m/z 400 eingestellt.

Flüssiginjektions Analyse ESI wurde mit einer Surveyor MS Pumpe bei einer Flussrate von 100 µL/min mit 20/80 oder 80/20 Wasser/Acetonitril als Laufmittel durchgeführt. Je 1.0-10 µL wurden unter Verwendung von Inlinefiltern injiziert.

HPLC (Reinheitsbestimmung)

Die Detektion erfolgte bei zwei Wellenlängen (210 nm und 254 nm) mit einem G1315A Dioden Array Detektor. Gemäß der verwendeten HPLC-Methode (Tab. 16) wurde ein Volumen von je 5.0 oder 10 µL einer Probelösung von 100 µg/mL injiziert. Das verwendete Probelösungsmittel ist bei den einzelnen Substanzbeschreibungen aufgeführt. Die Ofentemperatur des G1316A ColComp betrug 22 °C, 35 °C oder 50 °C. Mit einem G1311A QuatPump Pumpensystem wurden Fließgeschwindigkeiten von 0.5 mL/min, 0.8 mL/min, 1.0 mL/min oder 1.2 mL/min

erzeugt. Verschiedene Eluenten wurden als mobile Phase verwendet. Diese bestanden entweder aus 100 % organischem Lösungsmittel oder aus Mischungen von 60 – 90 % organischem Lösungsmittel und entsprechen 30 – 10 % Wasser bzw. Pufferlösung. Dem wässrigen Anteil wurde mitunter 2 % THF oder 2 % Ameisensäure zugesetzt. Folgende Säulen wurden verwendet:

Agilent Poroshell 120 Å, EC-C18 2.7 µm, 3.0 x 100 mm (1)

Synergie™, 4 µm, Hydri-RP 80 Å, 250 x 4.6 mm, Ea (2)

Gemini®, 5 µm, C18 110 Å, 2.0 x 150 mm, Ea (3)

Methode	Säule	Fließ- geschw. [mL/min]	Eluent	Säulen- temp. [°C]	Injektions- vol. [µL]
Ia	1	1.0	MeCN/H ₂ O mit 2 % THF (85:15)	50	10
Ib	1	1.0	MeCN/H ₂ O mit 2 % THF (80:20)	50	10
Ic	1	0.5	MeCN/H ₂ O mit 2 % THF (80:20)	50	10
Id	1	1.0	MeCN/H ₂ O mit 2 % THF (75:25)	50	10
Ie	1	1.0	MeCN/H ₂ O mit 2 % THF (70:30)	50	10
If	1	1.0	MeCN/H ₂ O mit 2 % THF (65:35)	50	10
Ig	1	1.0	MeCN/H ₂ O mit 2 % THF (60:40)	50	10
II	1	1.2	MeCN/H ₂ O mit 2 % THF (75:25)	50	10
IIIa	1	1.0	MeCN/H ₂ O mit 2 % CH ₂ O ₂ (80:20)	50	10
IIIb	2	2.0	MeCN/H ₂ O mit 2 % CH ₂ O ₂ (80:20)	50	10
IIIc	1	1.0	MeCN/H ₂ O mit 2 % CH ₂ O ₂ (70:30)	50	5.0
IIId	3	0.8	MeCN/H ₂ O mit 2 % CH ₂ O ₂ (70:30)	50	10
IV	1	1.0	MeCN/H ₂ O (85:15)	50	10

V	2	1.0	MeCN/H ₂ O (65:35)	22	10
VI	1	0.5	MeCN/0.1 TEAA Buffer (80:20)	50	10
VII	1	1.0	MeCN	50	10
VIII	1	1.0	MeOH/H ₂ O mit 2 % CH ₂ O ₂ (85:15)	50	10
IXa	1	1.0	MeOH/H ₂ O mit 2 % CH ₂ O ₂ (80:20)	50	5.0
IXb	1	1.0	MeOH/H ₂ O mit 2 % CH ₂ O ₂ (80:20)	35	10
X	1	0.8	MeOH/Phosphatpuffer pH 3.0 (90:10)	35	10
XI	1	1.0	MeOH/H ₂ O mit 2 % THF (85:15)	50	10

Tab. 16: HPLC-Methoden zur Reinheitsbestimmung.

6.1.3 MATERIALIEN, ARBEITSTECHNIKEN UND ZUSÄTZLICHE ANGABEN

Chemikalien und Lösungsmittel

Die verwendeten Lösungsmittel wurden in kommerziell verfügbarer p.a. Qualität benutzt. Lösungsmittel mit geringerer Qualität wurden durch Destillation gereinigt. Tetrahydrofuran wurde über Natrium-Benzophenon-Ketyl unter Rückfluss erhitzt und abdestilliert. Für die analytische HPLC wurden Lösungsmittel in HPLC grade sowie bidestilliertes Wasser verwendet. Die Chemikalien und Materialien wurden von Acros Organics, Sigma Aldrich, TCI, VWR, Fisher Scientific, abcr, Th. Geyer und Alfa Aesar bezogen und ohne weitere Aufreinigung verwendet.

Dünnschichtchromatographie

Als stationäre Phase wurden DC Fertigfolien Polygram® SIL G/UV₂₅₄ (Schichtdicke 0.2 mm; Format 40 x 80 mm) der Fa. Macherey-Nagel verwendet. Die Detektion erfolgte unter UV-Licht bei 254 nm und 366 nm, sowie ggf. durch Besprühen oder Eintauchen in geeignete Reagenzienlösungen (Eisen(III)-chlorid-Lösung, Dragendorffs-Reagenz, Ehrlichs-Reagenz).

Säulenchromatographie

Als stationäre Phase wurde Kieselgel 60, Korngröße 0.040 – 0.063 mm und LiChroprep® RP-18, Korngröße 0.040 – 0.063 mm, der Fa. Merck verwendet. Die jeweilige Zusammensetzung des Elutionsmittels ist in der Beschreibung der einzelnen Verbindungen in Volumenanteilen angegeben.

Ausbeute

Die Angaben zur Ausbeute beziehen sich auf die durch Umkristallisation, Ausfällung, Filtration und Waschen oder durch Säulenchromatographie gereinigte Substanz.

Software

Als Software wurden Microsoft® Office 2013 (Microsoft), MestReNova 10.0 (Mestrelab) und ChemDraw Professional® 16.0 (PerkinElmer) verwendet.

6.2 ALLGEMEINE ARBEITSVORSCHRIFTEN

Detailliertere Angaben bezüglich der verwendeten Mengen, Volumina, Art der Lösungsmittel, Reaktionszeiten sowie Eluenten bei der Säulenchromatographie über die Angaben der allgemeinen Arbeitsvorschriften hinaus sind in den einzelnen Substanzbeschreibungen aufgeführt.

Arbeitsvorschrift A: Synthese der Amide 122 und 123

Das Amin wird mit Terephthalsäuremonomethylester (**120**) (2.0 eq.), *N,N'*-Diisopropylcarbodiimid (2.2 eq.) und 4-(Dimethylamino)-pyridin (0.3 eq.) in Dichlormethan suspendiert und bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt und das Rohprodukt mittels Säulenchromatographie aufgereinigt.

Arbeitsvorschrift B: Cyclodehydrierung

In einem Mikrowellenvial wird das Amid und 2-Chlorpyridin (1.2 eq.) in Dichlormethan unter Rühren gelöst und auf -78 °C gekühlt. Zu der Lösung wird tropfenweise Trifluormethansulfonsäureanhydrid (1.1 eq.) zugegeben und das Reaktionsgemisch nach 5 min auf 0 °C gebracht. Nach 5 min wird die Kühlung beendet und über 5 min auf Raumtemperatur erwärmt. Das Reaktionsgemisch wird anschließend im Mikrowellenreaktor 5 min bei 140 °C, 300 W und einem maximalen Druck von 145 bar erhitzt. Die Lösung wird auf Raumtemperatur gekühlt und mit Triethylamin neutralisiert. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt und das Rohprodukt mittels Säulenchromatographie aufgereinigt.

Arbeitsvorschrift C: N-Alkylierung

Das Amin wird unter N₂-Atmosphäre in trockenem DMF gelöst, auf 0 °C gekühlt und tropfenweise mit 1 M Lithiumhexamethyldisilazid (2.0 eq. oder 1.0 eq.) in Toluol versetzt. Nach 15 min wird eine Lösung von 4-(Brommethyl)benzoesäuremethylester (**50**) (1.7 eq.) in trockenem DMF zugegeben und die Reaktion bei Raumtemperatur fortgesetzt. Der Reaktionsansatz wird in Wasser gegeben und wiederholt mit Dichlormethan extrahiert. Die

vereinigten organischen Phasen werden mit gesättigter wässriger Kochsalzlösung gewaschen und über Magnesiumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt und das Rohprodukt mittels Säulenchromatographie aufgereinigt.

Arbeitsvorschrift D: Hydrolyse der Carbonsäuremethylester und des Phosphonsäurediethylesters 24

Der Ester wird in einem Gemisch aus 1,4-Dioxan/Wasser (1:1) suspendiert. Dann wird 2 M Natriumhydroxid-Lösung (5.0 eq. für **24**, 2.5 eq. oder 1.2 eq. für Carbonsäuremethylester) hinzugefügt und das Gemisch bei Raumtemperatur oder erhöhter Temperatur gerührt. Nach vollständiger Umsetzung (DC-Kontrolle) wird die Lösung gegebenenfalls auf Raumtemperatur abgekühlt und mit 2 M Zitronensäure oder 2 M Salzsäure angesäuert (pH 4). Der dabei ausgefallene Feststoff wird unter Vakuum abfiltriert, mit Wasser gewaschen und getrocknet. Sofern keine Ausfällung des Produkts erfolgt, wird der Reaktionsansatz wiederholt mit dem angegebenen organischen Lösungsmittel extrahiert. Nach Waschen der vereinigten organischen Phasen mit gesättigter wässriger Kochsalzlösung wird die Lösung über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Weitere Aufreinigungsschritte sind nicht erforderlich.

Arbeitsvorschrift E: Synthese THP-geschützter Hydroxamsäuren mittels Benzotriazolderivat (HOBt)

Die Carbonsäure wird in Dichlormethan und Triethylamin (1.7 eq.) gelöst. Zu dieser Lösung werden 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimidhydrochlorid (EDC) (1.2 eq.), 1-Hydroxybenzotriazol (HOBt) (1.2 eq.) und *O*-(Tetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)hydroxylamin (1.2 eq.) hinzugefügt und das Gemisch bei Raumtemperatur gerührt. Nach der angegebenen Zeit wird die Lösung wiederholt mit einer gesättigten wässrigen Natriumhydrogencarbonat-Lösung gewaschen und über Magnesiumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt und das Rohprodukt mittels Säulenchromatographie aufgereinigt.

Arbeitsvorschrift F: Synthese THP-geschützter Hydroxamsäuren mittels COMU

Die Carbonsäure wird unter N₂-Atmosphäre in trockenem DMF gelöst, auf 0 °C gekühlt und Triethylamin oder *N,N*-Diisopropylethylamin (2.0 eq.) zugetropft. Eine Lösung von COMU (1.5 eq.) in trockenem DMF wird der Lösung zugefügt und 5 min gerührt. Danach wird eine Lösung von *O*-(Tetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)hydroxylamin (1.5 eq.) in trockenem DMF zugegeben. Die Lösung wird eine Stunde bei 0 °C und anschließend bei Raumtemperatur gerührt. Dann wird der Reaktionsansatz in Wasser gegeben und wiederholt mit Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit gesättigter wässriger Kochsalzlösung gewaschen und über Magnesiumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt und das Rohprodukt mittels Säulenchromatographie aufgereinigt.

Arbeitsvorschrift G: Entschützung der THP-geschützten Hydroxamsäuren

Die THP-geschützte Hydroxamsäure wird in Dichlormethan gelöst. Zur Lösung wird 4 M Salzsäure in 1,4-Dioxan (1.1 eq. oder 5.2 eq.) zugetropft und bei Raumtemperatur gerührt. Der ausgefallene Feststoff wird unter Vakuum abfiltriert und mit kleinen Volumina gekühltem Dichlormethan gewaschen. Sofern keine Ausfällung des Produkts erfolgt, wird das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und das Rohprodukt mittels Säulenchromatographie aufgereinigt.

Arbeitsvorschrift H: Synthese von Hydroxamsäuren direkt aus Carbonsäuren

Die Carbonsäure wird unter N₂-Atmosphäre in trockenem DMF gelöst und auf 0 °C gekühlt. *N,N*-Diisopropylethylamin (2.0 eq.) und eine Lösung von COMU (1.5 eq.) in trockenem DMF wird hinzugegeben und das Gemisch eine Stunde bei 0 °C gerührt. Äquimolare Mengen Hydroxylaminhydrochlorid und *N,N*-Diisopropylethylamin werden unter N₂-Atmosphäre in trockenem DMF gelöst und 15 min gerührt. Die frisch hergestellte Lösung aus freiem Hydroxylamin in trockenem DMF (3.0 eq.) wird der obigen Lösung zugefügt und weiter bei Raumtemperatur gerührt. Das Gemisch wird mit Wasser versetzt und mehrmals mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über Na₂SO₄ getrocknet, das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und das Rohprodukt mittels Säulenchromatographie aufgereinigt (Aufarbeitung A). Alternativ wird das Lösungsmittel im Vakuum aus dem Reaktionsansatz entfernt und das Rohprodukt direkt mittels Säulenchromatographie aufgereinigt (Aufarbeitung B). Gegebenenfalls wird zusätzlich zu Aufarbeitung A und B mittels Waschen oder Ausfällen mit anschließender Filtration weiter aufgereinigt.

Arbeitsvorschrift I: N-Arylethylisierung von aromatischen Aminen und N-Heterocyclen

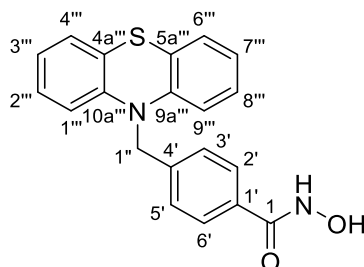
Die N-haltige Verbindung (1.0 mmol) wird unter N₂-Atmosphäre in trockenem Dichlormethan gelöst und auf 0 °C gekühlt. Dann wird der Enolether (1.0 eq.) und langsam 0.74 mL Trifluoressigsäure (9.7 eq.) und 1.6 mL Triethylsilan (10 eq.) hinzugefügt. Der Reaktionsverlauf wird mittels Dünnschichtchromatographie verfolgt und weitere Äquivalente Enolether (0.5 eq. oder 1.0 – 3.0 eq.) werden portionsweise bis zur vollständigen Umsetzung der N-haltigen Verbindung zugegeben bzw. bis keine weitere Umsetzung mehr zu beobachten ist. Dem Reaktionsgemisch werden vorsichtig 20 mL 2 M Natriumhydroxid-Lösung hinzugefügt und das Gemisch wiederholt mit organischem Lösungsmittel extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit gesättigter wässriger Kochsalzlösung gewaschen und über Magnesiumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt und das Rohprodukt mittels Säulenchromatographie aufgereinigt.

Arbeitsvorschrift J: Wittig-Olefinierung von Aldehyden zu Enolethern

Methoxymethyltriphenylphosphoniumchlorid (1.3 eq.) wird unter N₂-Atmosphäre in trockenem Tetrahydrofuran suspendiert und auf 0 °C oder -78 °C gebracht. Nach langsamer Zugabe der angegebenen Base (1.3 eq.) wird 30 min bei 0 °C oder -78 °C gekühlt. Der Aldehyd (1.0 eq.) wird unter N₂-Atmosphäre in trockenem Tetrahydrofuran gelöst, ebenfalls auf 0 °C oder -78 °C gebracht und zum Reaktionsgemisch zugetropft. Danach wird die Kühlung beendet und die Reaktion bei Raumtemperatur fortgesetzt. Der Reaktionsansatz wird in Wasser gegeben und mit 2 M Salzsäure angesäuert (pH 4) und wiederholt mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit gesättigter wässriger Kochsalzlösung gewaschen und über Magnesiumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt und das Rohprodukt mittels Säulenchromatographie aufgereinigt.

6.3 BESCHREIBUNG DER SUBSTANZEN

4-[(10*H*-Phenothiazin-10-yl)methyl]-*N*-hydroxybenzamid (**20**)


 $\text{C}_{20}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_2\text{S}$
 $M_r = 348.42$

Die Durchführung erfolgte nach Arbeitsvorschrift G. Es wurden 102 mg (0.235 mmol) (\pm)-4-[(10*H*-Phenothiazin-10-yl)methyl]-*N*-[(tetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)oxy]benzamid (**232**) in 3.0 mL Dichlormethan und 310 μL (1.24 mmol) 4 M Salzsäure in 1,4-Dioxan eingesetzt. Die Entschützungszeit betrug 5 h.

Ausbeute: 68 % 56 mg grauer Feststoff

Schmelzpunkt/-bereich: 195 – 197 °C

^1H NMR (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ (ppm) = 11.16 (s, 1H, NHOH), 9.02 (bs, 1H, NH), 7.72 – 7.67 (m, 2H, 2'-H, 6'-H), 7.41 – 7.36 (m, 2H, 3'-H, 5'-H), 7.15 (dd, $J = 7.6, 1.5$ Hz, 2H, 4'''-H, 6'''-H), 7.07 (td, $J = 7.8, 1.5$ Hz, 2H, 2'''-H, 8'''-H), 6.91 (td, $J = 7.5, 1.0$ Hz, 2H, 3'''-H, 7'''-H), 6.78 (dd, $J = 8.2, 1.1$ Hz, 2H, 1'''-H, 9'''-H), 5.18 (s, 2H, 1''-H)

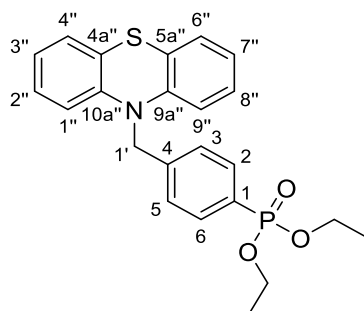
^{13}C NMR (126 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ (ppm) = 164.1 (C-1), 144.1 (C-9a''', C-10a'''), 140.4 (C-4'), 131.6 (C-1'), 127.6 (C-2''', C-8'''), 127.2 (C-2', C-6'), 126.9 (C-4''', C-6'''), 126.7 (C-3', C-5'), 122.8 (C-3''', C-7'''), 122.6 (C-4a''', C-5a'''), 115.9 (C-1''', C-9'''), 50.7 (C-1'')

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ (cm^{-1}) = 3253, 3214, 3059, 2855, 1636, 1614, 1567, 1538, 1496, 1466, 1443, 1370, 1260, 1230, 1016, 894, 869, 758, 749, 741, 657

MS (ESI): $m/z = 347$ $[\text{M}-\text{H}]^-$

HRMS (ESI): $m/z = 347.0858$ $[\text{M}-\text{H}]^-$ berechnet für $\text{C}_{20}\text{H}_{15}\text{N}_2\text{O}_2\text{S}^-$ 347.0860

HPLC (Methode II, MeOH): 95 % ($\lambda = 210$ nm), 95 % ($\lambda = 254$ nm)

{4-[(10*H*-Phenothiazin-10-yl)methyl]phenyl}phosphonsäurediethylester (24)C₂₃H₂₄NO₃PSM_r = 425.48

In 1.0 mL trockenem DMF wurden 113 mg (0.567 mmol) 10*H*-Phenothiazin (**23**) unter N₂-Atmosphäre gelöst, auf 0 °C gekühlt und tropfenweise mit 1.13 mL (1.13 mmol) 1 M Lithiumhexamethyldisilazid in Toluol versetzt. Nach 15 min wurde eine Lösung von 296 mg (0.964 mmol) [4-(Brommethyl)phenyl]phosphonsäurediethylester (**47**) in 0.5 mL trockenem DMF zugegeben und die Lösung 18 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde das Reaktionsgemisch in Wasser gegeben und dreimal mit Dichlormethan (je 30 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit gesättigter wässriger Kochsalzlösung gewaschen und über Magnesiumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und das Rohprodukt mittels Säulenchromatographie (Dichlormethan/Ethanol = 97.5:2.5, *R_f* = 0.3) aufgereinigt.

Ausbeute: 43 % 103 mg hellbraunes Öl

¹H NMR (400 MHz, CD₂Cl₂): δ (ppm) = 7.78 – 7.68 (m, 2H, 2-H, 6-H), 7.48 – 7.42 (m, 2H, 3-H, 5-H), 7.11 (dd, *J* = 7.6, 1.6 Hz, 2H, 4''-H, 6''-H), 7.00 (td, *J* = 7.8, 1.6 Hz, 2H, 2''-H, 8''-H), 6.89 (td, *J* = 7.5, 1.1 Hz, 2H, 3''-H, 7''-H), 6.64 (dd, *J* = 8.1, 1.1 Hz, 2H, 1''-H, 9''-H), 5.14 (s, 2H, 1'-H), 4.17 – 3.99 (m, 4H, CH₂CH₃, CH₂CH₃), 1.30 (t, *J* = 7.1 Hz, 6H, CH₂CH₃, CH₂CH₃)

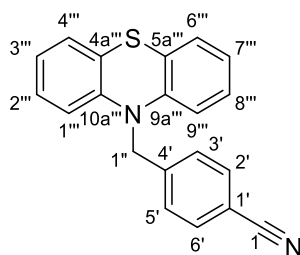
¹³C NMR (101 MHz, CD₂Cl₂): δ (ppm) = 144.9 (C-9a'', C-10a''), 142.3 (d, ⁴*J*_{C,P} = 3.2 Hz, C-4), 132.5 (d, ²*J*_{C,P} = 10.3 Hz, C-2, C-6), 128.1 (d, ¹*J*_{C,P} = 189.8 Hz, C-1), 127.8 (C-2'', C-8''), 127.5 (C-4'', C-6''), 127.4 (d, ³*J*_{C,P} = 15.3 Hz, C-3, C-5), 124.1 (C-4a'', C-5a''), 123.3 (C-3'', C-7''), 116.0 (C-1'', C-9''), 62.6 (d, ²*J*_{C,P} = 5.6 Hz, CH₂CH₃, CH₂CH₃), 52.8 (C-1'), 16.7 (d, ³*J*_{C,P} = 6.4 Hz, CH₂CH₃, CH₂CH₃)

IR (Film): $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) = 3062, 2981, 2929, 2904, 2865, 1594, 1465, 1366, 1252, 1129, 1051, 1022, 965, 749

MS (ESI): *m/z* = 426 [M+H]⁺

HRMS (ESI): *m/z* = 426.1290 [M+H]⁺ berechnet für C₂₃H₂₅NO₃PS⁺ 426.1287

HPLC (Methode Ib, MeCN): 96 % (λ = 210 nm), 97 % (λ = 254 nm)

4-[(10*H*-Phenothiazin-10-yl)methyl]benzonitril (26) $C_{20}H_{14}N_2S$ $M_r = 314.41$

In 5.0 mL trockenem DMF wurden unter N_2 -Atmosphäre 1.00 g (5.02 mmol) 10*H*-Phenothiazin (**23**) gelöst, auf 0 °C abgekühlt und mit 403 mg (10.1 mmol) einer 60 %igen Natriumhydrid-Dispersion in Mineralöl versetzt. Nach 30 min wurde eine Lösung von 1.40 g (7.14 mmol) 4-(Brommethyl)benzonitril (**49**) in 5.0 mL trockenem DMF zugetropft und 24 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Lösung wurde vorsichtig in Wasser gegeben und viermal mit Dichlormethan (je 60 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit gesättigter wässriger Kochsalzlösung gewaschen und über Magnesiumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und das Rohprodukt mittels Säulenchromatographie (Dichlormethan/*n*-Pentan = 1:1, R_f = 0.4) aufgereinigt.

Ausbeute: 68 % 1.07 g hellbeiger Feststoff

Schmelzpunkt/-bereich: 56 – 58 °C

1H NMR (400 MHz, CD_2Cl_2): δ (ppm) = 7.65 – 7.59 (m, 2H, 2'-H, 6'-H), 7.51 – 7.45 (m, 2H, 3'-H, 5'-H), 7.13 (dd, J = 7.6, 1.6 Hz, 2H, 4'''-H, 6'''-H), 7.02 (td, J = 7.8, 1.6 Hz, 2H, 2'''-H, 8'''-H), 6.91 (td, J = 7.5, 1.2 Hz, 2H, 3'''-H, 7'''-H), 6.62 (dd, J = 8.1, 1.1 Hz, 2H, 1'''-H, 9'''-H), 5.14 (s, 2H, 1''-H)

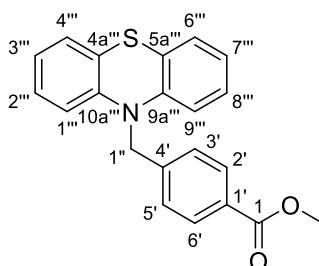
^{13}C NMR (101 MHz, CD_2Cl_2): δ (ppm) = 144.8 (C-9a'', C-10a''), 143.3 (C-4'), 133.1 (C-2', C-6'), 128.2 (C-3', C-5'), 127.8 (C-2'', C-8''), 127.6 (C-4'', C-6''), 124.5 (C-4a'', C-5a''), 123.4 (C-3'', C-5''), 119.2 (C-1), 116.0 (C-1'', C-9''), 111.6 (C-1'), 52.5 (C-1'')

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ (cm^{-1}) = 3058, 2920, 2851, 2226, 1569, 1463, 1443, 1365, 1286, 1255, 1217, 1127, 1038, 864, 814, 747, 547

MS (ESI): m/z = 356, 315 $[M+H]^+$

HRMS (ESI): m/z = 315.0951 $[M+H]^+$ berechnet für $C_{20}H_{15}N_2S^+$ 315.0950

HPLC (Methode Ib, MeCN): > 99 % (λ = 210 nm), > 99 % (λ = 254 nm)

4-[(10*H*-Phenothiazin-10-yl)methyl]benzoesäuremethylester (27)C₂₁H₁₇NO₂SM_r = 347.43

Die Durchführung erfolgte nach Arbeitsvorschrift C. Es wurden 1.05 g (5.27 mmol) 10*H*-Phenothiazin (**23**) in 6.0 mL trockenem DMF, 10.5 mL (10.5 mmol) 1 M Lithiumhexamethyldisilazid und 2.03 g (8.86 mmol) 4-(Brommethyl)benzoesäuremethylester (**50**) in 4.0 mL trockenem DMF eingesetzt. Nach einer Reaktionszeit von 93 h bei 50 °C wurde viermal mit Dichlormethan (je 60 mL) extrahiert und das Rohprodukt mittels Säulenchromatographie (Dichlormethan/*iso*-Hexan = 7:3, *R_f* = 0.7) aufgereinigt.

Ausbeute: 70 % 1.28 g beiger Feststoff

Schmelzpunkt/-bereich: 125 – 126 °C

¹H NMR (400 MHz, CD₂Cl₂): δ (ppm) = 8.02 – 7.92 (m, 2H, 2'-H, 6'-H), 7.47 – 7.38 (m, 2H, 3'-H, 5'-H), 7.11 (dd, *J* = 7.6, 1.6 Hz, 2H, 4'''-H, 6'''-H), 7.00 (td, *J* = 7.7, 1.3 Hz, 2H, 2'''-H, 8'''-H), 6.88 (td, *J* = 7.5, 1.2 Hz, 2H, 3'''-H, 7'''-H), 6.63 (dd, *J* = 8.1, 1.1 Hz, 2H, 1'''-H, 9'''-H), 5.14 (s, 2H, 1''-H), 3.86 (s, 3H, CH₃)

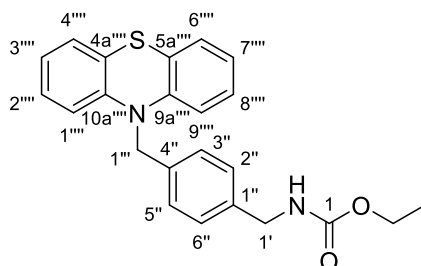
¹³C NMR (101 MHz, CD₂Cl₂): δ (ppm) = 167.1 (C-1), 144.9 (C-9a''', C-10a'''), 142.9 (C-4'), 130.3 (C-2', C-6'), 129.7 (C-1'), 127.8 (C-2'', C-8''), 127.4 (C-3', C-5'), 127.4 (C-4'', C-6''), 124.1 (C-4a''', C-5a'''), 123.2 (C-3'', C-7''), 116.0 (C-1'', C-9''), 52.7 (C-1''), 52.5 (CH₃)

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) = 3055, 2999, 2950, 2867, 2845, 1720, 1610, 1465, 1444, 1370, 1276, 1257, 1222, 1180, 1111, 1017, 868, 755, 746, 692, 653

MS (ESI): *m/z* = 348 [M+H]⁺, 264, 199

HRMS (ESI): *m/z* = 348.1052 [M+H]⁺ berechnet für C₂₁H₁₈NO₂S⁺ 348.1053

HPLC (Methode Ia, MeCN): > 99 % (λ = 210 nm), > 99 % (λ = 254 nm)

Ethyl-*N*-{4-[(10*H*-phenothiazin-10-yl)methyl]benzyl}carbamate (33)C₂₃H₂₂N₂O₂SM_r = 390.50

In 2.0 mL Dichlormethan wurden 112 mg (0.351 mmol) 4-[(10*H*-Phenothiazin-10-yl)methyl]phenyl]methanamin (**32**) gelöst, auf 0 °C gekühlt und 180 µL (1.05 mmol) *N,N*-Diisopropylethylamin zugetropft. Anschließend wurden 87 µL (0.91 mmol) Chlorameisensäureethylester hinzugefügt und die Lösung 1.5 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach Zugabe von 20 mL 2 M Natriumhydroxid-Lösung wurde dreimal mit Dichlormethan (je 20 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Natriumsulfat getrocknet, das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und das Rohprodukt mittels Säulenchromatographie (Dichlormethan/*n*-Pentan = 9:1, *R_f* = 0.3) aufgereinigt.

Ausbeute: 96 % 132 mg weißer Feststoff

Schmelzpunkt/-bereich: 107 °C

¹H NMR (400 MHz, CD₂Cl₂): δ (ppm) = 7.33 – 7.27 (m, 2H, 3''-H, 5''-H), 7.26 – 7.21 (m, 2H, 2''-H, 6''-H), 7.09 (dd, *J* = 7.6, 1.6 Hz, 2H, 4'''-H, 6'''-H), 7.00 (ddd, *J* = 8.2, 7.4, 1.6 Hz, 2H, 2'''-H, 8'''-H), 6.87 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H, 3'''-H, 7'''-H), 6.67 (dd, *J* = 8.2, 1.1 Hz, 2H, 1'''-H, 9'''-H), 5.08 (s, 3H, 1'''-H, NH), 4.31 (d, *J* = 6.1 Hz, 2H, 1'-H), 4.10 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H, CH₂CH₃), 1.22 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H, CH₂CH₃)

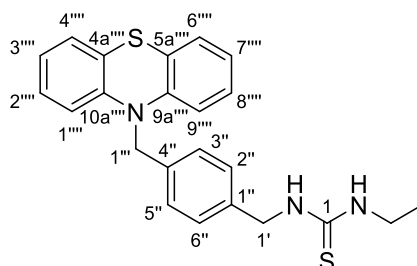
¹³C NMR (101 MHz, CD₂Cl₂): δ (ppm) = 157.1 (C-1), 145.2 (C-9a''', C-10a'''), 138.5 (C-1''), 136.5 (C-4''), 128.1 (C-2'', C-6''), 127.7 (C-2''', C-8'''), 127.5 (C-3'', C-5''), 127.4 (C-4''', C-6'''), 124.0 (C-4a''', C-5a'''), 123.1 (C-3''', C-7'''), 116.1 (C-1''', C-9'''), 61.4 (CH₂CH₃), 52.6 (C-1'''), 45.0 (C-1'), 15.0 (CH₂CH₃)

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) = 3303, 3062, 3013, 2980, 2933, 2902, 2854, 1685, 1550, 1462, 1421, 1373, 1326, 1264, 1139, 1038, 929, 751, 727, 674

MS (ESI): *m/z* = 391 [M+H]⁺

HRMS (ESI): *m/z* = 391.1475 [M+H]⁺ berechnet für C₂₃H₂₃N₂O₂S⁺ 391.1475

HPLC (Methode Ib, MeCN): > 99 % (λ = 210 nm), > 99 % (λ = 254 nm)

1-{4-[(10*H*-Phenothiazin-10-yl)methyl]benzyl}-3-ethylthioharnstoff (34) $C_{23}H_{23}N_3S_2$ $M_r = 405.58$

In 0.5 mL Tetrahydrofuran wurden 70 mg (0.22 mmol) 4-[(10*H*-Phenothiazin-10-yl)methyl]phenyl]methanamin (**32**) gelöst, 57 μ L (0.66 mmol) Ethylisothiocyanat dazugetropft und 16 h bei Raumtemperatur gerührt. Danach wurde die Lösung in 20 mL Wasser gegeben und dreimal mit Dichlormethan (je 20 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit gesättigter wässriger Kochsalzlösung gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und das Rohprodukt mittels Säulenchromatographie (Dichlormethan/Methanol = 99:1, $R_f = 0.2$) aufgereinigt.

Ausbeute: 60 % 53 mg weißer Feststoff

Schmelzpunkt/-bereich: 178 – 179 °C

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6): δ (ppm) = 7.67 (t, $J = 5.8$ Hz, 1H, $\text{NHCSNHCH}_2\text{CH}_3$), 7.37 (t, $J = 5.0$ Hz, 1H, NHCH_2CH_3), 7.31 – 7.26 (m, 2H, 3''-H, 5''-H), 7.26 – 7.21 (m, 2H, 2''-H, 6''-H), 7.13 (dd, $J = 7.6, 1.5$ Hz, 2H, 4'''-H, 6'''-H), 7.06 (td, $J = 7.8, 1.6$ Hz, 2H, 2'''-H, 8'''-H), 6.90 (td, $J = 7.5, 1.2$ Hz, 2H, 3'''-H, 7'''-H), 6.79 (d, $J = 8.2$ Hz, 2H, 1'''-H, 9'''-H), 5.11 (s, 2H, 1''-H), 4.62 (d, $J = 5.8$ Hz, 2H, 1'-H), 3.38 (p, $J = 6.9$ Hz, 2H, NHCH_2CH_3), 1.07 (t, $J = 7.2$ Hz, 3H, NHCH_2CH_3)

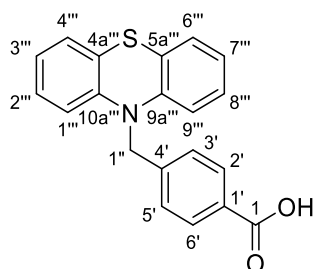
^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6): δ (ppm) = 182.2 (C-1), 144.1 (C-9a''', C-10a'''), 137.9 (C-1''), 135.3 (C-4''), 127.3 (C-2''', C-8'''), 127.3 (C-2'', C-6''), 126.6 (C-4''', C-6'''), 126.4 (C-3'', C-5''), 122.5 (C-4a''', C-5a'''), 122.4 (C-3''', C-7'''), 115.6 (C-1''', C-9'''), 50.7 (C-1'''), 46.5 (C-1'), 38.1 (NHCH_2CH_3), 14.2 (NHCH_2CH_3)

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ (cm^{-1}) = 3206, 3063, 3032, 2971, 2932, 2859, 1563, 1526, 1462, 1421, 1368, 1335, 1284, 1254, 1219, 1104, 958, 932, 802, 752, 729

MS (ESI): $m/z = 406$ [$\text{M}+\text{H}$] $^+$, 207

HRMS (ESI): $m/z = 406.1407$ [$\text{M}+\text{H}$] $^+$ berechnet für $\text{C}_{23}\text{H}_{24}\text{N}_3\text{S}_2^+$ 406.1406

HPLC (Methode Ib, MeCN): > 97 % ($\lambda = 210$ nm), > 99 % ($\lambda = 254$ nm)

4-[(10*H*-Phenothiazin-10-yl)methyl]benzoesäure (38) $C_{20}H_{15}NO_2S$ $M_r = 333.41$

Die Durchführung erfolgte nach Arbeitsvorschrift D. Es wurden 1.07 g (3.08 mmol) 4-[(10*H*-Phenothiazin-10-yl)methyl]benzoesäuremethylester (**27**), 3.78 mL (7.56 mmol) 2 M Natriumhydroxid-Lösung in 20 mL eines 1,4-Dioxan/Wasser-Gemisches (1:1) eingesetzt. Nach einer Reaktionszeit von 4 h bei 50 °C wurde der erhaltene Feststoff im Hochvakuum getrocknet.

Ausbeute: 82 % 840 mg weißer Feststoff

Schmelzpunkt/-bereich: 210 °C

1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6): δ (ppm) = 12.88 (bs, 1H, COOH), 7.92 – 7.87 (m, 2H, 2'-H, 6'-H), 7.46 – 7.41 (m, 2H, 3'-H, 5'-H), 7.15 (dd, J = 7.6, 1.5 Hz, 2H, 4'''-H, 6'''-H), 7.06 (td, J = 7.8, 1.5 Hz, 2H, 2'''-H, 8'''-H), 6.91 (td, J = 7.5, 1.0 Hz, 2H, 3'''-H, 7'''-H), 6.76 (dd, J = 8.3, 0.9 Hz, 2H, 1'''-H, 9'''-H), 5.20 (s, 2H, 1''-H)

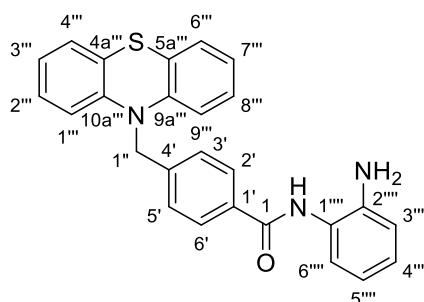
^{13}C NMR (126 MHz, DMSO- d_6): δ (ppm) = 167.1 (C-1), 144.1 (C-9a''', C-10a'''), 142.4 (C-4'), 129.6 (C-2', C-6'), 129.5 (C-1'), 127.5 (C-2''', C-8'''), 126.9 (C-3', C-5'), 126.9 (C-4''', C-6'''), 122.7 (C-3''', C-7'''), 122.6 (C-4a''', C-5a'''), 115.8 (C-1''', C-9'''), 50.9 (C-1'')

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ (cm $^{-1}$) = 3059, 3007, 2848, 2668, 2541, 1679, 1612, 1573, 1451, 1423, 1367, 1314, 1287, 1256, 1221, 1126, 1021, 965, 860, 756, 650, 550

MS (ESI): m/z = 332 [M-H] $^-$

HRMS (ESI): m/z = 332.0750 [M-H] $^-$ berechnet für $C_{20}H_{14}NO_2S^-$ 332.0751

HPLC (Methode XI, MeOH): > 99 % (λ = 210 nm), > 99 % (λ = 254 nm)

4-[(10*H*-Phenothiazin-10-yl)methyl]-*N*-(2-aminophenyl)benzamid (40)C₂₆H₂₁N₃OSM_r = 423.53

In 0.5 mL trockenem DMF wurden 100 mg (0.300 mmol) 4-[(10*H*-Phenothiazin-10-yl)methyl]benzoesäure (**38**) unter N₂-Atmosphäre gelöst, auf 0 °C gekühlt und 100 µL (0.588 mmol) *N,N*-Diisopropylethylamin zugetropft. Eine Lösung von 193 mg (0.451 mmol) COMU in 0.2 mL trockenem DMF wurde zugegeben und 15 min gerührt. Danach wurde eine Lösung von 97 mg (0.90 mmol) *o*-Phenylendiamin in 0.2 mL trockenem DMF hinzugefügt und das Reaktionsgemisch eine Stunde bei 0 °C, dann 20 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde die Lösung in Wasser gegeben und dreimal mit Ethylacetat (je 20 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit gesättigter wässriger Kochsalzlösung gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und das Rohprodukt mittels Säulenchromatographie (Dichlormethan/Methanol/0.1 % Triethylamin = 99:1:0.1, *R_f* = 0.2) aufgereinigt.

Ausbeute: 25 % 32 mg weißer Feststoff

Schmelzpunkt/-bereich: 204 – 205 °C

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ (ppm) = 9.60 (s, 1H, CONH), 8.00 – 7.86 (m, 2H, 2'-H, 6'-H), 7.54 – 7.38 (m, 2H, 3'-H, 5'-H), 7.17 (d, *J* = 7.7 Hz, 2H, 4'''-H, 6'''-H), 7.14 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H, 6'''-H), 7.09 (t, *J* = 7.7 Hz, 2H, 2'''-H, 8'''-H), 6.96 (t, *J* = 7.9 Hz, 1H, 4'''-H), 6.93 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H, 3'''-H, 7'''-H), 6.81 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H, 1'''-H, 9'''-H), 6.76 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H, 3'''-H), 6.58 (t, *J* = 7.5 Hz, 1H, 5'''-H), 5.22 (s, 2H, 1''-H), 4.88 (s, 2H, NH₂)

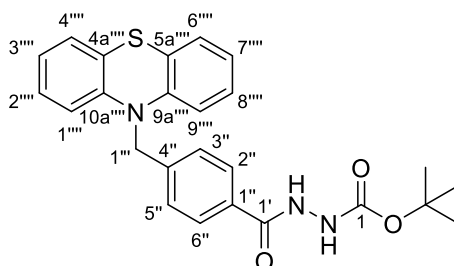
¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆): δ (ppm) = 165.0 (C-1), 144.2 (C-9a''', C-10a'''), 143.1 (C-2'''), 140.6 (C-4'), 133.4 (C-1'), 128.1 (C-2', C-6'), 127.5 (C-2'', C-8'''), 126.9, (C-4'', C-6'''), 126.7 (C-6'''), 126.6 (C-3', C-5'), 126.4 (C-4'''), 123.2 (C-1'''), 122.7 (C-3'', C-7'''), 122.7 (C-4a''', C-5a'''), 116.2 (C-5'''), 116.0 (C-3'''), 115.9 (C-1'', C-9'''), 50.8 (C-1'')

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) = 3406, 3328, 3054, 2943, 1654, 1620, 1570, 1503, 1464, 1442, 1366, 1286, 1257, 1215, 1047, 866, 740

MS (ESI): *m/z* = 424 [M+H]⁺

HRMS (ESI): *m/z* = 424.1481 [M+H]⁺ berechnet für C₂₆H₂₂N₃OS⁺ 424.1478

HPLC (Methode Ib, MeCN): > 99 % (λ = 210 nm), > 99 % (λ = 254 nm)

tert-Butyl 2-{4-[(10*H*-phenothiazin-10-yl)methyl]benzoyl}hydrazin-1-carboxylat (42)C₂₅H₂₅N₃O₃SM_r = 447.55

In 0.5 mL trockenem DMF wurden 353 mg (1.06 mmol) 4-[(10*H*-Phenothiazin-10-yl)methyl]benzoesäure (**38**) unter N₂-Atmosphäre gelöst, auf 0 °C gekühlt und 540 µL (3.18 mmol) *N,N*-Diisopropylethylamin zugetropft. Eine Lösung von 680 mg (1.59 mmol) COMU in 1.0 mL trockenem DMF wurde zugegeben und 20 min gerührt. Dann wurde eine Lösung von 210 mg (1.59 mmol) Boc-Hydrazin in 0.5 mL trockenem DMF hinzugegeben und das Reaktionsgemisch für eine Stunde bei 0 °C und 19 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde die Lösung in Wasser gegeben und dreimal mit Ethylacetat (je 30 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit gesättigter wässriger Kochsalzlösung gewaschen und über Magnesiumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und das Rohprodukt mittels Säulenchromatographie (*iso*-Hexan/Ethylacetat = 7:3, *R_f* = 0.2) aufgereinigt.

Ausbeute: 71 % 338 mg weißer Feststoff

Schmelzpunkt/-bereich: 124 – 125 °C

¹H NMR (500 MHz, CD₂Cl₂): δ (ppm) = 8.13 (s, 1H, NHNHCOOC(CH₃)₃), 7.79 – 7.65 (m, 2H, 2''-H, 6''-H), 7.47 – 7.34 (m, 2H, 3''-H, 5''-H), 7.11 (dd, *J* = 7.6, 1.5 Hz, 2H, 4'''-H, 6'''-H), 6.99 (ddd, *J* = 8.1, 7.4, 1.6 Hz, 2H, 2'''-H, 8'''-H), 6.88 (td, *J* = 7.5, 1.2 Hz, 2H, 3'''-H, 7'''-H), 6.73 (s, 1H, NHNHCOOC(CH₃)₃), 6.62 (dd, *J* = 8.2, 1.1 Hz, 2H, 1'''-H, 9'''-H), 5.12 (s, 2H, 1''-H), 1.46 (s, 9H, C(CH₃)₃)

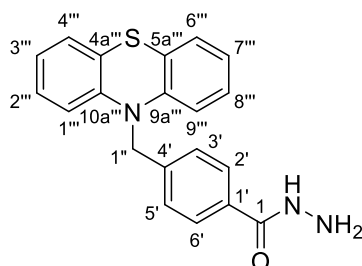
¹³C NMR (126 MHz, CD₂Cl₂): δ (ppm) = 167.0 (C-1'), 156.2 (C-1), 144.9 (C-9a''', C-10a'''), 142.2 (C-4''), 131.4 (C-1''), 128.2 (C-2'', C-6''), 127.8 (C-2''', C-8'''), 127.7 (C-3'', C-5''), 127.5 (C-4''', C-6'''), 124.2 (C-4a''', C-5a'''), 123.3 (C-3''', C-7'''), 116.0 (C-1''', C-9'''), 82.2 (C(CH₃)₃), 52.6 (C-1'''), 28.4 (C(CH₃)₃)

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) = 3216, 3063, 2978, 2931, 1712, 1651, 1571, 1487, 1464, 1367, 1284, 1254, 1217, 1158, 1048, 1018, 867, 747, 595

MS (ESI): *m/z* = 446 [M-H]⁻

HRMS (ESI): *m/z* = 446.1542 [M-H]⁻ berechnet für C₂₅H₂₄N₃O₃S⁻ 446.1544

HPLC (Methode Ib, MeCN): > 99 % (λ = 210 nm), > 99 % (λ = 254 nm)

4-[(10*H*-Phenothiazin-10-yl)methyl]benzhydrazid (45) $C_{20}H_{17}N_3OS$ $M_r = 347.44$

In 1.0 mL Chloroform wurden 302 mg (0.675 mmol) *tert*-Butyl 2-{4-[(10*H*-phenothiazin-10-yl)methyl]benzoyl}hydrazin-1-carboxylat (**42**) gelöst und auf 0 °C gekühlt. Dann wurden vorsichtig 1.20 mL (15.7 mmol) Trifluoressigsäure zugetropft. Die Lösung wurde bis zur vollständigen Umsetzung je 1.5 h bei 0 °C und bei Raumtemperatur gerührt. Nach Zugabe von 15 mL gesättigter wässriger Natriumhydrogencarbonat-Lösung wurde das Gemisch dreimal mit Dichlormethan (je 30 mL) extrahiert und die vereinigten organischen Phasen über Natriumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und das Rohprodukt mittels Säulenchromatographie (Dichlormethan/Methanol/0.1 % Triethylamin = 97:3:0.1, $R_f = 0.3$) aufgereinigt.

Ausbeute: 64 % 151 mg weißer Feststoff

Schmelzpunkt/-bereich: 221 – 222 °C

1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6): δ (ppm) = 9.69 (s, 1H, CONHNH₂), 7.83 – 7.67 (m, 2H, 2'-H, 6'-H), 7.46 – 7.30 (m, 2H, 3'-H, 5'-H), 7.15 (dd, $J = 7.6, 1.6$ Hz, 2H, 4'''-H, 6'''-H), 7.07 (ddd, $J = 8.2, 7.4, 1.6$ Hz, 2H, 2'''-H, 8'''-H), 6.91 (td, $J = 7.5, 1.1$ Hz, 2H, 3'''-H, 7'''-H), 6.78 (dd, $J = 8.2, 1.2$ Hz, 2H, 1'''-H, 9'''-H), 5.18 (s, 2H, 1''-H), 4.45 (s, 2H, CONHNH₂)

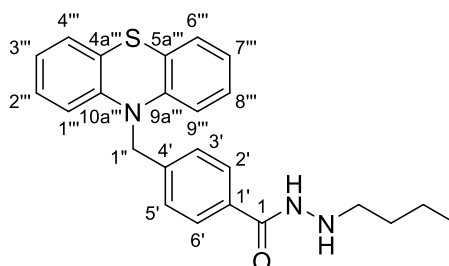
^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6): δ (ppm) = 165.6 (C-1), 144.1 (C-9a''', C-10a'''), 140.2 (C-4'), 132.0 (C-1'), 127.5 (C-2''', C-8'''), 127.2 (C-2', C-6'), 126.8 (C-4''', C-6'''), 126.6 (C-3', C-5'), 122.7 (C-3''', C-7'''), 122.6 (C-4a''', C-5a'''), 115.8 (C-1''', C-9'''), 50.7 (C-1'')

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) = 3295, 3058, 2921, 2850, 1665, 1612, 1568, 1489, 1465, 1443, 1368, 1258, 1223, 1129, 1106, 1048, 929, 868, 742, 658, 612, 505

MS (ESI): $m/z = 388, 348 [M+H]^+$

HRMS (ESI): $m/z = 348.1166 [M+H]^+$ berechnet für $C_{20}H_{18}N_3OS^+$ 348.1165

HPLC (Methode Id, MeCN): > 99 % ($\lambda = 210$ nm), > 99 % ($\lambda = 254$ nm)

4-[(10*H*-Phenothiazin-10-yl)methyl]-*N'*-butylbenzhydrazid (46)C₂₄H₂₅N₃OSM_r = 403.54

In 1.5 mL Methanol wurden 118 mg (0.340 mmol) 4-[(10*H*-Phenothiazin-10-yl)methyl]benzhydrazid (**45**) suspendiert. Dann wurden 31 µL (0.34 mmol) Butyraldehyd sowie eine katalytische Menge an *p*-Toluolsulfonsäure zugegeben und das Gemisch bei Raumtemperatur gerührt. Nach 17 h wurden weitere 31 µL (0.34 mmol) Butyraldehyd zugefügt und weitere 24 h bei Raumtemperatur gerührt. Nachdem das Reaktionsgemisch mit 4 M Salzsäure in 1,4-Dioxan auf pH 5 gebracht wurde, wurden 26 mg (0.41 mmol) Natriumcyanoborhydrid zugegeben und 3 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde das Reaktionsgemisch eingeeengt, der Rückstand mit 20 mL Wasser versetzt und dreimal mit Dichlormethan (je 20 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit gesättigter wässriger Kochsalzlösung gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und das Rohprodukt mittels Säulenchromatographie (Dichlormethan/Methanol = 98:2, *R_f* = 0.2) aufgereinigt.

Ausbeute: 52 % 71 mg weiße Kristalle

Schmelzpunkt/-bereich: 61 – 63 °C

¹H NMR (400 MHz, CD₂Cl₂): δ (ppm) = 7.71 – 7.66 (m, 2H, 2'-H, 6'-H), 7.63 (s, 1H, CONHNH), 7.45 – 7.39 (m, 2H, 3'-H, 5'-H), 7.11 (dd, *J* = 7.6, 1.6 Hz, 2H, 4'''-H, 6'''-H), 7.00 (ddd, *J* = 8.1, 7.4, 1.6 Hz, 2H, 2'''-H, 8'''-H), 6.89 (td, *J* = 7.5, 1.1 Hz, 2H, 3'''-H, 7'''-H), 6.64 (dd, *J* = 8.1, 1.1 Hz, 2H, 1'''-H, 9'''-H), 5.13 (s, 2H, 1''-H), 4.80 (s, 1H, CONHNH), 2.88 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H, NHCH₂CH₂CH₂CH₃), 1.54 – 1.45 (m, 2H, NHCH₂CH₂CH₂CH₃), 1.45 – 1.31 (m, 2H, NHCH₂CH₂CH₂CH₃), 0.92 (t, *J* = 7.3 Hz, 3H, NHCH₂CH₂CH₂CH₃)

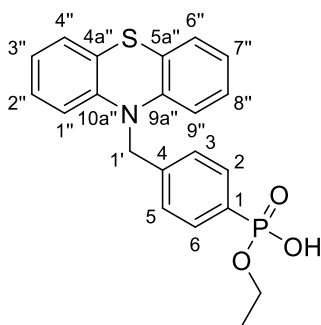
¹³C NMR (126 MHz, CD₂Cl₂): δ (ppm) = 167.0 (C-1), 145.0 (C-9a''', C-10a'''), 141.5 (C-4'), 132.7 (C-1'), 127.8 (C-2''', C-8'''), 127.7 (C-2', C-6'), 127.6 (C-3', C-5'), 127.5 (C-4''', C-6'''), 124.2 (C-4a''', C-5a'''), 123.2 (C-3''', C-7'''), 116.0 (C-1''', C-9'''), 52.6 (C-1''), 52.5 (NHCH₂CH₂CH₂CH₃), 30.7 (NHCH₂CH₂CH₂CH₃), 20.8 (NHCH₂CH₂CH₂CH₃), 14.3 (NHCH₂CH₂CH₂CH₃)

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) = 3266, 3061, 2955, 2927, 2859, 1636, 1571, 1464, 1365, 1286, 1256, 1218, 1128, 1105, 1048, 1017, 866, 747

MS (ESI): $m/z = 807 [2M+H]^+$, $404 [M+H]^+$

HRMS (ESI): $m/z = 404.1796 [M+H]^+$ berechnet für $C_{24}H_{26}N_3OS^+$ 404.1791

HPLC (Methode Ib, MeCN): 97 % ($\lambda = 210 \text{ nm}$), 96 % ($\lambda = 254 \text{ nm}$)

{4-[(10*H*-Phenothiazin-10-yl)methyl]phenyl}phosphonsäuremonoethylester (53) $C_{21}H_{20}NO_3PS$ $M_r = 397.43$

Die Durchführung erfolgte nach Arbeitsvorschrift D. Es wurden 68 mg (0.16 mmol) {4-[(10*H*-Phenothiazin-10-yl)methyl]phenyl}phosphonsäurediethylester (**24**) und 0.40 mL (0.80 mmol) 2 M Natriumhydroxid-Lösung in 0.5 mL eines 1,4-Dioxan/Wasser-Gemisches (1:1) eingesetzt. Nach einer Reaktionszeit von 76 h bei 70 °C wurde die Lösung dreimal mit Dichlormethan (je 30 mL) extrahiert.

Ausbeute: 61 % 39 mg hellrosa Feststoff

Schmelzpunkt/-bereich: 148 – 150 °C

1H NMR (400 MHz, CD_2Cl_2): δ (ppm) = 7.75 – 7.65 (m, 2H, 2-H, 6-H), 7.43 – 7.35 (m, 2H, 3-H, 6-H), 7.10 (dd, $J = 7.6, 1.6$ Hz, 2H, 4''-H, 6''-H), 6.98 (td, $J = 7.9, 1.6$ Hz, 2H, 2''-H, 8''-H), 6.87 (td, $J = 7.5, 1.2$ Hz, 2H, 3''-H, 7''-H), 6.61 (dd, $J = 8.1, 1.2$ Hz, 2H, 1''-H, 9''-H), 6.28 (s, 1H, OH), 5.10 (s, 2H, 1'-H), 4.00 (qd, $J = 7.1$ Hz, $^3J_{H,P} = 7.1$ Hz, 2H, $\underline{CH_2}CH_3$), 1.22 (t, $J = 7.1$ Hz, 3H, $CH_2\underline{CH_3}$)

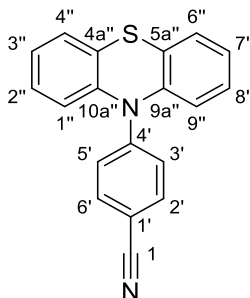
^{13}C NMR (101 MHz, CD_2Cl_2): δ (ppm) = 144.9 (C-9a'', C-10a''), 142.2 (d, $^4J_{C,P} = 3.1$ Hz, C-4), 132.2 (d, $^2J_{C,P} = 10.7$ Hz, C-2, C-6), 128.7 (d, $^1J_{C,P} = 194.5$ Hz, C-1), 127.8 (C-2'', C-8''), 127.4 (C-4'', C-6''), 127.3 (d, $^3J_{C,P} = 15.7$ Hz, C-3, C-5), 124.1 (C-4a'', C-5a''), 123.2 (C-3'', C-7''), 116.0 (C-1'', C-9''), 62.5 (d, $^2J_{C,P} = 5.8$ Hz, $\underline{CH_2}CH_3$), 52.8 (C-1'), 16.6 (d, $^3J_{C,P} = 6.7$ Hz, $CH_2\underline{CH_3}$)

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ (cm^{-1}) = 3061, 2979, 2924, 2853, 1593, 1464, 1367, 1256, 1219, 1130, 1041, 990, 747, 621, 523

MS (ESI): $m/z = 398$ $[M+H]^+$, 300

HRMS (ESI): $m/z = 398.0975$ $[M+H]^+$ berechnet für $C_{21}H_{21}NO_3PS^+$ 398.0974

HPLC (Methode IIIb, MeOH): > 99 % ($\lambda = 210$ nm), > 99 % ($\lambda = 254$ nm)

4-(10*H*-Phenothiazin-10-yl)benzonitril (60)(Literaturbekannte Substanz^[180], hergestellt in Anlehnung an Arbeitsvorschrift C) $C_{19}H_{12}N_2S$ $M_r = 300.38$

602 mg (3.02 mmol) 10*H*-Phenothiazin (**23**) wurden unter N_2 -Atmosphäre in 1.5 mL trockenem DMF unter Rühren gelöst, auf 0 °C gekühlt und tropfenweise 6.00 mL (6.00 mmol) 1 M Lithiumhexamethyldisilazid in Toluol hinzugefügt. Nach 30 min wurde eine Lösung von 620 mg (5.12 mmol) 4-Fluorbenzonitril (**59**) in 0.5 mL trockenem DMF zugegeben und das Reaktionsgemisch 17 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde die Lösung auf Wasser gegeben und dreimal mit Dichlormethan (je 30 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit gesättigter wässriger Kochsalzlösung gewaschen und über Magnesiumsulfat getrocknet. Nach Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum wurde das Rohprodukt mittels Säulenchromatographie (*iso*-Hexan/Dichlormethan = 6:4, $R_f = 0.3$) aufgereinigt.

Ausbeute: 46 % 413 mg weiße Kristalle

Schmelzpunkt/-bereich: 157 – 158 °C
(Lit.: 159 °C)^[180]

1H NMR (400 MHz, CD_2Cl_2): δ (ppm) = 7.54 – 7.46 (m, 2H, 2'-H, 6'-H), 7.44 (ddd, $J = 7.7$, 1.4, 0.5 Hz, 2H, 4''-H, 6''-H), 7.32 (ddd, $J = 8.3$, 6.9, 1.4 Hz, 2H, 2''-H, 8''-H), 7.28 (ddd, $J = 8.0$, 1.9, 0.5 Hz, 2H, 1''-H, 9''-H), 7.21 (ddd, $J = 7.7$, 6.9, 1.9 Hz, 2H, 3''-H, 7''-H), 7.12 – 7.06 (m, 2H, 3'-H, 5'-H)

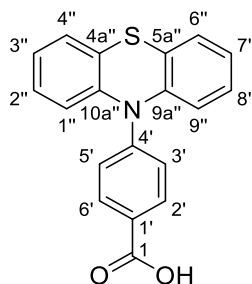
^{13}C NMR (126 MHz, CD_2Cl_2): δ (ppm) = 149.4 (C-4'), 141.6 (C-9a'', C-10a''), 134.1 (C-2', C-6'), 133.3 (C-4a'', C-5a''), 129.3 (C-4'', C-6''), 128.0 (C-2'', C-8''), 126.7 (C-3'', C-7''), 126.4 (C-1'', C-9''), 119.8 (C-1), 117.5 (C-3', C-5'), 104.8 (C-1')

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ (cm^{-1}) = 3061, 2211, 1608, 1581, 1507, 1474, 1459, 1445, 1334, 1284, 1263, 1230, 1176, 1122, 1031, 825, 760, 739

MS (ESI): m/z = 393, 318 $[M+NH_4]^+$, 301 $[M+H]^+$

HRMS (ESI): m/z = 301.0795 $[M+H]^+$ berechnet für $C_{19}H_{13}N_2S^+$ 301.0794

HPLC (Methode Ia, MeCN): > 99 % ($\lambda = 210$ nm), > 99 % ($\lambda = 254$ nm)

4-(10*H*-Phenothiazin-10-yl)benzoesäure (61)(Literaturbekannte Substanz^[180]; Änderung in der Methode war erforderlich) $C_{19}H_{13}NO_2S$ $M_r = 319.38$

354 mg (1.18 mmol) 4-(10*H*-Phenothiazin-10-yl)benzonitril (**60**) und 97.0 mg (1.73 mmol) KOH wurden in 2.0 mL eines Gemisches aus Ethanol und Wasser (7:3) zum Rückfluss erhitzt. Nach 41 h wurden weitere 192 mg (3.42 mmol) KOH dazugegeben und weitere 4 h bis zur vollständigen Umsetzung (DC-Kontrolle) zum Rückfluss erhitzt. Das Reaktionsgemisch wurde auf Raumtemperatur abgekühlt, mit 4.0 mL Wasser verdünnt und mit 2 M Salzsäure angesäuert (pH 4). Der erhaltene Feststoff wurde unter Vakuum abfiltriert und mittels Säulenchromatographie (Dichlormethan/Methanol/0.1 % Essigsäure = 96:4:0.1, $R_f = 0.5$) aufgereinigt. Neben der Zielverbindung **61** wurden als zuerst eluierende Fraktion auch 99 mg (0.31 mmol) des entsprechenden primären Amids **62** erhalten.

Ausbeute: 49 % 186 mg hellbeiger Feststoff

Schmelzpunkt/-bereich: 221 – 222 °C
(Lit.: 224 °C)^[180]

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ (ppm) = 13.02 (bs, 1H, COOH), 8.03 – 7.98 (m, 2H, 2'-H, 6'-H), 7.33 (dd, $J = 7.7, 1.5$ Hz, 2H, 4''-H, 6''-H), 7.29 – 7.24 (m, 2H, 3'-H, 5'-H), 7.18 (td, $J = 7.9, 1.5$ Hz, 2H, 2''-H, 8''-H), 7.09 (td, $J = 7.5, 1.2$ Hz, 2H, 3''-H, 7''-H), 6.82 (d, $J = 8.1$ Hz, 2H, 1''-H, 9''-H)

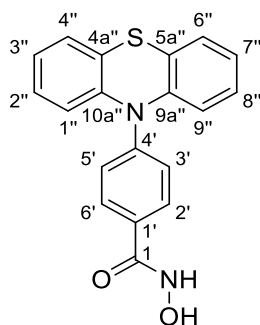
¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆): δ (ppm) = 167.3 (C-1), 146.8 (C-4'), 142.5 (C-9a'', C-10a''), 132.0 (C-2', C-6'), 128.2 (C-4'', C-6''), 128.1 (C-2'', C-8''), 128.0 (C-1'), 126.5 (C-4a'', C-5a''), 125.1 (C-3'', C-7''), 123.2 (C-3', C-5'), 121.9 (C-1'', C-9'')

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) = 3063, 2975, 2668, 2549, 1683, 1605, 1585, 1512, 1461, 1426, 1293, 1263, 1183, 1128, 840, 760, 732, 694, 551

MS (ESI): $m/z = 318$ [M-H]⁻

HRMS (ESI): $m/z = 318.0595$ [M-H]⁻ berechnet für C₁₉H₁₂NO₂S⁻ 318.0594

HPLC (Methode VIII, MeOH): > 99 % ($\lambda = 210$ nm), > 99 % ($\lambda = 254$ nm)

N-Hydroxy-4-(10*H*-phenothiazin-10-yl)benzamid (63) $C_{19}H_{14}N_2O_2S$ $M_r = 334.39$

Die Durchführung erfolgte nach Arbeitsvorschrift H. Es wurden 183 mg (0.573 mmol) 4-(10*H*-Phenothiazin-10-yl)benzoesäure (**61**) in 1.0 mL trockenem DMF, 190 μ L (1.12 mmol) *N,N*-Diisopropylethylamin, 365 mg (0.852 mmol) COMU in 0.5 mL trockenem DMF und 118 mg (1.70 mmol) Hydroxylaminhydrochlorid in 0.5 mL trockenem DMF eingesetzt. Nach einer Reaktionszeit von 14 h wurde Aufarbeitung A befolgt und die Lösung auf Wasser gegeben und dreimal mit Ethylacetat (je 50 mL) extrahiert. Das Rohprodukt wurde mittels Säulenchromatographie (Dichlormethan/Methanol/0.1 % Essigsäure = 98:2:0.1, $R_f = 0.3$) aufgereinigt. Der erhaltene Rückstand nach der Säulenchromatographie wurde erneut in Dichlormethan aufgenommen und wiederholt mit Wasser gewaschen. Dabei entstanden feine Kristalle in der organischen Phase, die unter Vakuum abfiltriert wurden.

Ausbeute: 16 % 30 mg hellgelbe Kristalle

Schmelzpunkt/-bereich: 160 – 162 °C

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6): δ (ppm) = 11.27 (s, 1H, NHOH), 9.09 (s, 1H, NH), 7.96 – 7.87 (m, 2H, 2'-H, 6'-H), 7.42 – 7.32 (m, 2H, 3'-H, 5'-H), 7.21 (dd, $J = 7.6, 1.6$ Hz, 2H, 4''-H, 6''-H), 7.07 (td, $J = 7.8, 1.6$ Hz, 2H, 2''-H, 8''-H), 6.98 (td, $J = 7.5, 1.3$ Hz, 2H, 3''-H, 7''-H), 6.50 (dd, $J = 8.2, 1.2$ Hz, 2H, 1''-H, 9''-H)

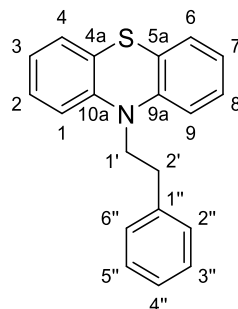
^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6): δ (ppm) = 163.6 (C-1), 144.1 (C-4'), 142.7 (C-9a'', C-10a''), 130.8 (C-1'), 129.3 (C-2', C-6'), 127.5 (C-2'', C-8''), 127.3 (C-4'', C-6''), 126.4 (C-3', C-5'), 123.8 (C-3'', C-7''), 122.9 (C-4a'', C-5a''), 118.9 (C-1'', C-9'')

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ (cm^{-1}) = 3253, 3068, 2881, 1625, 1590, 1493, 1463, 1442, 1308, 1261, 1242, 1154, 1046, 926, 891, 740, 619

MS (ESI): $m/z = 333$ [M-H] $^-$

HRMS (ESI): $m/z = 333.0704$ [M-H] $^-$ berechnet für $C_{19}H_{13}N_2O_2S^-$ 333.0703

HPLC (Methode II, MeOH): 96 % ($\lambda = 210$ nm), 97 % ($\lambda = 254$ nm)

10-Phenethyl-10*H*-phenothiazin (65)(Literaturbekannte Substanz^[189]) $C_{20}H_{17}NS$ $M_r = 303.42$

Die Durchführung erfolgte nach Arbeitsvorschrift I. Es wurden 199 mg (1.00 mmol) 10*H*-Phenothiazin (**23**) in 3.0 mL trockenem Dichlormethan und insgesamt 200 μ L (1.50 mmol) (*E/Z*)-(2-Methoxyvinyl)benzol (**64**) in zwei Portionen eingesetzt. Nach einer Reaktionszeit von 2 h wurde zweimal mit Ethylacetat (je 70 mL) extrahiert und das Rohprodukt mittels Säulenchromatographie (*iso*-Hexan bis *iso*-Hexan/Ethylacetat 95:5, $R_f = 0.3$) aufgereinigt.

Ausbeute: 92 % 280 mg weißer Feststoff

Schmelzpunkt/-bereich: 72 – 73 °C
(Lit.: 72 – 73 °C)^[189]

1H NMR (500 MHz, CD_2Cl_2): δ (ppm) = 7.33 – 7.22 (m, 5H, 2''-H, 3''-H, 4''-H, 5''-H, 6''-H), 7.19 (ddd, $J = 8.1, 7.3, 1.5$ Hz, 2H, 2-H, 8-H), 7.15 (dd, $J = 7.6, 1.5$ Hz, 2H, 4-H, 6-H), 6.97 (dd, $J = 8.3, 1.2$ Hz, 2H, 1-H, 9-H), 6.94 (td, $J = 7.5, 1.2$ Hz, 2H, 3-H, 7-H), 4.12 – 4.07 (m, 2H, 1'-H), 3.12 – 3.06 (m, 2H, 2'-H)

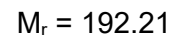
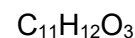
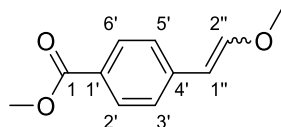
^{13}C NMR (126 MHz, CD_2Cl_2): δ (ppm) = 145.7 (C-9a, C-10a), 139.8 (C-1''), 129.3 (C-2'', C-6''), 129.0 (C-3'', C-5''), 127.9 (C-4, C-6), 127.9 (C-2, C-8), 126.9 (C-4''), 125.7 (C-4a, C-5a), 123.1 (C-3, C-7), 116.2 (C-1, C-9), 49.4 (C-1'), 33.9 (C-2')

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ (cm^{-1}) = 3059, 3024, 2988, 2933, 2872, 2858, 1589, 1487, 1458, 1335, 1286, 1244, 1174, 1106, 1042, 749, 727, 702, 629, 507

MS (ESI): $m/z = 320, 304 [M+H]^+$

HRMS (ESI): $m/z = 304.1155 [M+H]^+$ berechnet für $C_{20}H_{18}NS^+$ 304.1155

HPLC (Methode Ib, MeCN): > 99 % ($\lambda = 210$ nm), > 99 % ($\lambda = 254$ nm)

(E,Z)-4-(2-Methoxyvinyl)benzoesäuremethylester (67)(Literaturbekannte Substanz^[279])

Die Durchführung erfolgte nach Arbeitsvorschrift J. Es wurden 10.6 g (30.9 mmol) Methoxymethyltriphenylphosphoniumchlorid in 140 mL trockenem THF, 15.5 mL (31.0 mmol) 2 M Lithiumdiisopropylamid in THF/*n*-Heptan/Ethylbenzol und 4.00 g (24.4 mmol) 4-Formylbenzoesäuremethylester (**66**) in 18 mL trockenem THF bei 0 °C eingesetzt. Nach einer Reaktionszeit von 12 h wurde zweimal mit Ethylacetat (je 500 mL) extrahiert und das Rohprodukt mittels Säulenchromatographie (*iso*-Hexan/Dichlormethan = 7:3, $R_f = 0.3$) aufgereinigt.

Ausbeute: 73 % 3.44 g weißer harzartiger Feststoff

Das Produkt liegt in einem *E/Z*-Verhältnis = 1 : 0.8 vor. Zur besseren Übersicht werden die NMR-Daten der beiden Isomere hier getrennt aufgeführt.

¹H NMR (500 MHz, CD₂Cl₂):

E-Isomer: δ (ppm) = 7.90 – 7.88 (m, 2H, 2'-H, 6'-H), 7.32 – 7.27 (m, 2H, 3'-H, 5'-H), 7.20 (d, $J = 13.0$ Hz, 1H, 2''-H), 5.84 (d, $J = 13.0$ Hz, 1H, 1''-H), 3.86 (s, 3H, CH₃), 3.71 (s, 3H, 2''-OCH₃)

Z-Isomer: δ (ppm) = 7.93 – 7.90 (m, 2H, 2'-H, 6'-H), 7.64 – 7.59 (m, 2H, 3'-H, 5'-H), 6.28 (d, $J = 7.0$ Hz, 1H, 2''-H), 5.27 (d, $J = 7.0$ Hz, 1H, 1''-H), 3.86 (s, 3H, CH₃), 3.82 (s, 3H, 2''-OCH₃)

¹³C NMR (126 MHz, CD₂Cl₂):

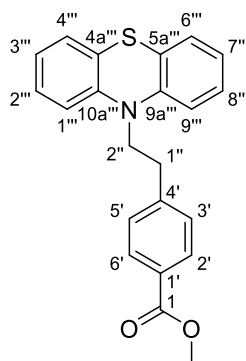
E-Isomer: δ (ppm) = 167.3 (C-1), 151.6 (C-2''), 142.1 (C-4'), 130.4 (C-2', C-6'), 127.7 (C-1'), 125.2 (C-3', C-5'), 104.8 (C-1''), 57.3 (2''-OCH₃), 52.3 (CH₃)

Z-Isomer: δ (ppm) = 167.4 (C-1), 150.8 (C-2''), 141.4 (C-4'), 129.9 (C-2', C-6'), 128.4 (C-3', C-5'), 127.6 (C-1'), 105.0 (C-1''), 61.6 (2''-OCH₃), 52.3 (CH₃)

IR (Film): $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) = 2952, 1722, 1612, 1436, 1280, 1195, 1108, 1018, 761, 731

MS (EI): m/z (%) = 192 [M]⁺ (12), 178 (6), 165 (11), 164 (18), 163 (100), 149 (13), 135 (7), 133 (9), 77 (5) 75 (6)

HRMS (EI): m/z = 192.0777 [M]⁺ berechnet für C₁₁H₁₂O₃⁺ 192.0781

4-[2-(10*H*-Phenothiazin-10-yl)ethyl]benzoesäuremethylester (68) $C_{22}H_{19}NO_2S$ $M_r = 361.46$

501 mg (2.51 mmol) 10*H*-Phenothiazin (**23**) und 1.44 g (7.49 mmol) (*E,Z*)-4-(2-Methoxyvinyl)benzoesäuremethylester (**67**) wurden in 3.8 mL trockenem Dichlormethan unter N_2 -Atmosphäre gelöst und auf 0 °C gekühlt. Dann wurden 1.88 mL (24.4 mmol) Trifluoressigsäure und 4.00 mL (25.0 mmol) Triethylsilan tropfenweise hinzugefügt. Nach 1 h wurde vorsichtig 50 mL 2 M Natriumhydroxid-Lösung zugegeben und dreimal mit Dichlormethan (je 50 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit gesättigter wässriger Kochsalzlösung gewaschen und über Magnesiumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und das Rohprodukt mittels Säulenchromatographie (Dichlormethan/*iso*-Hexan = 1:1, R_f = 0.4) aufgereinigt.

Ausbeute: 81 % 731 mg hellgelbe Kristalle

Schmelzpunkt/-bereich: 91 – 92 °C

1H NMR (500 MHz, CD_2Cl_2): δ (ppm) = 7.96 – 7.91 (m, 2H, 2'-H, 6'-H), 7.35 – 7.30 (m, 2H, 3'-H, 5'-H), 7.19 (td, J = 7.9, 1.5 Hz, 2H, 2'''-H, 8'''-H), 7.15 (dd, J = 8.0, 1.3 Hz, 2H, 4'''-H, 6'''-H), 6.98 – 6.92 (m, 4H, 1'''-H, 3'''-H, 7'''-H, 9'''-H), 4.15 – 4.10 (m, 2H, 2''-H), 3.87 (s, 3H, CH_3), 3.17 – 3.11 (m, 2H, 1''-H)

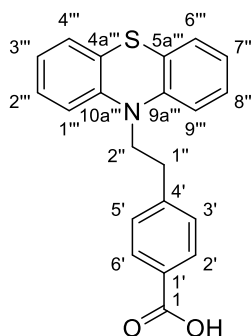
^{13}C NMR (126 MHz, CD_2Cl_2): δ (ppm) = 167.3 (C-1), 145.6 (C-9a''', C-10a'''), 145.2 (C-4'), 130.1 (C-2', C-6'), 129.4 (C-3', C-5'), 129.0 (C-1'), 128.0 (C-4''', C-6'''), 127.9 (C-2''', C-8'''), 126.0 (C-4a''', C-5a'''), 123.2 (C-3''', C-7'''), 116.2 (C-1''', C-9'''), 52.4 (CH_3), 48.8 (C-2''), 33.8 (C-1'')

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ (cm^{-1}) = 3055, 3029, 3005, 2951, 2853, 1713, 1609, 1569, 1484, 1457, 1429, 1335, 1284, 1245, 1177, 1113, 1018, 751, 730, 706

MS (ESI): m/z = 362 [$M+H$] $^+$

HRMS (ESI): m/z = 362.1207 [$M+H$] $^+$ berechnet für $C_{22}H_{20}NO_2S^+$ 362.1209

HPLC (Methode Ia, MeCN): > 99 % (λ = 210 nm), > 99 % (λ = 254 nm)

4-[2-(10*H*-Phenothiazin-10-yl)ethyl]benzoesäure (69) $C_{21}H_{17}NO_2S$ $M_r = 347.43$

Die Durchführung erfolgte nach Arbeitsvorschrift D. Es wurden 318 mg (0.880 mmol) 4-[2-(10*H*-Phenothiazin-10-yl)ethyl]benzoesäuremethylester (**68**), 540 μ L (1.08 mmol) 2 M Natriumhydroxid-Lösung in 6.0 mL eines 1,4-Dioxan/Wasser-Gemisches (1:1) eingesetzt. Nach einer Reaktionszeit von 3 h bei 60 °C wurde der erhaltene Feststoff bei 60 °C getrocknet.

Ausbeute: 92 % 280 mg weißer Feststoff

Schmelzpunkt/-bereich: 165 – 166 °C

1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6): δ (ppm) = 12.83 (bs, 1H, COOH), 7.91 – 7.76 (m, 2H, 2'-H, 6'-H), 7.46 – 7.33 (m, 2H, 3'-H, 5'-H), 7.22 (td, J = 7.6, 1.5 Hz, 2H, 2'''-H, 8'''-H), 7.16 (dd, J = 7.6, 1.5 Hz, 2H, 4'''-H, 6'''-H), 7.12 (dd, J = 8.3, 1.1 Hz, 2H, 1'''-H, 9'''-H), 6.96 (td, J = 7.4, 1.1 Hz, 2H, 3'''-H, 7'''-H), 4.22 – 4.03 (m, 2H, 2''-H), 3.13 – 2.97 (m, 2H, 1''-H)

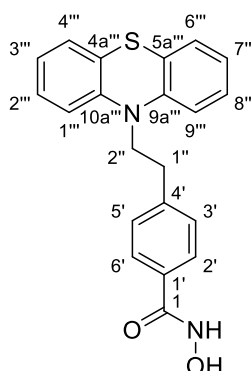
^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6): δ (ppm) = 167.2 (C-1), 144.5 (C-9a''', C-10a'''), 144.4 (C-4'), 129.3 (C-2', C-6'), 129.0 (C-3', C-5'), 128.8 (C-1'), 127.7 (C-2''', C-8'''), 127.2 (C-4''', C-6'''), 124.0 (C-4a''', C-5a'''), 122.6 (C-3''', C-7'''), 116.1 (C-1''', C-9'''), 47.6 (C-2''), 32.5 (C-1'')

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ (cm^{-1}) = 3059, 2973, 2945, 2847, 2665, 2547, 1686, 1609, 1572, 1459, 1422, 1315, 1285, 1247, 1179, 1106, 1018, 750, 647

MS (ESI): m/z = 346 [M-H] $^-$

HRMS (ESI): m/z = 346.0905 [M-H] $^-$ berechnet für $C_{21}H_{16}NO_2S^-$ 346.0907

HPLC (Methode VIII, MeOH): > 99 % (λ = 210 nm), > 99 % (λ = 254 nm)

4-[2-(10*H*-Phenothiazin-10-yl)ethyl]-*N*-hydroxybenzamid (70) $C_{21}H_{18}N_2O_2S$ $M_r = 362.45$

Die Durchführung erfolgte nach Arbeitsvorschrift H. Es wurden 205 mg (0.590 mmol) 4-[2-(10*H*-Phenothiazin-10-yl)ethyl]benzoesäure (**69**) in 1.5 mL trockenem DMF, 200 μ L (1.18 mmol) *N,N*-Diisopropylethylamin, 379 mg (0.885 mmol) COMU in 0.6 mL trockenem DMF und 124 mg (1.78 mmol) Hydroxylaminhydrochlorid in 0.6 mL trockenem DMF eingesetzt. Nach einer Reaktionszeit von 4 h wurde Aufarbeitung B befolgt und das Rohprodukt mittels Säulenchromatographie (Dichlormethan/Methanol/0.1 % Essigsäure = 98:2:0.1, $R_f = 0.2$) aufgereinigt. Nach Waschen mit Wasser wurde der Feststoff bei 50 °C getrocknet. Der erhaltene Rückstand nach der Säulenchromatographie wurde erneut in Dichlormethan aufgenommen und die Lösung wiederholt mit Wasser gewaschen. Dabei entstanden feine Kristalle in der organischen Phase, die unter Vakuum abfiltriert wurden.

Ausbeute: 50 % 107 mg hellbeige Kristalle

Schmelzpunkt/-bereich: 149 – 151 °C

1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6): δ (ppm) = 11.15 (s, 1H, $NHOH$), 8.97 (s, 1H, $NHOH$), 7.76 – 7.57 (m, 2H, 2'-H, 6'-H), 7.46 – 7.31 (m, 2H, 3'-H, 5'-H), 7.23 (t, $J = 7.7$ Hz, 2H, 2'''-H, 8'''-H), 7.16 (d, $J = 7.4$ Hz, 2H, 4'''-H, 6'''-H), 7.12 (d, $J = 8.1$ Hz, 2H, 1'''-H, 9'''-H), 6.96 (t, $J = 7.4$ Hz, 2H, 3'''-H, 7'''-H), 4.11 (t, $J = 7.2$ Hz, 2H, 2''-H), 3.02 (t, $J = 7.2$ Hz, 2H, 1''-H)

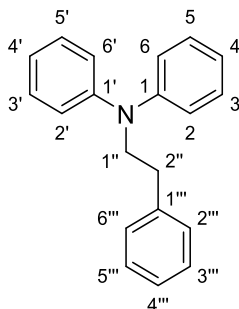
^{13}C NMR (126 MHz, DMSO- d_6): δ (ppm) = 164.1 (C-1), 144.6 (C-9a''', C-10a'''), 142.5 (C-4'), 130.7 (C-1'), 128.8 (C-3', C-5'), 127.7 (C-2''', C-8'''), 127.2 (C-4''', C-6'''), 126.9 (C-2', C-6'), 123.9 (C-4a''', C-5a'''), 122.6 (C-3''', C-7'''), 116.0 (C-1''', C-9'''), 47.7 (C-2''), 32.3 (C-1'')

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ (cm^{-1}) = 3171, 3061, 2855, 1624, 1569, 1485, 1458, 1336, 1283, 1249, 1159, 1035, 1015, 905, 752

MS (ESI): $m/z = 363$ $[M+H]^+$

HRMS (ESI): $m/z = 363.1160$ $[M+H]^+$ berechnet für $C_{21}H_{19}N_2O_2S^+$ 363.1162

HPLC (Methode Ib, MeOH): > 99 % ($\lambda = 210$ nm), > 99 % ($\lambda = 254$ nm)

N-Phenethyl-N-phenylanilin (91)(Literaturbekannte Substanz^[188]) $C_{20}H_{19}N$ $M_r = 273.38$

Die Durchführung erfolgte nach Arbeitsvorschrift I. Es wurden 169 mg (1.00 mmol) Diphenylamin (**90**) in 1.5 mL trockenem Dichlormethan und insgesamt 390 μ L (2.90 mmol) (*E/Z*)-(2-Methoxyvinyl)benzol (**64**) eingesetzt. Nach einer Reaktionszeit von 5 h wurde dreimal mit Dichlormethan (je 20 mL) extrahiert und das Rohprodukt mittels Säulenchromatographie (*iso*-Hexan/Dichlormethan 98:2, $R_f = 0.2$) aufgereinigt.

Ausbeute: 70 % 190 mg hellbeiger Feststoff

Schmelzpunkt/-bereich: 60 – 62 °C

1H NMR (400 MHz, CD_2Cl_2): δ (ppm) = 7.35 – 7.17 (m, 9H, 3-H, 5-H, 3'-H, 5'-H, 2''-H, 3''-H, 4''-H, 5''-H, 6''-H), 7.00 – 6.92 (m, 6H, 2-H, 4-H, 6-H, 2'-H, 4'-H, 6'-H), 3.97 – 3.90 (m, 2H, 1''-H), 2.99 – 2.92 (m, 2H, 2''-H)

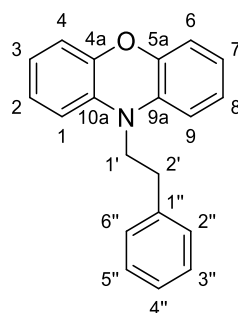
^{13}C NMR (101 MHz, CD_2Cl_2): δ (ppm) = 148.4 (C-1, C-1'), 140.2 (C-1''), 129.8 (C-3, C-5, C-3', C-5'), 129.4 (C-2'', C-6''), 129.0 (C-3'', C-5''), 126.8 (C-4''), 121.8 (C-4, C-4'), 121.5 (C-2, C-6, C-2', C-6'), 54.5 (C-1''), 34.2 (C-2'')

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ (cm^{-1}) = 3058, 3025, 3002, 2954, 2925, 2870, 1589, 1495, 1450, 1373, 1354, 1277, 1245, 1181, 1094, 1069, 1019, 748, 727, 699, 554

MS (ESI): $m/z = 274$ $[M+H]^+$

HRMS (ESI): $m/z = 274.1591$ $[M+H]^+$ berechnet für $C_{20}H_{20}N^+$ 274.1590

HPLC (Methode Ib, MeCN): 98 % ($\lambda = 210$ nm), 99 % ($\lambda = 254$ nm)

10-Phenethyl-10H-phenoxazin (92) $C_{20}H_{17}NO$ $M_r = 287.36$

Die Durchführung erfolgte nach Arbeitsvorschrift I. Es wurden 183 mg (1.00 mmol) 10H-Phenoxazin in 3.0 mL trockenem Dichlormethan und insgesamt 260 μ L (1.90 mmol) (*E/Z*)-(2-Methoxyvinyl)benzol (**64**) in zwei Portionen eingesetzt. Nach einer Reaktionszeit von 4 h wurde zweimal mit Ethylacetat (je 60 mL) extrahiert und das Rohprodukt mittels Säulenchromatographie (*iso*-Hexan, $R_f = 0.4$) aufgereinigt.

Ausbeute: 55 % 157 mg hellbeiger Feststoff

Schmelzpunkt/-bereich: 71 – 73 °C

1H NMR (400 MHz, CD_2Cl_2): δ (ppm) = 7.39 – 7.31 (m, 4H, 2''-H, 3''-H, 5''-H, 6''-H), 7.29 – 7.24 (m, 1H, 4''-H), 6.84 (ddd, $J = 8.0, 7.1, 1.9$ Hz, 2H, 2-H, 8-H), 6.67 (ddd, $J = 7.8, 7.2, 1.3$ Hz, 2H, 3-H, 7-H), 6.65 – 6.59 (m, 4H, 1-H, 4-H, 6-H, 9-H), 3.77 – 3.70 (m, 2H, 1'-H), 2.99 – 2.92 (m, 2H, 2'-H)

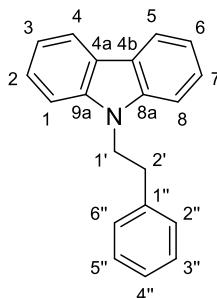
^{13}C NMR (101 MHz, CD_2Cl_2): δ (ppm) = 145.5 (C-4a, C-5a), 139.3 (C-1''), 133.6 (C-9a, C-10a), 129.3 (C-2'', C-6''/C-3'', C-5''), 129.2 (C-3'', C-5''/C-2'', C-6''), 127.1 (C-4''), 124.3 (C-2, C-8), 121.4 (C-3, C-7), 115.8 (C-4, C-6), 112.0 (C-1, C-9), 46.2 (C-1'), 31.7 (C-2')

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ (cm^{-1}) = 3062, 3026, 2959, 2924, 2900, 2866, 1629, 1592, 1492, 1383, 1327, 1312, 1275, 1133, 1066, 907, 848, 737, 704, 517

MS (ESI): $m/z = 288$ $[M+H]^+$

HRMS (ESI): $m/z = 288.1384$ $[M+H]^+$ berechnet für $C_{20}H_{18}NO^+$ 288.1383

HPLC (Methode Ib, MeCN): 99 % ($\lambda = 210$ nm), 99 % ($\lambda = 254$ nm)

9-Phenethyl-9H-carbazol (93)(Literaturbekannte Substanz^[192]) $C_{20}H_{17}N$ $M_r = 271.36$

Die Durchführung erfolgte nach Arbeitsvorschrift I. Es wurden 167 mg (1.00 mmol) Carbazol in 3.0 mL trockenem Dichlormethan und insgesamt 260 μ L (1.90 mmol) (*E/Z*)-(2-Methoxyvinyl)benzol (**64**) in zwei Portionen eingesetzt. Nach einer Reaktionszeit von 4 h wurde zweimal mit Ethylacetat (je 60 mL) extrahiert und das Rohprodukt mittels Säulenchromatographie (*iso*-Hexan, $R_f = 0.3$) aufgereinigt.

Ausbeute: 54 % 145 mg weißer Feststoff

Schmelzpunkt/-bereich: 105 – 108 °C

1H NMR (400 MHz, CD_2Cl_2): δ (ppm) = 8.10 (ddd, $J = 7.8, 1.2, 0.8$ Hz, 2H, 4-H, 5-H), 7.44 (ddd, $J = 8.2, 7.0, 1.2$ Hz, 2H, 2-H, 7-H), 7.37 (dt, $J = 8.2, 0.9$ Hz, 2H, 1-H, 8-H), 7.29 – 7.17 (m, 7H, 3-H, 6-H, 2''-H, 3''-H, 4''-H, 5''-H, 6''-H), 4.57 – 4.51 (m, 2H, 1'-H), 3.17 – 3.11 (m, 2H, 2'-H)

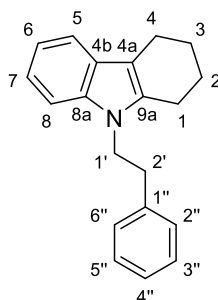
^{13}C NMR (101 MHz, CD_2Cl_2): δ (ppm) = 140.8 (C-8a, C-9a), 139.4 (C-1''), 129.4 (C-2'', C-6''), 129.1 (C-3'', C-5''), 127.1 (C-4''), 126.1 (C-2, C-7), 123.3 (C-4a, C-4b), 120.7 (C-4, C-5), 119.4 (C-3, C-6), 109.2 (C-1, C-8), 45.4 (C-1'), 35.6 (C-2')

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ (cm^{-1}) = 3049, 3027, 2929, 2878, 2855, 1595, 1484, 1452, 1350, 1326, 1236, 1185, 1152, 1127, 1063, 998, 749, 726, 703, 542

MS (EI): m/z (%) = 271 [M] $^+$ (28), 180 (100), 152 (14), 91 (5)

HRMS (EI): m/z = 271.1357 [M] $^+$ berechnet für $C_{20}H_{17}N^{+}$ 271.1356

HPLC (Methode Ib, MeCN): 95 % ($\lambda = 210$ nm), 95 % ($\lambda = 254$ nm)

9-Phenethyl-2,3,4,9-tetrahydro-1H-carbazol (94)(Literaturbekannte Substanz^[280]) $C_{20}H_{21}N$ $M_r = 275.40$

Die Durchführung erfolgte nach Arbeitsvorschrift I. Es wurden 172 mg (1.00 mmol) 2,3,4,9-Tetrahydro-1H-carbazol in 1.5 mL trockenem Dichlormethan und insgesamt 390 μ L (2.90 mmol) (*E/Z*)-(2-Methoxyvinyl)benzol (**64**) eingesetzt. Nach einer Reaktionszeit von 9 h wurde dreimal mit Dichlormethan (je 20 mL) extrahiert und das Rohprodukt mittels Säulenchromatographie (*iso*-Hexan/Dichlormethan 98:2, $R_f = 0.2$) aufgereinigt.

Ausbeute: 48 % 131 mg hellgelbes Öl

1H NMR (400 MHz, CD_2Cl_2): δ (ppm) = 7.45 (dt, $J = 7.8, 1.0$ Hz, 1H, 5-H), 7.33 – 7.18 (m, 4H, 8-H, 3''-H, 4''-H, 5''-H), 7.12 (ddd, $J = 8.2, 7.0, 1.3$ Hz, 1H, 7-H), 7.08 – 7.01 (m, 3H, 6-H, 2''-H, 6''-H), 4.25 – 4.20 (m, 2H, 1'-H), 3.03 – 2.96 (m, 2H, 2'-H), 2.74 – 2.65 (m, 2H, 4-H), 2.41 – 2.37 (m, 2H, 1-H), 1.87 – 1.75 (m, 4H, 2-H, 3-H)

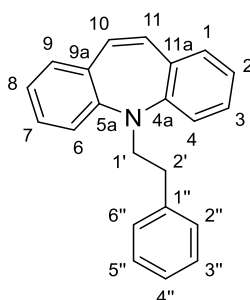
^{13}C NMR (101 MHz, CD_2Cl_2): δ (ppm) = 139.6 (C-1''), 136.4 (C-8a), 136.2 (C-9a), 129.5 (C-2'', C-6''), 129.0 (C-3'', C-5''), 128.3 (C-4b), 127.0 (C-4''), 120.8 (C-7), 119.0 (C-6), 118.2 (C-5), 109.6 (C-4a), 109.2 (C-8), 45.2 (C-1'), 37.0 (C-2'), 23.9 (C-2/C-3), 23.8 (C-3/C-2), 22.5 (C-1), 21.6 (C-4)

IR (Film): $\tilde{\nu}$ (cm^{-1}) = 3084, 3053, 3026, 2929, 2877, 2851, 2837, 1613, 1496, 1467, 1426, 1372, 1357, 1316, 1238, 1177, 1012, 737, 700

MS (ESI): $m/z = 276$ $[M+H]^+$

HRMS (ESI): $m/z = 276.1747$ $[M+H]^+$ berechnet für $C_{20}H_{22}N^+$ 276.1747

HPLC (Methode Ic, MeCN): 98 % ($\lambda = 210$ nm), 93 % ($\lambda = 254$ nm)

5-Phenethyl-5H-dibenz[b,f]azepin (95) $C_{22}H_{19}N$ $M_r = 297.40$

Die Durchführung erfolgte nach Arbeitsvorschrift I. Es wurden 199 mg (1.03 mmol) 5H-Dibenz[b,f]azepin in 3.5 mL trockenem Dichlormethan und insgesamt 520 μ L (3.90 mmol) (E/Z)-(2-Methoxyvinyl)benzol (**64**) eingesetzt. Nach einer Reaktionszeit von 71 h wurde zweimal mit Dichlormethan (je 80 mL) extrahiert und das Rohprodukt mittels Säulenchromatographie (iso-Hexan bis iso-Hexan/Ethylacetat 95:5, $R_f = 0.2$) aufgereinigt.

Ausbeute: 80 % 245 mg rotbraunes Öl

1H NMR (400 MHz, CD_2Cl_2): δ (ppm) = 7.29 (ddd, $J = 8.2, 7.2, 1.7$ Hz, 2H, 3-H, 7-H), 7.29 – 7.24 (m, 2H, 3''-H, 5''-H), 7.23 – 7.14 (m, 3H, 2''-H, 4''-H, 6''-H), 7.09 (dd, $J = 7.5, 1.8$ Hz, 2H, 1-H, 9-H), 7.08 (dd, $J = 8.1, 0.9$ Hz, 2H, 4-H, 6-H), 7.01 (td, $J = 7.3, 1.1$ Hz, 2H, 2-H, 8-H), 6.73 (s, 2H, 10-H, 11-H), 3.97 – 3.92 (m, 2H, 1'-H), 2.87 – 2.81 (m, 2H, 2'-H)

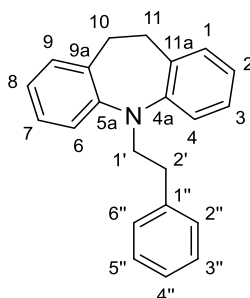
^{13}C NMR (101 MHz, CD_2Cl_2): δ (ppm) = 151.4 (C-4a, C-5a), 140.6 (C-1''), 134.5 (C-9a, C-11a), 132.6 (C-10, C-11), 129.7 (C-1, C-9), 129.5 (C-2'', C-6''), 129.4 (C-3, C-7), 128.8 (C-3'', C-5''), 126.6 (C-4''), 123.9 (C-2, C-8), 120.9 (C-4, C-6), 53.0 (C-1'), 34.8 (C-2')

IR (Film): $\tilde{\nu}$ (cm^{-1}) = 3060, 3023, 2926, 2844, 1593, 1484, 1459, 1436, 1322, 1232, 1179, 1116, 1030, 939, 907, 788, 767, 699

MS (ESI): $m/z = 298$ $[M+H]^+$

HRMS (ESI): $m/z = 298.1590$ $[M+H]^+$ berechnet für $C_{22}H_{20}N^+$ 298.1590

HPLC (Methode Ib, MeCN): 97 % ($\lambda = 210$ nm), 98 % ($\lambda = 254$ nm)

5-Phenethyl-10,11-dihydro-5H-dibenz[*b,f*]azepin (96)C₂₂H₂₁NM_r = 299.42

Die Durchführung erfolgte nach Arbeitsvorschrift I. Es wurden 195 mg (1.00 mmol) 10,11-Dihydro-5H-dibenz[*b,f*]azepin in 3.0 mL trockenem Dichlormethan und insgesamt 390 μ L (2.90 mmol) (*E/Z*)-(2-Methoxyvinyl)benzol (**64**) eingesetzt. Nach einer Reaktionszeit von 8 h wurde zweimal mit Dichlormethan (je 80 mL) extrahiert und das Rohprodukt mittels Säulenchromatographie (*iso*-Hexan bis *iso*-Hexan/Ethylacetat 95:5, *R_f* = 0.3) aufgereinigt.

Ausbeute: 75 % 225 mg hellgelbes Öl

¹H NMR (400 MHz, CD₂Cl₂): δ (ppm) = 7.28 – 7.21 (m, 2H, 3''-H, 5''-H), 7.21 – 7.16 (m, 1H, 4''-H), 7.15 – 7.12 (m, 4H, 3-H, 4-H, 6-H, 7-H), 7.12 – 7.05 (m, 4H, 1-H, 9-H, 2''-H, 6''-H), 6.95 – 6.89 (m, 2H, 2-H, 8-H), 4.04 – 3.95 (m, 2H, 1'-H), 2.97 (s, 4H, 10-H, 11-H), 2.90 – 2.82 (m, 2H, 2'-H)

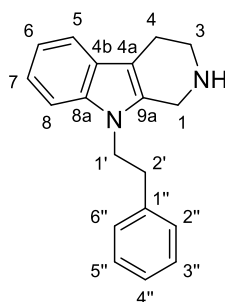
¹³C NMR (101 MHz, CD₂Cl₂): δ (ppm) = 148.8 (C-4a, C-5a), 140.6 (C-1''), 135.0 (C-9a, C-11a), 130.3 (C-1, C-9), 129.3 (C-2'', C-6''), 128.8 (C-3'', C-5''), 126.9 (C-3, C-7), 126.6 (C-4''), 123.0 (C-2, C-8), 120.5 (C-4, C-6), 52.8 (C-1'), 34.9 (C-2'), 32.4 (C-10, C-11)

IR (Film): $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) = 3061, 3025, 2918, 2839, 1596, 1487, 1469, 1455, 1332, 1249, 1229, 1125, 1111, 1030, 916, 763, 747, 699

MS (ESI): *m/z* = 300 [M+H]⁺

HRMS (ESI): *m/z* = 300.1747 [M+H]⁺ berechnet für C₂₂H₂₂N⁺ 300.1747

HPLC (Methode Ib, MeCN): > 99 % (λ = 210 nm), > 99 % (λ = 254 nm)

9-Phenethyl-2,3,4,9-tetrahydro-1H-pyrido[3,4-b]indol (97) $C_{19}H_{20}N_2$ $M_r = 276.38$

Die Durchführung erfolgte nach Arbeitsvorschrift I. Es wurden 173 mg (1.00 mmol) 2,3,4,9-Tetrahydro-1H-pyrido[3,4-b]indol in 2.0 mL trockenem Dichlormethan und insgesamt 390 μ L (2.90 mmol) (*E/Z*)-(2-Methoxyvinyl)benzol (**64**) eingesetzt. Nach einer Reaktionszeit von 15 h wurde dreimal mit Dichlormethan (je 20 mL) extrahiert. Das Rohprodukt wurde mittels Säulenchromatographie (Dichlormethan/Methanol 98:2, $R_f = 0.2$) und anschließender Ausfällung aus Dichlormethan mit *iso*-Hexan aufgereinigt.

Ausbeute: 20 % 54 mg hellbeiger Feststoff

Schmelzpunkt/-bereich: 216 – 219 °C

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6): δ (ppm) = 9.68 (bs, 1H, NH), 7.48 (dd, $J = 7.9, 1.0$ Hz, 2H, 5-H, 8-H), 7.32 – 7.18 (m, 3H, 3''-H, 4''-H, 5''-H), 7.20 – 7.11 (m, 3H, 7-H, 2''-H, 6''-H), 7.05 (td, $J = 7.3, 1.0$ Hz, 1H, 6-H), 4.34 – 4.26 (m, 2H, 1'-H), 4.08 (s, 2H, 1-H), 3.31 – 3.25 (m, 2H, 3-H), 2.96 – 2.88 (m, 4H, 4-H, 2'-H)

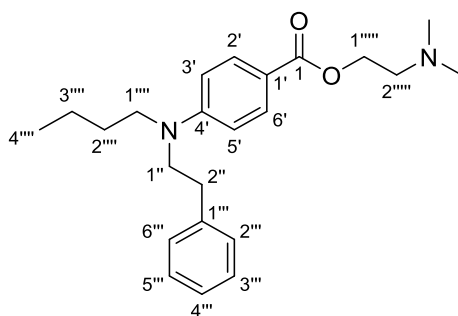
^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6): δ (ppm) = 138.5 (C-1''), 136.0 (C-8a), 129.0 (C-2'', C-6''), 128.3 (C-3'', C-5''), 128.0 (C-9a), 126.5 (C-4''), 125.8 (C-4b), 121.6 (C-7), 119.1 (C-6), 118.0 (C-5), 109.7 (C-8), 105.5 (C-4a), 44.5 (C-1'), 41.2 (C-3), 39.1 (C-1), 35.7 (C-2'), 18.2 (C-4)

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ (cm^{-1}) = 3418, 3054, 3024, 2925, 2782, 2703, 2657, 2631, 2452, 1583, 1465, 1344, 1177, 1066, 880, 738, 706, 532

MS (ESI): $m/z = 277$ $[\text{M}+\text{H}]^+$

HRMS (ESI): $m/z = 277.1699$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ berechnet für $C_{19}H_{21}N_2^+$ 277.1699

HPLC (Methode VI, MeCN): > 99 % ($\lambda = 210$ nm), > 99 % ($\lambda = 254$ nm)

2-(Dimethylamino)ethyl 4-[N-butyl-N-(phenethyl)amino]benzoat (99) $C_{23}H_{32}N_2O_2$ $M_r = 368.52$

Die Durchführung erfolgte nach Arbeitsvorschrift I. Es wurden 265 mg (1.00 mmol) 2-(Dimethylamino)ethyl-4-(butylamino)benzoat in 1.0 mL trockenem Dichlormethan und insgesamt 390 μ L (2.90 mmol) (*E/Z*)-(2-Methoxyvinyl)benzol (**64**) eingesetzt. Nach einer Reaktionszeit von 9 h wurde dreimal mit Dichlormethan (je 20 mL) extrahiert und das Rohprodukt mittels Säulenchromatographie (Dichlormethan/MeOH 95:5, $R_f = 0.3$) aufgereinigt.

Ausbeute: 85 % 315 mg hellgelbes Öl

1H NMR (400 MHz, CD_2Cl_2): δ (ppm) = 7.89 – 7.83 (m, 2H, 2'-H, 6'-H), 7.34 – 7.28 (m, 2H, 3'''-H, 5'''-H), 7.26 – 7.20 (m, 3H, 2'''-H, 4'''-H, 6'''-H), 6.70 – 6.64 (m, 2H, 3'-H, 5'-H), 4.32 (t, $J = 5.8$ Hz, 2H, 1''''-H), 3.60 – 3.54 (m, 2H, 1''-H), 3.30 – 3.23 (m, 2H, 1'''-H), 2.92 – 2.86 (m, 2H, 2''-H), 2.65 (t, $J = 5.8$ Hz, 2H, 2''''-H), 2.30 (s, 6H, CH_3 , CH_3), 1.62 – 1.49 (m, 2H, 2'''-H), 1.34 (m, 2H, 3'''-H), 0.94 (t, $J = 7.3$ Hz, 3H, 4'''-H)

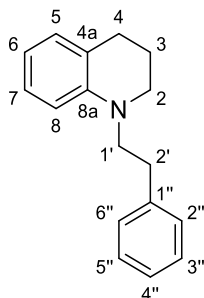
^{13}C NMR (101 MHz, CD_2Cl_2): δ (ppm) = 167.1 (C-1), 151.7 (C-4'), 139.9 (C-1'''), 131.9 (C-2', C-6'), 129.3 (C-2'', C-6''), 129.1 (C-3'', C-5''), 126.9 (C-4''), 117.0 (C-1'), 111.0 (C-3', C-5'), 62.7 (C-1'''''), 58.6 (C-2'''''), 53.3 (C-1''), 51.4 (C-1'''''), 46.1 (CH_3 , CH_3), 33.9 (C-2''), 29.8 (C-2'''''), 20.8 (C-3'''''), 14.3 (C-4''''')

IR (Film): $\tilde{\nu}$ (cm^{-1}) = 3085, 3061, 3027, 2956, 2871, 2820, 2769, 1703, 1606, 1523, 1455, 1402, 1365, 1277, 1183, 1112, 828, 768, 700

MS (ESI): $m/z = 369$ $[M+H]^+$

HRMS (ESI): $m/z = 369.2533$ $[M+H]^+$ berechnet für $C_{23}H_{33}N_2O_2^+$ 369.2537

HPLC (Methode VI, MeCN): > 99 % ($\lambda = 210$ nm), > 99 % ($\lambda = 254$ nm)

1-Phenethyl-1,2,3,4-tetrahydroquinolin (100)(Literaturbekannte Substanz^[281]) $C_{17}H_{19}N$ $M_r = 237.35$

Die Durchführung erfolgte nach Arbeitsvorschrift I. Es wurden 136 mg (1.02 mmol) 1,2,3,4-Tetrahydrochinolin in 1.5 mL trockenem Dichlormethan und insgesamt 390 μ L (2.90 mmol) (*E/Z*)-(2-Methoxyvinyl)benzol (**64**) eingesetzt. Nach einer Reaktionszeit von 6 h wurde dreimal mit Dichlormethan (je 20 mL) extrahiert und das Rohprodukt mittels Säulenchromatographie (*iso*-Hexan/Dichlormethan 9:1, $R_f = 0.1$) aufgereinigt.

Ausbeute: 55 % 133 mg farbloses Öl

1H NMR (400 MHz, CD_2Cl_2): δ (ppm) = 7.35 – 7.29 (m, 2H, 3''-H, 5''-H), 7.28 – 7.20 (m, 3H, 2''-H, 4''-H, 6''-H), 7.04 (ddd, $J = 8.2, 7.3, 1.8$ Hz, 1H, 7-H), 6.93 (ddd, $J = 7.4, 1.9, 1.0$ Hz, 1H, 5-H), 6.65 (dd, $J = 8.2, 1.0$ Hz, 1H, 8-H), 6.54 (td, $J = 7.3, 1.1$ Hz, 1H, 6-H), 3.52 – 3.46 (m, 2H, 1'-H), 3.25 – 3.20 (m, 2H, 2-H), 2.90 – 2.84 (m, 2H, 2'-H), 2.76 – 2.70 (m, 2H, 4-H), 1.96 – 1.85 (m, 2H, 3-H)

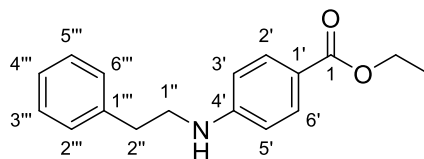
^{13}C NMR (101 MHz, CD_2Cl_2): δ (ppm) = 145.5 (C-8a), 140.7 (C-1''), 129.6 (C-5), 129.4 (C-2'', C-6''), 129.0 (C-3'', C-5''), 127.6 (C-7), 126.6 (C-4''), 123.0 (C-4a), 115.9 (C-6), 110.9 (C-8), 53.9 (C-1'), 50.1 (C-2), 32.9 (C-2'), 28.7 (C-4), 22.8 (C-3)

IR (Film): $\tilde{\nu}$ (cm^{-1}) = 3062, 3025, 2930, 2884, 2842, 1601, 1505, 1455, 1346, 1304, 1201, 1115, 1061, 994, 743, 699

MS (ESI): $m/z = 238$ $[M+H]^+$, 127

HRMS (ESI): $m/z = 238.1591$ $[M+H]^+$ berechnet für $C_{17}H_{20}N^+$ 238.1590

HPLC (Methode Ib, MeCN): 99 % ($\lambda = 210$ nm), 98 % ($\lambda = 254$ nm)

Ethyl 4-(phenethylamino)benzoat (101)(Literaturbekannte Substanz^[282]) $C_{17}H_{19}NO_2$ $M_r = 269.34$

Die Durchführung erfolgte nach Arbeitsvorschrift I. Es wurden 165 mg (1.00 mmol) 4-Aminobenzoesäureethylester in 3.0 mL trockenem Dichlormethan und insgesamt 390 μ L (2.90 mmol) (*E/Z*)-(2-Methoxyvinyl)benzol (**64**) eingesetzt. Nach einer Reaktionszeit von 77 h wurde zweimal mit Ethylacetat (je 80 mL) extrahiert und das Rohprodukt mittels Säulenchromatographie (*iso*-Hexan bis *iso*-Hexan/Ethylacetat 9:1, $R_f = 0.2$) aufgereinigt.

Ausbeute: 48 % 129 mg gelbes Öl

1H NMR (400 MHz, CD_2Cl_2): δ (ppm) = 7.85 – 7.81 (m, 2H, 2'-H, 6'-H), 7.37 – 7.30 (m, 2H, 3'''-H, 5'''-H), 7.27 – 7.21 (m, 3H, 2'''-H, 4'''-H, 6'''-H), 6.59 – 6.55 (m, 2H, 3'-H, 5'-H), 4.27 (q, $J = 7.1$ Hz, 3H, $\underline{CH_2}CH_3$, NH), 3.45 (t, $J = 7.1$ Hz, 2H, 1''-H), 2.93 (t, $J = 7.1$ Hz, 2H, 2''-H), 1.34 (t, $J = 7.1$ Hz, 3H, $CH_2\underline{CH_3}$)

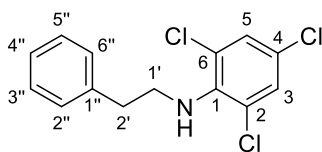
^{13}C NMR (101 MHz, CD_2Cl_2): δ (ppm) = 167.1 (C-1), 152.4 (C-4'), 139.6 (C-1'''), 131.8 (C-2', C-6'), 129.3 (C-2''', C-6'''), 129.1 (C-3''', C-5'''), 127.0 (C-4'''), 119.3 (C-1'), 112.0 (C-3', C-5'), 60.7 ($\underline{CH_2}CH_3$), 45.0 (C-1''), 35.8 (C-2''), 14.8 ($CH_2\underline{CH_3}$)

IR (Film): $\tilde{\nu}$ (cm^{-1}) = 3374, 3060, 3027, 2979, 2933, 2869, 1700, 1605, 1526, 1276, 1174, 1107, 1023, 837, 770, 699

MS (ESI): $m/z = 368, 270 [M+H]^+$

HRMS (ESI): $m/z = 270.1488 [M+H]^+$ berechnet für $C_{17}H_{20}NO_2^+$ 270.1489

HPLC (Methode IIId, MeCN): 91 % ($\lambda = 210$ nm), 91 % ($\lambda = 254$ nm)

2,4,6-Trichlor-*N*-phenethylanilin (102) $\text{C}_{14}\text{H}_{12}\text{Cl}_3\text{N}$ $M_r = 300.61$

Die Durchführung erfolgte nach Arbeitsvorschrift I. Es wurden 193 mg (0.982 mmol) 2,4,6-Trichloranilin in 2.0 mL trockenem Dichlormethan und insgesamt 260 μL (1.90 mmol) (*E/Z*)-(2-Methoxyvinyl)benzol (**64**) eingesetzt. Nach einer Reaktionszeit von 4 h wurde zweimal mit Ethylacetat (je 60 mL) extrahiert und das Rohprodukt mittels Säulenchromatographie (*iso*-Hexan bis *iso*-Hexan/Dichlormethan 87:13, $R_f = 0.2$) aufgereinigt.

Ausbeute: 52 % 156 mg hellgelbes Öl

^1H NMR (400 MHz, CD_2Cl_2): δ (ppm) = 7.33 – 7.27 (m, 2H, 3''-H, 5''-H), 7.24 (s, 2H, 3-H, 5-H), 7.23 – 7.20 (m, 3H, 2''-H, 4''-H, 6''-H), 4.08 (s, 1H, NH), 3.60 (td, $J = 6.8$ Hz, 2H, 1'-H), 2.86 (t, $J = 7.2$ Hz, 2H, 2'-H)

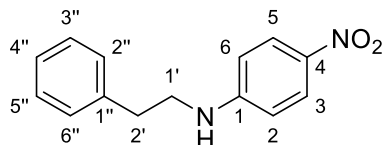
^{13}C NMR (101 MHz, CD_2Cl_2): δ (ppm) = 142.2 (C-1), 139.5 (C-1''), 129.3 (C-2'', C-6''), 129.1 (C-3, C-5, C-3'', C-5''), 127.0 (C-4''), 126.5 (C-2, C-6), 125.5 (C-4), 49.0 (C-1'), 37.5 (C-2')

IR (Film): $\tilde{\nu}$ (cm^{-1}) = 3386, 3084, 3063, 3028, 2925, 2854, 1559, 1482, 1452, 1382, 1242, 1084, 857, 798, 745, 698

MS (ESI): m/z = 304 [$(^{35}\text{Cl}^{37}\text{Cl}_2)\text{M}+\text{H}$] $^+$, 302 [$(^{35}\text{Cl}_2^{37}\text{Cl})\text{M}+\text{H}$] $^+$, 300 [$(^{35}\text{Cl}_3)\text{M}+\text{H}$] $^+$

HRMS (ESI): m/z = 300.0109 [$\text{M}+\text{H}$] $^+$ berechnet für $\text{C}_{14}\text{H}_{13}^{35}\text{Cl}_3\text{N}^+$ 300.0108

HPLC (Methode Ib, MeCN): 97 % ($\lambda = 210$ nm), 98 % ($\lambda = 254$ nm)

4-Nitro-*N*-phenethylanilin (103)(Literaturbekannte Substanz^[283]) $C_{14}H_{14}N_2O_2$ $M_r = 242.28$

Die Durchführung erfolgte nach Arbeitsvorschrift I. Es wurden 138 mg (0.999 mmol) 4-Nitroanilin in 2.5 mL trockenem Dichlormethan und insgesamt 390 μ L (2.90 mmol) (*E/Z*)-(2-Methoxyvinyl)benzol (**64**) in drei Portionen eingesetzt. Nach einer Reaktionszeit von 5 h wurde zweimal mit Ethylacetat (je 60 mL) extrahiert und das Rohprodukt mittels Säulenchromatographie (*iso*-Hexan bis *iso*-Hexan /Ethylacetat 9:1, $R_f = 0.3$) aufgereinigt.

Ausbeute: 41 % 99 mg hellgelbe Kristalle

Schmelzpunkt/-bereich: 59 – 60 °C

^1H NMR (400 MHz, CD_2Cl_2): δ (ppm) = 8.08 – 8.03 (m, 2H, 3-H, 5-H), 7.37 – 7.30 (m, 2H, 3''-H, 5''-H), 7.28 – 7.22 (m, 3H, 2''-H, 4''-H, 6''-H), 6.59 – 6.53 (m, 2H, 2-H, 6-H), 4.64 (s, 1H, NH), 3.50 (td, $J = 7.1, 5.7$ Hz, 2H, 1'-H), 2.95 (t, $J = 7.1$ Hz, 2H, 2'-H)

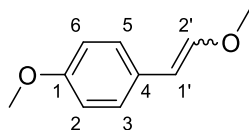
^{13}C NMR (101 MHz, CD_2Cl_2): δ (ppm) = 153.8 (C-1), 139.1 (C-1''), 138.5 (C-4), 129.3 (C-3'', C-5''), 129.2 (C-2'', C-6''), 127.2 (C-4''), 126.8 (C-3, C-5), 111.6 (C-2, C-6), 45.0 (C-1'), 35.6 (C-2')

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ (cm^{-1}) = 3347, 3083, 3026, 2932, 2889, 2858, 2789, 1601, 1535, 1470, 1293, 1184, 1108, 838, 750, 697, 661

MS (ESI): $m/z = 287$ [M+Formiat] $^-$, 241 [M-H] $^-$

HRMS (ESI): $m/z = 241.0984$ [M-H] $^-$ berechnet für $C_{14}H_{13}N_2O_2^-$ 241.0983

HPLC (Methode IIId, MeCN): > 99 % ($\lambda = 210$ nm), > 99 % ($\lambda = 254$ nm)

(E,Z)-1-Methoxy-4-(2-methoxyvinyl)benzol (107)(Literaturbekannte Substanz^[284]) $C_{10}H_{12}O_2$ $M_r = 164.20$

Die Durchführung erfolgte nach Arbeitsvorschrift J. Es wurden 6.29 g (18.3 mmol) Methoxymethyltriphenylphosphoniumchlorid in 85 mL trockenem THF, 9.20 mL (18.4 mmol) 2 M Lithiumdiisopropylamid in THF/*n*-Heptan/Ethylbenzol und 2.00 g (14.7 mmol) 4-Methoxybenzaldehyd in 11 mL trockenem THF bei 0 °C eingesetzt. Nach einer Reaktionszeit von 12 h wurde dreimal mit Ethylacetat (je 100 mL) extrahiert und das Rohprodukt mittels Säulenchromatographie (*iso*-Hexan bis *iso*-Hexan/Ethylacetat = 95:5, $R_f = 0.3$) aufgereinigt.

Ausbeute: 89 % 2.51 g farbloses Öl

Das Produkt liegt in einem *E/Z*-Verhältnis = 1:1 vor. Zur besseren Übersicht werden die NMR-Daten der beiden Isomere hier getrennt aufgeführt.

¹H NMR (500 MHz, CD₂Cl₂):

E-Isomer: δ (ppm) = 7.18 – 7.13 (m, 2H, 3-H, 5-H), 6.94 (d, $J = 13.0$ Hz, 1H, 2'-H), 6.81 – 6.79 (m, 2H, 2-H, 6-H), 5.78 (d, $J = 13.0$ Hz, 1H, 1'-H), 3.77 (s, 3H, OCH₃), 3.65 (s, 3H, 2'-OCH₃)

Z-Isomer: δ (ppm) = 7.50 – 7.47 (m, 2H, 3-H, 5-H), 6.83 – 6.81 (m, 2H, 2-H, 6-H), 6.07 (d, $J = 7.0$ Hz, 1H, 2'-H), 5.16 (d, $J = 7.0$ Hz, 1H, 1'-H), 3.78 (s, 3H, OCH₃), 3.75 (s, 3H, 2'-OCH₃)

¹³C NMR (126 MHz, CD₂Cl₂):

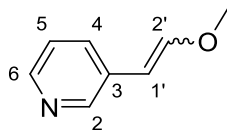
E-Isomer: δ (ppm) = 158.5 (C-1), 148.1 (C-2'), 129.5 (C-4), 126.6 (C-3, C-5), 114.6 (C-2, C-6), 105.0 (C-1'), 57.0 (2'-OCH₃), 55.7 (OCH₃)

Z-Isomer: δ (ppm) = 158.2 (C-1), 147.0 (C-2'), 129.8 (C-3, C-5), 129.4 (C-4), 114.0 (C-2, C-6), 105.4 (C-1'), 61.0 (2'-OCH₃), 55.8 (OCH₃)

IR (Film): $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) = 3033, 3002, 2954, 2935, 2907, 2834, 1653, 1606, 1510, 1463, 1246, 1177, 1151, 1094, 1035, 937, 837

MS (EI): m/z (%) = 165 (9), 164 [M^+] (100), 149 (55), 122 (5), 121 (75), 91 (7), 78 (7), 77 (7)

HRMS (EI): m/z = 164.0837 [M^+] berechnet für $C_{10}H_{12}O_2^{+}$ 164.0832

(E,Z)-3-(2-Methoxyvinyl)pyridin (108)(Literaturbekannte Substanz^[284]) C_8H_9NO $M_r = 135.17$

Die Durchführung erfolgte nach Arbeitsvorschrift J. Es wurden 6.24 g (18.2 mmol) Methoxymethyltriphenylphosphoniumchlorid in 30 mL trockenem THF, 18.2 mL (18.2 mmol) 1 M Kalium-*tert*-butanolat in THF und 1.50 g (14.0 mmol) Pyridin-3-aldehyd in 4.0 mL trockenem THF bei -78 °C eingesetzt. Nach einer Reaktionszeit von 4 h wurde das Reaktionsgemisch anstelle der Extraktion mit 50 mL *iso*-Hexan versetzt und das ausgefallene Triphenylphosphinoxid abfiltriert. Aus dem Filtrat wurde das Lösungsmittel entfernt und das Rohprodukt mittels Säulenchromatographie (Dichlormethan bis Dichlormethan/Ethanol = 97.5:2.5, $R_f = 0.2$) aufgereinigt.

Ausbeute: 80 % 1.51 g blass rötliches Öl

Das Produkt liegt in einem *E/Z*-Verhältnis = 1:0.5 vor. Zur besseren Übersicht werden die NMR-Daten der beiden Isomere hier getrennt aufgeführt.

 1H NMR (500 MHz, CD_2Cl_2):

E-Isomer: δ (ppm) = 8.45 (d, $J = 2.3$ Hz, 1H, 2-H), 8.32 (dd, $J = 4.8, 1.7$ Hz, 1H, 6-H), 7.54 (dddd, $J = 7.9, 2.3, 1.6, 0.5$ Hz, 1H, 4-H), 7.17 (dddd, $J = 7.9, 4.7, 0.9, 0.4$ Hz, 1H, 5-H), 7.10 (d, $J = 13.1$ Hz, 1H, 2'-H), 5.77 (d, $J = 13.1$ Hz, 1H, 1'-H), 3.70 (s, 3H, 2'-OCH₃)

Z-Isomer: δ (ppm) = 8.64 (d, $J = 2.1$ Hz, 1H, 2-H), 8.30 (dd, $J = 4.8, 1.6$ Hz, 1H, 6-H), 7.96 (dddd, $J = 8.0, 2.2, 1.7, 0.4$ Hz, 1H, 4-H), 7.19 (dddd, $J = 8.0, 4.8, 0.8, 0.4$ Hz, 1H, 5-H), 6.28 (d, $J = 6.9$ Hz, 1H, 2'-H), 5.20 (d, $J = 6.9$ Hz, 1H, 1'), 3.80 (s, 3H, 2'-OCH₃)

 ^{13}C NMR (126 MHz, CD_2Cl_2):

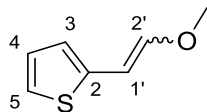
E-Isomer: δ (ppm) = 150.7 (C-2'), 147.5 (C-2), 147.3 (C-6), 132.8 (C-3), 131.8 (C-4), 123.9 (C-5), 101.8 (C-1'), 57.2 (2'-OCH₃)

Z-Isomer: δ (ppm) = 150.5 (C-2'), 149.8 (C-2), 147.0 (C-6), 135.1 (C-4), 132.8 (C-3), 123.6 (C-5), 102.3 (C-1'), 61.4 (2'-OCH₃)

IR (Film): $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) = 3030, 3006, 2937, 2834, 1639, 1567, 1416, 1337, 1283, 1246, 1207, 1152, 1122, 1098, 937, 821, 710

MS (EI): m/z (%) = 136 (8), 135 [M^+] (100), 120 (40), 92 (33), 65 (16)

HRMS (EI): m/z = 135.0678 [M^+] berechnet für $C_8H_9NO^+$ 135.0679

(E,Z)-2-(2-Methoxyvinyl)thiophen (109)(Literaturbekannte Substanz^[285]) C_7H_8OS $M_r = 140.20$

Die Durchführung erfolgte nach Arbeitsvorschrift J. Es wurden 7.64 g (22.3 mmol) Methoxymethyltriphenylphosphoniumchlorid in 100 mL trockenem THF, 11.1 mL (22.2 mmol) 2 M Lithiumdiisopropylamid in THF/*n*-Heptan/Ethylbenzol und 2.00 g (17.8 mmol) Thiophen-2-carbaldehyd in 13.0 mL trockenem THF bei 0 °C eingesetzt. Nach einer Reaktionszeit von 12 h wurde dreimal mit Ethylacetat (je 100 mL) extrahiert und aus den vereinigten organischen Phasen das Lösungsmittel entfernt. Der Rückstand wurde in *iso*-Hexan/Ethylacetat suspendiert und das ausgefallene Triphenylphosphinoxid abfiltriert. Aus dem Filtrat wurde das Lösungsmittel entfernt und das Rohprodukt mittels Säulenchromatographie (*iso*-Hexan bis *iso*-Hexan/Ethylacetat = 95:5, $R_f = 0.3$) aufgereinigt.

Ausbeute: 46 % 1.16 g gelbes Öl

Das Produkt liegt in einem *E/Z*-Verhältnis = 1 : 0.6 vor. Zur besseren Übersicht werden die NMR-Daten der beiden Isomere hier getrennt aufgeführt.

¹H NMR (500 MHz, CD₂Cl₂):

E-Isomer: δ (ppm) = 7.01 (d, $J = 5.1$ Hz, 1H, 5-H), 7.00 (d, $J = 12.8$ Hz, 1H, 2'-H), 6.91 (dd, $J = 5.1, 3.5$ Hz, 1H, 4-H), 6.80 (d, $J = 3.5$ Hz, 1H, 3-H), 5.99 (d, $J = 12.8$ Hz, 1H, 1'-H), 3.66 (s, 3H, 2'-OCH₃)

Z-Isomer: δ (ppm) = 7.16 (d, $J = 5.1$ Hz, 1H, 5-H), 6.98 (d, $J = 3.6$ Hz, 1H, 3-H), 6.95 (dd, $J = 5.1, 3.6$ Hz, 1H, 4-H), 6.15 (d, $J = 6.4$ Hz, 1H, 2'-H), 5.63 (d, $J = 6.5$ Hz, 1H, 1'-H), 3.81 (s, 3H, 2'-OCH₃)

¹³C NMR (126 MHz, CD₂Cl₂):

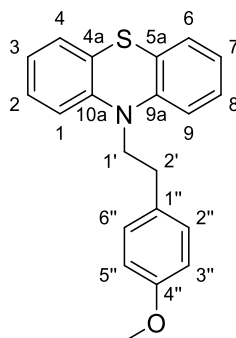
E-Isomer: δ (ppm) = 149.4 (C-2'), 140.6 (C-2), 127.8 (C-4), 123.2 (C-3), 121.8 (C-5), 99.8 (C-1'), 57.3 (2'-OCH₃)

Z-Isomer: δ (ppm) = 146.4 (C-2'), 138.8 (C-2), 126.8 (C-4), 125.1 (C-3), 124.4 (C-5), 100.7 (C-1'), 61.0 (2'-OCH₃)

IR (Film): $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) = 3106, 3063, 3006, 2932, 2856, 2831, 1637, 1451, 1389, 1328, 1273, 1231, 1148, 1096, 937, 826, 694

MS (EI): m/z (%) = 141 (7), 140 [M]⁺ (100), 125 (30), 97 (83)

HRMS (EI): m/z = 140.0290 [M]⁺ berechnet für C₇H₈OS⁺ 140.0290

10-(4-Methoxyphenethyl)-10H-phenothiazin (110) $C_{21}H_{19}NOS$ $M_r = 333.45$

Die Durchführung erfolgte nach Arbeitsvorschrift I. Es wurden 199 mg (1.00 mmol) 10H-Phenothiazin (**23**) in 2.0 mL trockenem Dichlormethan und insgesamt 246 mg (1.50 mmol) (*E/Z*)-1-Methoxy-4-(2-methoxyvinyl)benzol (**107**) in zwei Portionen eingesetzt. Nach einer Reaktionszeit von 4 h wurde zweimal mit Dichlormethan (je 80 mL) extrahiert und das Rohprodukt mittels Säulenchromatographie (*iso*-Hexan bis *iso*-Hexan/Ethylacetat 95:5, $R_f = 0.3$) aufgereinigt.

Ausbeute: 68 % 228 mg hellgelbes Öl

1H NMR (400 MHz, CD_2Cl_2): δ (ppm) = 7.22 – 7.13 (m, 6H, 2-H, 4-H, 6-H, 8-H, 2''-H, 6''-H), 6.96 (dd, $J = 8.2, 1.1$ Hz, 2H, 1-H, 9-H), 6.94 (td, $J = 7.4, 1.2$ Hz, 2H, 3-H, 7-H), 6.87 – 6.82 (m, 2H, 3''-H, 5''-H), 4.09 – 4.02 (m, 2H, 1'-H), 3.77 (s, 3H, CH_3), 3.07 – 2.99 (m, 2H, 2'-H)

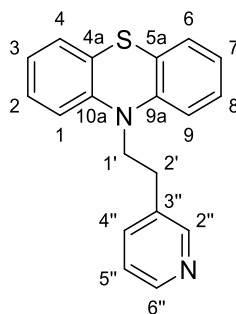
^{13}C NMR (101 MHz, CD_2Cl_2): δ (ppm) = 158.9 (C-4''), 145.7 (C-9a, C-10a), 131.8 (C-1''), 130.2 (C-2'', C-6''), 127.9 (C-2, C-8), 127.8 (C-4, C-6), 125.7 (C-4a, C-5a), 123.0 (C-3, C-7), 116.2 (C-1, C-9), 114.4 (C-3'', C-5''), 55.7 (CH_3), 49.6 (C-1'), 32.9 (C-2')

IR (Film): $\tilde{\nu}$ (cm^{-1}) = 3061, 2995, 2931, 2833, 1611, 1512, 1458, 1336, 1284, 1246, 1178, 1108, 1036, 822, 749, 728

MS (ESI): $m/z = 334$ $[M+H]^+$, 135

HRMS (ESI): $m/z = 334.1260$ $[M+H]^+$ berechnet für $C_{21}H_{20}NOS^+$ 334.1260

HPLC (Methode Ib, MeCN): > 99 % ($\lambda = 210$ nm), > 99 % ($\lambda = 254$ nm)

10-[2-(Pyridin-3-yl)ethyl]-10H-phenothiazin (111) $C_{19}H_{16}N_2S$ $M_r = 304.41$

Die Durchführung erfolgte nach Arbeitsvorschrift I. Es wurden 199 mg (1.00 mmol) 10H-Phenothiazin (**23**) in 2.0 mL trockenem Dichlormethan und insgesamt 270 mg (2.00 mmol) (*E/Z*)-3-(2-Methoxyvinyl)pyridin (**108**) in zwei Portionen eingesetzt. Nach einer Reaktionszeit von 20 h wurde zweimal mit Dichlormethan (je 80 mL) extrahiert und das Rohprodukt mittels Säulenchromatographie (*iso*-Hexan bis *iso*-Hexan/Ethylacetat 19:1, $R_f = 0.5$) aufgereinigt.

Ausbeute: 72 % 218 mg weißer Feststoff

Schmelzpunkt/-bereich: 94 – 95 °C

1H NMR (400 MHz, CD_2Cl_2): δ (ppm) = 8.44 (d, $J = 2.0$ Hz, 1H, 2''-H), 8.42 (dd, $J = 4.8$, 1.7 Hz, 1H, 6''-H), 7.55 (ddd, $J = 7.8$, 2.3, 1.7 Hz, 1H, 4''-H), 7.21 – 7.19 (m, 1H, 5''-H), 7.20 (ddd, $J = 8.2$, 7.3, 1.5 Hz, 2H, 2-H, 8-H), 7.16 (dd, $J = 7.9$, 1.5 Hz, 2H, 4-H, 6-H), 6.95 (dd, $J = 8.1$, 1.3 Hz, 2H, 1-H, 9-H), 6.95 (ddd, $J = 7.4$, 1.2 Hz, 2H, 3-H, 7-H), 4.15 – 4.09 (m, 2H, 1'-H), 3.10 – 3.05 (m, 2H, 2'-H)

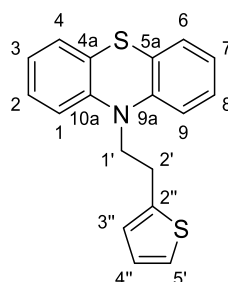
^{13}C NMR (101 MHz, CD_2Cl_2): δ (ppm) = 150.7 (C-2''), 148.4 (C-6''), 145.6 (C-9a, C-10a), 136.7 (C-4''), 135.1 (C-3''), 128.1 (C-4, C-6), 127.9 (C-2, C-8), 126.2 (C-4a, C-5a), 123.8 (C-5''), 123.3 (C-3, C-7), 116.3 (C-1, C-9), 48.7 (C-1'), 31.0 (C-2')

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ (cm^{-1}) = 3087, 3051, 3033, 2952, 2935, 2864, 1567, 1458, 1335, 1302, 1243, 1195, 1167, 1105, 1032, 853, 753, 714, 624, 506

MS (ESI): $m/z = 305$ $[M+H]^+$, 113

HRMS (ESI): $m/z = 305.1106$ $[M+H]^+$ berechnet für $C_{19}H_{17}N_2S^+$ 305.1107

HPLC (Methode Ib, MeCN): > 99 % ($\lambda = 210$ nm), > 99 % ($\lambda = 254$ nm)

10-[2-(Thiophen-2-yl)ethyl]-10*H*-phenothiazin (112) $C_{18}H_{15}NS_2$ $M_r = 309.45$

Die Durchführung erfolgte nach Arbeitsvorschrift I. Es wurden 199 mg (1.00 mmol) 10*H*-Phenothiazin (**23**) in 2.0 mL trockenem Dichlormethan und insgesamt 210 mg (1.50 mmol) (*E/Z*)-2-(2-Methoxyvinyl)thiophen (**109**) in zwei Portionen eingesetzt. Nach einer Reaktionszeit von 3 h wurde zweimal mit Dichlormethan (je 80 mL) extrahiert und das Rohprodukt mittels Säulenchromatographie (*iso*-Hexan bis *iso*-Hexan /Ethylacetat 19:1, $R_f = 0.4$) aufgereinigt.

Ausbeute: 94 % 291 mg weißer harzartiger Feststoff

1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6): δ (ppm) = 7.31 (dd, $J = 5.1, 1.3$ Hz, 1H, 5''-H), 7.22 (ddd, $J = 8.2, 7.3, 1.6$ Hz, 2H, 2-H, 8-H), 7.17 (dd, $J = 7.6, 1.5$ Hz, 2H, 4-H, 6-H), 7.09 (dd, $J = 8.2, 1.1$ Hz, 2H, 1-H, 9-H), 6.96 (td, $J = 7.5, 1.1$ Hz, 2H, 3-H, 7-H), 6.96 (dd, $J = 3.3, 1.2$ Hz, 1H, 3''-H), 6.93 (dd, $J = 5.0, 3.4$ Hz, 1H, 4''-H), 4.16 – 4.11 (m, 2H, 1'-H), 3.23 – 3.18 (m, 2H, 2'-H)

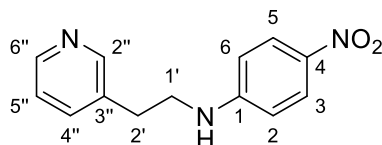
^{13}C NMR (126 MHz, DMSO- d_6): δ (ppm) = 144.5 (C-9a, C-10a), 140.9 (C-2''), 127.6 (C-2, C-8), 127.2 (C-4, C-6), 126.9 (C-4''), 125.4 (C-3''), 124.2 (C-5''), 124.0 (C-4a, C-5a), 122.7 (C-3, C-7), 115.9 (C-1, C-9), 47.9 (C-1'), 26.7 (C-2')

IR (Film): $\tilde{\nu}$ (cm $^{-1}$) = 3065, 2917, 2849, 1781, 1593, 1571, 1458, 1365, 1335, 1285, 1248, 1193, 1105, 1039, 928, 850, 824, 748, 696

MS (ESI): $m/z = 326, 310$ [M+H] $^+$, 212

HRMS (ESI): $m/z = 310.0718$ [M+H] $^+$ berechnet für $C_{18}H_{16}NS_2^+$ 310.0719

HPLC (Methode IIIC, MeCN): 97 % ($\lambda = 210$ nm), 98 % ($\lambda = 254$ nm)

4-Nitro-*N*-[2-(pyridin-3-yl)ethyl]anilin (113)(Literaturbekannte Substanz^[286]) $C_{13}H_{13}N_3O_2$ $M_r = 243.27$

Die Durchführung erfolgte nach Arbeitsvorschrift I. Es wurden 138 mg (0.999 mmol) 4-Nitroanilin in 1.5 mL trockenem Dichlormethan und 135 mg (0.999 mmol) (*E/Z*)-3-(2-Methoxyvinyl)pyridin (**108**) eingesetzt. Nach einer Reaktionszeit von 2 h wurde zweimal mit Ethylacetat (je 60 mL) extrahiert und das Rohprodukt mittels Säulenchromatographie (*iso*-Hexan bis *iso*-Hexan/Ethylacetat 9:1, $R_f = 0.2$) aufgereinigt.

Ausbeute: 72 % 176 mg dunkelgelbe Kristalle

Schmelzpunkt/-bereich: 121 °C

^1H NMR (500 MHz, CD_2Cl_2): δ (ppm) = 8.49 – 8.44 (m, 2H, 2''-H, 6''-H), 8.09 – 8.03 (m, 2H, 3-H, 5-H), 7.56 (dt, $J = 7.8, 2.0$ Hz, 1H, 4''-H), 7.26 (ddd, $J = 7.8, 4.8, 0.8$ Hz, 1H, 5''-H), 6.60 – 6.55 (m, 2H, 2-H, 6-H), 4.78 (s, 1H, NH), 3.52 (td, $J = 7.0, 5.8$ Hz, 2H, 1'-H), 2.95 (t, $J = 7.0$ Hz, 2H, 2'-H)

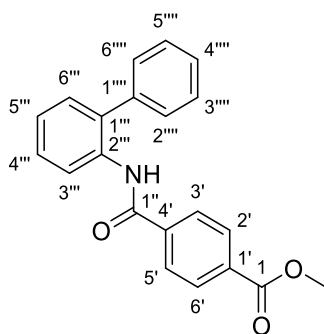
^{13}C NMR (126 MHz, CD_2Cl_2): δ (ppm) = 153.6 (C-1), 150.7 (C-2''), 148.7 (C-6''), 138.7 (C-4), 136.6 (C-4''), 134.5 (C-3''), 126.8 (C-3, C-5), 124.1 (C-5''), 111.7 (C-2, C-6), 44.6 (C-1'), 32.9 (C-2')

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ (cm^{-1}) = 3269, 3185, 3128, 3087, 3057, 3029, 2922, 2867, 1604, 1546, 1467, 1434, 1294, 1179, 1109, 845, 811, 754, 706, 591

MS (ESI): $m/z = 285, 244$ $[\text{M}+\text{H}]^+$, 135

HRMS (ESI): $m/z = 244.1079$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ berechnet für $\text{C}_{13}\text{H}_{14}\text{N}_3\text{O}_2^+$ 244.1081

HPLC (Methode Ib, MeCN): > 99 % ($\lambda = 210$ nm), > 99 % ($\lambda = 254$ nm)

4-[(1,1'-Biphenyl)-2-ylcarbamoyl]benzoesäuremethylester (122) $C_{21}H_{17}NO_3$ $M_r = 331.37$

Die Durchführung erfolgte nach Arbeitsvorschrift A. Es wurden 501 mg (2.96 mmol) 2-Aminobiphenyl (**114**), 1.08 g (5.99 mmol) 4-(Methoxycarbonyl)benzoesäure (**120**), 822 mg (6.51 mmol) *N,N'*-Diisopropylcarbodiimid und 108 mg (0.884 mmol) 4-(Dimethylamino)-pyridin in 20 mL Dichlormethan eingesetzt. Nach einer Reaktionszeit von 47 h wurde mittels Säulenchromatographie (*iso*-Hexan/Ethylacetat = 9:1, $R_f = 0.2$) aufgereinigt.

Ausbeute: 83 % 813 mg weißer Feststoff

Schmelzpunkt/-bereich: 176 °C

1H NMR (500 MHz, CD_2Cl_2): δ (ppm) = 8.45 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H, 3'''-H), 8.12 – 7.93 (m, 3H, NH, 2'-H, 6'-H), 7.72 – 7.57 (m, 2H, 3'-H, 5'-H), 7.56 – 7.49 (m, 2H, 3'''-H, 5'''-H), 7.49 – 7.40 (m, 4H, 4'''-H, 2'''-H, 4'''-H, 6'''-H), 7.34 (dd, $J = 7.6, 1.6$ Hz, 1H, 6'''-H), 7.26 (td, $J = 7.5, 1.2$ Hz, 1H, 5'''-H), 3.90 (s, 3H, CH_3)

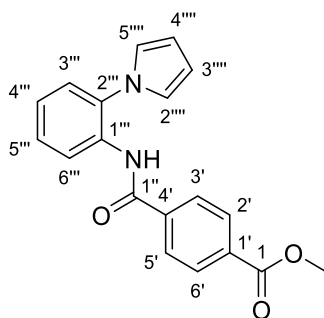
^{13}C NMR (126 MHz, CD_2Cl_2): δ (ppm) = 166.5 (C-1), 164.5 (C-1''), 139.2 (C-4'), 138.5 (C-1'''), 135.3 (C-2'''), 133.5 (C-1'), 133.4 (C-1''), 130.6 (C-6'''), 130.3 (C-2', C-6'), 129.8 (C-2''', C-6'''), 129.8 (C-3''', C-5'''), 129.0 (C-4'''), 128.8 (C-4'''), 127.4 (C-3', C-5'), 125.2 (C-5'''), 121.8 (C-3'''), 52.8 (CH_3)

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ (cm^{-1}) = 3237, 3058, 3027, 2947, 2839, 1728, 1641, 1537, 1496, 1436, 1325, 1278, 1187, 1128, 1108, 1017, 868, 750, 740, 721, 705

MS (ESI): $m/z = 330$ $[M-H]^-$

HRMS (ESI): $m/z = 330.1136$ $[M-H]^-$ berechnet für $C_{21}H_{16}NO_3^-$ 330.1136

HPLC (Methode Id, MeCN): > 99 % ($\lambda = 210$ nm), > 99 % ($\lambda = 254$ nm)

4-[[2-(1*H*-Pyrrol-1-yl)phenyl]carbamoyl]benzoesäuremethylester (123) $C_{19}H_{16}N_2O_3$ $M_r = 320.35$

Die Durchführung erfolgte nach Arbeitsvorschrift A. Es wurden 1.00 g (6.32 mmol) 1-(2-Aminophenyl)pyrrol (**115**), 2.28 g (12.7 mmol) 4-(Methoxycarbonyl)benzoesäure (**120**), 1.76 g (13.9 mmol) *N,N'*-Diisopropylcarbodiimid und 233 mg (1.91 mmol) 4-(Dimethylamino)-pyridin in 40 mL Dichlormethan eingesetzt. Nach einer Reaktionszeit von 65 h wurde mittels Säulenchromatographie (*iso*-Hexan/Ethylacetat = 9:1, $R_f = 0.2$) aufgereinigt.

Ausbeute: 68 % 1.37 g weiße Kristalle

Schmelzpunkt/-bereich: 130 °C

1H NMR (500 MHz, CD_2Cl_2): δ (ppm) = 8.56 (dd, $J = 8.3, 1.4$ Hz, 1H, 6'''-H), 8.09 – 8.04 (m, 2H, 2'-H, 6'-H), 7.78 (bs, 1H, NH), 7.71 – 7.65 (m, 2H, 3'-H, 5'-H), 7.47 (td, $J = 7.9, 1.5$ Hz, 1H, 5'''-H), 7.40 (dd, $J = 7.8, 1.5$ Hz, 1H, 3'''-H), 7.25 (td, $J = 7.7, 1.4$ Hz, 1H, 4'''-H), 6.88 (t, $J = 2.1$ Hz, 2H, 2'''-H, 5'''-H), 6.45 (t, $J = 2.1$ Hz, 2H, 3'''-H, 4'''-H), 3.91 (s, 3H, CH_3)

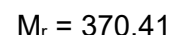
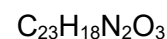
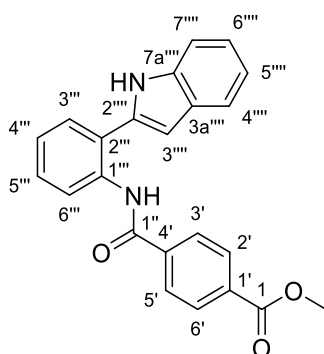
^{13}C NMR (126 MHz, CD_2Cl_2): δ (ppm) = 166.5 (C-1), 164.4 (C-1'), 138.6 (C-4'), 134.6 (C-1'''), 133.8 (C-1'), 131.7 (C-2'''), 130.4 (C-2', C-6'), 129.4 (C-5'''), 127.5 (C-3', C-5'), 127.4 (C-3'''), 125.0 (C-4'''), 122.7 (C-2''', C-5'''), 121.5 (C-6'''), 111.2 (C-3''', C-4'''), 52.9 (CH_3)

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ (cm^{-1}) = 3317, 3007, 2951, 1724, 1654, 1522, 1489, 1449, 1329, 1277, 1107, 1066, 1015, 871, 820, 758, 733, 708, 628

MS (ESI): $m/z = 319$ $[M-H]^-$

HRMS (ESI): $m/z = 319.1088$ $[M+H]^+$ berechnet für $C_{19}H_{15}N_2O_3$ 319.1088

HPLC (Methode Id, MeCN): > 99 % ($\lambda = 210$ nm), > 99 % ($\lambda = 254$ nm)

4-[[2-(1*H*-Indol-2-yl)phenyl]carbamoyl]benzoesäuremethylester (124)

In 15 mL Toluol wurden 900 mg (4.32 mmol) 2-(1*H*-Indol-2-yl)anilin (**119**) und 909 mg (4.58 mmol) 4-(Chlorcarbonyl)benzoesäuremethylester (**121**) suspendiert und auf 0 °C gekühlt. Zu dem Reaktionsgemisch wurden langsam 1.23 mL (15.2 mmol) Pyridin zugetropft sowie 28 mg (0.23 mmol) 4-(Dimethylamino)-pyridin hinzugefügt und anschließend 1 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und das Rohprodukt mittels Säulenchromatographie (*iso*-Hexan/Ethylacetat = 8:2, *R_f* = 0.3 und Dichlormethan/Methanol = 99:1, *R_f* = 0.3) aufgereinigt.

Ausbeute: 83 % 1.33 g blassoranger Feststoff

Schmelzpunkt/-bereich: 142 – 144 °C

¹H NMR (500 MHz, CD₂Cl₂): δ (ppm) = 8.81 (s, 2H, CONH, NH), 8.47 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H, 6'''-H), 8.06 – 7.98 (m, 2H, 2'-H, 6'-H), 7.83 – 7.75 (m, 2H, 3'-H, 5'-H), 7.65 (dd, *J* = 8.0, 1.0 Hz, 1H, 4'''-H), 7.53 (dd, *J* = 7.7, 1.6 Hz, 1H, 3'''-H), 7.47 (dd, *J* = 8.1, 1.0 Hz, 1H, 7'''-H), 7.41 (ddd, *J* = 8.6, 7.6, 1.6 Hz, 1H, 5'''-H), 7.25 (td, *J* = 7.5, 1.2 Hz, 1H, 4'''-H), 7.25 (ddd, *J* = 8.2, 7.0, 1.1 Hz, 1H, 6'''-H), 7.16 (ddd, *J* = 8.0, 7.1, 1.0 Hz, 1H, 5'''-H), 6.71 (dd, *J* = 2.1, 0.9 Hz, 1H, 3'''-H), 3.90 (s, 3H, CH₃)

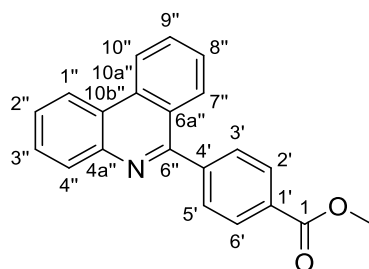
¹³C NMR (126 MHz, CD₂Cl₂): δ (ppm) = 166.5 (C-1), 164.9 (C-1'''), 138.9 (C-4'), 137.4 (C-7a'''), 135.8 (C-1'''), 134.6 (C-2'''), 133.6 (C-1'), 130.4 (C-2', C-6'), 129.9 (C-3'''), 129.7 (C-5'''), 129.4 (C-3a'''), 127.6 (C-3', C-5'), 125.4 (C-4'''), 124.4 (C-2'''), 123.4 (C-6'''), 122.2 (C-6'''), 121.2 (C-4'''), 121.0 (C-5'''), 111.7 (C-7'''), 103.0 (C-3'''), 52.8 (CH₃)

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) = 3377, 3059, 2951, 2844, 1724, 1663, 1583, 1524, 1439, 1283, 1192, 1110, 1017, 870, 823, 792, 750, 724

MS (ESI): *m/z* = 369 [M-H]⁻

HRMS (ESI): *m/z* = 369.1247 [M-H]⁻ berechnet für C₂₃H₁₇N₂O₃⁻ 369.1245

HPLC (Methode Id, MeCN): > 99 % (λ = 210 nm), > 99 % (λ = 254 nm)

4-(Phenanthridin-6-yl)benzoesäuremethylester (125) $C_{21}H_{15}NO_2$ $M_r = 313.36$

Die Durchführung erfolgte nach Arbeitsvorschrift B. Es wurden 1.00 g (3.02 mmol) 4-[(1,1'-Biphenyl)-2-ylcarbamoyl]benzoesäuremethylester (**122**), 340 μ L (3.62 mmol) 2-Chlorpyridin und 560 μ L (3.33 mmol) Trifluormethansulfonsäureanhydrid in 16 mL Dichlormethan eingesetzt. Das Rohprodukt wurde mittels Säulenchromatographie (Dichlormethan/Methanol = 99:1, $R_f = 0.3$) aufgereinigt.

Ausbeute: 71 % 668 mg weißer Feststoff

Schmelzpunkt/-bereich: 160 – 161 °C

1H NMR (500 MHz, CD_2Cl_2): δ (ppm) = 8.75 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H, 10''-H), 8.66 (dd, $J = 8.2$, 1.4 Hz, 1H, 1''-H), 8.25 – 8.20 (m, 2H, 2'-H, 6'-H), 8.18 (dd, $J = 8.1$, 1.4 Hz, 1H, 4''-H), 8.06 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H, 7''-H), 7.90 (ddd, $J = 8.2$, 7.1, 1.0 Hz, 1H, 9''-H), 7.85 – 7.81 (m, 2H, 3'-H, 5'-H), 7.79 (ddd, $J = 8.2$, 7.1, 1.3 Hz, 1H, 3''-H), 7.73 (ddd, $J = 8.2$, 7.1, 1.2 Hz, 1H, 2''-H), 7.65 (ddd, $J = 8.0$, 7.0, 0.7 Hz, 1H, 8''-H), 3.97 (s, 3H, CH_3)

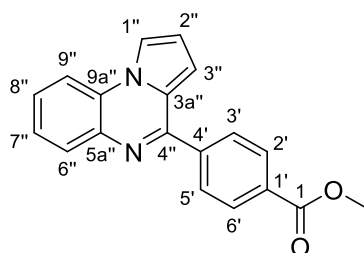
^{13}C NMR (126 MHz, CD_2Cl_2): δ (ppm) = 167.2 (C-1), 160.5 (C-6''), 144.8 (C-4'), 144.3 (C-4a''), 133.9 (C-10a''), 131.3 (C-9''), 130.9 (C-1'), 130.8 (C-4''), 130.4 (C-3', C-5'), 129.9 (C-2', C-6'), 129.5 (C-3''), 128.8 (C-7''), 127.9 (C-8''), 127.8 (C-2''), 125.4 (C-6a''), 124.3 (C-10b''), 122.9 (C-10''), 122.6 (C-1''), 52.7 (CH_3)

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ (cm^{-1}) = 3068, 3029, 3001, 2951, 2853, 1726, 1610, 1431, 1314, 1277, 1191, 1104, 1021, 960, 869, 779, 751, 724, 703

MS (ESI): $m/z = 314$ $[M+H]^+$

HRMS (ESI): $m/z = 314.1176$ $[M+H]^+$ berechnet für $C_{21}H_{16}NO_2^+$ 314.1176

HPLC (Methode Ia, MeCN): > 99 % ($\lambda = 210$ nm), > 99 % ($\lambda = 254$ nm)

4-(Pyrrolo[1,2-a]quinoxalin-4-yl)benzoesäuremethylester (126) $C_{19}H_{14}N_2O_2$ $M_r = 302.33$

Die Durchführung erfolgte nach Arbeitsvorschrift B. Es wurden 1.30 g (4.06 mmol) 4-[[2-(1*H*-Pyrrol-1-yl)phenyl]carbamoyl]benzoesäuremethylester (**123**), 460 μ L (4.90 mmol) 2-Chlorpyridin und 750 μ L (4.46 mmol) Trifluormethansulfonsäureanhydrid in 13 mL Dichlormethan eingesetzt. Das Rohprodukt wurde mittels Säulenchromatographie (*iso*-Hexan/Ethylacetat = 17:3, R_f = 0.3) aufgereinigt.

Ausbeute: 75 % 924 mg hellgelber Feststoff

Schmelzpunkt/-bereich: 158 – 159 °C

1H NMR (400 MHz, CD_2Cl_2): δ (ppm) = 8.23 – 8.17 (m, 2H, 2'-H, 6'-H), 8.13 – 8.08 (m, 2H, 3'-H, 5'-H), 8.05 (dd, J = 2.8, 1.2 Hz, 1H, 1''-H), 8.00 (dd, J = 8.0, 1.5 Hz, 1H, 6''-H), 7.93 (dd, J = 8.2, 1.3 Hz, 1H, 9''-H), 7.56 (td, J = 7.7, 1.6 Hz, 1H, 8''-H), 7.48 (td, J = 7.7, 1.4 Hz, 1H, 7''-H), 7.00 (dd, J = 4.1, 1.2 Hz, 1H, 3''-H), 6.93 (dd, J = 4.0, 2.8 Hz, 1H, 2''-H), 3.96 (s, 3H, CH_3)

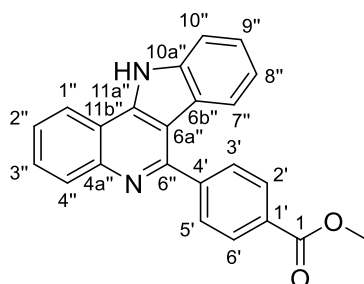
^{13}C NMR (101 MHz, CD_2Cl_2): δ (ppm) = 167.1 (C-1), 153.5 (C-4''), 143.2 (C-4'), 136.7 (C-5a''), 131.8 (C-1'), 130.8 (C-6''), 130.1 (C-2', C-6'), 129.2 (C-3', C-5'), 128.4 (C-8''), 127.7 (C-9a''), 125.9 (C-7''), 125.6 (C-3a''), 115.5 (C-1''), 114.6 (C-2''), 114.4 (C-9''), 108.8 (C-3''), 52.7 (CH_3)

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ (cm^{-1}) = 3149, 3103, 3060, 3028, 2955, 2850, 1720, 1610, 1477, 1424, 1371, 1284, 1185, 1102, 1038, 933, 863, 772, 747, 713

MS (ESI): m/z = 303 $[M+H]^+$

HRMS (ESI): m/z = 303.1127 $[M+H]^+$ berechnet für $C_{19}H_{15}N_2O_2^+$ 303.1128

HPLC (Methode Ia, MeCN): > 99 % (λ = 210 nm), > 99 % (λ = 254 nm)

4-(11*H*-Indolo[3,2-*c*]chinolin-6-yl)benzoesäuremethylester (127) $C_{23}H_{16}N_2O_2$ $M_r = 352.39$

Die Durchführung erfolgte nach Arbeitsvorschrift B. Es wurden 1.01 g (2.73 mmol) 4-[[2-(1*H*-Indol-2-yl)phenyl]carbamoyl]benzoesäuremethylester (**124**), 300 μ L (3.20 mmol) 2-Chlorpyridin und 500 μ L (2.97 mmol) Trifluormethansulfonsäureanhydrid in 8.0 mL Dichlormethan eingesetzt. Das Rohprodukt wurde mittels Säulenchromatographie (Dichlormethan/Methanol = 98:2, $R_f = 0.2$) aufgereinigt.

Ausbeute: 72 % 690 mg weißer Feststoff

Schmelzpunkt/-bereich: 272 – 273 °C

^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6): δ (ppm) = 12.97 (s, 1H, NH), 8.59 (dd, $J = 8.1, 1.5$ Hz, 1H, 1''-H), 8.28 – 8.18 (m, 2H, 2'-H, 6'-H), 8.15 (dd, $J = 8.2, 1.3$ Hz, 1H, 4''-H), 8.03 – 7.95 (m, 2H, 3'-H, 5'-H), 7.78 (ddd, $J = 8.4, 6.9, 1.5$ Hz, 1H, 3''-H), 7.74 (dd, $J = 8.1, 0.9$ Hz, 1H, 10''-H), 7.73 (ddd, $J = 8.2, 7.0, 1.3$ Hz, 1H, 2''-H), 7.48 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H, 7''-H), 7.46 (ddd, $J = 8.2, 7.2, 1.2$ Hz, 1H, 9''-H), 7.15 (ddd, $J = 8.1, 7.3, 0.9$ Hz, 1H, 8''-H), 3.94 (s, 3H, CH₃)

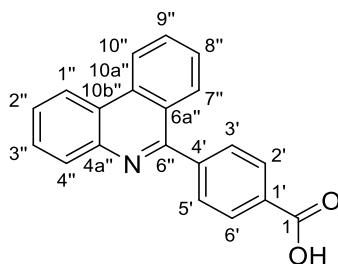
^{13}C NMR (126 MHz, DMSO- d_6): δ (ppm) = 166.1 (C-1), 154.3 (C-6''), 145.2 (C-4'), 144.9 (C-4a''), 141.1 (C-11a''), 139.1 (C-10a''), 129.9 (C-1'), 129.5 (C-4''), 129.4 (C-2', C-6'), 129.4 (C-3', C-5'), 128.7 (C-3''), 126.0 (C-2''), 125.6 (C-9''), 122.0 (C-1''), 121.4 (C-6b''), 121.0 (C-7''), 120.5 (C-8''), 116.4 (C-11b''), 112.1 (C-10''), 111.8 (C-6a''), 52.4 (CH₃)

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) = 3431, 3055, 2946, 2883, 2844, 2795, 1724, 1559, 1517, 1502, 1458, 1437, 1360, 1272, 1241, 1112, 1100, 1018, 952, 776, 753, 745, 713, 619

MS (ESI): $m/z = 351$ [M-H]⁻

HRMS (ESI): $m/z = 351.1140$ [M-H]⁻ berechnet für C₂₃H₁₅N₂O₂⁻ 351.1139

HPLC (Methode Ia, MeCN): > 99 % ($\lambda = 210$ nm), > 99 % ($\lambda = 254$ nm)

4-(Phenanthridin-6-yl)benzoesäure (128)(Literaturbekannte Substanz^[287]) $C_{20}H_{13}NO_2$ $M_r = 299.33$

Die Durchführung erfolgte nach Arbeitsvorschrift D. Es wurden 474 mg (1.51 mmol) 4-(Phenanthridin-6-yl)benzoesäuremethylester (**125**), 1.90 mL (3.80 mmol) 2 M Natriumhydroxid-Lösung in 22 mL eines 1,4-Dioxan/Wasser-Gemisches (1:1) eingesetzt. Nach einer Reaktionszeit von 19 h bei Raumtemperatur wurde der erhaltene Feststoff im Hochvakuum getrocknet.

Ausbeute: 87 % 394 mg weißer Feststoff

Schmelzpunkt/-bereich: 287 – 288 °C

1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6): δ (ppm) = 13.22 (bs, 1H, OH), 8.97 (d, J = 8.2 Hz, 1H, 10''-H), 8.87 (dd, J = 8.1, 1.5 Hz, 1H, 1''-H), 8.19 – 8.15 (m, 2H, 2'-H, 6'-H), 8.13 (dd, J = 7.0, 1.1 Hz, 1H, 4''-H), 8.01 (dd, J = 8.8, 1.0 Hz, 1H, 7''-H), 7.99 (td, J = 7.8, 7.2, 1.0 Hz, 1H, 9''-H), 7.88 – 7.71 (m, 5H, 3'-H, 5'-H, 2''-H, 3''-H, 8''-H)

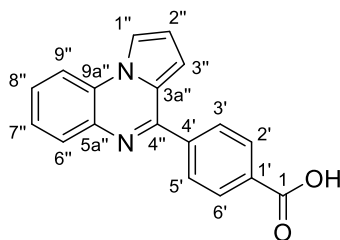
^{13}C NMR (126 MHz, DMSO- d_6): δ (ppm) = 167.2 (C-1), 159.6 (C-6''), 143.4 (C-4'), 143.1 (C-4a''), 132.9 (C-10a''), 131.3 (C-9''), 131.0 (C-1'), 130.0 (C-3', C-5'), 129.8 (C-4''), 129.3 (C-2', C-6'), 129.3 (C-3''), 128.0 (C-8''), 128.0 (C-7''), 127.6 (C-2''), 124.2 (C-6a''), 123.4 (C-10b''), 123.0 (C-10''), 122.8 (C-1'')

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ (cm $^{-1}$) = 3066, 2853, 2667, 2545, 1697, 1610, 1426, 1361, 1313, 1293, 1138, 1019, 871, 782, 752, 726, 703, 670, 544

MS (ESI): m/z = 344 [M+Formiat] $^-$, 298 [M-H] $^-$

HRMS (ESI): m/z = 298.0873 [M-H] $^-$ berechnet für $C_{20}H_{12}NO_2^-$ 298.0874

HPLC (Methode VIII, MeOH): > 99 % (λ = 210 nm), > 99 % (λ = 254 nm)

4-(Pyrrolo[1,2-a]quinoxalin-4-yl)benzoesäure (129) $C_{18}H_{12}N_2O_2$ $M_r = 288.31$

Die Durchführung erfolgte nach Arbeitsvorschrift D. Es wurden 505 mg (1.67 mmol) 4-(Pyrrolo[1,2-a]quinoxalin-4-yl)benzoesäuremethylester (**126**), 2.10 mL (4.20 mmol) 2 M Natriumhydroxid-Lösung in 22 mL eines 1,4-Dioxan/Wasser-Gemisches (1:1) eingesetzt. Nach einer Reaktionszeit von 12 h bei Raumtemperatur wurde der erhaltene Feststoff im Hochvakuum getrocknet.

Ausbeute: 80 % 383 mg hellgelber Feststoff

Schmelzpunkt/-bereich: 273 – 274 °C

1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6): δ (ppm) = 13.17 (s, 1H, OH), 8.58 (dd, J = 2.6, 1.2 Hz, 1H, 1''-H), 8.33 (dd, J = 8.3, 1.2 Hz, 1H, 9''-H), 8.17 – 8.13 (m, 2H, 2'-H, 6'-H), 8.13 – 8.10 (m, 2H, 3'-H, 5'-H), 7.96 (dd, J = 8.1, 1.4 Hz, 1H, 6''-H), 7.63 (ddd, J = 8.4, 7.3, 1.5 Hz, 1H, 8''-H), 7.52 (ddd, J = 8.3, 7.2, 1.2 Hz, 1H, 7''-H), 7.06 (dd, J = 4.0, 1.2 Hz, 1H, 3''-H), 7.00 (dd, J = 4.0, 2.7 Hz, 1H, 2''-H)

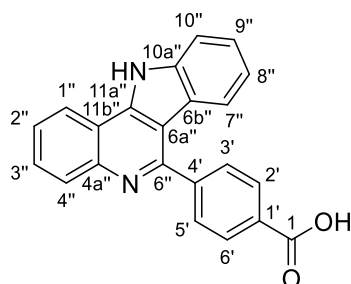
^{13}C NMR (126 MHz, DMSO- d_6): δ (ppm) = 167.0 (C-1), 152.2 (C-4''), 141.7 (C-4'), 135.3 (C-5a''), 131.9 (C-1'), 129.6 (C-6''), 129.5 (C-2', C-6'), 128.7 (C-3', C-5'), 128.2 (C-8''), 126.7 (C-9a''), 125.6 (C-7''), 124.0 (C-3a''), 116.8 (C-1''), 114.8 (C-9''), 114.4 (C-2''), 108.4 (C-3'')

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ (cm $^{-1}$) = 2875, 2546, 1694, 1609, 1531, 1476, 1423, 1372, 1314, 1289, 1270, 1175, 1099, 1008, 932, 866, 775, 748, 715, 590

MS (ESI): m/z = 287 [M-H] $^-$

HRMS (ESI): m/z = 287.0827 [M-H] $^-$ berechnet für $C_{18}H_{11}N_2O_2^-$ 287.0826

HPLC (Methode VIII, MeOH): > 99 % (λ = 210 nm), > 99 % (λ = 254 nm)

4-(11*H*-Indolo[3,2-*c*]quinolin-6-yl)benzoesäure (130) $C_{22}H_{14}N_2O_2$ $M_r = 338.37$

Die Durchführung erfolgte nach Arbeitsvorschrift D. Es wurden 240 mg (0.681 mmol) 4-(11*H*-Indolo[3,2-*c*]chinolin-6-yl)benzoesäuremethylester (**127**), 850 μ L (1.70 mmol) 2 M Natriumhydroxid-Lösung in 10 mL eines 1,4-Dioxan/Wasser-Gemisches (1:1) eingesetzt. Nach einer Reaktionszeit von 41 h bei Raumtemperatur wurde der erhaltene Feststoff im Hochvakuum getrocknet.

Ausbeute: 96 % 220 mg hellgelber Feststoff

Schmelzpunkt/-bereich: 409 – 410 °C

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6): δ (ppm) = 12.96 (s, 2H, NH, OH), 8.59 (dd, J = 8.0, 1.6 Hz, 1H, 1''-H), 8.25 – 8.18 (m, 2H, 2'-H, 6'-H), 8.15 (dd, J = 8.2, 1.3 Hz, 1H, 4''-H), 8.00 – 7.93 (m, 2H, 3'-H, 5'-H), 7.78 (ddd, J = 8.4, 7.0, 1.5 Hz, 1H, 3''-H), 7.74 (d, J = 8.2 Hz, 1H, 10''-H), 7.73 (ddd, J = 8.1, 6.9, 1.3 Hz, 1H, 2''-H), 7.49 (d, J = 8.2 Hz, 1H, 7''-H), 7.46 (ddd, J = 8.2, 7.3, 1.1 Hz, 1H, 9''-H), 7.16 (ddd, J = 8.1, 7.2, 0.8 Hz, 1H, 8''-H)

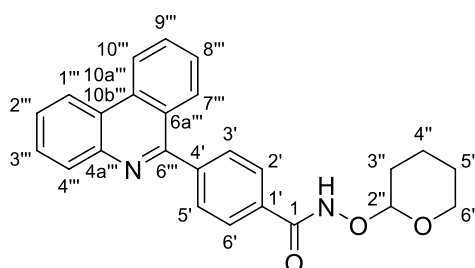
^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6): δ (ppm) = 167.2 (C-1), 154.4 (C-6''), 144.9 (C-4a''), 144.8 (C-4'), 141.1 (C-11a''), 139.1 (C-10a''), 131.1 (C-1'), 129.5 (C-2', C-6'), 129.4 (C-4''), 129.1 (C-3', C-5'), 128.6 (C-3''), 125.9 (C-2''), 125.5 (C-9''), 122.0 (C-1''), 121.4 (C-6b''), 121.0 (C-7''), 120.4 (C-8''), 116.3 (C-11b''), 112.0 (C-10''), 111.8 (C-6a'')

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ (cm^{-1}) = 3401, 3054, 2942, 2885, 2760, 2635, 1705, 1583, 1536, 1446, 1372, 1223, 1173, 1111, 1017, 905, 786, 742, 689, 618, 548

MS (ESI): m/z = 337 $[\text{M-H}]^-$

HRMS (ESI): m/z = 337.0982 $[\text{M-H}]^-$ berechnet für $C_{22}H_{13}N_2O_2^-$ 337.0983

HPLC (Methode VII, DMSO): > 99 % (λ = 254 nm)

(±)-4-(Phenanthridin-6-yl)-N-[(tetrahydro-2H-pyran-2-yl)oxy]benzamid (131) $C_{25}H_{22}N_2O_3$ $M_r = 398.46$

Die Durchführung erfolgte nach Arbeitsvorschrift E. Es wurden 282 mg (0.942 mmol) 4-(Phenanthridin-6-yl)benzoesäure (**128**), 220 μ L (1.59 mmol) Triethylamin, 214 mg (1.12 mmol) 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimidhydrochlorid, 152 mg (1.12 mmol) 1-Hydroxybenzotriazol und 130 mg (1.11 mmol) O-(Tetrahydro-2H-pyran-2-yl)hydroxylamin in 25 mL Dichlormethan eingesetzt. Nach einer Reaktionszeit von 14 h wurde dreimal mit gesättigter wässriger Natriumhydrogencarbonat-Lösung (je 30 mL) gewaschen und des Rohprodukt mittels Säulenchromatographie (Dichlormethan/Methanol = 97:3, $R_f = 0.2$) aufgereinigt.

Ausbeute: 73 % 272 mg weißer Feststoff

Schmelzpunkt/-bereich: 197 °C

^1H NMR (400 MHz, CD_2Cl_2): δ (ppm) = 9.63 (s, 1H, NH), 8.74 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H, 10'''-H), 8.66 (dd, $J = 8.1, 1.5$ Hz, 1H, 1'''-H), 8.24 (dd, $J = 8.1, 1.4$ Hz, 1H, 4'''-H), 8.02 (dd, $J = 8.3, 1.2$ Hz, 1H, 7'''-H), 7.91 – 7.88 (m, 2H, 2'-H, 6'-H), 7.89 (ddd, $J = 8.2, 7.0, 1.1$ Hz, 1H, 9'''-H), 7.80 (ddd, $J = 8.2, 6.9, 1.4$ Hz, 1H, 3'''-H), 7.79 – 7.75 (m, 2H, 3'-H, 5'-H), 7.73 (ddd, $J = 8.3, 7.1, 1.4$ Hz, 1H, 2'''-H), 7.63 (ddd, $J = 8.2, 7.0, 1.1$ Hz, 1H, 8'''-H), 5.15 (t, $J = 2.7$ Hz, 1H, 2''-H), 3.99 (ddd, $J = 11.5, 9.5, 3.0$ Hz, 1H, 6''-H_a), 3.59 (dtd, $J = 11.3, 4.1, 1.5$ Hz, 1H, 6''-H_e), 1.95 – 1.80 (m, 3H, 3''-H_a, 3''-H_e, 4''-H_a/H_e), 1.72 – 1.51 (m, 3H, 4''-H_a/H_e, 5''-H_a, 5''-H_e)

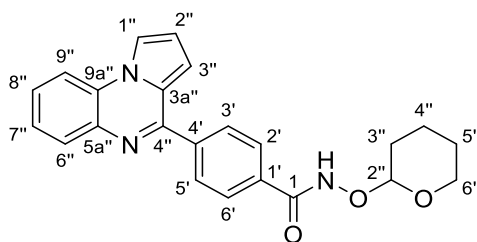
^{13}C NMR (101 MHz, CD_2Cl_2): δ (ppm) = 166.0 (C-1), 160.6 (C-6'''), 144.3 (C-4a'''), 143.6 (C-4'), 134.0 (C-10a'''), 133.1 (C-1'), 131.4 (C-9'''), 130.6 (C-3', C-5', C-4'''), 129.6 (C-3'''), 128.9 (C-7'''), 127.9 (C-8'''), 127.8 (C-2'''), 127.7 (C-2', C-6'), 125.4 (C-6a'''), 124.4 (C-10b'''), 122.9 (C-1'''), 122.7 (C-10'''), 103.2 (C-2''), 63.1 (C-6''), 28.8 (C-3''), 25.7 (C-5''), 19.3 (C-4'')

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ (cm^{-1}) = 3251, 3068, 2941, 2924, 2845, 1643, 1523, 1459, 1367, 1202, 1114, 1020, 960, 904, 866, 838, 753, 725, 615

MS (ESI): $m/z = 399$ $[\text{M}+\text{H}]^+$

HRMS (ESI): $m/z = 399.1708$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ berechnet für $\text{C}_{25}\text{H}_{23}\text{N}_2\text{O}_3^+$ 399.1703

HPLC (Methode VIII, MeOH): > 99 % ($\lambda = 210$ nm), > 99 % ($\lambda = 254$ nm)

(±)-4-(Pyrrolo[1,2-a]quinoxalin-4-yl)-N-[(tetrahydro-2H-pyran-2-yl)oxy]benzamid (132)C₂₃H₂₁N₃O₃M_r = 387.44

Die Durchführung erfolgte nach Arbeitsvorschrift E. Es wurden 407 mg (1.41 mmol) 4-(Pyrrolo[1,2-a]quinoxalin-4-yl)benzoesäure (**129**), 330 µL (2.38 mmol) Triethylamin, 326 mg (1.70 mmol) 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimidhydrochlorid, 228 mg (1.69 mmol) 1-Hydroxybenzotriazol und 202 mg (1.72 mmol) O-(Tetrahydro-2H-pyran-2-yl)hydroxylamin in 25 mL Dichlormethan eingesetzt. Nach einer Reaktionszeit von 14 h wurde dreimal mit gesättigter wässriger Natriumhydrogencarbonat-Lösung (je 30 mL) gewaschen und des Rohprodukt mittels Säulenchromatographie (Dichlormethan/Methanol = 98:2, *R_f* = 0.3) aufgereinigt.

Ausbeute: 60 % 326 mg gelber Feststoff

Schmelzpunkt/-bereich: 101 – 103 °C

¹H NMR (400 MHz, CD₂Cl₂): δ (ppm) = 9.30 (s, 1H, NH), 8.10 – 8.02 (m, 2H, 3'-H, 5'-H), 8.06 (dd, *J* = 2.9, 1.2 Hz, 1H, 1'''-H), 8.03 (dd, *J* = 8.0, 1.5 Hz, 1H, 6'''-H), 7.94 (dd, *J* = 8.2, 1.4 Hz, 1H, 9'''-H), 7.91 – 7.84 (m, 2H, 2'-H, 6'-H), 7.57 (ddd, *J* = 8.3, 7.3, 1.5 Hz, 1H, 8'''-H), 7.49 (ddd, *J* = 8.5, 7.2, 1.4 Hz, 1H, 7'''-H), 6.97 (dd, *J* = 4.1, 1.3 Hz, 1H, 3'''-H), 6.92 (dd, *J* = 4.1, 2.7 Hz, 1H, 2'''-H), 5.12 (t, *J* = 3.2 Hz, 1H, 2''-H), 4.03 (ddd, *J* = 11.6, 9.2, 2.9 Hz, 1H, 6''-H_a), 3.64 (dtd, *J* = 11.2, 4.2, 1.7 Hz, 1H, 6''-H_e), 1.96 – 1.79 (m, 3H, 3''-H_a, 3''-H_e, 4''-H_a/H_e), 1.74 – 1.53 (m, 3H, 4''-H_a/H_e, 5''-H_a, 5''-H_e)

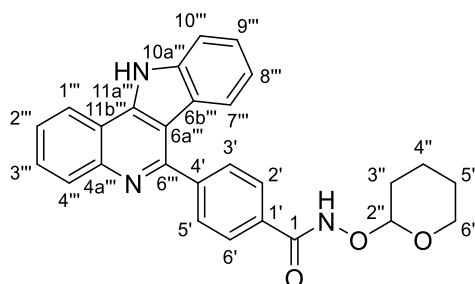
¹³C NMR (101 MHz, CD₂Cl₂): δ (ppm) = 166.0 (C-1), 153.5 (C-4'''), 142.2 (C-4'), 136.7 (C-5a'''), 133.9 (C-1'), 130.7 (C-6'''), 129.5 (C-3', C-5'), 128.4 (C-8'''), 127.9 (C-2', C-6'), 127.7 (C-9a'''), 125.9 (C-7'''), 125.6 (3a'''), 115.6 (C-1'''), 114.7 (C-2'''), 114.4 (C-9'''), 108.9 (C-3'''), 103.2 (C-2''), 63.2 (C-6''), 28.7 (C-3''), 25.7 (C-5''), 19.3 (C-4'')

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) = 3212, 3139, 2946, 2870, 2850, 1655, 1529, 1476, 1422, 1369, 1320, 1205, 1114, 1037, 950, 903, 863, 757, 717

MS (ESI): *m/z* = 388 [M+H]⁺

HRMS (ESI): *m/z* = 388.1655 [M+H]⁺ berechnet für C₂₃H₂₂N₃O₃⁺ 388.1656

HPLC (Methode Ia, MeCN): > 99 % (λ = 210 nm), > 99 % (λ = 254 nm)

(±)-4-(11*H*-Indolo[3,2-*c*]quinolin-6-yl)-*N*-[(tetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)oxy]benzamid (133**)**C₂₇H₂₃N₃O₃M_r = 437.50

Die Durchführung erfolgte nach Arbeitsvorschrift F. Es wurden 102 mg (0.301 mmol) 4-(11*H*-Indolo[3,2-*c*]quinolin-6-yl)benzoesäure (**130**) in 1.5 mL trockenem DMF, 100 µL (0.588 mmol) *N,N*-Diisopropylethylamin, 190 mg (0.444 mmol) COMU in 1.0 mL trockenem DMF und 53 mg (0.45 mmol) *O*-(Tetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)hydroxylamin in 1.0 mL trockenem DMF eingesetzt. Nach einer Reaktionszeit von 17 h wurde dreimal mit Dichlormethan (je 10 mL) extrahiert und das Rohprodukt mittels Säulenchromatographie (Dichlormethan/Methanol/0.1 % Triethylamin = 92:8:0.1, *R_f* = 0.5) aufgereinigt.

Ausbeute: 60 % 78 mg weißer Feststoff

Schmelzpunkt/-bereich: 243 °C

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ (ppm) = 12.94 (s, 1H, NH), 11.85 (s, 1H, CONH), 8.59 (dd, *J* = 8.1, 1.5 Hz, 1H, 1'''-H), 8.15 (dd, *J* = 8.3, 1.2 Hz, 1H, 4'''-H), 8.07 – 8.01 (m, 2H, 2'-H, 6'-H), 7.97 – 7.91 (m, 2H, 3'-H, 5'-H), 7.79 (ddd, *J* = 8.4, 6.9, 1.5 Hz, 1H, 3'''-H), 7.74 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H, 10'''-H), 7.73 (ddd, *J* = 8.2, 6.9, 1.3 Hz, 1H, 2'''-H), 7.51 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H, 7'''-H), 7.46 (ddd, *J* = 8.2, 7.2, 1.1 Hz, 1H, 9'''-H), 7.16 (ddd, *J* = 8.0, 7.3, 0.9 Hz, 1H, 8'''-H), 5.09 (t, *J* = 2.3 Hz, 1H, 2''-H), 4.21 – 4.03 (m, 1H, 6''-H_a), 3.64 – 3.51 (m, 1H, 6''-H_e), 1.87 – 1.70 (m, 3H, 3''-H_a, 3''-H_e, 4''-H_a/H_e), 1.68 – 1.51 (m, 3H, 4''-H_a/H_e, 5''-H_a, 5''-H_e)

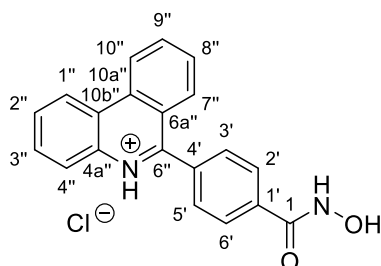
¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆): δ (ppm) = 164.0 (C-1), 154.5 (C-6'''), 144.9 (C-4a'''), 143.6 (C-4'), 141.1 (C-11a'''), 139.1 (C-10a'''), 132.6 (C-1'), 129.4 (C-4'''), 129.0 (C-3', C-5'), 128.6 (C-3'''), 127.4 (C-2', C-6'), 125.9 (C-2'''), 125.5 (C-9'''), 122.0 (C-1'''), 121.4 (C-6b'''), 121.0 (C-7'''), 120.4 (C-8'''), 116.3 (C-11b'''), 112.0 (C-10'''), 111.8 (C-6a'''), 101.0 (C-2''), 61.4 (C-6''), 27.9 (C-3''), 24.8 (C-5''), 18.3 (C-4'')

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) = 3441, 3263, 3053, 2942, 2869, 1663, 1638, 1566, 1501, 1440, 1359, 1319, 1240, 1205, 1112, 1022, 951, 897, 872, 767, 741

MS (ESI): *m/z* = 919, 436 [M-H]⁻

HRMS (ESI): *m/z* = 436.1662 [M-H]⁻ berechnet für C₂₇H₂₂N₃O₃⁻ 436.1667

HPLC (Methode VII, MeOH): > 99 % (λ = 210 nm), > 99 % (λ = 254 nm)

6-[4-(Hydroxycarbamoyl)phenyl]phenanthridin-5-ium chlorid (134) $C_{20}H_{15}ClN_2O_2$ $M_r = 350.80$

Die Durchführung erfolgte nach Arbeitsvorschrift G. Es wurden 151 mg (0.379 mmol) (\pm)-4-(Phenanthridin-6-yl)-*N*-[(tetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)oxy]benzamid (**131**) in 6.0 mL Dichlormethan und 100 μ L (0.400 mmol) 4 M Salzsäure in 1,4-Dioxan eingesetzt. Die Entschützungszeit betrug 19 h.

Ausbeute: 95 % 127 mg weißer Feststoff

Schmelzpunkt/-bereich: 237 °C

1H NMR (500 MHz, Pyridin- d_5): δ (ppm) = 8.84 (d, J = 8.3 Hz, 1H, 10''-H), 8.78 (dd, J = 8.2, 1.3 Hz, 1H, 1''-H), 8.60 – 8.53 (m, 2H, 2'-H, 6'-H), 8.46 (dd, J = 8.2, 1.3 Hz, 1H, 4''-H), 8.10 (dd, J = 8.2, 1.1 Hz, 1H, 7''-H), 8.03 – 7.97 (m, 2H, 3'-H, 5'-H), 7.89 (ddd, J = 8.3, 7.0, 1.2 Hz, 1H, 9''-H), 7.81 (ddd, J = 8.2, 7.0, 1.4 Hz, 1H, 3''-H), 7.74 (ddd, J = 8.3, 7.0, 1.4 Hz, 1H, 2''-H), 7.65 (ddd, J = 8.2, 7.0, 1.1 Hz, 1H, 8''-H)

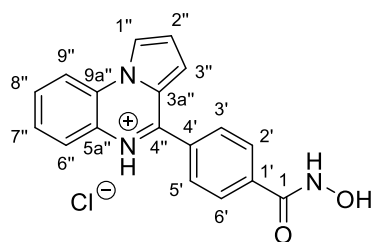
^{13}C NMR (126 MHz, Pyridin- d_5): δ (ppm) = 165.4 (C-1), 160.4 (C-6''), 144.4 (C-4a''), 142.9 (C-4'), 134.6 (C-1'), 133.8 (C-10a''), 131.1 (C-9''), 130.7 (C-4''), 130.6 (C-3', C-5'), 129.4 (C-3''), 128.7 (C-7''), 127.9 (C-8''), 127.8 (C-2', C-6'), 127.6 (C-2''), 125.2 (C-6a''), 124.2 (C-10b''), 123.0 (C-10''), 122.9 (C-1'')

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ (cm $^{-1}$) = 3205, 3139, 3058, 3016, 2923, 2849, 2817, 2773, 2740, 1678, 1637, 1608, 1529, 1459, 1369, 1332, 1303, 1149, 1011, 887, 868, 796, 758, 724, 595

MS (ESI): m/z = 313 [M-H] $^{-}$

HRMS (ESI): m/z = 313.0981 [M-H] $^{-}$ berechnet für $C_{20}H_{13}N_2O_2^{-}$ 313.0983

HPLC (Methode 1e, MeOH): > 99 % (λ = 210 nm), > 99 % (λ = 254 nm)

4-(4-(Hydroxycarbamoyl)phenyl)pyrrolo[1,2-a]chinoxalin-5-ium chlorid (135) $C_{18}H_{14}ClN_3O_2$ $M_r = 339.78$

Die Durchführung erfolgte nach Arbeitsvorschrift G. Es wurden 141 mg (0.364 mmol) (\pm)-4-(Pyrrolo[1,2-*a*]quinoxalin-4-yl)-*N*-[(tetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)oxy]benzamid (**132**) in 5.0 mL Dichlormethan und 100 μ L (0.400 mmol) 4 M Salzsäure in 1,4-Dioxan eingesetzt. Die Entschützungszeit betrug 3 h.

Ausbeute: 82 % 102 mg gelber Feststoff

Schmelzpunkt/-bereich: 235 – 236 °C

^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6): δ (ppm) = 8.99 (s, 1H, 1''-H), 8.53 (d, J = 8.3 Hz, 1H, 9''-H), 8.23 (d, J = 8.0 Hz, 1H, 6''-H), 8.14 – 8.09 (m, 2H, 3'-H, 5'-H), 8.07 – 8.03 (m, 2H, 2'-H, 6'-H), 7.78 (t, J = 7.7 Hz, 1H, 8''-H), 7.66 (t, J = 7.7 Hz, 1H, 7''-H), 7.42 (d, J = 4.2 Hz, 1H, 3''-H), 7.27 (dd, J = 4.3, 2.5 Hz, 1H, 2''-H)

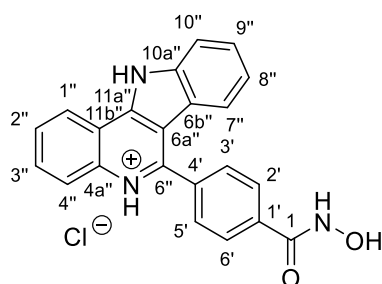
^{13}C NMR (126 MHz, DMSO- d_6): δ (ppm) = 163.0 (C-1), 151.0 (C-1'), 135.6 (C-4''), 134.7 (C-4'), 129.7 (C-3', C-5', C-5a''), 129.4 (C-8''), 127.4 (C-2', C-6'), 126.8 (C-7''), 126.4 (C-9a''), 124.9 (C-6''), 123.5 (C-3a''), 121.9 (C-1''), 117.4 (C-2''), 115.6 (C-3'', C-9'')

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ (cm^{-1}) = 3196, 3109, 3039, 3000, 2862, 2765, 2732, 1666, 1619, 1583, 1534, 1449, 1437, 1400, 1319, 1161, 1012, 890, 856, 760, 714, 648

MS (ESI): m/z = 302 $[\text{M}-\text{H}]^-$

HRMS (ESI): m/z = 302.0933 $[\text{M}-\text{H}]^-$ berechnet für $C_{18}H_{12}N_3O_2^-$ 302.0935

HPLC (Methode 1e, MeOH): > 99 % (λ = 210 nm), > 99 % (λ = 254 nm)

6-(4-(Hydroxycarbamoyl)phenyl)-11*H*-indolo[3,2-*c*]chinolin-5-ium chlorid (136) $C_{22}H_{16}ClN_3O_2$ $M_r = 389.84$

Die Durchführung erfolgte nach Arbeitsvorschrift G. Es wurden 59 mg (0.13 mmol) (\pm)-4-(11*H*-Indolo[3,2-*c*]quinolin-6-yl)-*N*-[(tetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)oxy]benzamid (**133**) in 3.0 mL Dichlormethan und 40 μ L (0.16 mmol) 4 M Salzsäure in 1,4-Dioxan eingesetzt. Die Entschützungszeit betrug 5 h.

Ausbeute: 73 % 37 mg hellgelber Feststoff

Schmelzpunkt/-bereich: 264 °C

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6): δ (ppm) = 15.41 (bs, 1H, NH^+), 14.77 (bs, 1H, NH), 11.62 (bs, 1H, NHOH), 9.30 (bs, 1H, NH), 9.00 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H, 1''-H), 8.44 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H, 4''-H), 8.20 – 8.14 (m, 2H, 2'-H, 6'-H), 8.14 – 8.07 (m, 3H, 3'-H, 5'-H, 3''-H), 8.01 (t, $J = 7.6$ Hz, 1H, 2''-H), 7.92 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H, 10''-H), 7.65 (ddd, $J = 8.2, 6.8, 1.4$ Hz, 1H, 9''-H), 7.36 (t, $J = 8.0$ Hz, 1H, 8''-H), 7.32 (d, $J = 7.7$ Hz, 1H, 7''-H)

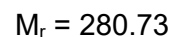
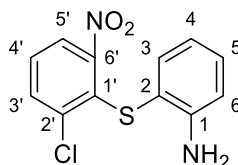
^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6): δ (ppm) = 163.2 (C-1), 150.4 (C-6''), 144.1 (C-11a''), 140.4 (C-10a''), 135.6 (C-4a''), 133.9 (C-4'), 132.3 (C-3''), 129.8 (C-1', C-3', C-5'), 128.2 (C-2''), 127.9 (C-9''), 127.6 (C-2', C-6'), 123.7 (C-1''), 122.9 (C-8''), 121.5 (C-6b''), 121.2 (C-4''), 120.9 (C-7''), 115.2 (C-11b''), 113.4 (C-10''), 112.1 (C-6a'')

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ (cm^{-1}) = 3419, 3053, 2941, 2873, 2783, 1640, 1586, 1557, 1445, 1404, 1367, 1242, 1220, 1155, 1015, 894, 763, 711, 619, 569

MS (ESI): $m/z = 354$ $[\text{M}-\text{Cl}]^+$

HRMS (ESI): $m/z = 354.1232$ $[\text{M}-\text{Cl}]^+$ berechnet für $C_{22}H_{16}N_3O_2^+$ 354.1237

HPLC (Methode 1e, MeOH): > 99 % ($\lambda = 210$ nm), > 99 % ($\lambda = 254$ nm)

2-[(2-Chlor-6-nitrophenyl)thio]anilin (151)(Literaturbekannte Substanz^[288], hergestellt in Anlehnung an eine alternative Methode^[246])

Eine Lösung von 1.70 mL (15.9 mmol) 2-Aminothiophenol (**150**) in 32 ml Ethanol wurde zum Rückfluss erhitzt. Dann wurde eine Lösung von 1.31 g (16.0 mmol) trockenem Natriumacetat in 8.0 ml Ethanol sowie eine Lösung von 3.10 g (16.1 mmol) 1,2-Dichlor-3-nitrobenzol (**149**) in 19 mL Ethanol zugegeben und das Reaktionsgemisch 3 h zum Rückfluss erhitzt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurde das Reaktionsgemisch eingeengt und über Nacht im Kühlschrank aufbewahrt. Der auskristallisierte Feststoff wurde unter Vakuum abfiltriert, mit 30 %igem Ethanol gewaschen und aus Methanol umkristallisiert.

Ausbeute: 43 % 1.93 g orange Kristalle

Schmelzpunkt/-bereich: 125 °C
(Lit.: 126 – 127 °C)^[288]

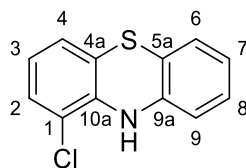
¹H NMR (500 MHz, CD₂Cl₂): δ (ppm) = 7.62 (dd, J = 8.1, 1.4 Hz, 1H, 3'-H), 7.55 (dd, J = 8.0, 1.4 Hz, 1H, 5'-H), 7.38 (t, J = 8.0 Hz, 1H, 4'-H), 7.12 (dd, J = 7.8, 1.4 Hz, 1H, 3-H), 7.11 (ddd, J = 7.9, 7.4, 1.6 Hz, 1H, 5-H), 6.70 (dd, J = 8.0, 1.4 Hz, 1H, 6-H), 6.63 (ddd, J = 7.7, 7.3, 1.3 Hz, 1H, 4-H), 4.27 (s, 2H, NH₂)

¹³C NMR (126 MHz, CD₂Cl₂): δ (ppm) = 154.9 (C-6'), 148.6 (C-1), 140.2 (C-2'), 135.2 (C-3), 133.9 (C-3'), 130.8 (C-5), 129.8 (C-4'), 128.7 (C-1'), 123.0 (C-5'), 119.3 (C-4), 116.1 (C-6), 115.4 (C-2)

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) = 3428, 3342, 3069, 2874, 1616, 1524, 1480, 1445, 1359, 1308, 1247, 1138, 1049, 1024, 879, 854, 798, 754, 719, 579, 536, 506

MS (ESI): m/z = 283 [³⁷Cl]M+H⁺, 281 [³⁵Cl]M+H⁺, 188

HRMS (ESI): m/z = 281.0146 [M+H]⁺ berechnet für C₁₂H₁₀³⁵ClN₂O₂S⁺ 281.0146

1-Chlor-10H-phenothiazin (154)(Literaturbekannte Substanz^[288], hergestellt in Anlehnung an eine alternative Methode^[246]) $C_{12}H_8ClNS$ $M_r = 233.71$

In 100 mL Ameisensäure wurden 1.65 g (5.88 mmol) 2-[(2-Chlor-6-nitrophenyl)thio]anilin (**151**) unter Lösen 3 h zum Rückfluss erhitzt. Nach Abkühlen wurde die Lösung mit 2 M Natriumhydroxid-Lösung neutralisiert und dreimal mit Ethylacetat (je 200 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der erhaltene Rückstand wurde mit *iso*-Hexan gewaschen und der Feststoff unter Vakuum abfiltriert. Der Feststoff (1.30 g) wurde in 6.0 mL Aceton gelöst, eine Lösung von 252 mg (4.49 mmol) Kaliumhydroxid in 6.0 mL Ethanol zugegeben und 5 h zum Rückfluss erhitzt. Anschließend wurde das Reaktionsgemisch auf Eis gegossen, der ausgefallene Feststoff unter Vakuum abfiltriert und mit 30 %igem Ethanol gewaschen. Zur Aufreinigung wurde das Rohprodukt in Ethylacetat gelöst und mit *iso*-Hexan ausgefällt.

Ausbeute: 52 % 713 mg grauer Feststoff

Schmelzpunkt/-bereich: 93 – 94 °C
(Lit.: 92 – 93 °C)^[288]

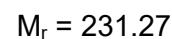
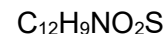
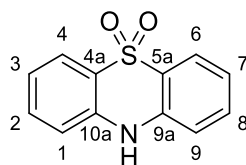
¹H NMR (400 MHz, CD₂Cl₂): δ (ppm) = 7.08 (dd, J = 8.0, 1.4 Hz, 1H, 2-H), 7.04 (ddd, J = 7.9, 7.4, 1.5 Hz, 1H, 8-H), 6.98 (dd, J = 7.7, 1.5 Hz, 1H, 6-H), 6.89 (ddd, J = 7.7, 1.4, 0.6 Hz, 1H, 4-H), 6.87 (td, J = 7.6, 1.3 Hz, 1H, 7-H), 6.75 (t, J = 7.9 Hz, 1H, 3-H), 6.68 (dd, J = 7.9, 1.3 Hz, 1H, 9-H), 6.49 (s, 1H, NH)

¹³C NMR (101 MHz, CD₂Cl₂): δ (ppm) = 141.2 (C-9a), 138.6 (C-10a), 128.2 (C-8), 128.0 (C-2), 127.1 (C-6), 125.7 (C-4), 123.8 (C-7), 123.0 (C-3), 120.4 (C-4a), 119.6 (C-1), 118.4 (C-5a), 115.8 (C-9)

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) = 3342, 3053, 1567, 1497, 1479, 1446, 1297, 1264, 1196, 1128, 1100, 1071, 884, 861, 766, 749, 712, 618, 584, 539

MS (EI): m/z = 235 [(³⁷Cl)M]⁺ (32), 234 (13), 233 [(³⁵Cl)M]⁺ (100), 232 (7), 203 (5), 201 (16), 200 (5), 198 (28), 197 (8), 196 (12), 171 (5), 164 (5), 154 (7), 116, (7), 98 (6), 68 (6), 43 (5)

HRMS (EI): m/z = 233.0062 [M]⁺ berechnet für C₁₂H₈³⁵ClNS⁺ 233.0060

10H-Phenothiazin-5,5-dioxid (155)(Literaturbekannte Substanz^[289], hergestellt in Anlehnung an eine alternative Methode^[247])

In 20 mL Eisessig wurden 2.00 g (10.0 mmol) 10H-Phenothiazin (**23**) gelöst, 5.0 mL 30 %ige Wasserstoffperoxid-Lösung hinzugeben und zum Rückfluss erhitzt. Nach 15 min wurde der Siedevorgang unterbrochen und weitere 5.0 mL 30 %ige Wasserstoffperoxid-Lösung zugegeben. Anschließend wurde 3 h zum Rückfluss erhitzt und dann weitere 16 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde auf Raumtemperatur gekühlt und mit 10 mL Wasser versetzt. Der ausgefallene Feststoff wurde unter Vakuum abfiltriert und mittels Säulenchromatographie (Dichlormethan/Methanol = 9:1, $R_f = 0.5$) aufgereinigt.

Ausbeute: 49 % 1.14 g weiße Kristalle

Schmelzpunkt/-bereich: 258 – 259 °C
(keine Angabe in Lit.)

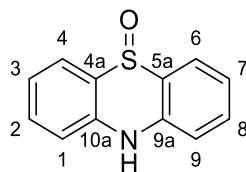
^1H NMR (400 MHz, CD_2Cl_2): δ (ppm) = 8.00 (dd, $J = 8.0, 1.4$ Hz, 2H, 4-H, 6-H), 7.54 (ddd, $J = 8.6, 7.2, 1.5$ Hz, 2H, 2-H, 8-H), 7.46 (s, 1H, NH), 7.24 (ddd, $J = 8.2, 7.2, 1.0$ Hz, 2H, 3-H, 7-H), 7.10 (d, $J = 8.3$ Hz, 2H, 1-H, 9-H)

^{13}C NMR (101 MHz, CD_2Cl_2): δ (ppm) = 138.3 (C-9a, C-10a), 133.7 (C-2, C-8), 123.7 (C-4, C-6), 122.7 (C-3, C-7), 122.6 (C-4a, C-5a), 117.0 (C-1, C-9)

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ (cm^{-1}) = 3303, 3192, 3120, 3076, 3010, 2926, 1609, 1580, 1518, 1472, 1348, 1284, 1153, 1125, 1059, 884, 854, 774, 751, 700, 632, 602, 551

MS (ESI): $m/z = 230$ $[\text{M-H}]^-$

HRMS (ESI): $m/z = 230.0282$ $[\text{M-H}]^-$ berechnet für $\text{C}_{12}\text{H}_8\text{NO}_2\text{S}^-$ 230.0281

10*H*-Phenothiazin-5-oxid (156)(Literaturbekannte Substanz^[248], nur durch Schmelzpunkt in der Literatur charakterisiert) $C_{12}H_9NOS$ $M_r = 215.27$

In 65 mL Ethanol wurden 2.00 g (10.0 mmol) 10*H*-Phenothiazin (**23**) gelöst und 650 µL 10 %ige ethanolische Kaliumhydroxid-Lösung und 1.95 mL 30 %ige Wasserstoffperoxid-Lösung zugegeben. Nach 3 h wurde der Siedevorgang unterbrochen und weitere 2.85 mL 30 %ige Wasserstoffperoxid-Lösung zugegeben. Anschließend wurde 4 h zum Rückfluss erhitzt und dann weitere 64 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach Neutralisation des Reaktionsgemisches mit 2 M Salzsäure wurde der ausgefallene Feststoff unter Vakuum abfiltriert, mit Ethanol gewaschen und unter Vakuum getrocknet.

Ausbeute: 94 % 2.02 g weiße Kristalle

Schmelzpunkt/-bereich: 248 – 249 °C
(Lit.: 242 – 242.5 °C)^[248]

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ (ppm) = 10.95 (s, 1H, NH), 7.90 (dd, *J* = 7.9, 1.4 Hz, 2H, 4-H, 6-H), 7.61 (ddd, *J* = 8.5, 7.1, 1.5 Hz, 2H, 2-H, 8-H), 7.39 (dd, *J* = 8.3, 1.1 Hz, 2H, 1-H, 9-H), 7.19 (ddd, *J* = 7.9, 7.2, 1.1 Hz, 2H, 3-H, 7-H)

¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆): δ (ppm) = 136.8 (C-9a, C-10a), 132.7 (C-2, C-8), 131.1 (C-4, C-6), 121.2 (C-3, C-7), 120.9 (C-4a, C-5a), 116.8 (C-1, C-9)

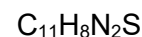
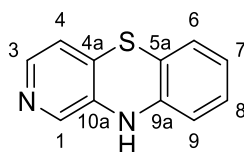
IR (KBr): $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) = 3314, 3242, 3204, 3149, 3054, 2966, 2926, 2875, 2842, 1616, 1583, 1522, 1470, 1360, 1267, 1075, 976, 799, 750, 642, 556, 509

MS (ESI): *m/z* = 431 [2M+H]⁺, 216 [M+H]⁺

HRMS (ESI): *m/z* = 216.0482 [M+H]⁺ berechnet für C₁₂H₁₀NOS⁺ 216.0478

10*H*-Benzo[*b*]pyrido[3,4-*e*][1,4]thiazin (164)

(Literaturbekannte Substanz^[250], nur durch Schmelzpunkt und Elementaranalyse in der Literatur charakterisiert)



Ein Gemisch aus 7.86 g (28.0 mmol) 2'-Bromphenyl-3-amino-4-pyridylsulfid^[250] (**163**), 4.29 g (40.5 mmol) Natriumcarbonat und 1.41 g (7.40 mmol) Kupfer(I)-iodid wurde homogen verrieben und unter permanentem N₂-Strom bei 180 – 190 °C geschmolzen. Nach 3 h wurde die Schmelze auf Raumtemperatur abgekühlt. Anstelle der in der Literatur beschriebenen Sublimation wurde der Schmelzkuchen fein verrieben und viermal mit Dichlormethan (je 400 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden eingeeengt, mit einer Ammoniak-Ammoniumchlorid-Pufferlösung gewaschen und über Magnesiumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und das Rohprodukt mittels Säulenchromatographie (Dichlormethan/Methanol = 98:2, *R_f* = 0.2) aufgereinigt.

Ausbeute: 60 % 3.35 g gelbe Kristalle

Schmelzpunkt/-bereich: 165 – 166 °C
(Lit.: 163.5 – 165 °C)^[250]

¹H NMR (500 MHz, CD₂Cl₂): δ (ppm) = 7.92 (d, *J* = 4.9 Hz, 1H, 3-H), 7.78 (s, 1H, 1-H), 7.00 (td, *J* = 7.6, 1.5 Hz, 1H, 8-H), 6.91 (dd, *J* = 7.8, 1.5 Hz, 1H, 6-H), 6.84 (d, *J* = 4.9 Hz, 1H, 4-H), 6.82 (td, *J* = 7.5, 1.3 Hz, 1H, 7-H), 6.58 (dd, *J* = 8.0, 1.3 Hz, 1H, 9-H), 6.34 (s, 1H, NH)

¹³C NMR (126 MHz, CD₂Cl₂): δ (ppm) = 143.8 (C-3), 141.3 (C-9a), 138.4 (C-10a), 135.4 (C-1), 129.5 (C-4a), 128.5 (C-8), 127.3 (C-6), 123.5 (C-7), 121.3 (C-4), 116.5 (C-5a), 115.5 (C-9)

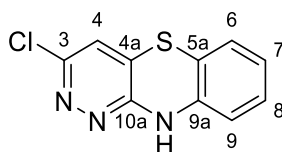
IR (KBr): $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) = 3245, 3159, 3060, 3026, 2985, 2840, 1593, 1552, 1528, 1478, 1435, 1391, 1321, 1289, 1233, 1060, 813, 737, 698, 611, 557

MS (ESI): *m/z* = 199 [M-H]⁻

HRMS (ESI): *m/z* = 199.0336 [M-H]⁻ berechnet für C₁₁H₇N₂S⁻ 199.0335

3-Chlor-10*H*-benzo[*b*]pyridazino[3,4-*e*][1,4]thiazin (171)

(Literaturbekannte Substanz^[252], nur durch Schmelzpunkt und Elementaranalyse in der Literatur charakterisiert)


 $C_{10}H_6ClN_3S$
 $M_r = 235.69$

In 79 mL konzentrierter Salzsäure wurden 4.50 g (16.6 mmol) 2-[(3,6-Dichlorpyridazin-4-yl)thio]anilin^[252] (**169**) suspendiert und auf 90 °C erwärmt. Nach 3 h wurde das Reaktionsgemisch mit 25 % Ammoniak-Lösung neutralisiert, der ausgefallene Feststoff unter Vakuum abfiltriert und mit Wasser gewaschen. Das trockene Rohprodukt wurde wiederholt mittels Säulenchromatographie (Dichlormethan/Methanol/0.1 % Triethylamin = 98:2:0.1, $R_f = 0.3$) aufgereinigt.

Ausbeute: 34 % 1.32 g gelbe Kristalle

Schmelzpunkt/-bereich: 276 – 277 °C
(Lit.: 278 °C)^[252]

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ (ppm) = 9.94 (s, 1H, NH), 7.38 (s, 1H, 4-H), 7.03 (ddd, $J = 8.0, 7.3, 1.5$ Hz, 1H, 8-H), 6.94 (dd, $J = 7.7, 1.5$ Hz, 1H, 6-H), 6.84 – 6.77 (m, 2H, 7-H, 9-H)

¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆): δ (ppm) = 153.8 (C-10a), 148.8 (C-3), 138.3 (C-9a), 128.5 (C-8), 127.9 (C-4a), 126.0 (C-6), 123.2 (C-4), 123.0 (C-7), 116.0 (C-9), 112.8 (C-5a)

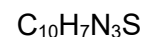
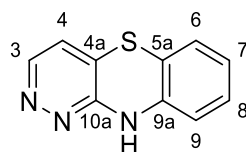
IR (KBr): $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) = 3225, 3186, 3136, 3042, 2994, 2956, 2852, 2807, 1592, 1508, 1484, 1436, 1407, 1309, 1102, 1080, 896, 864, 742, 686, 634

MS (ESI): $m/z = 238$ [³⁷Cl]M+H⁺, 236 [³⁵Cl]M+H⁺

HRMS (ESI): $m/z = 236.0044$ [M+H]⁺ berechnet für C₁₀H₇³⁵ClN₃S⁺ 236.0044

10H-Benzo[b]pyridazino[3,4-e][1,4]thiazin (172)

(Literaturbekannte Substanz^[252], nur durch Schmelzpunkt und Elementaranalyse in der Literatur charakterisiert, zusätzlich war Änderung in der Methode erforderlich)



In 10 mL Ethanol wurden 2.38 g (42.4 mmol) Kaliumhydroxid gelöst und 710 mg (3.01 mmol) 3-Chlor-10H-benzo[b]pyridazino[3,4-e][1,4]thiazin (**171**) sowie 178 mg Palladium/Aktivkohle (10 wt%) zugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde bei 50 °C und 20 bar 12 h hydriert. Nach Entfernen des Katalysators durch Filtration wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und das Rohprodukt mittels Säulenchromatographie (Dichlormethan/Methanol/0.1 % Triethylamin = 98:2:0.1, $R_f = 0.2$) aufgereinigt.

Ausbeute: 65 % 395 mg gelbe Kristalle

Schmelzpunkt/-bereich: 263 – 264 °C
(Lit.: 263 °C)^[252]

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ (ppm) = 9.72 (s, 1H, NH), 8.33 (d, $J = 5.0$ Hz, 1H, 3-H), 7.14 (d, $J = 5.0$ Hz, 1H, 4-H), 7.02 (td, $J = 7.7, 1.5$ Hz, 1H, 8-H), 6.93 (dd, $J = 7.8, 1.4$ Hz, 1H, 6-H), 6.84 (dd, $J = 8.0, 1.3$ Hz, 1H, 9-H), 6.79 (td, $J = 7.5, 1.3$ Hz, 1H, 7-H)

¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆): δ (ppm) = 154.5 (C-10a), 146.8 (C-3), 139.1 (C-9a), 128.3 (C-8), 126.1 (C-6), 123.4 (C-4a), 123.1 (C-4), 122.8 (C-7), 115.8 (C-9), 113.5 (C-5a)

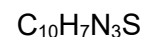
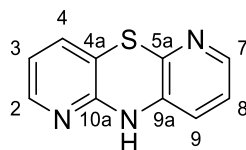
IR (KBr): $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) = 3226, 3184, 3137, 3089, 3003, 2946, 2904, 2854, 1591, 1550, 1519, 1487, 1439, 1347, 1311, 1093, 1043, 894, 833, 758, 672, 573

MS (ESI): $m/z = 202$ [M+H]⁺

HRMS (ESI): $m/z = 202.0433$ [M+H]⁺ berechnet für C₁₀H₈N₃S⁺ 202.0433

10*H*-Dipyrido[2,3-*b*:2',3'-*e*][1,4]thiazin (177)

(Literaturbekannte Substanz^[240], nur durch Schmelzpunkt, Infrarotspektroskopie und Elementaranalyse in der Literatur charakterisiert)



In 19 mL eines Lösungsmittelgemisches aus Dimethylsulfoxid/Ethanol (1:1) wurden 355 mg (6.33 mmol) Kaliumhydroxid unter Erhitzen gelöst. Die heiße Lösung wurde zu einer Lösung von 1.52 g (6.12 mmol) 3-[(3-Nitropyridin-2-yl)amino]pyridin-2-thiol^[240] (**176**) in 3.8 mL Dimethylsulfoxid gegeben und 7 h zum Rückfluss erhitzt. Aus dem Reaktionsgemisch wurde Ethanol im Vakuum entfernt und das restliche Gemisch auf 30 mL Wasser gegeben. Der ausgefallene Feststoff wurde unter Vakuum abfiltriert, mit Wasser gewaschen und bei 50 °C getrocknet.

Ausbeute: 67 % 820 mg hellorange Kristalle

Schmelzpunkt/-bereich: 223 – 224 °C
(Lit.: 222.5 – 224.5 °C)^[240]

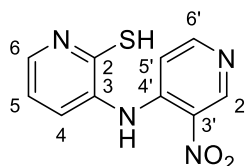
¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ (ppm) = 9.21 (s, 1H, NH), 7.82 – 7.73 (m, 2H, 2-H, 7-H), 7.26 (dd, *J* = 7.6, 1.6 Hz, 1H, 4-H), 7.00 – 6.91 (m, 2H, 8-H, 9-H), 6.71 (dd, *J* = 7.6, 4.9 Hz, 1H, 3-H)

¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆): δ (ppm) = 151.2 (C-10a), 145.8 (C-2), 142.3 (C-7), 139.6 (C-5a), 136.9 (C-9a), 134.0 (C-4), 122.7 (C-9), 120.5 (C-8), 117.9 (C-3), 112.7 (C-4a)

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) = 3195, 3146, 3082, 3054, 3011, 2972, 1586, 1552, 1516, 1432, 1299, 1205, 1122, 862, 797, 777, 748, 611, 542

MS (ESI): *m/z* = 202 [M+H]⁺

HRMS (ESI): *m/z* = 202.0435 [M+H]⁺ berechnet für C₁₀H₈N₃S⁺ 202.0433

3-[(3-Nitropyridin-4-yl)amino]pyridin-2-thiol (184) $C_{10}H_8N_4O_2S$ $M_r = 248.26$

In 60 mL eines Lösungsmittelgemisches aus Methanol/Wasser (1:3) wurden 906 mg (7.18 mmol) 3-Aminopyridin-2-thiol (**174**) und 1.14 g (7.19 mmol) 4-Chlor-3-nitropyridin (**161**) gelöst und 45 min auf 100 °C erhitzt. Die gebildeten Kristalle wurden unter Vakuum abfiltriert, mit heißem Wasser gewaschen und bei 50 °C getrocknet.

Ausbeute: 81 % 1.44 g rote Kristalle

Schmelzpunkt/-bereich: 251 °C

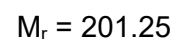
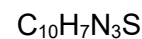
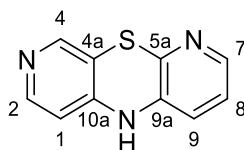
1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6): δ (ppm) = 14.12 (bs, 1H, SH), 10.40 (s, 1H, NH), 9.19 (s, 1H, 2'-H), 8.45 (d, $J = 6.1$ Hz, 1H, 6'-H), 7.83 (dd, $J = 7.7, 1.4$ Hz, 1H, 4-H), 7.64 (td, $J = 6.1, 1.4$ Hz, 1H, 6-H), 7.50 (d, $J = 6.1$ Hz, 1H, 5'-H), 6.95 – 6.88 (m, 1H, 5-H)

^{13}C NMR (126 MHz, DMSO- d_6): δ (ppm) = 169.9 (C-2), 153.7 (C-6'), 148.4 (C-2'), 143.4 (C-4'), 137.8 (C-3), 133.1 (C-6), 131.9 (C-3'), 124.2 (C-4), 113.1 (C-5), 110.3 (C-5')

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ (cm^{-1}) = 3465, 3239, 3077, 2626, 2040, 1604, 1556, 1514, 1429, 1354, 1286, 1256, 1189, 1146, 1050, 914, 824, 788, 764, 604, 538

MS (ESI): $m/z = 247$ [M-H] $^-$

HRMS (ESI): $m/z = 247.0296$ [M-H] $^-$ berechnet für $C_{10}H_7N_4O_2S^-$ 247.0295

5H-Dipyrido[2,3-b:4',3'-e][1,4]thiazin (185)(Literaturbekannte Substanz^[257], hergestellt in Anlehnung an eine alternative Methode^[240])

In 17 mL eines Lösungsmittelgemisches aus Dimethylsulfoxid/Ethanol (1:1) wurden 322 mg (5.74 mmol) Kaliumhydroxid unter Erhitzen gelöst. Die heiße Lösung wurde zu einer Lösung von 1.37 g (5.52 mmol) 3-[(3-Nitropyridin-4-yl)amino]pyridin-2-thio (**184**) in 3.5 mL Dimethylsulfoxid gegeben und 31 h zum Rückfluss erhitzt. Aus dem Reaktionsgemisch wurde Ethanol im Vakuum entfernt und das restliche Gemisch auf 30 mL Wasser gegeben. Die wässrige Phase wurde dreimal mit Ethylacetat (je 50 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Magnesiumsulfat getrocknet, das organische Lösungsmittel im Vakuum entfernt und das Rohprodukt mittels Säulenchromatographie (Dichlormethan/Methanol 95:5, $R_f = 0.2$) aufgereinigt.

Ausbeute: 42 % 462 mg dunkelgelber Feststoff

Schmelzpunkt/-bereich: 226 – 227 °C
(Lit.: 149 – 150 °C)^[257]

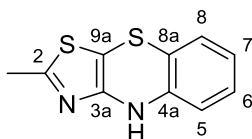
^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6): δ (ppm) = 9.13 (s, 1H, NH), 7.96 (d, $J = 5.3$ Hz, 1H, 2-H), 7.86 (s, 1H, 4-H), 7.80 (dd, $J = 4.7, 1.5$ Hz, 1H, 7-H), 6.96 (dd, $J = 8.0, 4.7$ Hz, 1H, 8-H), 6.85 (dd, $J = 8.0, 1.5$ Hz, 1H, 9-H), 6.48 (d, $J = 5.4$ Hz, 1H, 1-H)

^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6): δ (ppm) = 149.0 (C-2), 146.0 (C-10a), 145.7 (C-4), 142.8 (C-7), 140.0 (C-5a), 135.8 (C-9a), 122.8 (C-8), 120.6 (C-9), 113.6 (C-4a), 108.7 (C-1)

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ (cm^{-1}) = 3246, 3151, 3044, 2979, 2924, 2896, 1554, 1490, 1445, 1416, 1318, 1180, 1111, 1036, 903, 820, 789, 727, 606, 558

MS (ESI): $m/z = 202$ $[\text{M}+\text{H}]^+$

HRMS (ESI): $m/z = 202.0431$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ berechnet für $\text{C}_{10}\text{H}_8\text{N}_3\text{S}^+$ 202.0433

2-Methyl-4H-benzo[*b*]thiazolo[4,5-*e*][1,4]thiazin (189)(Literaturbekannte Substanz^[258], nicht in der Literatur charakterisiert) $C_{10}H_8N_2S_2$ $M_r = 220.31$

In 24 mL trockenem Benzol wurden 3.66 g (18.3 mmol) 2-Chlor-2*H*-benzo[*b*][1,4]thiazin-3(4*H*)-on (**187**) und 1.38 g (18.4 mmol) Thioacetamid (**188**) suspendiert. Das Reaktionsgemisch wurde 15 h unter Verwendung eines Wasserabscheiders zum Rückfluss erhitzt. Anschließend wurde das organische Lösungsmittel im Vakuum entfernt und das Rohprodukt mittels Säulenchromatographie (*iso*-Hexan/Ethylacetat 4:1, $R_f = 0.5$) aufgereinigt

Ausbeute: 38 % 1.54 g brauner Feststoff

Schmelzpunkt/-bereich: 88 – 89 °C

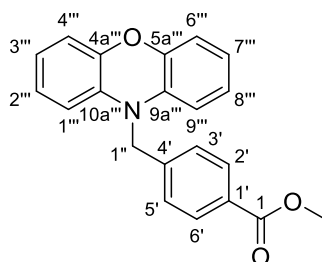
1H NMR (400 MHz, CD_2Cl_2): δ (ppm) = 7.01 (td, $J = 7.7$, 1.5 Hz, 1H, 6-H), 6.92 (dd, $J = 7.8$, 1.4 Hz, 1H, 8-H), 6.82 (td, $J = 7.5$, 1.2 Hz, 1H, 7-H), 6.57 (dd, $J = 8.0$, 1.2 Hz, 1H, 5-H), 6.52 (s, 1H, NH), 2.55 (s, 3H, CH_3)

^{13}C NMR (101 MHz, CD_2Cl_2): δ (ppm) = 164.6 (C-2), 151.0 (C-3a), 143.1 (C-4a), 128.5 (C-6), 127.4 (C-8), 123.5 (C-7), 116.4 (C-8a), 116.0 (C-5), 93.5 (C-9a), 19.8 (CH_3)

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ (cm^{-1}) = 3310, 3270, 3230, 3058, 1617, 1589, 1555, 1521, 1492, 1466, 1431, 1366, 1313, 1184, 1038, 764, 738, 673

MS (ESI): $m/z = 237, 221 [M+H]^+$

HRMS (ESI): $m/z = 221.0202 [M+H]^+$ berechnet für $C_{10}H_9N_2S_2^+$ 221.0202

4-[(10*H*-Phenoxazin-10-yl)methyl]benzoesäuremethylester (196) $C_{21}H_{17}NO_3$ $M_r = 331.37$

Die Durchführung erfolgte nach Arbeitsvorschrift C. Es wurden 402 mg (2.19 mmol) 10*H*-Phenoxazin (**190**) in 3.0 mL trockenem DMF, 4.45 mL (4.45 mmol) 1 M Lithiumhexamethyldisilazid und 863 mg (3.77 mmol) 4-(Brommethyl)benzoesäuremethylester (**50**) in 2.0 mL trockenem DMF eingesetzt. Nach einer Reaktionszeit von 12 h wurde dreimal mit Dichlormethan (je 50 mL) extrahiert und das Rohprodukt mittels Säulenchromatographie (Dichlormethan/*iso*-Hexan = 4:1, $R_f = 0.5$) aufgereinigt.

Ausbeute: 77 % 561 mg hellgrüner Feststoff

Schmelzpunkt/-bereich: 124 – 126 °C

1H NMR (400 MHz, CD_2Cl_2): δ (ppm) = 8.02 – 7.98 (m, 2H, 2'-H, 6'-H), 7.43 – 7.38 (m, 2H, 3'-H, 5'-H), 6.74 – 6.66 (m, 6H, 2'''-H, 3'''-H, 4'''-H, 6'''-H, 7'''-H, 8'''-H), 6.31 (d, $J = 6.8$ Hz, 2H, 1'''-H, 9'''-H), 4.83 (s, 2H, 1''-H), 3.88 (s, 3H, CH_3)

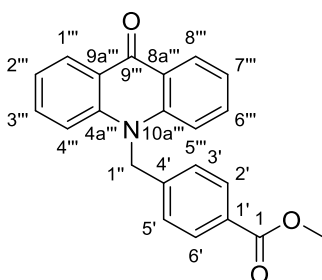
^{13}C NMR (101 MHz, CD_2Cl_2): δ (ppm) = 167.1 (C-1), 145.7 (C-4a''', C-5a'''), 142.6 (C-4'), 134.1 (C-9a''', C-10a'''), 130.6 (C-2', C-6'), 130.0 (C-1'), 126.8 (C-3', C-5'), 124.3 (C-2''', C-8'''), 122.0 (C-3''', C-7'''), 115.8 (C-4'', C-6'''), 112.7 (C-1''', C-9'''), 52.5 (CH_3), 49.6 (C-1'')

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ (cm^{-1}) = 3056, 3028, 2957, 2932, 2872, 1733, 1610, 1490, 1430, 1380, 1276, 1247, 1180, 1109, 1015, 912, 860, 760, 739

MS (ESI): $m/z = 332$ $[M+H]^+$

HRMS (ESI): $m/z = 332.1283$ $[M+H]^+$ berechnet für $C_{21}H_{18}NO_3^+$ 332.1281

HPLC (Methode Ia, MeCN): > 99 % ($\lambda = 210$ nm), > 99 % ($\lambda = 254$ nm)

4-[[9-Oxoacridin-10(9H)-yl]methyl]benzoesäuremethylester (197) $C_{22}H_{17}NO_3$ $M_r = 343.38$

Die Durchführung erfolgte nach Arbeitsvorschrift C. Es wurden 400 mg (2.05 mmol) 9(10H)-Acridon (**191**) in 2.0 mL trockenem DMF, 4.08 mL (4.08 mmol) 1 M Lithiumhexamethyldisilazid und 798 g (3.48 mmol) 4-(Brommethyl)benzoesäuremethylester (**50**) in 1.5 mL trockenem DMF eingesetzt. Nach einer Reaktionszeit von 24 h wurde viermal mit Dichlormethan (je 30 mL) extrahiert und das Rohprodukt mittels Säulenchromatographie (Dichlormethan/Methanol = 99:1, $R_f = 0.4$) aufgereinigt.

Ausbeute: 77 % 542 mg hellgelbe Kristalle

Schmelzpunkt/-bereich: 235 – 236 °C

1H NMR (500 MHz, CD_2Cl_2): δ (ppm) = 8.52 (dd, $J = 8.0, 1.7$ Hz, 2H, 1'''-H, 8'''-H), 8.02 – 7.97 (m, 2H, 2'-H, 6'-H), 7.65 (ddd, $J = 8.7, 6.9, 1.8$ Hz, 2H, 3'''-H, 6'''-H), 7.36 – 7.28 (m, 6H, 3'-H, 5'-H, 2'''-H, 4'''-H, 5'''-H, 7'''-H), 5.66 (s, 2H, 1''-H), 3.87 (s, 3H, CH_3)

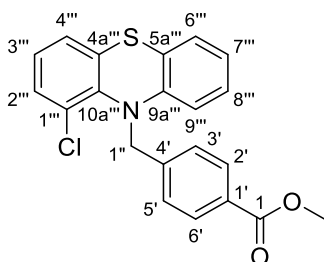
^{13}C NMR (126 MHz, CD_2Cl_2): δ (ppm) = 178.3 (C-9'''), 166.9 (C-1), 143.0 (C-4a''', C-10a'''), 141.6 (C-4'), 134.6 (C-3''', C-6'''), 130.8 (C-2', C-6'), 130.5 (C-1'), 128.1 (C-1''', C-8'''), 126.4 (C-3', C-5'), 123.2 (C-8a''', C-9a'''), 122.2 (C-2''', C-7'''), 115.7 (C-4''', C-5'''), 52.6 (CH_3), 51.1 (C-1'')

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ (cm^{-1}) = 3054, 3028, 2948, 2834, 1716, 1634, 1611, 1598, 1494, 1462, 1431, 1381, 1280, 1177, 1106, 1014, 937, 875, 746, 670, 542

MS (ESI): $m/z = 344 [M+H]^+$

HRMS (ESI): $m/z = 344.1281 [M+H]^+$ berechnet für $C_{22}H_{18}NO_3^+$ 344.1281

HPLC (Methode Ia, MeCN): > 99 % ($\lambda = 210$ nm), > 99 % ($\lambda = 254$ nm)

4-[(1-Chlor-10*H*-phenothiazin-10-yl)methyl]benzoesäuremethylester (198) $C_{21}H_{16}ClNO_2S$ $M_r = 381.87$

Die Durchführung erfolgte nach Arbeitsvorschrift C. Es wurden 450 mg (1.93 mmol) 1-Chlor-10*H*-phenothiazin (**154**) in 3.0 mL trockenem DMF, 3.85 mL (3.85 mmol) 1 M Lithiumhexamethyldisilazid und 770 mg (3.36 mmol) 4-(Brommethyl)benzoesäuremethylester (**50**) in 2.0 mL trockenem DMF eingesetzt. Nach einer Reaktionszeit von 19 h wurde dreimal mit Dichlormethan (je 30 mL) extrahiert und das Rohprodukt mittels Säulenchromatographie (*iso*-Hexan/Ethylacetat = 19:1, $R_f = 0.4$ und *iso*-Hexan/Aceton = 9:1, $R_f = 0.5$) aufgereinigt.

Ausbeute: 63 % 465 mg weißer Feststoff

Schmelzpunkt/-bereich: 159 – 161 °C

1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6): δ (ppm) = 7.81 – 7.76 (m, 2H, 2'-H, 6'-H), 7.50 – 7.46 (m, 2H, 3'-H, 5'-H), 7.34 (dd, $J = 8.0, 1.4$ Hz, 1H, 4'''-H), 7.22 (dd, $J = 7.9, 1.3$ Hz, 2H, 2'''-H, 9'''-H), 7.15 (dd, $J = 7.7, 1.5$ Hz, 1H, 6'''-H), 7.15 (td, $J = 7.7, 1.5$ Hz, 1H, 8'''-H), 7.07 (t, $J = 7.8$ Hz, 1H, 3'''-H), 6.96 (td, $J = 7.5, 1.2$ Hz, 1H, 7'''-H), 5.22 (s, 2H, 1''-H), 3.79 (s, 3H, CH₃)

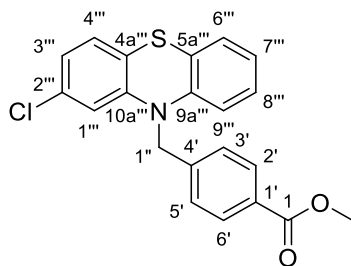
^{13}C NMR (126 MHz, DMSO- d_6): δ (ppm) = 165.9 (C-1), 145.0 (C-9a'''), 143.4 (C-4'), 140.6 (C-10a'''), 133.4 (C-1'''), 129.7 (C-4'''), 129.0 (C-2', C-6'), 128.6 (C-1'), 128.2 (C-3', C-5'), 128.2 (C-5a'''), 127.6 (C-8'''/6'''), 126.8 (C-6'''/8'''), 126.2 (C-2'''), 125.8 (C-4a'''), 125.4 (C-3'''), 124.1 (C-7'''), 121.2 (C-9'''), 56.6 (C-1''), 52.0 (CH₃)

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) = 3057, 3007, 2955, 2909, 2865, 1719, 1611, 1476, 1435, 1275, 1106, 1085, 1018, 849, 770, 752, 717, 696, 594

MS (ESI): m/z = 384 [(³⁷Cl)M+H]⁺, 382 [(³⁵Cl)M+H]⁺, 235, 233, 226

HRMS (ESI): m/z = 382.0663 [M+H]⁺ berechnet für C₂₁H₁₇ClNO₂S⁺ 382.0663

HPLC (Methode Ia, MeCN): > 99 % (λ = 210 nm), > 99 % (λ = 254 nm)

4-[(2-Chlor-10*H*-phenothiazin-10-yl)methyl]benzoesäuremethylester (199)(Literaturbekannte Substanz^[290]) $C_{21}H_{16}ClNO_2S$ $M_r = 381.87$

Die Durchführung erfolgte nach Arbeitsvorschrift C. Es wurden 599 mg (2.56 mmol) 2-Chlor-10*H*-phenothiazin (**192**) in 1.5 mL trockenem DMF, 5.11 mL (5.11 mmol) 1 M Lithiumhexamethyldisilazid und 995 mg (4.34 mmol) 4-(Brommethyl)benzoesäuremethylester (**50**) in 1.0 mL trockenem DMF eingesetzt. Nach einer Reaktionszeit von 20 h wurde dreimal mit Dichlormethan (je 30 mL) extrahiert und das Rohprodukt mittels Säulenchromatographie (Dichlormethan/*iso*-Hexan = 1:1, $R_f = 0.3$) aufgereinigt.

Ausbeute: 50 % 490 mg weißer Feststoff

Schmelzpunkt/-bereich: 56 – 58 °C

1H NMR (400 MHz, CD_2Cl_2): δ (ppm) = 8.05 – 7.90 (m, 2H, 2'-H, 6'-H), 7.48 – 7.36 (m, 2H, 3'-H, 5'-H), 7.10 (dd, $J = 7.6, 1.6$ Hz, 1H, 6'''-H), 7.02 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H, 4'''-H), 7.00 (td, $J = 7.8, 1.6$ Hz, 1H, 8'''-H), 6.91 (td, $J = 7.7, 1.2$ Hz, 1H, 7'''-H), 6.87 (dd, $J = 8.2, 2.1$ Hz, 1H, 3'''-H), 6.63 (dd, $J = 8.2, 1.2$ Hz, 1H, 9'''-H), 6.61 (d, $J = 2.1$ Hz, 1H, 1'''-H), 5.10 (s, 2H, 1''-H), 3.87 (s, 3H, CH_3)

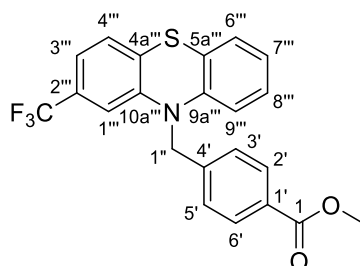
^{13}C NMR (101 MHz, CD_2Cl_2): δ (ppm) = 167.1 (C-1), 146.3 (C-10a'''), 144.3 (C-9a'''), 142.2 (C-4'), 133.6 (C-2'''), 130.5 (C-2', C-6'), 130.0 (C-1'), 128.1 (C-4'''), 128.0 (C-8'''), 127.6 (C-6'''), 127.4 (C-3', C-5'), 124.0 (C-5a'''), 123.7 (C-7'''), 123.0 (C-3'''), 123.0 (C-4a'''), 116.4 (C-1'''), 116.2 (C-9'''), 52.9 (C-1''), 52.5 (CH_3)

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ (cm^{-1}) = 3060, 2948, 2851, 1719, 1636, 1613, 1566, 1463, 1406, 1279, 1249, 1109, 1018, 899, 845, 803, 752

MS (ESI): m/z = 384 [^{37}Cl]M+H $^+$, 382 [^{35}Cl]M+H $^+$, 341, 235, 233, 217

HRMS (ESI): m/z = 382.0667 [M+H] $^+$ berechnet für $C_{21}H_{17}^{35}ClNO_2S^+$ 382.0663

HPLC (Methode Ia, MeCN): > 99 % ($\lambda = 210$ nm), > 99 % ($\lambda = 254$ nm)

4-[[2-(Trifluormethyl)-10*H*-phenothiazin-10-yl]methyl]benzoesäuremethylester (200) $C_{22}H_{16}F_3NO_2S$ $M_r = 415.43$

Die Durchführung erfolgte nach Arbeitsvorschrift C. Es wurden 450 mg (1.68 mmol) 2-(Trifluormethyl)-10*H*-phenothiazin (**193**) in 2.0 mL trockenem DMF, 3.35 mL (3.35 mmol) 1 M Lithiumhexamethyldisilazid und 652 mg (2.85 mmol) 4-(Brommethyl)benzoesäuremethylester (**50**) in 1.0 mL trockenem DMF eingesetzt. Nach einer Reaktionszeit von 3 h wurde dreimal mit Dichlormethan (je 30 mL) extrahiert und das Rohprodukt mittels Säulenchromatographie (*iso*-Hexan/Dichlormethan = 1:1, $R_f = 0.3$) aufgereinigt.

Ausbeute: 67 % 468 mg weißer Feststoff

Schmelzpunkt/-bereich: 51 – 53 °C

1H NMR (400 MHz, CD_2Cl_2): δ (ppm) = 8.01 – 7.96 (m, 2H, 2'-H, 6'-H), 7.47 – 7.41 (m, 2H, 3'-H, 5'-H), 7.22 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H, 4'''-H), 7.16 – 7.10 (m, 2H, 3'''-H, 6'''-H), 7.03 (td, $J = 7.8$, 1.6 Hz, 1H, 8'''-H), 6.93 (td, $J = 7.5$, 1.2 Hz, 1H, 7'''-H), 6.83 (d, $J = 0.8$ Hz, 1H, 1'''-H), 6.68 (dd, $J = 8.1$, 1.1 Hz, 1H, 9'''-H), 5.15 (s, 2H, 1''-H), 3.87 (s, 3H, CH_3)

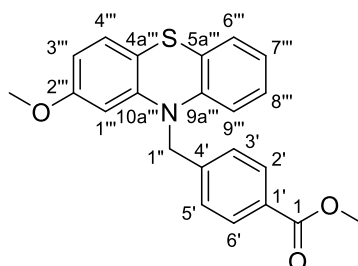
^{13}C NMR (101 MHz, CD_2Cl_2): δ (ppm) = 167.0 (C-1), 145.6 (C-10a'''), 144.3 (C-9a'''), 142.0 (C-4'), 130.5 (C-2', C-6'), 130.1 (C-1'), 129.8 (q, $^2J_{C,F} = 32.4$ Hz, C-2'''), 129.7 (C-4a'''), 128.2 (C-8'''), 127.7 (C-4'''), 127.7 (C-6'''), 127.4 (C-3', C-5'), 124.6 (q, $^1J_{C,F} = 272.3$ Hz, CF_3), 123.9 (C-7'''), 123.5 (C-5a'''), 119.9 (q, $^3J_{C,F} = 3.9$ Hz, C-3'''), 116.5 (C-9'''), 112.3 (q, $^3J_{C,F} = 3.9$ Hz, C-1'''), 52.8 (C-1''), 52.5 (CH_3)

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ (cm^{-1}) = 3062, 2999, 2951, 2851, 1720, 1604, 1472, 1445, 1425, 1325, 1280, 1251, 1166, 1145, 1113, 1085, 1019, 906, 865, 816, 754

MS (ESI): $m/z = 432, 416 [M+H]^+, 267$

HRMS (ESI): $m/z = 416.0930 [M+H]^+$ berechnet für $C_{22}H_{17}F_3NO_2S^+$ 416.0927

HPLC (Methode Ia, MeCN): > 99 % ($\lambda = 210$ nm), > 99 % ($\lambda = 254$ nm)

4-[(2-Methoxy-10*H*-phenothiazin-10-yl)methyl]benzoesäuremethylester (201) $C_{22}H_{19}NO_3S$ $M_r = 377.46$

Die Durchführung erfolgte nach Arbeitsvorschrift C. Es wurden 607 mg (2.65 mmol) 2-Methoxy-10*H*-phenothiazin (**194**) in 3.0 mL trockenem DMF, 5.21 mL (5.21 mmol) 1 M Lithiumhexamethyldisilazid und 1.05 g (4.58 mmol) 4-(Brommethyl)benzoesäuremethylester (**50**) in 2.0 mL trockenem DMF eingesetzt. Nach einer Reaktionszeit von 44 h wurde dreimal mit Dichlormethan (je 30 mL) extrahiert und das Rohprodukt mittels Säulenchromatographie (Dichlormethan/*iso*-Hexan = 1:1, $R_f = 0.3$) aufgereinigt.

Ausbeute: 66 % 661 mg weißer Feststoff

Schmelzpunkt/-bereich: 147 °C

1H NMR (500 MHz, CD_2Cl_2): δ (ppm) = 8.02 – 7.90 (m, 2H, 2'-H, 6'-H), 7.48 – 7.35 (m, 2H, 3'-H, 5'-H), 7.11 (dd, $J = 7.6, 1.6$ Hz, 1H, 6'''-H), 7.04 – 6.94 (m, 2H, 4'''-H, 8'''-H), 6.88 (td, $J = 7.5, 1.1$ Hz, 1H, 7'''-H), 6.65 (dd, $J = 8.2, 1.1$ Hz, 1H, 9'''-H), 6.45 (dd, $J = 8.4, 2.5$ Hz, 1H, 3'''-H), 6.22 (d, $J = 2.5$ Hz, 1H, 1'''-H), 5.12 (s, 2H, 1''-H), 3.86 (s, 3H, CH_3), 3.61 (s, 3H, OCH_3)

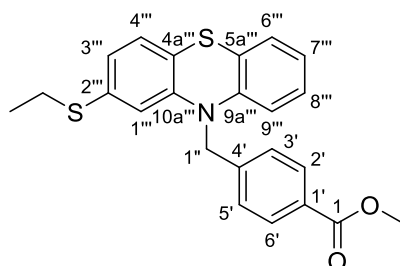
^{13}C NMR (126 MHz, CD_2Cl_2): δ (ppm) = 167.1 (C-1), 160.3 (C-2'''), 146.3 (C-10a'''), 144.8 (C-9a'''), 142.9 (C-4'), 130.4 (C-2', C-6'), 129.8 (C-1'), 127.8 (C-4'''), 127.6 (C-8'''), 127.4 (C-6'''), 127.4 (C-3', C-5'), 124.8 (C-5a'''), 123.3 (C-7'''), 116.1 (C-9'''), 115.0 (C-4a'''), 107.5 (C-3'''), 104.0 (C-1'''), 55.8 (OCH_3), 52.8 (C-1''), 52.5 (CH_3)

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ (cm^{-1}) = 3053, 3004, 2959, 2937, 2838, 1713, 1602, 1586, 1572, 1470, 1444, 1354, 1284, 1204, 1176, 1106, 1014, 925, 828, 783, 753, 747, 736

MS (ESI): $m/z = 378$ $[M+H]^+$, 299

HRMS (ESI): $m/z = 378.1159$ $[M+H]^+$ berechnet für $C_{22}H_{20}NO_3S^+$ 378.1158

HPLC (Methode Ia, MeCN): > 99 % ($\lambda = 210$ nm), > 99 % ($\lambda = 254$ nm)

4-[[2-(Ethylthio)-10*H*-phenothiazin-10-yl]methyl]benzoesäuremethylester (202)C₂₃H₂₁NO₂S₂M_r = 407.55

Die Durchführung erfolgte nach Arbeitsvorschrift C. Es wurden 700 mg (2.70 mmol) 2-(Ethylthio)-10*H*-phenothiazin (**195**) in 1.5 mL trockenem DMF, 2.64 mL (2.64 mmol) 1 M Lithiumhexamethyldisilazid und 1.06 g (4.63 mmol) 4-(Brommethyl)benzoesäuremethylester (**50**) in 1.5 mL trockenem DMF eingesetzt. Nach einer Reaktionszeit von 47 h wurde dreimal mit Dichlormethan (je 50 mL) extrahiert und das Rohprodukt mittels Säulenchromatographie (Dichlormethan/*iso*-Hexan = 1:1, *R_f* = 0.2) aufgereinigt.

Ausbeute:	70 %	765 mg	zähflüssiges hellgelbes Öl
------------------	------	--------	-------------------------------

¹H NMR (400 MHz, CD₂Cl₂): δ (ppm) = 8.01 – 7.95 (m, 2H, 2'-H, 6'-H), 7.46 – 7.40 (m, 2H, 3'-H, 5'-H), 7.11 (dd, *J* = 7.6, 1.6 Hz, 1H, 6'''-H), 7.01 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, 4'''-H), 7.01 (td, *J* = 7.8, 1.6 Hz, 1H, 8'''-H), 6.90 (td, *J* = 7.5, 1.1 Hz, 1H, 7'''-H), 6.85 (dd, *J* = 8.0, 1.8 Hz, 1H, 3'''-H), 6.66 (dd, *J* = 8.0, 1.3 Hz, 1H, 9'''-H), 6.58 (d, *J* = 1.8 Hz, 1H, 1'''-H), 5.13 (s, 2H, 1''-H), 3.87 (s, 3H, CH₃), 2.68 (q, *J* = 7.3 Hz, 2H, SCH₂CH₃), 1.08 (t, *J* = 7.3 Hz, 3H, SCH₂CH₃)

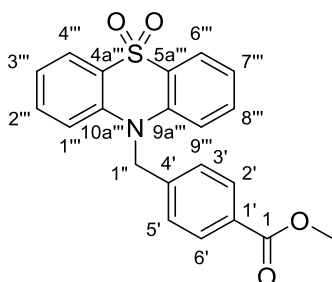
¹³C NMR (101 MHz, CD₂Cl₂): δ (ppm) = 167.1 (C-1), 145.3 (C-10a'''), 144.8 (C-9a'''), 142.7 (C-4'), 136.3 (C-2'''), 130.5 (C-2', C-6'), 129.9 (C-1'), 127.8 (C-8'''), 127.5 (C-4''', C-6'''), 127.4 (C-3', C-5'), 124.3 (C-5a'''), 124.0 (C-3'''), 123.4 (C-7'''), 121.9 (C-4a'''), 116.9 (C-1'''), 116.2 (C-9'''), 52.8 (C-1''), 52.5 (CH₃), 28.4 (SCH₂CH₃), 14.7 (SCH₂CH₃)

IR (Film): $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) = 3060, 2950, 2925, 2868, 1720, 1612, 1566, 1466, 1403, 1279, 1218, 1110, 1019, 901, 803, 753

MS (ESI): *m/z* = 424, 408 [M+H]⁺, 259

HRMS (ESI): *m/z* = 408.1091 [M+H]⁺ berechnet für C₂₃H₂₂NO₂S₂⁺ 408.1086

HPLC (Methode X, MeCN): > 99 % (λ = 210 nm), > 99 % (λ = 254 nm)

4-[(5,5-Dioxo-10*H*-phenothiazin-10-yl)methyl]benzoesäuremethylester (203)C₂₁H₁₇NO₄SM_r = 379.43

Die Durchführung erfolgte nach Arbeitsvorschrift C. Es wurden 452 mg (1.95 mmol) 10*H*-Phenothiazin-5,5-dioxid (**155**) in 3.0 mL trockenem DMF, 3.88 mL (3.88 mmol) 1 M Lithiumhexamethyldisilazid und 763 mg (3.33 mmol) 4-(Brommethyl)benzoesäuremethylester (**50**) in 2.0 mL trockenem DMF eingesetzt. Nach einer Reaktionszeit von 19 h wurde dreimal mit Dichlormethan (je 30 mL) extrahiert und das Rohprodukt mittels Säulenchromatographie (Dichlormethan/*iso*-Hexan = 9:1, *R_f* = 0.3) aufgereinigt.

Ausbeute: 79 % 581 mg weißer Feststoff

Schmelzpunkt/-bereich: 204 – 205 °C

¹H NMR (400 MHz, CD₂Cl₂): δ (ppm) = 8.11 (dd, *J* = 7.9, 1.5 Hz, 2H, 4'''-H, 6'''-H), 8.05 – 7.97 (m, 2H, 2'-H, 6'-H), 7.52 (ddd, *J* = 8.8, 7.2, 1.7 Hz, 2H, 2'''-H, 8'''-H), 7.35 – 7.25 (m, 4H, 3'-H, 5'-H, 3'''-H, 7'''-H), 7.11 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H, 1'''-H, 9'''-H), 5.49 (s, 2H, 1''-H), 3.88 (s, 3H, CH₃)

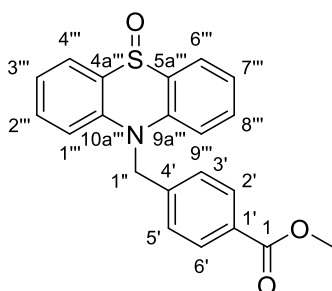
¹³C NMR (126 MHz, CD₂Cl₂): δ (ppm) = 166.9 (C-1), 141.4 (C-9a''', C-10a'''), 141.0 (C-4'), 133.9 (C-2''', C-8'''), 130.8 (C-2', C-6'), 130.4 (C-1'), 126.7 (C-3', C-5'), 125.2 (C-4a''', C-5a'''), 123.8 (C-4'', C-6''), 122.9 (C-3''', C-7'''), 117.1 (C-1''', C-9'''), 53.3 (C-1''), 52.6 (CH₃)

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) = 3063, 3014, 2993, 2947, 2840, 1717, 1590, 1468, 1443, 1373, 1281, 1251, 1164, 1137, 1108, 1082, 871, 758, 737, 570

MS (ESI): *m/z* = 397 [M+NH₄]⁺, 380 [M+H]⁺, 190

HRMS (ESI): *m/z* = 380.0951 [M+H]⁺ berechnet für C₂₁H₁₈NO₄S⁺ 380.0951

HPLC (Methode Ia, MeCN): > 99 % (λ = 210 nm), > 99 % (λ = 254 nm)

4-[(5-Oxo-10H-phenothiazin-10-yl)methyl]benzoesäuremethylester (204) $C_{21}H_{17}NO_3S$ $M_r = 363.43$

Die Durchführung erfolgte nach Arbeitsvorschrift C. Es wurden 523 mg (2.43 mmol) 10H-Phenothiazin-5-oxid (**156**) in 2.0 mL trockenem DMF, 2.41 mL (2.41 mmol) 1 M Lithiumhexamethyldisilazid und 936 mg (4.09 mmol) 4-(Brommethyl)benzoesäuremethylester (**50**) in 1.0 mL trockenem DMF eingesetzt. Nach einer Reaktionszeit von 18 h wurde viermal mit Dichlormethan (je 30 mL) extrahiert und das Rohprodukt mittels Säulenchromatographie (Dichlormethan/Methanol = 98:2, $R_f = 0.2$) aufgereinigt.

Ausbeute: 76 % 673 mg weißer Feststoff

Schmelzpunkt/-bereich: 178 °C

1H NMR (400 MHz, CD_2Cl_2): δ (ppm) = 8.03 – 7.94 (m, 4H, 2'-H, 6'-H, 4'''-H, 6'''-H), 7.51 (ddd, $J = 8.7, 7.3, 1.7$ Hz, 2H, 2'''-H, 8'''-H), 7.31 – 7.24 (m, 4H, 3'-H, 5'-H, 3'''-H, 7'''-H), 7.17 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H, 1'''-H, 9'''-H), 5.56 (s, 2H, 1''-H), 3.88 (s, 3H, CH_3)

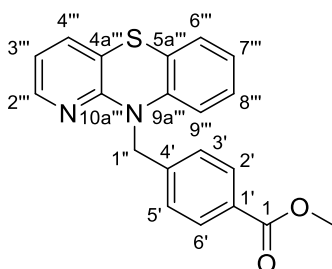
^{13}C NMR (101 MHz, CD_2Cl_2): δ (ppm) = 167.0 (C-1), 141.4 (C-4'), 139.2 (C-9a''', C-10a'''), 133.4 (C-2''', C-8'''), 131.8 (C-4''', C-6'''), 130.7 (C-2', C-6'), 130.3 (C-1'), 126.7 (C-3', C-5'), 125.8 (C-4a''', C-5a'''), 122.8 (C-3''', C-7'''), 117.0 (C-1''', C-9'''), 52.9 (C-1''), 52.6 (CH_3)

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ (cm^{-1}) = 3063, 3019, 2993, 2943, 2838, 1719, 1611, 1587, 1464, 1372, 1283, 1252, 1214, 1188, 1175, 1109, 1048, 1019, 874, 754, 706, 528

MS (ESI): $m/z = 364$ $[M+H]^+$

HRMS (ESI): $m/z = 364.0998$ $[M+H]^+$ berechnet für $C_{21}H_{18}NO_3S^+$ 364.1002

HPLC (Methode Ia, MeCN): > 99 % ($\lambda = 210$ nm), > 99 % ($\lambda = 254$ nm)

4-[(10*H*-Benzo[*b*]pyrido[2,3-*e*][1,4]thiazin-10-yl)methyl]benzoesäuremethylester (205) $C_{20}H_{16}N_2O_2S$ $M_r = 348.42$

Die Durchführung erfolgte nach Arbeitsvorschrift C. Es wurden 507 mg (2.53 mmol) 10*H*-Benzo[*b*]pyrido[2,3-*e*][1,4]thiazin (**159**) in 3.0 mL trockenem DMF, 4.98 mL (4.98 mmol) 1 M Lithiumhexamethyldisilazid und 976 mg (4.26 mmol) 4-(Brommethyl)benzoesäuremethylester (**50**) in 2.0 mL trockenem DMF eingesetzt. Nach einer Reaktionszeit von 24 h wurde dreimal mit Dichlormethan (je 50 mL) extrahiert und das Rohprodukt mittels Säulenchromatographie (*iso*-Hexan/Ethylacetat = 9:1, $R_f = 0.3$) aufgereinigt.

Ausbeute: 67 % 593 mg beiger Feststoff

Schmelzpunkt/-bereich: 127 – 128 °C

1H NMR (500 MHz, CD_2Cl_2): δ (ppm) = 7.97 – 7.91 (m, 2H, 2'-H, 6'-H), 7.90 (dd, $J = 4.9$, 1.7 Hz, 1H, 2'''-H), 7.41 – 7.36 (m, 2H, 3'-H, 5'-H), 7.30 (dd, $J = 7.5$, 1.7 Hz, 1H, 4'''-H), 7.04 (dd, $J = 7.6$, 1.6 Hz, 1H, 6'''-H), 6.94 (td, $J = 7.8$, 1.6 Hz, 1H, 8'''-H), 6.86 (td, $J = 7.5$, 1.2 Hz, 1H, 7'''-H), 6.78 (dd, $J = 7.5$, 4.9 Hz, 1H, 3'''-H), 6.58 (dd, $J = 8.3$, 1.2 Hz, 1H, 9'''-H), 5.37 (s, 2H, 1''-H), 3.86 (s, 3H, CH_3)

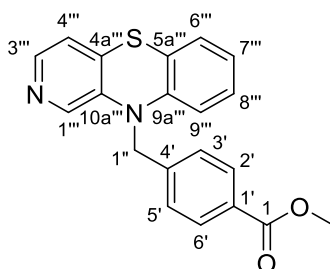
^{13}C NMR (126 MHz, CD_2Cl_2): δ (ppm) = 167.2 (C-1), 154.8 (C-10a'''), 145.6 (C-2'''), 144.0 (C-4'), 142.9 (C-9a'''), 134.6 (C-4'''), 130.2 (C-2', C-6'), 129.3 (C-1'), 128.0 (C-8'''), 127.2 (C-6'''), 127.2 (C-3', C-5'), 123.6 (C-7'''), 121.4 (C-5a'''), 118.8 (C-3'''), 117.3 (C-4a'''), 116.5 (C-9'''), 52.4 (CH_3), 49.5 (C-1'')

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ (cm^{-1}) = 3029, 2988, 2965, 2947, 2875, 1715, 1612, 1590, 1567, 1485, 1412, 1360, 1281, 1211, 1131, 1114, 1019, 891, 801, 751, 698, 615

MS (ESI): $m/z = 349$ [$M+H$] $^+$, 200

HRMS (ESI): $m/z = 349.1007$ [$M+H$] $^+$ berechnet für $C_{20}H_{17}N_2O_2S^+$ 349.1005

HPLC (Methode Ia, MeCN): > 99 % ($\lambda = 210$ nm), > 99 % ($\lambda = 254$ nm)

4-[(10*H*-Benzo[*b*]pyrido[3,4-*e*][1,4]thiazin-10-yl)methyl]benzoesäuremethylester (206)C₂₀H₁₆N₂O₂SM_r = 348.42

Die Durchführung erfolgte nach Arbeitsvorschrift C. Es wurden 1.21 g (6.04 mmol) 10*H*-Benzo[*b*]pyrido[3,4-*e*][1,4]thiazin (**164**) in 3.0 mL trockenem DMF, 6.00 mL (6.00 mmol) 1 M Lithiumhexamethyldisilazid und 2.32 g (10.1 mmol) 4-(Brommethyl)benzoesäuremethylester (**50**) in 2.0 mL trockenem DMF eingesetzt. Nach einer Reaktionszeit von 39 h wurde dreimal mit Dichlormethan (je 150 mL) extrahiert und das Rohprodukt mittels Säulenchromatographie (*iso*-Hexan/Ethylacetat = 3:2, *R_f* = 0.2) aufgereinigt.

Ausbeute: 72 % 1.52 g hellbeiger Feststoff

Schmelzpunkt/-bereich: 169 – 170 °C

¹H NMR (400 MHz, CD₂Cl₂): δ (ppm) = 8.03 – 7.95 (m, 3H, 2'-H, 6'-H, 3'''-H), 7.79 (s, 1H, 1'''-H), 7.45 – 7.38 (m, 2H, 3'-H, 5'-H), 7.06 (dd, *J* = 7.6, 1.5 Hz, 1H, 6'''-H), 7.02 (td, *J* = 8.0, 1.5 Hz, 1H, 8'''-H), 6.99 (d, *J* = 4.9 Hz, 1H, 4'''-H), 6.90 (td, *J* = 7.6, 1.1 Hz, 1H, 7'''-H), 6.63 (dd, *J* = 8.2, 1.1 Hz, 1H, 9'''-H), 5.14 (s, 2H, 1''-H), 3.87 (s, 3H, CH₃)

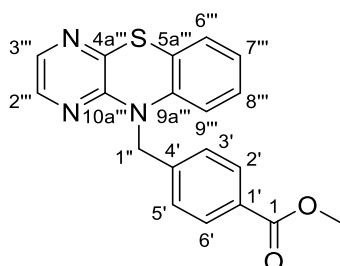
¹³C NMR (101 MHz, CD₂Cl₂): δ (ppm) = 167.0 (C-1), 144.2 (C-3'''), 144.1 (C-9a'''), 142.0 (C-4'), 140.6 (C-10a'''), 136.4 (C-1'''), 134.8 (C-4a'''), 130.6 (C-2', C-6'), 130.1 (C-1'), 128.4 (C-8'''), 127.6 (C-6'''), 127.2 (C-3', C-5'), 123.7 (C-7'''), 121.8 (C-5a'''), 121.4 (C-4'''), 116.3 (C-9'''), 52.6 (C-1''), 52.5 (CH₃)

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) = 3053, 2950, 1716, 1611, 1473, 1445, 1432, 1417, 1370, 1282, 1237, 1175, 1105, 1051, 1018, 961, 868, 819, 752, 743, 690, 668

MS (ESI): *m/z* = 349 [M+H]⁺, 182

HRMS (ESI): *m/z* = 349.1004 [M+H]⁺ berechnet für C₂₀H₁₇N₂O₂S⁺ 349.1005

HPLC (Methode Ia, MeCN): > 99 % (λ = 210 nm), > 99 % (λ = 254 nm)

4-[(10*H*-Benzo[*b*]pyrazino[2,3-*e*][1,4]thiazin-10-yl)methyl]benzoesäuremethylester (207)C₁₉H₁₅N₃O₂SM_r = 349.41

Die Durchführung erfolgte nach Arbeitsvorschrift C. Es wurden 601 mg (2.99 mmol) 10*H*-Benzo[*b*]pyrazino[2,3-*e*][1,4]thiazin (**167**) in 2.0 mL trockenem DMF, 5.95 mL (5.95 mmol) 1 M Lithiumhexamethyldisilazid und 1.15 g (5.02 mmol) 4-(Brommethyl)benzoesäuremethylester (**50**) in 1.0 mL trockenem DMF eingesetzt. Nach einer Reaktionszeit von 3 h wurde dreimal mit Dichlormethan (je 50 mL) extrahiert und das Rohprodukt mittels Säulenchromatographie (*iso*-Hexan/Ethylacetat = 9:1, *R_f* = 0.3) aufgereinigt.

Ausbeute: 45 % 473 mg gelber Feststoff

Schmelzpunkt/-bereich: 153 – 154 °C

¹H NMR (400 MHz, CD₂Cl₂): δ (ppm) = 7.99 – 7.94 (m, 2H, 2'-H, 6'-H), 7.74 (d, *J* = 2.8 Hz, 1H, 3'''-H), 7.66 (d, *J* = 2.8 Hz, 1H, 2'''-H), 7.38 – 7.32 (m, 2H, 3'-H, 5'-H), 7.00 (dd, *J* = 7.5, 1.7 Hz, 1H, 6'''-H), 6.93 (td, *J* = 7.8, 1.8 Hz, 1H, 8'''-H), 6.87 (td, *J* = 7.5, 1.3 Hz, 1H, 7'''-H), 6.54 (dd, *J* = 8.1, 1.2 Hz, 1H, 9'''-H), 5.26 (s, 2H, 1''-H), 3.87 (s, 3H, CH₃)

¹³C NMR (101 MHz, CD₂Cl₂): δ (ppm) = 167.1 (C-1), 150.5 (C-10a'''), 143.1 (C-4a'''), 142.9 (C-4'), 140.5 (C-9a'''), 139.0 (C-2'''), 137.4 (C-3'''), 130.3 (C-2', C-6'), 129.6 (C-1'), 128.3 (C-8'''), 127.5 (C-6'''), 126.9 (C-3', C-5'), 124.1 (C-7'''), 120.2 (C-5a'''), 116.6 (C-9'''), 52.5 (CH₃), 49.4 (C-1'')

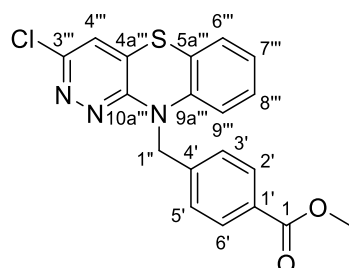
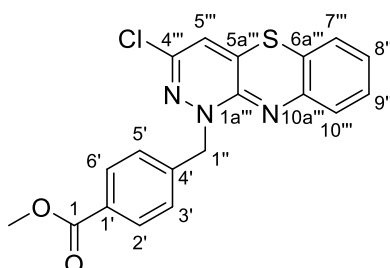
IR (KBr): $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) = 3049, 2953, 2916, 2842, 1716, 1612, 1501, 1485, 1451, 1402, 1283, 1242, 1178, 1146, 1123, 1105, 1062, 1019, 962, 889, 832, 812, 746, 677

MS (ESI): *m/z* = 350 [M+H]⁺, 148

HRMS (ESI): *m/z* = 350.0960 [M+H]⁺ berechnet für C₁₉H₁₆N₃O₂S⁺ 350.0958

HPLC (Methode Ia, MeCN): > 99 % (λ = 210 nm), > 99 % (λ = 254 nm)

4-[(3-Chlor-10*H*-benzo[*b*]pyridazino[3,4-*e*][1,4]thiazin-10-yl)methyl]benzoesäuremethylester (208) und 4-[(3-Chloro-1*H*-benzo[*b*]pyridazino[3,4-*e*][1,4]thiazin-1-yl)methyl]benzoesäuremethylester (257)

**208****257**C₁₉H₁₄ClN₃O₂SM_r = 383.85

Die Durchführung erfolgte nach Arbeitsvorschrift C. Es wurden 501 mg (2.13 mmol) 3-Chlor-10*H*-benzo[*b*]pyridazino[3,4-*e*][1,4]thiazin (**171**) in 6.0 mL trockenem DMF, 4.31 mL (4.31 mmol) 1 M Lithiumhexamethyldisilazid und 836 g (3.65 mmol) 4-(Brommethyl)-benzoesäuremethylester (**50**) in 1.0 mL trockenem DMF eingesetzt. Nach einer Reaktionszeit von 16 h bei Raumtemperatur und 2 h bei 60 °C wurde dreimal mit Dichlormethan (je 80 mL) extrahiert. Das Rohprodukt wurde zuerst mittels Säulenchromatographie (*iso*-Hexan/Ethylacetat = 4:1, *R_f* = 0.5 (**257**) und 0.2 (**208**)) aufgereinigt und dadurch **208** analysenrein erhalten. Anschließend wurde **257** mittels Säulenchromatographie (Dichlormethan/*iso*-Hexan = 4:1, *R_f* = 0.4 (**257**) und 0.1 (**208**)) weiter aufgereinigt.

4-[(3-Chlor-10*H*-benzo[*b*]pyridazino[3,4-*e*][1,4]thiazin-10-yl)methyl]benzoesäuremethylester (208):

Ausbeute: 47 % 383 mg gelber Feststoff

Schmelzpunkt/-bereich: 180 – 181 °C

¹H NMR (500 MHz, CD₂Cl₂): δ (ppm) = 8.00 – 7.95 (m, 2H, 2'-H, 6'-H), 7.40 – 7.35 (m, 2H, 3'-H, 5'-H), 7.04 – 6.98 (m, 3H, 4'''-H, 6'''-H, 8'''-H), 6.91 (td, *J* = 7.3, 1.1 Hz, 1H, 7'''-H), 6.66 (dd, *J* = 8.2, 1.2 Hz, 1H, 9'''-H), 5.41 (s, 2H, 1''-H), 3.87 (s, 3H, CH₃)

¹³C NMR (126 MHz, CD₂Cl₂): δ (ppm) = 167.1 (C-1), 155.1 (C-10a'''), 151.2 (C-3'''), 142.4 (C-4'), 140.9 (C-9a'''), 131.7 (C-4a'''), 130.3 (C-2', C-6'), 129.7 (C-1'), 129.1 (C-8'''), 127.4 (C-6'''), 127.0 (C-3', C-5'), 124.4 (C-7'''), 123.8 (C-4'''), 117.9 (C-5a'''), 117.4 (C-9'''), 52.5 (CH₃), 50.2 (C-1'')

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) = 3062, 3007, 2952, 1725, 1610, 1538, 1483, 1447, 1401, 1319, 1274, 1222, 1190, 1106, 1013, 1000, 865, 849, 821, 754, 680

MS (ESI): *m/z* = 386 [(³⁷Cl)M+H]⁺, 384 [(³⁵Cl)M+H]⁺

HRMS (ESI): $m/z = 384.0569$ $[M+H]^+$ berechnet für $C_{19}H_{15}^{35}ClN_3O_2S^+$ 384.0568

HPLC (Methode Ia, MeCN): > 99 % ($\lambda = 210$ nm), > 99 % ($\lambda = 254$ nm)

4-[(3-Chloro-1*H*-benzo[*b*]pyridazino[3,4-*e*][1,4]thiazin-1-yl)methyl]benzoesäuremethyl-ester (257):

Ausbeute: 17 % 142 mg orangeroter Feststoff

Schmelzpunkt/-bereich: 195 – 196 °C

1H NMR (500 MHz, CD_2Cl_2): δ (ppm) = 8.03 – 7.98 (m, 2H, 2'-H, 6'-H), 7.56 – 7.50 (m, 2H, 3'-H, 5'-H), 6.90 (td, $J = 7.7, 1.5$ Hz, 1H, 9'''-H), 6.75 – 6.69 (m, 2H, 8'''-H, 10'''-H), 6.62 (dd, $J = 8.0, 1.5$ Hz, 1H, 7'''-H), 5.95 (s, 1H, 5'''-H), 5.01 (s, 2H, 1''-H), 3.88 (s, 3H, CH_3)

^{13}C NMR (126 MHz, CD_2Cl_2): δ (ppm) = 167.1 (C-1), 148.6 (C-1a'''), 143.6 (C-10a'''), 142.1 (C-4'), 139.1 (C-4'''/5a'''), 138.9 (C-5a'''/4'''), 130.2 (C-1'), 130.1 (C-2', C-6'), 129.1 (C-3', C-5'), 128.9 (C-9'''), 127.2 (C-10'''), 125.0 (C-7'''), 124.8 (C-8'''), 117.4 (C-6a'''), 116.4 (C-5'''), 55.9 (C-1''), 52.5 (CH_3)

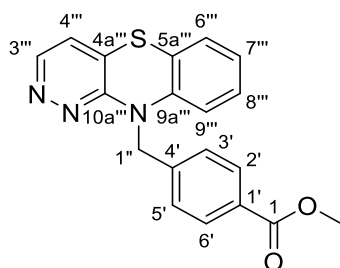
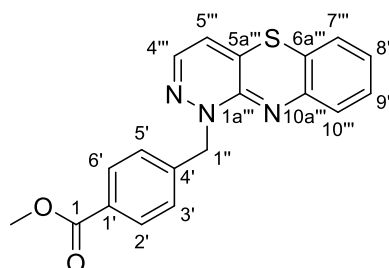
IR (KBr): $\tilde{\nu}$ (cm^{-1}) = 3060, 3003, 2954, 2924, 2853, 1724, 1524, 1492, 1464, 1429, 1349, 1281, 1112, 1085, 1021, 928, 881, 847, 754, 708, 601

MS (ESI): $m/z = 386$ [^{37}Cl]M+H $^+$, 384 [^{35}Cl]M+H $^+$

HRMS (ESI): $m/z = 384.0568$ $[M+H]^+$ berechnet für $C_{19}H_{15}^{35}ClN_3O_2S^+$ 384.0568

HPLC (Methode Ia, MeCN): > 99 % ($\lambda = 210$ nm), > 99 % ($\lambda = 254$ nm)

4-[(10*H*-Benzo[*b*]pyridazino[3,4-*e*][1,4]thiazin-10-yl)methyl]benzoesäuremethylester (209) und 4-[(1*H*-Benzo[*b*]pyridazino[3,4-*e*][1,4]thiazin-1-yl)methyl]benzoesäuremethylester (258)

**209****258**C₁₉H₁₅N₃O₂SM_r = 349.41

Die Durchführung erfolgte nach Arbeitsvorschrift C. Es wurden 694 mg (3.45 mmol) 10*H*-Benzo[*b*]pyridazino[3,4-*e*][1,4]thiazin (**172**) in 3.0 mL trockenem DMF, 6.82 mL (6.82 mmol) 1 M Lithiumhexamethyldisilazid und 1.34 g (5.85 mmol) 4-(Brommethyl)-benzoesäuremethylester (**50**) in 2.0 mL trockenem DMF eingesetzt. Nach einer Reaktionszeit von 13 h wurde dreimal mit Dichlormethan (je 80 mL) extrahiert. Das Rohprodukt wurde zuerst mittels Säulenchromatographie (Dichlormethan/Methanol = 98:2, *R_f* = 0.7 (**258**) und 0.3 (**209**)) aufgereinigt und dadurch **209** analysenrein erhalten. Anschließend wurde **258** mittels Säulenchromatographie (Dichlormethan/*iso*-Hexan = 19:1, *R_f* = 0.3 (**258**) und 0.0 (**209**)) weiter aufgereinigt.

4-[(10*H*-Benzo[*b*]pyridazino[3,4-*e*][1,4]thiazin-10-yl)methyl]benzoesäuremethylester (209):

Ausbeute: 47 % 564 mg beiger Feststoff

Schmelzpunkt/-bereich: 179 °C

¹H NMR (400 MHz, CD₂Cl₂): δ (ppm) = 8.43 (d, *J* = 4.9 Hz, 1H, 3'''-H), 8.00 – 7.93 (m, 2H, 2'-H, 6'-H), 7.42 – 7.36 (m, 2H, 3'-H, 5'-H), 7.03 – 6.96 (m, 3H, 4'''-H, 6'''-H, 8'''-H), 6.89 (td, *J* = 7.5, 1.2 Hz, 1H, 7'''-H), 6.65 (dd, *J* = 8.1, 1.2 Hz, 1H, 9'''-H), 5.46 (s, 2H, 1''-H), 3.87 (s, 3H, CH₃)

¹³C NMR (101 MHz, CD₂Cl₂): δ (ppm) = 167.2 (C-1), 156.0 (C-10a'''), 147.6 (C-3'''), 143.0 (C-4'), 141.5 (C-9a'''), 130.3 (C-2', C-6'), 129.6 (C-1'), 128.8 (C-8'''), 128.1 (C-4a'''), 127.3 (C-6'''), 127.1 (C-3', C-5') 124.1 (C-7'''), 123.5 (C-4'''), 118.9 (C-5a'''), 117.2 (C-9'''), 52.5 (CH₃), 50.0 (C-1'')

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) = 3058, 3022, 2950, 2920, 1719, 1611, 1485, 1446, 1415, 1397, 1325, 1281, 1239, 1176, 1110, 1019, 847, 835, 750, 669

MS (ESI): $m/z = 350$ $[M+H]^+$

HRMS (ESI): $m/z = 350.0960$ $[M+H]^+$ berechnet für $C_{19}H_{16}N_3O_2S^+$ 350.0958

HPLC (Methode Ia, MeCN): > 99 % ($\lambda = 210$ nm), > 99 % ($\lambda = 254$ nm)

4-[(1*H*-Benzo[*b*]pyridazino[3,4-*e*][1,4]thiazin-1-yl)methyl]benzoesäuremethylester (258):

Ausbeute: 14 % 171 mg orangeroter
Feststoff

Schmelzpunkt/-bereich: 145 – 146 °C

1H NMR (400 MHz, CD_2Cl_2): δ (ppm) = 8.03 – 7.97 (m, 2H, 2'-H, 6'-H), 7.55 – 7.49 (m, 2H, 3'-H, 5'-H), 6.90 (d, $J = 4.3$ Hz, 1H, 4'''-H), 6.85 (td, $J = 7.6, 1.6$ Hz, 1H, 9'''-H), 6.69 – 6.62 (m, 2H, 8'''-H, 10'''-H), 6.56 (dd, $J = 7.6, 1.5$ Hz, 1H, 7'''-H), 5.93 (d, $J = 4.3$ Hz, 1H, 5'''-H), 5.06 (s, 2H, 1''-H), 3.88 (s, 3H, CH_3)

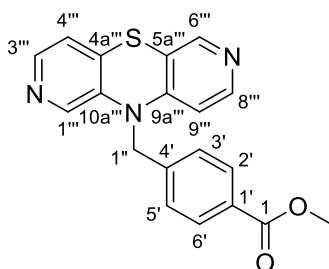
^{13}C NMR (101 MHz, CD_2Cl_2): δ (ppm) = 167.2 (C-1), 150.6 (C-1a'''), 144.5 (C-10a'''), 142.8 (C-4'), 138.3 (C-4'''), 136.3 (C-5a'''), 130.0 (C-2', C-6'), 130.0 (C-1'), 129.1 (C-3', C-5'), 128.6 (C-9'''), 126.6 (C-10'''), 125.0 (C-7'''), 124.3 (C-8'''), 118.3 (C-6a'''), 116.1 (C-5'''), 55.9 (C-1''), 52.5 (CH_3)

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ (cm^{-1}) = 3049, 3022, 2984, 2953, 2842, 1725, 1596, 1532, 1464, 1435, 1332, 1281, 1249, 1178, 1113, 1098, 1022, 875, 828, 754, 710, 593

MS (ESI): $m/z = 350$ $[M+H]^+$

HRMS (ESI): $m/z = 350.0961$ $[M+H]^+$ berechnet für $C_{19}H_{16}N_3O_2S^+$ 350.0958

HPLC (Methode Ia, MeCN): 97 % ($\lambda = 210$ nm), > 98 % ($\lambda = 254$ nm)

4-[(10*H*-Dipyrido[3,4-*b*:3',4'-*e*][1,4]thiazin-10-yl)methyl]benzoesäuremethylester (211)C₁₉H₁₅N₃O₂SM_r = 349.41

Die Durchführung erfolgte nach Arbeitsvorschrift C. Es wurden 346 mg (1.72 mmol) 10*H*-Dipyrido[3,4-*b*:3',4'-*e*][1,4]thiazin (**181**) in 1.8 mL trockenem DMF, 1.74 mL (1.74 mmol) 1 M Lithiumhexamethyldisilazid und 675 mg (2.95 mmol) 4-(Brommethyl)benzoesäuremethylester (**50**) in 0.6 mL trockenem DMF eingesetzt. Nach einer Reaktionszeit von 20 h wurde dreimal mit Dichlormethan (je 30 mL) extrahiert und das Rohprodukt mittels Säulenchromatographie (Dichlormethan/Methanol = 95:5, *R_f* = 0.4) aufgereinigt.

Ausbeute: 55 % 330 mg hellgelber Feststoff

Schmelzpunkt/-bereich: 192 – 193 °C

¹H NMR (400 MHz, CD₂Cl₂): δ (ppm) = 8.07 (d, *J* = 5.9 Hz, 1H, 8'''-H), 8.06 (s, 1H, 6'''-H), 8.04 (d, *J* = 4.9 Hz, 1H, 3'''-H), 8.05 – 7.97 (m, 2H, 2'-H, 6'-H), 7.78 (s, 1H, 1'''-H), 7.39 – 7.33 (m, 2H, 3'-H, 5'-H), 6.99 (dd, *J* = 4.9, 0.5 Hz, 1H, 4'''-H), 6.40 (d, *J* = 5.6 Hz, 1H, 9'''-H), 5.12 (s, 2H, 1''-H), 3.88 (s, 3H, CH₃)

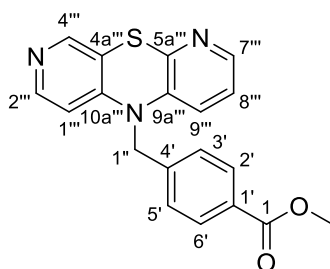
¹³C NMR (101 MHz, CD₂Cl₂): δ (ppm) = 166.9 (C-1), 150.6 (C-9a'''), 150.1 (C-8'''), 147.1 (C-6'''), 145.3 (C-3'''), 140.5 (C-4'), 138.7 (C-10a'''), 136.5 (C-1'''), 133.7 (C-4a'''), 130.8 (C-2', C-6'), 130.4 (C-1'), 126.9 (C-3', C-5'), 121.9 (C-4'''), 117.5 (C-5a'''), 110.2 (C-9'''), 52.6 (CH₃), 52.1 (C-1'')

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) = 3033, 2944, 2840, 1723, 1583, 1475, 1420, 1374, 1281, 1186, 1110, 1049, 1017, 878, 813, 802, 754, 692, 610

MS (ESI): *m/z* = 350 [M+H]⁺, 277

HRMS (ESI): *m/z* = 350.0954 [M+H]⁺ berechnet für C₁₉H₁₆N₃O₂S⁺ 350.0958

HPLC (Methode Ia, MeCN): > 99 % (λ = 210 nm), > 99 % (λ = 254 nm)

4-[(5*H*-Dipyrido[2,3-*b*:4',3'-*e*][1,4]thiazin-5-yl)methyl]benzoesäuremethylester (212)C₁₉H₁₅N₃O₂SM_r = 349.41

Die Durchführung erfolgte nach Arbeitsvorschrift C. Es wurden 370 mg (1.84 mmol) 5*H*-Dipyrido[2,3-*b*:4',3'-*e*][1,4]thiazin (**185**) in 1.8 mL trockenem DMF, 1.84 mL (1.84 mmol) 1 M Lithiumhexamethyldisilazid und 719 mg (3.14 mmol) 4-(Brommethyl)benzoesäuremethylester (**50**) in 0.6 mL trockenem DMF eingesetzt. Nach einer Reaktionszeit von 20 h wurde dreimal mit Dichlormethan (je 30 mL) extrahiert und das Rohprodukt mittels Säulenchromatographie (Dichlormethan/Methanol = 95:5, *R_f* = 0.4) aufgereinigt.

Ausbeute: 49 % 312 mg beiger Feststoff

Schmelzpunkt/-bereich: 179 – 180 °C

¹H NMR (400 MHz, CD₂Cl₂): δ (ppm) = 8.08 (s, 1H, 4'''-H), 8.04 (d, *J* = 5.6 Hz, 1H, 2'''-H), 8.03 – 7.99 (m, 2H, 2'-H, 6'-H), 7.96 (dd, *J* = 4.7, 1.3 Hz, 1H, 7'''-H), 7.37 – 7.31 (m, 2H, 3'-H, 5'-H), 6.86 (dd, *J* = 8.2, 4.7 Hz, 1H, 8'''-H), 6.71 (dd, *J* = 8.2, 1.3 Hz, 1H, 9'''-H), 6.36 (d, *J* = 5.6 Hz, 1H, 1'''-H), 5.03 (s, 2H, 1''-H), 3.88 (s, 3H, CH₃)

¹³C NMR (101 MHz, CD₂Cl₂): δ (ppm) = 166.9 (C-1), 149.7 (C-2'''), 149.3 (C-10a'''), 147.3 (C-4'''), 146.1 (C-5a'''), 144.1 (C-7'''), 140.4 (C-4'), 138.7 (C-9a'''), 130.8 (C-2', C-6'), 130.4 (C-1'), 126.8 (C-3', C-5'), 122.5 (C-8'''), 121.7 (C-9'''), 118.8 (C-4a'''), 109.9 (C-1'''), 52.6 (CH₃), 52.2 (C-1'')

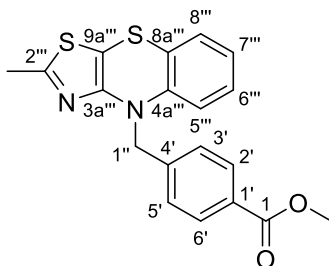
IR (KBr): $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) = 3035, 2951, 1706, 1612, 1587, 1572, 1549, 1493, 1449, 1420, 1377, 1273, 1181, 1111, 1046, 1020, 968, 881, 812, 786, 754, 732, 689, 606

MS (ESI): *m/z* = 350 [M+H]⁺, 290

HRMS (ESI): *m/z* = 350.0954 [M+H]⁺ berechnet für C₁₉H₁₆N₃O₂S⁺ 350.0958

HPLC (Methode Ia, MeCN): > 99 % (λ = 210 nm), > 99 % (λ = 254 nm)

4-[(2-Methyl-4*H*-benzo[*b*]thiazolo[4,5-*e*][1,4]thiazin-4-yl)methyl]benzoesäuremethylester (213)



$$\text{C}_{19}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_2\text{S}_2$$

$$M_r = 368.47$$

Die Durchführung erfolgte nach Arbeitsvorschrift C. Es wurden 802 mg (3.64 mmol) 2-Methyl-4*H*-benzo[*b*]thiazolo[4,5-*e*][1,4]thiazin (**189**) in 2.8 mL trockenem DMF, 3.63 mL (3.63 mmol) 1 M Lithiumhexamethyldisilazid und 1.41 g (6.16 mmol) 4-(Brommethyl)-benzoesäuremethylester (**50**) in 1.4 mL trockenem DMF eingesetzt. Nach einer Reaktionszeit von 2 h wurde dreimal mit Dichlormethan (je 80 mL) extrahiert und das Rohprodukt mittels Säulenchromatographie (Dichlormethan/*iso*-Hexan = 7:3, R_f = 0.3) aufgereinigt.

Ausbeute: 52 % 697 mg gelber Feststoff

Schmelzpunkt/-bereich: 149 °C

^1H NMR (400 MHz, CD_2Cl_2): δ (ppm) = 8.00 – 7.93 (m, 2H, 2'-H, 6'-H), 7.48 – 7.43 (m, 2H, 3'-H, 5'-H), 6.97 – 6.87 (m, 2H, 6'''-H, 8'''-H), 6.79 (td, J = 7.5, 1.2 Hz, 1H, 7'''-H), 6.47 (dd, J = 8.2, 1.2 Hz, 1H, 5'''-H), 5.23 (s, 2H, 1''-H), 3.87 (s, 3H, COOCH_3), 2.52 (s, 3H, 2'''-CH₃)

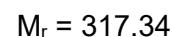
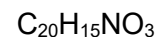
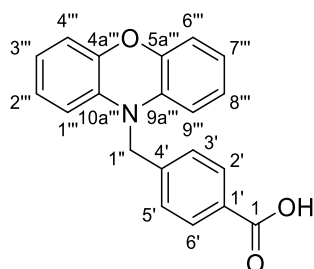
^{13}C NMR (101 MHz, CD_2Cl_2): δ (ppm) = 167.2 (C-1), 163.6 (C-2'''), 152.8 (C-3a'''), 144.3 (C-4a'''), 144.1 (C-4'), 130.3 (C-2', C-6'), 129.6 (C-1'), 128.2 (C-6'''/8'''), 127.6 (C-8'''/6'''), 127.1 (C-3', C-5'), 123.3 (C-7'''), 120.2 (C-8a'''), 115.3 (C-5'''), 96.6 (C-9a'''), 52.5 (COOCH_3), 50.9 (C-1''), 19.9 (2'''-CH₃)

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) = 3063, 2944, 2842, 1709, 1574, 1544, 1471, 1438, 1385, 1282, 1243, 1191, 1174, 1107, 1043, 1015, 949, 850, 754, 745, 694, 666

MS (ESI): m/z = 369 [M+H]⁺, 220

HRMS (ESI): m/z = 369.0727 [M+H]⁺ berechnet für $\text{C}_{19}\text{H}_{17}\text{N}_2\text{O}_2\text{S}_2^+$ 369.0726

HPLC (Methode Ia, MeCN): > 99 % (λ = 210 nm), > 99 % (λ = 254 nm)

4-[(10*H*-Phenoxazin-10-yl)methyl]benzoesäure (214)

Die Durchführung erfolgte nach Arbeitsvorschrift D. Es wurden 409 mg (1.23 mmol) 4-[(10*H*-Phenoxazin-10-yl)methyl]benzoesäuremethylester (**196**), 1.54 mL (3.08 mmol) 2 M Natriumhydroxid-Lösung in 16 mL eines 1,4-Dioxan/Wasser-Gemisches (1:1) eingesetzt. Nach einer Reaktionszeit von 2 h bei Raumtemperatur und 2 h bei 50 °C wurde der erhaltene Feststoff im Hochvakuum getrocknet.

Ausbeute: 92 % 359 mg gelber Feststoff

Schmelzpunkt/-bereich: 213 – 214 °C

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6): δ (ppm) = 12.87 (bs, 1H, OH), 7.96 – 7.89 (m, 2H, 2'-H, 6'-H), 7.44 – 7.37 (m, 2H, 3'-H, 5'-H), 6.74 (ddd, $J = 7.7, 7.0, 2.0$ Hz, 2H, 2'''-H, 8'''-H), 6.70 (dd, $J = 7.6, 1.9$ Hz, 2H, 4'''-H, 6'''-H), 6.67 (ddd, $J = 8.0, 7.0, 1.4$ Hz, 2H, 3'''-H, 7'''-H), 6.46 (dd, $J = 7.9, 1.4$ Hz, 2H, 1'''-H, 9'''-H), 4.95 (s, 2H, 1''-H)

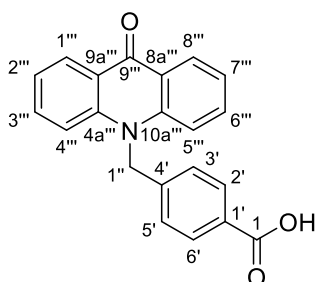
^{13}C NMR (126 MHz, DMSO- d_6): δ (ppm) = 167.1 (C-1), 144.1 (C-4a''', C-5a'''), 142.0 (C-4'), 133.0 (C-9a''', C-10a'''), 129.8 (C-2', C-6'), 129.6 (C-1'), 126.4 (C-3', C-5'), 124.1 (C-2''', C-8'''), 121.3 (C-3''', C-7'''), 115.1 (C-4''', C-6'''), 112.4 (C-1''', C-9'''), 47.0 (C-1'')

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ (cm^{-1}) = 3067, 3013, 2908, 2870, 2669, 2549, 1691, 1605, 1490, 1423, 1376, 1312, 1276, 1177, 1133, 912, 739, 536

MS (ESI): $m/z = 316$ $[\text{M}-\text{H}]^-$

HRMS (ESI): $m/z = 316.0981$ $[\text{M}-\text{H}]^-$ berechnet für $\text{C}_{20}\text{H}_{14}\text{NO}_3^-$ 316.0979

HPLC (Methode VIII, MeOH): > 99 % ($\lambda = 210$ nm), > 99 % ($\lambda = 254$ nm)

4-[[9-Oxoacridin-10(9*H*)-yl]methyl]benzoesäure (215) $C_{21}H_{15}NO_3$ $M_r = 329.36$

Die Durchführung erfolgte nach Arbeitsvorschrift D. Es wurden 250 mg (0.728 mmol) 4-[[9-Oxoacridin-10(9*H*)-yl]methyl]benzoesäuremethylester (**197**), 910 μ L (1.82 mmol) 2 M Natriumhydroxid-Lösung in 5.0 mL eines 1,4-Dioxan/Wasser-Gemisches (1:1) verwendet. Nach einer Reaktionszeit von 88 h bei Raumtemperatur wurde der erhaltene Feststoff im Hochvakuum getrocknet.

Ausbeute: 68 % 163 mg hellgelber Feststoff

Schmelzpunkt/-bereich: 317 – 318 °C

^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6): δ (ppm) = 12.91 (s, 1H, OH), 8.39 (dd, J = 8.0, 1.7 Hz, 2H, 1'''-H, 8'''-H), 7.98 – 7.85 (m, 2H, 2'-H, 6'-H), 7.76 (ddd, J = 8.7, 6.9, 1.7 Hz, 2H, 3'''-H, 6'''-H), 7.62 (d, J = 8.7 Hz, 2H, 4'''-H, 5'''-H), 7.35 (t, J = 7.4 Hz, 2H, 2'''-H, 7'''-H), 7.31 – 7.23 (m, 2H, 3'-H, 5'-H), 5.89 (s, 2H, 1''-H)

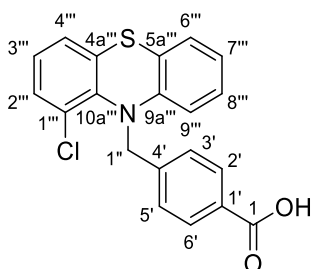
^{13}C NMR (126 MHz, DMSO- d_6): δ (ppm) = 176.7 (C-9'''), 167.0 (C-1), 142.0 (C-4a''', C-10a'''), 141.6 (C-4'), 134.4 (C-3''', C-6'''), 129.9 (C-2', C-6'), 129.9 (C-1'), 126.8 (C-1''', C-8'''), 126.1 (C-3', C-5'), 121.7 (C-8a''', C-9a'''), 121.7 (C-2''', C-7'''), 116.1 (C-4''', C-5'''), 49.0 (C-1'')

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ (cm^{-1}) = 3070, 2913, 2619, 2497, 1709, 1609, 1591, 1496, 1461, 1419, 1379, 1292, 1267, 1234, 1177, 1111, 937, 872, 754, 674, 548

MS (ESI): m/z = 330 $[\text{M}+\text{H}]^+$

HRMS (ESI): m/z = 330.1124 $[\text{M}+\text{H}]^+$ berechnet für $C_{21}H_{16}NO_3^+$ 330.1125

HPLC (Methode IXa, MeOH): > 99 % (λ = 210 nm), > 99 % (λ = 254 nm)

4-[(1-Chlor-10*H*-phenothiazin-10-yl)methyl]benzoesäure (216) $C_{20}H_{14}ClNO_2S$ $M_r = 367.85$

Die Durchführung erfolgte nach Arbeitsvorschrift D. Es wurden 303 mg (0.793 mmol) 4-[(1-Chlor-10*H*-phenothiazin-10-yl)methyl]benzoesäuremethylester (**198**), 980 μ L (1.96 mmol) 2 M Natriumhydroxid-Lösung in 10 mL eines 1,4-Dioxan/Wasser-Gemisches (1:1) eingesetzt. Nach einer Reaktionszeit von 48 h bei 50 °C wurde der erhaltene Feststoff im Hochvakuum getrocknet.

Ausbeute: 80 % 235 mg weißer Feststoff

Schmelzpunkt/-bereich: 218 °C

1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6): δ (ppm) = 12.87 (bs, 1H, COOH), 7.82 – 7.70 (m, 2H, 2'-H, 6'-H), 7.50 – 7.40 (m, 2H, 3'-H, 5'-H), 7.34 (dd, J = 8.0, 1.4 Hz, 1H, 4'''-H), 7.22 (dd, J = 7.5, 1.2 Hz, 2H, 2'''-H, 9'''-H), 7.15 (dd, J = 7.6, 1.5 Hz, 1H, 6'''-H), 7.15 (dd, J = 7.7, 1.4 Hz, 1H, 8'''-H), 7.06 (t, J = 7.8 Hz, 1H, 3'''-H), 6.96 (td, J = 7.5, 1.3 Hz, 1H, 7'''-H), 5.21 (s, 2H, 1''-H)

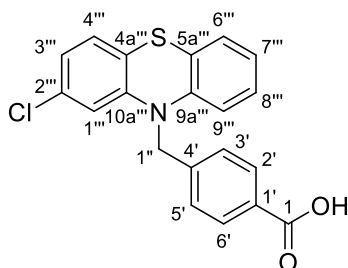
^{13}C NMR (126 MHz, DMSO- d_6): δ (ppm) = 167.1 (C-1), 145.1 (C-9a'''), 142.9 (C-4'), 140.7 (C-10a'''), 133.4 (C-1'''), 129.9 (C-1'), 129.7 (C-4'''), 129.2 (C-2', C-6'), 128.1 (C-5a'''), 128.0 (C-3', C-5'), 127.6 (C-8'''/6'''), 126.8 (C-6'''/8'''), 126.3 (C-2'''), 125.8 (C-4a'''), 125.4 (C-3'''), 124.1 (C-7'''), 121.1 (C-9'''), 56.6 (C-1'')

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ (cm^{-1}) = 3066, 3007, 2927, 2860, 2665, 2536, 1683, 1612, 1478, 1451, 1434, 1289, 1263, 1086, 1019, 958, 770, 748, 719, 597, 544

MS (ESI): m/z = 368 [^{37}Cl]M-H] $^-$, 366 [^{35}Cl]M-H] $^-$

HRMS (ESI): m/z = 366.0364 [M-H] $^-$ berechnet für $C_{20}H_{13}^{35}ClNO_2S^-$ 366.0361

HPLC (Methode VIII, MeOH): > 99 % (λ = 210 nm), > 99 % (λ = 254 nm)

4-[(2-Chlor-10*H*-phenothiazin-10-yl)methyl]benzoesäure (217)(Literaturbekannte Substanz^[290]) $C_{20}H_{14}ClNO_2S$ $M_r = 367.85$

Die Durchführung erfolgte nach Arbeitsvorschrift D. Es wurden 360 mg (0.942 mmol) 4-[(2-Chlor-10*H*-phenothiazin-10-yl)methyl]benzoesäuremethylester (**199**), 1.18 mL (2.36 mmol) 2 M Natriumhydroxid-Lösung in 6.0 mL eines 1,4-Dioxan/Wasser-Gemisches (1:1) eingesetzt. Nach einer Reaktionszeit von 2 h bei 60 °C wurde der erhaltene Feststoff im Hochvakuum getrocknet.

Ausbeute: 91 % 317 mg weißer Feststoff

Schmelzpunkt/-bereich: 123 – 125 °C

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ (ppm) = 13.18 (bs, 1H, COOH), 7.95 – 7.85 (m, 2H, 2'-H, 6'-H), 7.46 – 7.38 (m, 2H, 3'-H, 5'-H), 7.17 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H, 6'''-H), 7.16 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H, 4'''-H), 7.08 (td, *J* = 7.8, 1.5 Hz, 1H, 8'''-H), 6.97 (dd, *J* = 8.1, 1.8 Hz, 1H, 3'''-H), 6.94 (t, *J* = 7.5 Hz, 1H, 7'''-H), 6.86 – 6.74 (m, 2H, 1'''-H, 9'''-H), 5.22 (s, 2H, 1''-H)

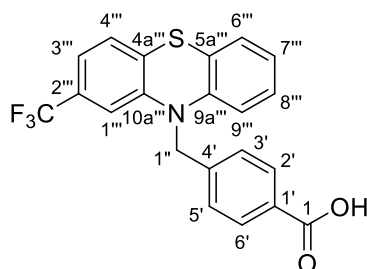
¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆): δ (ppm) = 167.2 (C-1), 145.6 (C-10a'''), 143.4 (C-9a'''), 141.4 (C-4'), 132.2 (C-2'''), 130.5 (C-1'), 129.6 (C-2', C-6'), 127.9 (C-4'''), 127.7 (C-8'''), 127.0 (C-6'''), 126.8 (C-3', C-5'), 123.2 (C-7'''), 122.3 (C-3''', C-5a'''), 121.7 (C-4a'''), 116.2 (C-9'''), 115.8 (C-1'''), 50.8 (C-1'')

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) = 3061, 3008, 2954, 2926, 2868, 2669, 2544, 1685, 1613, 1567, 1463, 1425, 1405, 1285, 1253, 1128, 1108, 1019, 899, 854, 808, 749, 734

MS (ESI): *m/z* = 368 [(³⁷Cl)M-H]⁻, 366 [(³⁵Cl)M-H]⁻

HRMS (ESI): *m/z* = 366.0368 [M-H]⁻ berechnet für C₂₀H₁₃³⁵ClNO₂S⁻ 366.0361

HPLC (Methode VIII, MeOH): > 99 % (λ = 210 nm), > 99 % (λ = 254 nm)

4-[(2-(Trifluormethyl)-10*H*-phenothiazin-10-yl)methyl]benzoesäure (218) $C_{21}H_{14}F_3NO_2S$ $M_r = 401.40$

Die Durchführung erfolgte nach Arbeitsvorschrift D. Es wurden 333 mg (0.802 mmol) 4-[[2-(Trifluormethyl)-10*H*-phenothiazin-10-yl)methyl]benzoesäuremethylester (**200**), 990 μ L (1.98 mmol) 2 M Natriumhydroxid-Lösung in 5.0 mL eines 1,4-Dioxan/Wasser-Gemisches (1:1) eingesetzt. Nach einer Reaktionszeit von 16 h bei 60 °C wurde der erhaltene Feststoff im Hochvakuum getrocknet.

Ausbeute: 79 % 255 mg weißer Feststoff

Schmelzpunkt/-bereich: 173 – 174 °C

1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6): δ (ppm) = 12.91 (bs, 1H, COOH), 7.97 – 7.84 (m, 2H, 2'-H, 6'-H), 7.50 – 7.42 (m, 2H, 3'-H, 5'-H), 7.37 (d, J = 8.0 Hz, 1H, 4'''-H), 7.24 (dd, J = 8.0, 1.8 Hz, 1H, 3'''-H), 7.19 (dd, J = 7.6, 1.5 Hz, 1H, 6'''-H), 7.12 (td, J = 7.8, 1.5 Hz, 1H, 8'''-H), 6.99 (d, J = 1.8 Hz, 1H, 1'''-H), 6.97 (td, J = 7.5, 1.1 Hz, 1H, 7'''-H), 6.84 (dd, J = 8.2, 1.1 Hz, 1H, 9'''-H), 5.29 (s, 2H, 1''-H)

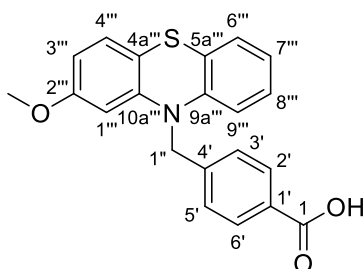
^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6): δ (ppm) = 167.0 (C-1), 144.7 (C-10a'''), 143.4 (C-9a'''), 141.8 (C-4'), 129.7 (C-2', C-6'), 128.6 (C-4a'''/C-1'), 128.5 (C-1'/C-4a'''), 128.1 (q, $^2J_{C,F}$ = 31.9 Hz, C-2'''), 128.0 (C-8'''), 127.5 (C-4'''), 127.1 (C-6'''), 127.0 (C-3', C-5'), 124.0 (q, $^1J_{C,F}$ = 272.1 Hz, CF₃), 123.4 (C-7'''), 121.8 (C-5a'''), 119.3 (q, $^3J_{C,F}$ = 4.0 Hz, C-3'''), 116.3 (C-9'''), 112.0 (q, $^3J_{C,F}$ = 3.6 Hz, C-1'''), 50.8 (C-1'')

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) = 3060, 2967, 2856, 2671, 2554, 1686, 1604, 1474, 1445, 1425, 1357, 1326, 1296, 1253, 1164, 1114, 1086, 908, 873, 760, 741

MS (ESI): m/z = 801 [2M-H]⁻, 400 [M-H]⁻

HRMS (ESI): m/z = 400.0626 [M-H]⁻ berechnet für C₂₁H₁₃F₃NO₂S⁻ 400.0625

HPLC (Methode VIII, MeOH): > 99 % (λ = 210 nm), > 99 % (λ = 254 nm)

4-[(2-Methoxy-10*H*-phenothiazin-10-yl)methyl]benzoesäure (219) $C_{21}H_{17}NO_3S$ $M_r = 363.43$

Die Durchführung erfolgte nach Arbeitsvorschrift D. Es wurden 569 mg (1.51 mmol) 4-[(2-Methoxy-10*H*-phenothiazin-10-yl)methyl]benzoesäuremethylester (**201**), 1.85 mL (3.70 mmol) 2 M Natriumhydroxid-Lösung in 15 mL eines 1,4-Dioxan/Wasser-Gemisches (1:1) eingesetzt. Nach einer Reaktionszeit von 2 h bei 60 °C wurde der erhaltene Feststoff im Hochvakuum getrocknet.

Ausbeute: 87 % 479 mg weißer Feststoff

Schmelzpunkt/-bereich: 179 – 182 °C

1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6): δ (ppm) = 12.87 (s, 1H, COOH), 7.99 – 7.81 (m, 2H, 2'-H, 6'-H), 7.54 – 7.36 (m, 2H, 3'-H, 5'-H), 7.15 (dd, J = 7.6, 1.5 Hz, 1H, 6'''-H), 7.07 (td, J = 7.5, 1.5 Hz, 1H, 8'''-H), 7.05 (d, J = 8.4 Hz, 1H, 4'''-H), 6.91 (td, J = 7.5, 1.1 Hz, 1H, 7'''-H), 6.79 (dd, J = 8.3, 1.1 Hz, 1H, 9'''-H), 6.53 (dd, J = 8.5, 2.4 Hz, 1H, 3'''-H), 6.35 (d, J = 2.4 Hz, 1H, 1'''-H), 5.21 (s, 2H, 1''-H), 3.61 (s, 3H, OCH₃)

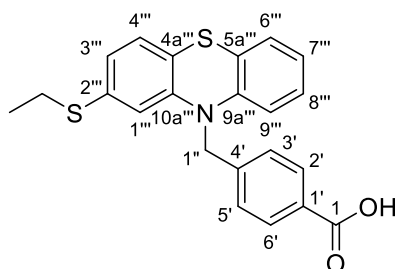
^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6): δ (ppm) = 167.0 (C-1), 159.3 (C-2'''), 145.4 (C-10a'''), 144.0 (C-9a'''), 142.4 (C-4'), 129.6 (C-2', C-6'), 129.5 (C-1'), 127.4 (C-8'''), 127.2 (C-4'''), 126.9 (C-3', C-5'), 126.8 (C-6'''), 123.3 (C-5a'''), 122.7 (C-7'''), 115.9 (C-9'''), 113.4 (C-4a'''), 107.4 (C-3'''), 103.5 (C-1'''), 55.1 (OCH₃), 50.9 (C-1'')

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) = 3059, 2999, 2934, 2835, 2669, 2551, 1692, 1602, 1586, 1574, 1468, 1444, 1424, 1352, 1295, 1275, 1203, 1174, 1016, 925, 830, 746

MS (ESI): m/z = 362 [M-H]⁻

HRMS (ESI): m/z = 362.0860 [M-H]⁻ berechnet für C₂₁H₁₆NO₃S⁻ 362.0856

HPLC (Methode IIIa, MeOH): > 99 % (λ = 210 nm), > 99 % (λ = 254 nm)

4-[(2-(Ethylthio)-10*H*-phenothiazin-10-yl)methyl]benzoesäure (220) $C_{22}H_{19}NO_2S_2$ $M_r = 393.52$

Die Durchführung erfolgte nach Arbeitsvorschrift D. Es wurden 700 mg (1.72 mmol) 4-[[2-(Ethylthio)-10*H*-phenothiazin-10-yl)methyl]benzoesäuremethylester (**202**), 2.15 mL (4.30 mmol) 2 M Natriumhydroxid-Lösung in 11 mL eines 1,4-Dioxan/Wasser-Gemisches (1:1) eingesetzt. Nach einer Reaktionszeit von 12 h bei 60 °C wurde die Lösung zweimal mit Ethylacetat (je 100 mL) extrahiert.

Ausbeute: 87 % 591 mg hellgelber Feststoff

Schmelzpunkt/-bereich: 76 – 78 °C

1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6): δ (ppm) = 12.92 (bs, 1H, COOH), 7.98 – 7.82 (m, 2H, 2'-H, 6'-H), 7.51 – 7.37 (m, 2H, 3'-H, 5'-H), 7.16 (dd, $J = 7.6, 1.5$ Hz, 1H, 6'''-H), 7.09 (td, $J = 7.8, 1.5$ Hz, 1H, 8'''-H), 7.07 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H, 4'''-H), 6.93 (t, $J = 7.5$ Hz, 1H, 7'''-H), 6.85 (dd, $J = 8.0, 1.7$ Hz, 1H, 3'''-H), 6.82 (d, $J = 7.4$ Hz, 1H, 9'''-H), 6.64 (d, $J = 1.7$ Hz, 1H, 1'''-H), 5.22 (s, 2H, 1''-H), 2.73 (q, $J = 7.3$ Hz, 2H, SCH $\underline{2}$ CH $\underline{3}$), 0.97 (t, $J = 7.3$ Hz, 3H, SCH $\underline{2}$ CH $\underline{3}$)

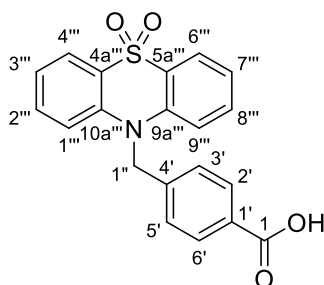
^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6): δ (ppm) = 167.1 (C-1), 144.4 (C-10a'''), 144.0 (C-9a'''), 142.2 (C-4'), 135.4 (C-2'''), 129.6 (C-1', C-2', C-6'), 127.6 (C-8'''), 127.1 (C-4'''), 126.9 (C-3', C-5', C-6'''), 122.9 (C-7'''), 122.7 (C-5a'''), 122.6 (C-3'''), 120.0 (C-4a'''), 116.0 (C-9'''), 115.7 (C-1'''), 50.8 (C-1''), 26.3 (SCH $\underline{2}$ CH $\underline{3}$), 14.0 (SCH $\underline{2}$ CH $\underline{3}$)

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ (cm $^{-1}$) = 3058, 2968, 2923, 2854, 2666, 2545, 1689, 1611, 1566, 1465, 1421, 1403, 1319, 1289, 1254, 1218, 1129, 901, 805, 750

MS (ESI): m/z = 438 [M+Formiat] $^-$, 408, 392 [M-H] $^-$

HRMS (ESI): m/z = 392.0784 [M-H] $^-$ berechnet für $C_{22}H_{18}NO_2S_2^-$ 392.0784

HPLC (Methode VIII, MeOH): > 99 % ($\lambda = 210$ nm), > 99 % ($\lambda = 254$ nm)

4-[(5,5-Dioxo-10*H*-phenothiazin-10-yl)methyl]benzoesäure (221) $C_{20}H_{15}NO_4S$ $M_r = 365.40$

Die Durchführung erfolgte nach Arbeitsvorschrift D. Es wurden 526 mg (1.39 mmol) 4-[(5,5-Dioxo-10*H*-phenothiazin-10-yl)methyl]benzoesäuremethylester (**203**), 1.71 mL (3.42 mmol) 2 M Natriumhydroxid-Lösung in 17 mL eines 1,4-Dioxan/Wasser-Gemisches (1:1) eingesetzt. Nach einer Reaktionszeit von 5 h bei 50 °C wurde der erhaltene Feststoff bei 60 °C getrocknet.

Ausbeute: 70 % 355 mg weißer Feststoff

Schmelzpunkt/-bereich: 250 – 253 °C

1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6): δ (ppm) = 12.98 (bs, 1H, COOH), 8.05 (dd, $J = 7.9, 1.5$ Hz, 2H, 4'''-H, 6'''-H), 7.95 – 7.84 (m, 2H, 2'-H, 6'-H), 7.65 (ddd, $J = 8.7, 7.3, 1.6$ Hz, 2H, 2'''-H, 8'''-H), 7.36 (t, $J = 7.6$ Hz, 2H, 3'''-H, 7'''-H), 7.32 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H, 1'''-H, 9'''-H), 7.29 – 7.22 (m, 2H, 3'-H, 5'-H), 5.69 (s, 2H, 1''-H)

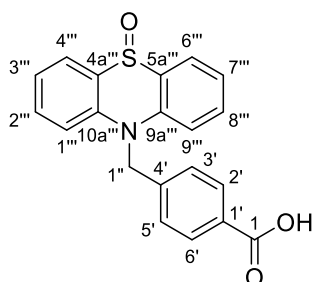
^{13}C NMR (126 MHz, DMSO- d_6): δ = 167.2 (C-1), 140.7 (C-4'), 140.4 (C-9a''', C-10a'''), 133.7 (C-2''', C-8'''), 130.4 (C-1'), 129.8 (C-2', C-6'), 126.2 (C-3', C-5'), 123.6 (C-4a''', C-5a'''), 122.6 (C-4''', C-6'''), 122.4 (C-3''', C-7'''), 117.2 (C-1''', C-9'''), 51.2 (C-1'')

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ (cm $^{-1}$) = 3243, 1725, 1589, 1468, 1375, 1284, 1255, 1219, 1163, 1137, 1100, 1082, 871, 749, 653, 604, 569

MS (ESI): m/z = 364 [M-H] $^{-}$

HRMS (ESI): m/z = 364.0650 [M-H] $^{-}$ berechnet für $C_{20}H_{14}NO_4S^{-}$ 364.0649

HPLC (Methode IIIa, MeOH): > 99 % (λ = 210 nm), > 99 % (λ = 254 nm)

4-[(5-Oxo-10*H*-phenothiazin-10-yl)methyl]benzoesäure (222) $C_{20}H_{15}NO_3S$ $M_r = 349.40$

Die Durchführung erfolgte nach Arbeitsvorschrift D. Es wurden 303 mg (0.834 mmol) 4-[(5-Oxo-10*H*-phenothiazin-10-yl)methyl]benzoesäuremethylester (**204**), 510 μ L (1.02 mmol) 2 M Natriumhydroxid-Lösung in 6.0 mL eines 1,4-Dioxan/Wasser-Gemisches (1:1) eingesetzt. Nach einer Reaktionszeit von 3 h bei 60 °C wurde der erhaltene Feststoff bei 60 °C getrocknet.

Ausbeute: 95 % 275 mg weißer Feststoff

Schmelzpunkt/-bereich: 328 °C

1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6): δ (ppm) = 12.91 (s, 1H, COOH), 8.02 (dd, J = 7.6, 1.6 Hz, 2H, 4'''-H, 6'''-H), 7.95 – 7.82 (m, 2H, 2'-H, 6'-H), 7.60 (ddd, J = 8.6, 7.2, 1.5 Hz, 2H, 2'''-H, 8'''-H), 7.37 – 7.27 (m, 4H, 1'''-H, 3'''-H, 7'''-H, 9'''-H), 7.27 – 7.20 (m, 2H, 3'-H, 5'-H), 5.74 (s, 2H, 1''-H)

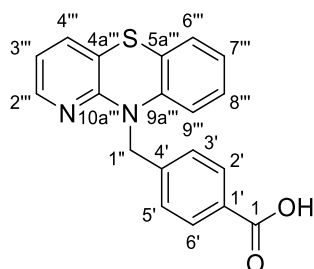
^{13}C NMR (126 MHz, DMSO- d_6): δ (ppm) = 167.0 (C-1), 141.3 (C-4'), 138.3 (C-9a''', C-10a'''), 133.0 (C-2''', C-8'''), 131.1 (C-4''', C-6'''), 129.8 (C-2', C-6'), 129.7 (C-1'), 126.3 (C-3', C-5'), 124.3 (C-4a''', C-5a'''), 122.1 (C-3''', C-7'''), 116.6 (C-1''', C-9'''), 50.7 (C-1'')

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ (cm^{-1}) = 2858, 2756, 2609, 2483, 1705, 1585, 1488, 1462, 1418, 1380, 1257, 1222, 1173, 1121, 1108, 1049, 987, 968, 876, 783, 759, 657

MS (ESI): m/z = 348 $[M-H]^-$

HRMS (ESI): m/z = 348.0699 $[M-H]^-$ berechnet für $C_{20}H_{14}NO_3S^-$ 348.0700

HPLC (Methode IIIc, DMSO): > 99 % (λ = 210 nm), > 99 % (λ = 254 nm)

4-[(10*H*-Benzo[*b*]pyrido[2,3-*e*][1,4]thiazin-10-yl)methyl]benzoesäure (223) $C_{19}H_{14}N_2O_2S$ $M_r = 334.39$

Die Durchführung erfolgte nach Arbeitsvorschrift D. Es wurden 312 mg (0.895 mmol) 4-[(10*H*-Benzo[*b*]pyrido[2,3-*e*][1,4]thiazin-10-yl)methyl]benzoesäuremethylester (**205**), 1.11 mL (2.22 mmol) 2 M Natriumhydroxid-Lösung in 10 mL eines 1,4-Dioxan/Wasser-Gemisches (1:1) eingesetzt. Nach einer Reaktionszeit von 5 h bei 60 °C wurde der erhaltene Feststoff bei 40 °C getrocknet.

Ausbeute: 88 % 263 mg hellbeiger Feststoff

Schmelzpunkt/-bereich: 175 – 177 °C

1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6): δ (ppm) = 12.92 (bs, 1H, COOH), 7.93 (dd, J = 4.9, 1.6 Hz, 1H, 2'''-H), 7.90 – 7.84 (m, 2H, 2'-H, 6'-H), 7.48 (dd, J = 7.5, 1.6 Hz, 1H, 4'''-H), 7.39 – 7.33 (m, 2H, 3'-H, 5'-H), 7.10 (dd, J = 7.6, 1.5 Hz, 1H, 6'''-H), 7.01 (td, J = 7.8, 1.6 Hz, 1H, 8'''-H), 6.93 – 6.86 (m, 2H, 3'''-H, 7'''-H), 6.68 (dd, J = 8.3, 1.1 Hz, 1H, 9'''-H), 5.37 (s, 2H, 1''-H)

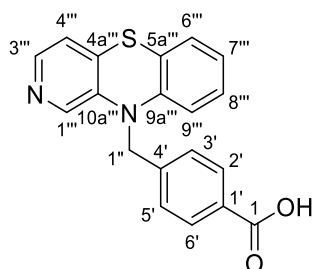
^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6): δ (ppm) = 167.3 (C-1), 153.5 (C-10a'''), 145.2 (C-2'''), 142.8 (C-4'), 141.7 (C-9a'''), 134.6 (C-4'''), 129.6 (C-1'), 129.4 (C-2', C-6'), 127.7 (C-8'''), 126.7 (C-6'''), 126.5 (C-3', C-5'), 123.2 (C-7'''), 119.7 (C-5a'''), 118.6 (C-3'''), 116.0 (C-9'''), 115.6 (C-4a'''), 47.9 (C-1'')

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ (cm $^{-1}$) = 3062, 3030, 2956, 2922, 2869, 2669, 2554, 1681, 1611, 1592, 1484, 1443, 1429, 1408, 1288, 1220, 1128, 1108, 881, 774, 751, 740, 657, 546

MS (ESI): m/z = 379 [M+Formiat] $^-$, 333 [M-H] $^-$

HRMS (ESI): m/z = 333.0706 [M-H] $^-$ berechnet für $C_{19}H_{13}N_2O_2S^-$ 333.0703

HPLC (Methode VIII, MeOH): > 99 % (λ = 210 nm), > 99 % (λ = 254 nm)

4-[(10*H*-Benzo[*b*]pyrido[3,4-*e*][1,4]thiazin-10-yl)methyl]benzoesäure (224) $C_{19}H_{14}N_2O_2S$ $M_r = 334.39$

Die Durchführung erfolgte nach Arbeitsvorschrift D. Es wurden 229 mg (0.657 mmol) 4-[(10*H*-Benzo[*b*]pyrido[3,4-*e*][1,4]thiazin-10-yl)methyl]benzoesäuremethylester (**206**), 820 μ L (1.64 mmol) 2 M Natriumhydroxid-Lösung in 6.0 mL eines 1,4-Dioxan/Wasser-Gemisches (1:1) eingesetzt. Nach einer Reaktionszeit von 2 h bei 60 °C wurde die Lösung dreimal mit Ethylacetat (je 50 mL) extrahiert.

Ausbeute: 90 % 198 mg gelber Feststoff

Schmelzpunkt/-bereich: 134 – 137 °C

1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6): δ (ppm) = 12.90 (s, 1H, COOH), 8.02 (d, J = 4.9 Hz, 1H, 3'''-H), 7.95 – 7.89 (m, 2H, 2'-H, 6'-H), 7.87 (s, 1H, 1'''-H), 7.48 – 7.40 (m, 2H, 3'-H, 5'-H), 7.18 (d, J = 4.9 Hz, 1H, 4'''-H), 7.15 (dd, J = 7.7, 1.5 Hz, 1H, 6'''-H), 7.10 (td, J = 7.8, 1.5 Hz, 1H, 8'''-H), 6.94 (t, J = 7.5 Hz, 1H, 7'''-H), 6.78 (d, J = 8.2 Hz, 1H, 9'''-H), 5.25 (s, 2H, 1''-H)

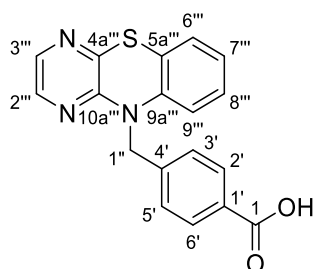
^{13}C NMR (126 MHz, DMSO- d_6): δ (ppm) = 167.0 (C-1), 143.4 (C-3'''), 143.2 (C-9a'''), 141.7 (C-4'), 139.6 (C-10a'''), 135.9 (C-1'''), 133.1 (C-4a'''), 129.7 (C-2', C-6'), 129.7 (C-1'), 128.2 (C-8'''), 127.1 (C-6'''), 126.8 (C-3', C-5'), 123.2 (C-7'''), 121.1 (C-4'''), 120.2 (C-5a'''), 116.1 (C-9'''), 50.4 (C-1'')

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ (cm $^{-1}$) = 3059, 2954, 2921, 2854, 2475, 2368, 1707, 1612, 1589, 1470, 1417, 1367, 1274, 1220, 1174, 1118, 1082, 1049, 1017, 824, 751

MS (ESI): m/z = 335 [M+H] $^{+}$

HRMS (ESI): m/z = 335.0850 [M+H] $^{+}$ berechnet für $C_{19}H_{15}N_2O_2S^{+}$ 335.0849

HPLC (Methode IXa, MeOH): > 99 % (λ = 210 nm), > 99 % (λ = 254 nm)

4-[(10*H*-Benzo[*b*]pyrazino[2,3-*e*][1,4]thiazin-10-yl)methyl]benzoesäure (225)C₁₈H₁₃N₃O₂SM_r = 335.38

Die Durchführung erfolgte nach Arbeitsvorschrift D. Es wurden 405 mg (1.16 mmol) 4-[(10*H*-Benzo[*b*]pyrazino[2,3-*e*][1,4]thiazin-10-yl)methyl]benzoesäuremethylester (**207**), 1.43 mL (2.86 mmol) 2 M Natriumhydroxid-Lösung in 10 mL eines 1,4-Dioxan/Wasser-Gemisches (1:1) eingesetzt. Nach einer Reaktionszeit von 2 h bei 60 °C wurde der erhaltene Feststoff bei 60 °C getrocknet.

Ausbeute: 91 % 354 mg gelber Feststoff

Schmelzpunkt/-bereich: 204 – 205 °C

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ (ppm) = 12.88 (bs, 1H, COOH), 7.91 – 7.84 (m, 2H, 2'-H, 6'-H), 7.82 (d, *J* = 2.8 Hz, 1H, 3'''-H), 7.79 (d, *J* = 2.8 Hz, 1H, 2'''-H), 7.40 – 7.35 (m, 2H, 3'-H, 5'-H), 7.09 (dd, *J* = 7.6, 1.5 Hz, 1H, 6'''-H), 7.01 (td, *J* = 7.8, 1.6 Hz, 1H, 8'''-H), 6.91 (td, *J* = 7.5, 1.1 Hz, 1H, 7'''-H), 6.62 (dd, *J* = 8.3, 1.1 Hz, 1H, 9'''-H), 5.27 (s, 2H, 1''-H)

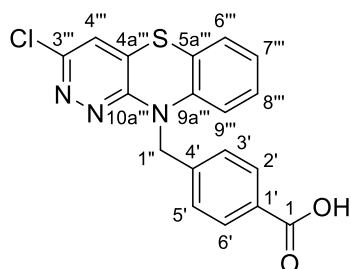
¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆): δ (ppm) = 167.1 (C-1), 149.2 (C-10a'''), 141.9 (C-4'), 141.2 (C-4a'''), 139.3 (C-9a'''), 138.8 (C-2'''), 136.8 (C-3'''), 129.6 (C-2', C-6'), 129.4 (C-1'), 128.1 (C-8'''), 126.8 (C-6'''), 126.4 (C-3', C-5'), 123.6 (C-7'''), 118.4 (C-5a'''), 116.2 (C-9'''), 47.9 (C-1'')

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) = 3058, 2907, 2663, 2542, 1684, 1611, 1502, 1483, 1450, 1398, 1280, 1240, 1179, 1143, 1126, 1063, 1017, 887, 836, 745, 652, 557

MS (ESI): *m/z* = 334 [M-H]⁻

HRMS (ESI): *m/z* = 334.0661 [M-H]⁻ berechnet für C₁₈H₁₂N₃O₂S⁻ 334.0656

HPLC (Methode VIII, MeOH): > 99 % (λ = 210 nm), > 99 % (λ = 254 nm)

4-[(3-Chlor-10*H*-benzo[*b*]pyridazino[3,4-*e*][1,4]thiazin-10-yl)methyl]benzoesäure (226) $C_{18}H_{12}ClN_3O_2S$ $M_r = 369.82$

Die Durchführung erfolgte nach Arbeitsvorschrift D. Es wurden 311 mg (0.810 mmol) 4-[(3-Chlor-10*H*-benzo[*b*]pyridazino[3,4-*e*][1,4]thiazin-10-yl)methyl]benzoesäuremethylester (**208**), 1.01 mL (2.02 mmol) 2 M Natriumhydroxid-Lösung in 7.0 mL eines 1,4-Dioxan/Wasser-Gemisches (1:1) verwendet. Nach einer Reaktionszeit von 14 h bei 40 °C wurde der erhaltene Feststoff im Hochvakuum getrocknet.

Ausbeute: 86 % 257 mg gelber Feststoff

Schmelzpunkt/-bereich: 254 °C

1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6): δ (ppm) = 12.87 (s, 1H, COOH), 7.92 – 7.86 (m, 2H, 2'-H, 6'-H), 7.59 (s, 1H, 4'''-H), 7.42 – 7.36 (m, 2H, 3'-H, 5'-H), 7.13 (dd, $J = 7.7, 1.5$ Hz, 1H, 6'''-H), 7.06 (td, $J = 7.8, 1.6$ Hz, 1H, 8'''-H), 6.93 (td, $J = 7.6, 1.0$ Hz, 1H, 7'''-H), 6.69 (dd, $J = 8.4, 1.1$ Hz, 1H, 9'''-H), 5.37 (s, 2H, 1''-H)

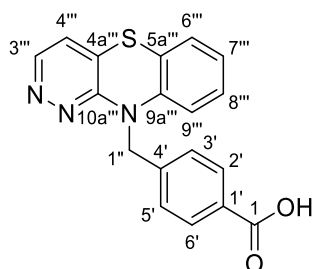
^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6): δ (ppm) = 167.1 (C-1), 153.9 (C-10a'''), 150.0 (C-3'''), 141.7 (C-4'), 139.7 (C-9a'''), 130.6 (C-4a'''), 129.5 (C-2', C-6'), 129.3 (C-1'), 128.6 (C-8'''), 126.8 (C-6'''), 126.5 (C-3', C-5'), 123.8 (C-7'''), 123.7 (C-4'''), 116.7 (C-9'''), 116.6 (C-5a'''), 48.7 (C-1'')

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ (cm $^{-1}$) = 3065, 2978, 2883, 2671, 2551, 1687, 1611, 1538, 1483, 1448, 1401, 1320, 1295, 1222, 1107, 853, 821, 755, 679

MS (ESI): $m/z = 372$ [^{37}Cl]M+H] $^+$, 370 [^{35}Cl]M+H] $^+$

HRMS (ESI): $m/z = 370.0412$ [M+H] $^+$ berechnet für $C_{18}H_{13}^{35}ClN_3O_2S^+$ 370.0412

HPLC (Methode VIII, MeOH): > 99 % ($\lambda = 210$ nm), > 99 % ($\lambda = 254$ nm)

4-[(10*H*-Benzo[*b*]pyridazino[3,4-*e*][1,4]thiazin-10-yl)methyl]benzoesäure (227) $C_{18}H_{13}N_3O_2S$ $M_r = 335.38$

Die Durchführung erfolgte nach Arbeitsvorschrift D. Es wurden 433 mg (1.24 mmol) 4-[(10*H*-Benzo[*b*]pyridazino[3,4-*e*][1,4]thiazin-10-yl)methyl]benzoesäuremethylester (**209**), 1.53 mL (3.06 mmol) 2 M Natriumhydroxid-Lösung in 10 mL eines 1,4-Dioxan/Wasser-Gemisches (1:1) verwendet. Nach einer Reaktionszeit von 2 h bei 60 °C wurde die Lösung dreimal mit Ethylacetat (je 100 mL) extrahiert.

Ausbeute: 85 % 353 mg gelber Feststoff

Schmelzpunkt/-bereich: 229 – 230 °C

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6): δ (ppm) = 12.75 (bs, 1H, COOH), 8.51 (d, J = 4.9 Hz, 1H, 3'''-H), 7.92 – 7.86 (m, 2H, 2'-H, 6'-H), 7.43 – 7.37 (m, 2H, 3'-H, 5'-H), 7.34 (d, J = 5.0 Hz, 1H, 4'''-H), 7.11 (dd, J = 7.6, 1.5 Hz, 1H, 6'''-H), 7.06 (td, J = 7.8, 1.6 Hz, 1H, 8'''-H), 6.92 (td, J = 7.5, 1.1 Hz, 1H, 7'''-H), 6.73 (dd, J = 8.3, 1.1 Hz, 1H, 9'''-H), 5.45 (s, 2H, 1''-H)

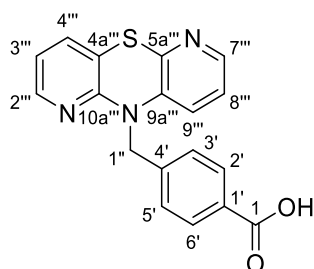
^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6): δ (ppm) = 167.1 (C-1), 154.6 (C-10a'''), 147.3 (C-3'''), 142.2 (C-4'), 140.3 (C-9a'''), 129.5 (C-2', C-6'), 129.2 (C-1'), 128.4 (C-8'''), 126.8 (C-6'''), 126.5 (C-3', C-5'), 126.3 (C-4a'''), 123.6 (C-7'''), 123.6 (C-4'''), 117.4 (C-5a'''), 116.6 (C-9'''), 48.4 (C-1'')

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ (cm $^{-1}$) = 3062, 3026, 2924, 2544, 1684, 1611, 1485, 1446, 1414, 1395, 1321, 1286, 1227, 1179, 1105, 995, 842, 753, 665

MS (ESI): m/z = 336 [M+H] $^{+}$

HRMS (ESI): m/z = 336.0802 [M+H] $^{+}$ berechnet für $C_{18}H_{14}N_3O_2S^{+}$ 336.0801

HPLC (Methode IIIa, MeOH): > 99 % (λ = 210 nm), > 99 % (λ = 254 nm)

4-[(10*H*-Dipyrido[2,3-*b*:2',3'-*e*][1,4]thiazin-10-yl)methyl]benzoesäure (228)C₁₈H₁₃N₃O₂SM_r = 335.38

Die Durchführung erfolgte nach Arbeitsvorschrift D. Es wurden 287 mg (0.821 mmol) 4-[(10*H*-Dipyrido[2,3-*b*:2',3'-*e*][1,4]thiazin-10-yl)methyl]benzoesäuremethylester (**210**), 500 µL (1.00 mmol) 2 M Natriumhydroxid-Lösung in 6.0 mL eines 1,4-Dioxan/Wasser-Gemisches (1:1) eingesetzt. Nach einer Reaktionszeit von 38 h bei Raumtemperatur wurde der erhaltene Feststoff bei 60 °C getrocknet.

Ausbeute: 82 % 226 mg hellgelber Feststoff

Schmelzpunkt/-bereich: 250 – 251 °C

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ (ppm) = 12.86 (s, 1H, COOH), 7.94 – 7.86 (m, 4H, 2'-H, 6'-H, 2'''-H, 7'''-H), 7.48 (dd, *J* = 7.5, 1.6 Hz, 1H, 4'''-H), 7.40 – 7.35 (m, 2H, 3'-H, 5'-H), 6.98 (dd, *J* = 8.3, 4.7 Hz, 1H, 8'''-H), 6.89 (dd, *J* = 7.6, 4.9 Hz, 1H, 3'''-H), 6.84 (dd, *J* = 8.4, 1.3 Hz, 1H, 9'''-H), 5.32 (s, 2H, 1''-H)

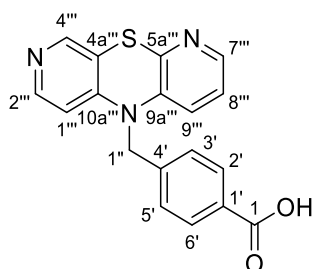
¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆): δ (ppm) = 167.1 (C-1), 151.4 (C-10a'''), 145.3 (C-2'''), 142.8 (C-5a'''), 142.6 (C-7'''), 142.2 (C-4'), 137.6 (C-9a'''), 134.8 (C-4'''), 129.6 (C-2', C-6'), 129.3, (C-1'), 126.5, (C-3', C-5'), 122.4, (C-8'''), 121.6, (C-9'''), 118.8, (C-3'''), 115.1, (C-4a'''), 47.5, (C-1'')

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) = 3052, 2922, 2801, 2625, 2508, 1704, 1613, 1574, 1551, 1443, 1403, 1272, 1215, 1128, 1018, 884, 789, 750, 698, 615

MS (ESI): *m/z* = 334 [M-H]⁻

HRMS (ESI): *m/z* = 334.0657 [M-H]⁻ berechnet für C₁₈H₁₂N₃O₂S⁻ 334.0656

HPLC (Methode IXa, MeOH): > 99 % (λ = 210 nm), > 99 % (λ = 254 nm)

4-[(5*H*-Dipyrido[2,3-*b*:4',3'-*e*][1,4]thiazin-5-yl)methyl]benzoesäure (230)C₁₈H₁₃N₃O₂SM_r = 335.38

Die Durchführung erfolgte nach Arbeitsvorschrift D. Es wurden 272 mg (0.778 mmol) 4-[(5*H*-Dipyrido[2,3-*b*:4',3'-*e*][1,4]thiazin-5-yl)methyl]benzoesäuremethylester (**212**), 480 µL (0.960 mmol) 2 M Natriumhydroxid-Lösung in 6.0 mL eines 1,4-Dioxan/Wasser-Gemisches (1:1) eingesetzt. Nach einer Reaktionszeit von 3 h bei 60 °C wurde der erhaltene Feststoff bei 50 °C getrocknet.

Ausbeute: 80 % 208 mg hellgelber Feststoff

Schmelzpunkt/-bereich: 129 – 132 °C

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ (ppm) = 12.94 (bs, 1H, COOH), 8.12 (s, 1H, 4'''-H), 8.09 (d, *J* = 5.7 Hz, 1H, 2'''-H), 7.97 (d, *J* = 4.7 Hz, 1H, 7'''-H), 7.95 – 7.88 (m, 2H, 2'-H, 6'-H), 7.41 – 7.34 (m, 2H, 3'-H, 5'-H), 7.05 (dd, *J* = 8.3, 4.7 Hz, 1H, 8'''-H), 6.94 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H, 9'''-H), 6.58 (d, *J* = 5.6 Hz, 1H, 1'''-H), 5.18 (s, 2H, 1''-H)

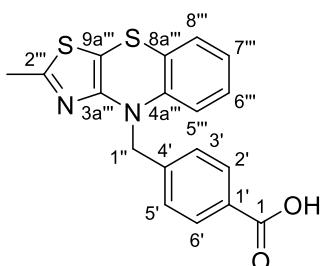
¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆): δ (ppm) = 167.0 (C-1), 149.3 (C-2'''), 148.3 (C-10a'''), 146.3 (C-4'''), 143.9 (C-5a'''), 143.4 (C-7'''), 140.4 (C-4'), 137.7 (C-9a'''), 129.8 (C-1', C-2', C-6'), 126.6 (C-3', C-5'), 122.6 (C-8'''), 122.0 (C-9'''), 117.0 (C-4a'''), 109.8 (C-1'''), 50.0 (C-1'')

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) = 3059, 2951, 2858, 2622, 2491, 1696, 1593, 1575, 1552, 1492, 1449, 1420, 1379, 1276, 1176, 1117, 1053, 872, 788, 759, 613

MS (ESI): *m/z* = 334 [M-H]⁻

HRMS (ESI): *m/z* = 334.0653 [M-H]⁻ berechnet für C₁₈H₁₂N₃O₂S⁻ 334.0656

HPLC (Methode V, DMSO): > 99 % (λ = 210 nm), > 99 % (λ = 254 nm)

4-[(2-Methyl-4*H*-benzo[*b*]thiazolo[4,5-*e*][1,4]thiazin-4-yl)methyl]benzoesäure (231) $C_{18}H_{14}N_2O_2S_2$ $M_r = 354.44$

Die Durchführung erfolgte nach Arbeitsvorschrift D. Es wurden 255 mg (0.692 mmol) 4-[(2-Methyl-4*H*-benzo[*b*]thiazolo[4,5-*e*][1,4]thiazin-4-yl)methyl]benzoesäuremethylester (**213**), 430 μ L (0.860 mmol) 2 M Natriumhydroxid-Lösung in 5.0 mL eines 1,4-Dioxan/Wasser-Gemisches (1:1) eingesetzt. Nach einer Reaktionszeit von 3 h bei 60 °C und 11 h bei Raumtemperatur wurde der erhaltene Feststoff bei 60 °C getrocknet.

Ausbeute: 84 % 207 mg beiger Feststoff

Schmelzpunkt/-bereich: 223 – 224 °C

1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6): δ (ppm) = 12.86 (bs, 1H, COOH), 7.93 – 7.87 (m, 2H, 2'-H, 6'-H), 7.48 – 7.41 (m, 2H, 3'-H, 5'-H), 7.02 – 6.94 (m, 2H, 6'''-H, 8'''-H), 6.82 (td, $J = 7.5$, 1.1 Hz, 1H, 7'''-H), 6.60 (dd, $J = 8.2$, 1.1 Hz, 1H, 5'''-H), 5.24 (s, 2H, 1''-H), 2.52 (s, 3H, CH₃)

^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6): δ (ppm) = 167.1 (C-1), 163.3 (C-2'''), 151.7 (C-3a'''), 143.1 (C-4'), 143.0 (C-4a'''), 129.6 (C-2', C-6'), 129.5 (C-1'), 128.0 (C-6'''/8'''), 127.1 (C-8'''/6'''), 126.5 (C-3', C-5'), 122.9 (C-7'''), 118.4 (C-8a'''), 114.9 (C-5'''), 94.7 (C-9a'''), 49.3 (C-1''), 19.3 (CH₃)

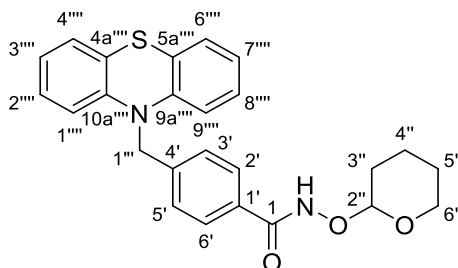
IR (KBr): $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) = 3063, 2956, 2911, 2852, 2671, 2552, 1690, 1612, 1576, 1539, 1467, 1423, 1384, 1280, 1179, 1117, 1043, 1018, 947, 736, 668

MS (ESI): $m/z = 353$ [M-H]⁻

HRMS (ESI): $m/z = 353.0427$ [M-H]⁻ berechnet für C₁₈H₁₃N₂O₂S₂⁻ 353.0424

HPLC (Methode VIII, MeOH): > 99 % ($\lambda = 210$ nm), > 99 % ($\lambda = 254$ nm)

**(±)-4-[(10*H*-Phenothiazin-10-yl)methyl]-*N*-[(tetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)oxy]benzamid
(232)**



$C_{25}H_{24}N_2O_3S$

$M_r = 432.54$

Die Durchführung erfolgte nach Arbeitsvorschrift F. Es wurden 213 mg (0.639 mmol) 4-[(10*H*-Phenothiazin-10-yl)methyl]benzoesäure (**38**) in 2.0 mL trockenem DMF, 180 μ L (1.30 mmol) Triethylamin, 405 mg (0.946 mmol) COMU in 1.0 mL trockenem DMF und 111 mg (0.948 mmol) *O*-(Tetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)hydroxylamin in 1.0 mL trockenem DMF eingesetzt. Nach einer Reaktionszeit von 16 h wurde dreimal mit Dichlormethan (je 20 mL) extrahiert und das Rohprodukt mittels Säulenchromatographie (*iso*-Hexan/Ethylacetat = 7:3, R_f = 0.2 bis 1:1, R_f = 0.4 und Dichlormethan/Methanol = 99:1, R_f = 0.2) aufgereinigt.

Ausbeute: 55 % 151 mg weißer Feststoff

Schmelzpunkt/-bereich: 187 – 188 °C

1H NMR (400 MHz, CD_2Cl_2): δ (ppm) = 8.92 (s, 1H, NH), 7.71 – 7.65 (m, 2H, 2'-H, 6'-H), 7.45 – 7.39 (m, 2H, 3'-H, 5'-H), 7.11 (dd, J = 7.6, 1.5 Hz, 2H, 4'''-H, 6'''-H), 7.00 (td, J = 7.8, 1.6 Hz, 2H, 2'''-H, 8'''-H), 6.89 (td, J = 7.5, 1.1 Hz, 2H, 3'''-H, 7'''-H), 6.63 (dd, J = 8.2, 1.1 Hz, 2H, 1'''-H, 9'''-H), 5.12 (s, 2H, 1''-H), 5.01 (t, J = 3.0 Hz, 1H, 2''-H), 3.96 (ddd, J = 11.9, 8.9, 3.0 Hz, 1H, 6''-H_a), 3.59 (dtd, J = 11.0, 4.0, 1.4 Hz, 1H, 6''-H_e), 1.87 – 1.74 (m, 3H, 3''-H_a, 3''-H_e, 4''-H_a/H_e), 1.67 – 1.51 (m, 3H, 4''-H_a/H_e, 5''-H_a, 5''-H_e)

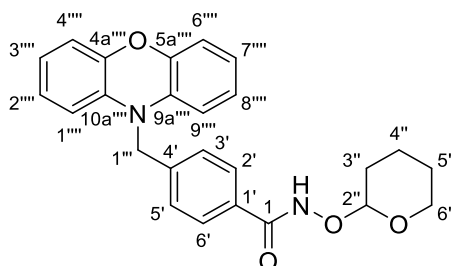
^{13}C NMR (101 MHz, CD_2Cl_2): δ (ppm) = 166.0 (C-1), 145.0 (C-9a''', C-10a'''), 141.9 (C-4'), 131.7 (C-1'), 128.1 (C-2', C-6'), 127.8 (C-2''', C-8'''), 127.7 (C-3', C-5'), 127.5 (C-4''', C-6'''), 124.3 (C-4a''', C-5a'''), 123.3 (C-3''', C-7'''), 116.0 (C-1''', C-9'''), 103.1 (C-2''), 63.2 (C-6''), 52.6 (C-1''), 28.7 (C-3''), 25.6 (C-5''), 19.3 (C-4'')

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) = 3233, 3063, 2946, 3880, 1645, 1571, 1461, 1364, 1286, 1257, 1219, 1128, 1117, 1039, 1012, 946, 898, 864, 748, 582

MS (ESI): m/z = 865 [2M+H]⁺, 433 [M+H]⁺, 349

HRMS (ESI): m/z = 433.1584 [M+H]⁺ berechnet für $C_{25}H_{25}N_2O_3S^+$ 433.1580

HPLC (Methode Ia, MeCN): > 99 % (λ = 210 nm), > 99 % (λ = 254 nm)

(±)-4-[(10*H*-Phenoxazin-10-yl)methyl]-*N*-[(tetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)oxy]benzamid (233)C₂₅H₂₄N₂O₄M_r = 416.48

Die Durchführung erfolgte nach Arbeitsvorschrift F. Es wurden 251 mg (0.791 mmol) 4-[(10*H*-Phenoxazin-10-yl)methyl]benzoesäure (**214**) in 2.0 mL trockenem DMF, 220 µL (1.59 mmol) Triethylamin, 507 mg (1.18 mmol) COMU in 1.0 mL trockenem DMF und 138 mg (1.18 mmol) *O*-(Tetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)hydroxylamin in 1.0 mL trockenem DMF eingesetzt. Nach einer Reaktionszeit von 3 h wurde dreimal mit Dichlormethan (je 20 mL) extrahiert und das Rohprodukt mittels Säulenchromatographie (Dichlormethan/Methanol = 98:2, *R_f* = 0.3 und *iso*-Hexan/Ethylacetat = 1:1, *R_f* = 0.4) aufgereinigt.

Ausbeute: 53 % 174 mg beiger Feststoff

Schmelzpunkt/-bereich: 171 – 172 °C

¹H NMR (400 MHz, CD₂Cl₂): δ (ppm) = 8.92 (s, 1H, NH), 7.75 – 7.62 (m, 2H, 2'-H, 6'-H), 7.46 – 7.31 (m, 2H, 3'-H, 5'-H), 6.76 – 6.61 (m, 6H, 2'''-H, 3'''-H, 4'''-H, 6'''-H, 7'''-H, 8'''-H), 6.30 (dd, *J* = 6.4, 1.9 Hz, 2H, 1'''-H, 9'''-H), 5.02 (t, *J* = 3.0 Hz, 1H, 2''-H), 4.82 (s, 2H, 1'''-H), 3.97 (ddd, *J* = 11.9, 8.9, 3.0 Hz, 1H, 6''-H_a), 3.60 (dtd, *J* = 11.1, 4.1, 1.7 Hz, 1H, 6''-H_e), 1.89 – 1.75 (m, 3H, 3''-H_a, 3''-H_e, 4''-H_a/H_e), 1.68 – 1.52 (m, 3H, 4''-H_a/H_e, 5''-H_a, 5''-H_e)

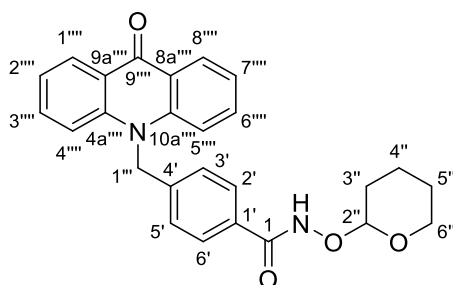
¹³C NMR (101 MHz, CD₂Cl₂): δ (ppm) = 166.0 (C-1), 145.7 (C-4a''', C-5a'''), 141.6 (C-4'), 134.1 (C-9a''', C-10a'''), 131.9 (C-1'), 128.3 (C-2', C-6'), 127.0 (C-3', C-5'), 124.3 (C-2'''/C-4''', C-8'''/C-6'''), 122.0 (C-3''', C-7'''), 115.8 (C-4'''/C-2''', C-6'''/C-8'''), 112.7 (C-1''', C-9'''), 103.1 (C-2''), 63.2 (C-6''), 49.4 (C-1''), 28.7 (C-3''), 25.6 (C-5''), 19.3 (C-4'')

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) = 3198, 3064, 2947, 1651, 1613, 1591, 1571, 1490, 1380, 1294, 1272, 1203, 1130, 1111, 1014, 949, 904, 873, 846, 738

MS (ESI): *m/z* = 833 [2M+H]⁺, 417 [M+H]⁺, 333, 182

HRMS (ESI): *m/z* = 417.1809 [M+H]⁺ berechnet für C₂₅H₂₅N₂O₄⁺ 417.1809

HPLC (Methode Ia, MeCN): 96 % (λ = 210 nm), > 99 % (λ = 254 nm)

(±)-4-[[9-Oxoacridin-10(9H)-yl]methyl]-N-[(tetrahydro-2H-pyran-2-yl)oxy]benzamid (234) $C_{26}H_{24}N_2O_4$ $M_r = 428.49$

Die Durchführung erfolgte nach Arbeitsvorschrift F. Es wurden 110 mg (0.334 mmol) 4-[[9-Oxoacridin-10(9H)-yl]methyl]benzoesäure (**215**) in 1.5 mL trockenem DMF, 110 μ L (0.647 mmol) *N,N*-Diisopropylethylamin, 220 mg (0.514 mmol) COMU in 1.0 mL trockenem DMF und 59 mg (0.50 mmol) *O*-(Tetrahydro-2H-pyran-2-yl)hydroxylamin in 1.0 mL trockenem DMF eingesetzt. Nach einer Reaktionszeit von 72 h wurde dreimal mit Dichlormethan (je 10 mL) extrahiert und das Rohprodukt mittels Säulenchromatographie (Dichlormethan/Methanol = 98:2, R_f = 0.3) aufgereinigt.

Ausbeute: 48 % 69 mg hellgelber Feststoff

Schmelzpunkt/-bereich: 224 °C

^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6): δ (ppm) = 11.58 (s, 1H, NH), 8.39 (d, J = 7.9 Hz, 2H, 1'''-H, 8'''-H), 7.75 (t, J = 8.0 Hz, 2H, 3'''-H, 6'''-H), 7.73 – 7.68 (m, 2H, 2'-H, 6'-H), 7.61 (d, J = 8.8 Hz, 2H, 4'''-H, 5'''-H), 7.35 (t, J = 7.6 Hz, 2H, 2'''-H, 7'''-H), 7.28 – 7.21 (m, 2H, 3'-H, 5'-H), 5.87 (s, 2H, 1''-H), 4.96 (s, 1H, 2''-H), 4.10 – 3.93 (m, 1H, 6''-H_a), 3.55 – 3.42 (m, 1H, 6''-H_e), 1.77 – 1.63 (m, 3H, 3''-H_a, 3''-H_e, 4''-H_a/H_e), 1.61 – 1.45 (m, 3H, 4''-H_a/H_e, 5''-H_a, 5''-H_e)

^{13}C NMR (126 MHz, DMSO- d_6): δ (ppm) = 176.7 (C-9'''), 164.0 (C-1), 142.1 (C-4a'''), C-10a'''), 140.1 (C-4'), 134.4 (C-3''', C-6'''), 131.5 (C-1'), 127.8 (C-2', C-6'), 126.7 (C-1''', C-8'''), 125.9 (C-3', C-5'), 121.7 (C-8a''', C-9a'''), 121.7 (C-2''', C-7'''), 116.1 (C-4''', C-5'''), 101.0 (C-2''), 61.4 (C-6''), 48.9 (C-1''), 27.9 (C-3''), 24.7 (C-5''), 18.3 (C-4'')

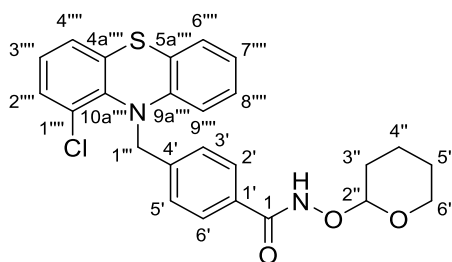
IR (KBr): $\tilde{\nu}$ (cm $^{-1}$) = 3242, 3069, 2943, 2871, 1676, 1631, 1607, 1575, 1492, 1461, 1378, 1292, 1267, 1178, 1112, 1037, 936, 903, 870, 755, 674, 545

MS (ESI): m/z = 451 [M+Na] $^+$, 429 [M+H] $^+$, 345

HRMS (ESI): m/z = 429.1806 [M+H] $^+$ berechnet für C₂₆H₂₅N₂O₄ $^+$ 429.1809

HPLC (Methode IXb, MeOH): 95 % (λ = 210 nm), 95 % (λ = 254 nm)

(±)-4-[(1-Chlor-10*H*-phenothiazin-10-yl)methyl]-*N*-[(tetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)oxy]-benzamid (235)



$C_{25}H_{23}ClN_2O_3S$

$M_r = 466.98$

Die Durchführung erfolgte nach Arbeitsvorschrift F. Es wurden 225 mg (0.612 mmol) 4-[(1-Chlor-10*H*-phenothiazin-10-yl)methyl]benzoesäure (**216**) in 1.5 mL trockenem DMF, 210 μ L (1.23 mmol) *N,N*-Diisopropylethylamin, 393 mg (0.918 mmol) COMU in 1.0 mL trockenem DMF und 107 mg (0.913 mmol) *O*-(Tetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)hydroxylamin in 1.0 mL trockenem DMF eingesetzt. Nach einer Reaktionszeit von 24 h wurde dreimal mit Dichlormethan (je 20 mL) extrahiert und das Rohprodukt mittels Säulenchromatographie (*iso*-Hexan/Ethylacetat = 7:3, R_f = 0.2 und Dichlormethan R_f = 0.2) aufgereinigt.

Ausbeute: 56 % 159 mg hellrosa Feststoff

Schmelzpunkt/-bereich: 78 – 80 °C

1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6): δ (ppm) = 11.53 (s, 1H, NH), 7.63 – 7.57 (m, 2H, 2'-H, 6'-H), 7.47 – 7.41 (m, 2H, 3'-H, 5'-H), 7.34 (dd, J = 8.0, 1.3 Hz, 1H, 4'''-H), 7.23 (dd, J = 7.7, 1.3 Hz, 1H, 2'''-H), 7.22 (dd, J = 8.3, 1.1 Hz, 1H, 9'''-H), 7.15 (dd, J = 7.7, 1.5 Hz, 1H, 6'''-H), 7.15 (dd, J = 7.7, 1.4 Hz, 1H, 8'''-H), 7.06 (t, J = 7.8 Hz, 1H, 3'''-H), 6.95 (td, J = 7.5, 1.2 Hz, 1H, 7'''-H), 5.21 (s, 2H, 1''-H), 4.94 (t, J = 3.0 Hz, 1H, 2''-H), 4.09 – 3.93 (m, 1H, 6''-H_a), 3.54 – 3.43 (m, 1H, 6''-H_e), 1.75 – 1.63 (m, 3H, 3''-H_a, 3''-H_e, 4''-H_a/H_e), 1.59 – 1.46 (m, 3H, 4''-H_a/H_e, 5''-H_a, 5''-H_e)

^{13}C NMR (126 MHz, DMSO- d_6): δ (ppm) = 163.8 (C-1), 145.1 (C-9a'''), 141.5 (C-4'), 140.7 (C-10a'''), 133.3 (C-1'''), 131.3 (C-1'), 129.8 (C-4'''), 128.0 (C-5a'''), 127.8 (C-3', C-5'), 127.6 (C-8'''), 127.1 (C-2', C-6'), 126.8 (C-6'''), 126.3 (C-2'''), 125.7 (C-4a'''), 125.3 (C-3'''), 124.1 (C-7'''), 121.0 (C-9'''), 100.8 (C-2''), 61.3 (C-6''), 56.6 (C-1'''), 27.8 (C-3''), 24.7 (C-5''), 18.2 (C-4'')

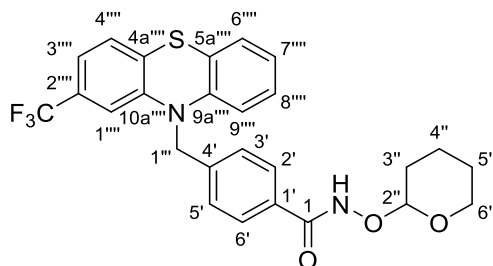
IR (KBr): $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) = 3212, 3059, 2946, 2867, 1647, 1573, 1478, 1448, 1432, 1261, 1203, 1113, 1037, 1015, 950, 904, 873, 800, 769, 749, 720, 599

MS (ESI): m/z = 931 [2M-H]⁻, 511 [M+Formiat]⁻, 465 [(³⁵Cl)M-H]⁻, 316, 180

HRMS (ESI): m/z = 465.1046 [M-H]⁻ berechnet für C₂₅H₂₂³⁵ClN₂O₃S⁻ 465.1045

HPLC (Methode Ia, MeCN): > 99 % (λ = 210 nm), > 99 % (λ = 254 nm)

(±)-*N*-[(Tetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)oxy]-4-[[2-(trifluormethyl)-10*H*-phenothiazin-10-yl]methyl]benzamid (236)


 $\text{C}_{26}\text{H}_{23}\text{F}_3\text{N}_2\text{O}_3\text{S}$
 $M_r = 500.54$

Die Durchführung erfolgte nach Arbeitsvorschrift F. Es wurden 233 mg (0.580 mmol) 4-[(2-(Trifluormethyl)-10*H*-phenothiazin-10-yl)methyl]benzoesäure (**218**) in 1.5 mL trockenem DMF, 200 μL (1.18 mmol) *N,N*-Diisopropylethylamin, 373 mg (0.871 mmol) COMU in 1.0 mL trockenem DMF und 103 mg (0.879 mmol) *O*-(Tetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)hydroxylamin in 1.0 mL trockenem DMF eingesetzt. Nach einer Reaktionszeit von 48 h wurde dreimal mit Dichlormethan (je 20 mL) extrahiert und das Rohprodukt mittels Säulenchromatographie (*n*-Pentan/Ethylacetat = 3:2, $R_f = 0.3$) aufgereinigt.

Ausbeute: 67 % 195 mg hellrosa Feststoff

Schmelzpunkt/-bereich: 80 – 82 °C

^1H NMR (500 MHz, CD_2Cl_2): δ (ppm) = 8.99 (s, 1H, NH), 7.73 – 7.68 (m, 2H, 2'-H, 6'-H), 7.45 – 7.40 (m, 2H, 3'-H, 5'-H), 7.22 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H, 4''''-H), 7.14 (dd, $J = 8.0, 1.7$ Hz, 1H, 3''''-H), 7.11 (dd, $J = 7.6, 1.5$ Hz, 1H, 6''''-H), 7.02 (td, $J = 7.8, 1.6$ Hz, 1H, 8''''-H), 6.92 (td, $J = 7.5, 1.1$ Hz, 1H, 7''''-H), 6.84 (d, $J = 1.7$ Hz, 1H, 1''''-H), 6.66 (dd, $J = 8.2, 1.1$ Hz, 1H, 9''''-H), 5.14 (s, 2H, 1'''-H), 5.01 (t, $J = 3.0$ Hz, 1H, 2''-H), 3.96 (ddd, $J = 11.9, 9.2, 3.0$ Hz, 1H, 6''-H_a), 3.59 (dtd, $J = 11.1, 4.1, 1.6$ Hz, 1H, 6''-H_b), 1.87 – 1.77 (m, 3H, 3''-H_a, 3''-H_e, 4''-H_a/H_e), 1.64 – 1.52 (m, 3H, 4''-H_a/H_e, 5''-H_a, 5''-H_e)

^{13}C NMR (126 MHz, CD_2Cl_2): δ (ppm) = 165.9 (C-1), 145.6 (C-10a'''), 144.2 (C-9a'''), 141.1 (C-4'), 131.9 (C-1'), 129.9 (q, $^2J_{\text{C,F}} = 32.3$ Hz, C-2'''), 129.7 (C-4a'''), 128.2 (C-8'''), 128.2 (C-2', C-6'), 127.7 (C-4'''), 127.6 (C-6'''), 127.6 (C-3', C-5'), 124.6 (q, $^1J_{\text{C,F}} = 272.0$ Hz, CF₃), 123.9 (C-7'''), 123.5 (C-5a'''), 119.9 (q, $^3J_{\text{C,F}} = 3.9$ Hz, C-3'''), 116.5 (C-9'''), 112.3 (q, $^3J_{\text{C,F}} = 3.9$ Hz, C-1'''), 103.2 (C-2''), 63.2 (C-6''), 52.7 (C-1''), 28.7 (C-3''), 25.6 (C-5''), 19.3 (C-4'')

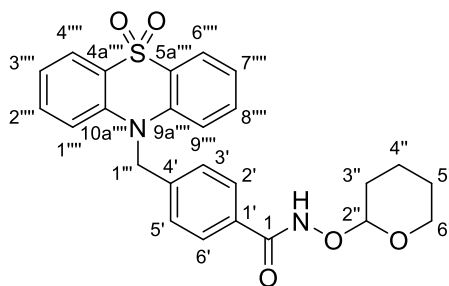
IR (KBr): $\tilde{\nu}$ (cm^{-1}) = 3260, 3050, 2951, 2880, 1653, 1572, 1472, 1444, 1424, 1324, 1253, 1169, 1119, 1085, 1039, 950, 905, 868, 816, 757

MS (ESI): $m/z = 501$ [M+H]⁺, 417

HRMS (ESI): $m/z = 501.1457$ [M+H]⁺ berechnet für $\text{C}_{26}\text{H}_{24}\text{F}_3\text{N}_2\text{O}_3\text{S}^+$ 501.1454

HPLC (Methode Ia, MeCN): 95 % (λ = 210 nm), 95 % (λ = 254 nm)

(±)-4-[(5,5-Dioxo-10*H*-phenothiazin-10-yl)methyl]-*N*-[(tetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)oxy]benzamid (237)



$C_{25}H_{24}N_2O_5S$

$M_r = 464.54$

Die Durchführung erfolgte nach Arbeitsvorschrift F. Es wurden 201 mg (0.550 mmol) 4-[(5,5-Dioxo-10*H*-phenothiazin-10-yl)methyl]benzoesäure (**221**) in 1.5 mL trockenem DMF, 190 μ L (1.12 mmol) *N,N*-Diisopropylethylamin, 355 mg (0.829 mmol) COMU in 1.0 mL trockenem DMF und 99 mg (0.85 mmol) *O*-(Tetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)hydroxylamin in 1.0 mL trockenem DMF eingesetzt. Nach einer Reaktionszeit von 91 h wurde dreimal mit Dichlormethan (je 20 mL) extrahiert und das Rohprodukt mittels Säulenchromatographie (Dichlormethan/Methanol = 98:2, $R_f = 0.2$ und *iso*-Hexan/Ethylacetat = 7:3, $R_f = 0.4$) aufgereinigt.

Ausbeute: 54 % 137 mg weißer Feststoff

Schmelzpunkt/-bereich: 206 °C

1H NMR (500 MHz, CD_2Cl_2): δ (ppm) = 8.91 (s, 1H, NH), 8.10 (dd, $J = 7.9, 1.6$ Hz, 2H, 4'''-H, 6'''-H), 7.74 – 7.69 (m, 2H, 2'-H, 6'-H), 7.51 (ddd, $J = 8.8, 7.2, 1.7$ Hz, 2H, 2'''-H, 8'''-H), 7.32 – 7.24 (m, 4H, 3'-H, 5'-H, 3'''-H, 7'''-H), 7.10 (d, $J = 8.6$ Hz, 2H, 1'''-H, 9'''-H), 5.47 (s, 2H, 1''-H), 5.01 (t, $J = 2.9$ Hz, 1H, 2''-H), 3.95 (ddd, $J = 12.0, 9.3, 3.0$ Hz, 1H, 6''-H_a), 3.59 (dtd, $J = 11.2, 4.1, 1.6$ Hz, 1H, 6'' H_e), 1.86 – 1.75 (m, 3H, 3''-H_a, 3''-H_e, 4''-H_a/H_e), 1.67 – 1.52 (m, 3H, 4''-H_a/H_e, 5''-H_a, 5''-H_e)

^{13}C NMR (126 MHz, CD_2Cl_2): δ (ppm) = 165.7 (C-1), 141.5 (C-9a''', C-10a'''), 140.1 (C-4'), 133.9 (C-2''', C-8'''), 132.3 (C-1'), 128.5 (C-2', C-6'), 126.9 (C-3', C-5'), 125.2 (C-4a''', C-5a'''), 123.8 (C-4''', C-6'''), 122.9 (C-3''', C-7'''), 117.1 (C-1''', C-9'''), 103.1 (C-2''), 63.2 (C-6''), 53.2 (C-1''), 28.6 (C-3''), 25.6 (C-5''), 19.2 (C-4'')

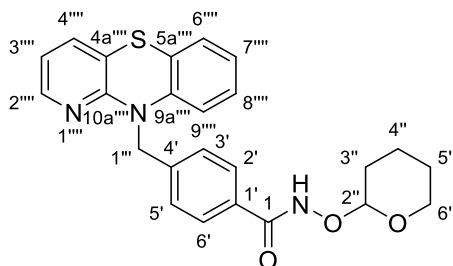
IR (KBr): $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) = 3252, 3072, 3009, 2949, 2871, 1655, 1589, 1579, 1486, 1467, 1376, 1292, 1255, 1167, 1140, 1084, 949, 903, 872, 752

MS (ESI): m/z = 927 [2M-H]⁻, 463 [M-H]⁻,

HRMS (ESI): m/z = 463.1334 [M-H]⁻ berechnet für $C_{25}H_{23}N_2O_5S^-$ 463.1333

HPLC (Methode Ia, MeCN): > 99 % ($\lambda = 210$ nm), > 99 % ($\lambda = 254$ nm)

(±)-4-[(10*H*-Benzo[*b*]pyrido[2,3-*e*][1,4]thiazin-10-yl)methyl]-*N*-[(tetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)oxy]benzamid (238)



$C_{24}H_{23}N_3O_3S$

$M_r = 433.53$

Die Durchführung erfolgte nach Arbeitsvorschrift F. Es wurden 203 mg (0.607 mmol) 4-[(10*H*-Benzo[*b*]pyrido[2,3-*e*][1,4]thiazin-10-yl)methyl]benzoesäure (**223**) in 1.5 mL trockenem DMF, 200 μ L (1.18 mmol) *N,N*-Diisopropylethylamin, 390 mg (0.911 mmol) COMU in 1.0 mL trockenem DMF und 107 mg (0.913 mmol) *O*-(Tetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)-hydroxylamin in 1.0 mL trockenem DMF eingesetzt. Nach einer Reaktionszeit von 21 h wurde dreimal mit Dichlormethan (je 20 mL) extrahiert und das Rohprodukt mittels Säulenchromatographie (Dichlormethan/Methanol = 98:2, R_f = 0.3) aufgereinigt.

Ausbeute: 51 % 133 mg weißer Feststoff

Schmelzpunkt/-bereich: 135 – 137 °C

1H NMR (500 MHz, CD_2Cl_2): δ (ppm) = 8.91 (s, 1H, NH), 7.89 (dd, J = 4.9, 1.6 Hz, 1H, 2'''-H), 7.73 – 7.58 (m, 2H, 2'-H, 6'-H), 7.45 – 7.33 (m, 2H, 3'-H, 5'-H), 7.30 (dd, J = 7.5, 1.6 Hz, 1H, 4'''-H), 7.04 (dd, J = 7.6, 1.5 Hz, 1H, 6'''-H), 6.94 (td, J = 7.8, 1.6 Hz, 1H, 8'''-H), 6.86 (td, J = 7.5, 1.1 Hz, 1H, 7'''-H), 6.78 (dd, J = 7.5, 4.8 Hz, 1H, 3'''-H), 6.57 (dd, J = 8.2, 1.1 Hz, 1H, 9'''-H), 5.35 (s, 2H, 1'''-H), 5.01 (t, J = 3.0 Hz, 1H, 2''-H), 3.96 (ddd, J = 11.9, 9.1, 2.9 Hz, 1H, 6''-H_a), 3.59 (dtd, J = 11.0, 4.2, 1.2 Hz, 1H, 6''-H_b), 1.88 – 1.74 (m, 3H, 3''-H_a, 3''-H_e, 4''-H_a/H_e), 1.69 – 1.51 (m, 3H, 4''-H_a/H_e, 5''-H_a, 5''-H_e)

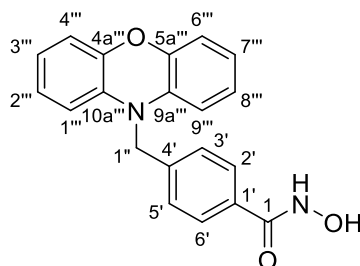
^{13}C NMR (126 MHz, CD_2Cl_2): δ (ppm) = 166.2 (C-1), 154.8 (C-10a'''), 145.6 (C-2'''), 143.0 (C-4'), 142.9 (C-9a'''), 134.7 (C-4'''), 131.2 (C-1'), 128.0 (C-8'''), 127.8 (C-2', C-6'), 127.4 (C-3', C-5'), 127.3 (C-6'''), 123.7 (C-7'''), 121.4 (C-5a'''), 118.8 (C-3'''), 117.4 (C-4a'''), 116.5 (C-9'''), 103.1 (C-2''), 63.2 (C-6''), 49.4 (C-1''), 28.7 (C-3''), 25.6 (C-5''), 19.3 (C-4'')

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) = 3188, 3060, 2949, 2872, 2849, 1648, 1568, 1483, 1444, 1411, 1221, 1111, 1014, 948, 902, 875, 785, 745, 618

MS (ESI): m/z = 456 [M+Na]⁺, 434 [M+H]⁺

HRMS (ESI): m/z = 434.1533 [M+H]⁺ berechnet für $C_{24}H_{24}N_3O_3S^+$ 434.1533

HPLC (Methode Ia, MeCN): > 99 % (λ = 210 nm), > 99 % (λ = 254 nm)

4-[(10*H*-Phenoxazin-10-yl)methyl]-*N*-hydroxybenzamid (239)(Literaturbekannte Substanz^[291]) $C_{20}H_{16}N_2O_3$ $M_r = 332.36$

Die Durchführung erfolgte nach Arbeitsvorschrift G. Es wurden 108 mg (0.259 mmol) (\pm)-4-[(10*H*-Phenoxazin-10-yl)methyl]-*N*-[(tetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)oxy]benzamid (**233**) in 6.0 mL Dichlormethan und 340 μ L (1.36 mmol) 4 M Salzsäure in 1,4-Dioxan eingesetzt. Die Entschützungszeit betrug 14 h.

Ausbeute: 23 % 20 mg beiger Feststoff

Schmelzpunkt/-bereich: 203 °C

1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6): δ (ppm) = 11.15 (s, 1H, $NHOH$), 9.00 (bs, 1H, NH), 7.74 – 7.69 (m, 2H, 2'-H, 6'-H), 7.37 – 7.33 (m, 2H, 3'-H, 5'-H), 6.74 (ddd, J = 7.9, 7.3, 1.8 Hz, 2H, 2'''-H, 8'''-H), 6.71 (dd, J = 7.9, 1.8 Hz, 2H, 4'''-H, 6'''-H), 6.67 (ddd, J = 7.9, 7.2, 1.3 Hz, 2H, 3'''-H, 7'''-H), 6.47 (dd, J = 8.0, 1.3 Hz, 2H, 1'''-H, 9'''-H), 4.92 (s, 2H, 1''-H)

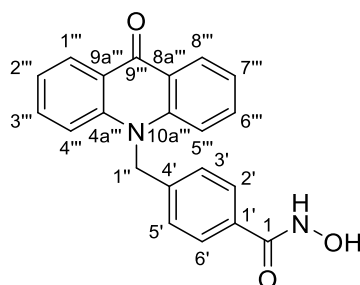
^{13}C NMR (126 MHz, DMSO- d_6): δ (ppm) = 164.1 (C-1), 144.1 (C-4a''', C-5a'''), 139.9 (C-4'), 133.1 (C-9a''', C-10a'''), 131.7 (C-1'), 127.3 (C-2', C-6'), 126.2 (C-3', C-5'), 124.1 (C-2'', C-8'''), 121.3 (C-3'', C-7'''), 115.1 (C-4'', C-6'''), 112.4 (C-1'', C-9'''), 46.8 (C-1'')

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ (cm $^{-1}$) = 3239, 3061, 3017, 2856, 1614, 1569, 1539, 1491, 1429, 1382, 1309, 1273, 1155, 1132, 1015, 893, 844, 739, 637, 582

MS (ESI): m/z = 331 [M-H] $^{-}$

HRMS (ESI): m/z = 331.1087 [M-H] $^{-}$ berechnet für $C_{20}H_{15}N_2O_3^{-}$ 331.1088

HPLC (Methode 1e, MeOH): > 99 % (λ = 210 nm), > 99 % (λ = 254 nm)

N-Hydroxy-4-{[9-oxoacridin-10(9H)-yl]methyl}benzamid (240) $C_{21}H_{16}N_2O_3$ $M_r = 344.37$

Die Durchführung erfolgte nach Arbeitsvorschrift G. Es wurden 40 mg (0.093 mmol) (\pm)-4-{[9-Oxoacridin-10(9H)-yl]methyl}-N-[(tetrahydro-2H-pyran-2-yl)oxy]benzamid (**234**) in 2.0 mL Dichlormethan und 0.12 mL (0.48 mmol) 4 M Salzsäure in 1,4-Dioxan eingesetzt. Die Entschützungszeit betrug 5 h.

Ausbeute: 79 % 26 mg hellgelber Feststoff

Schmelzpunkt/-bereich: 232 °C

1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6): δ (ppm) = 11.14 (s, 1H, $NH\text{OH}$), 9.00 (bs, 1H, $N\text{H}\text{OH}$), 8.39 (dd, $J = 8.0, 1.7$ Hz, 2H, 1'''-H, 8'''-H), 7.76 (ddd, $J = 8.7, 6.8, 1.7$ Hz, 2H, 3'''-H, 6'''-H), 7.72 – 7.67 (m, 2H, 2'-H, 6'-H), 7.62 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H, 4'''-H, 5'''-H), 7.35 (t, $J = 7.4$ Hz, 2H, 2'''-H, 7'''-H), 7.25 – 7.20 (m, 2H, 3'-H, 5'-H), 5.86 (s, 2H, 1''-H)

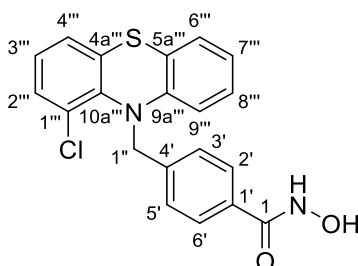
^{13}C NMR (126 MHz, DMSO- d_6): δ (ppm) = 176.7 (C-9'''), 163.9 (C-1), 142.0 (C-4a''', C-10a'''), 139.6 (C-4'), 134.4 (C-3''', C-6'''), 132.0 (C-1'), 127.5 (C-2', C-6'), 126.7 (C-1''', C-8'''), 125.8 (C-3', C-5'), 121.7 (C-8a''', C-9a'''), 121.6 (C-2''', C-7'''), 116.1 (C-4''', C-5'''), 48.9 (C-1'')

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ (cm^{-1}) = 3201, 3070, 2856, 1610, 1593, 1571, 1497, 1461, 1379, 1292, 1270, 1180, 1014, 937, 896, 753, 674, 546

MS (ESI): $m/z = 343$ $[M-H]^-$

HRMS (ESI): $m/z = 343.1087$ $[M-H]^-$ berechnet für $C_{21}H_{15}N_2O_3^-$ 343.1088

HPLC (Methode 1e, MeOH): > 99 % ($\lambda = 210$ nm), > 99 % ($\lambda = 254$ nm)

4-[(1-Chlor-10*H*-phenothiazin-10-yl)methyl]-*N*-hydroxybenzamid (241)C₂₀H₁₅ClN₂O₂SM_r = 382.86

Die Durchführung erfolgte nach Arbeitsvorschrift G. Es wurden 62 mg (0.13 mmol) (±)-4-[(1-Chlor-10*H*-phenothiazin-10-yl)methyl]-*N*-[(tetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)oxy]benzamid (**235**) in 2.0 mL Dichlormethan und 0.17 mL (0.68 mmol) 4 M Salzsäure in 1,4-Dioxan eingesetzt. Die Aufreinigung erfolgte mittels RP₁₈-Säulenchromatographie (Methanol).

Ausbeute: 46 % 23 mg beiger Feststoff

Schmelzpunkt/-bereich: 75 – 77 °C

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ (ppm) = 11.09 (s, 1H, NHOH), 8.95 (s, 1H, NH₂OH), 7.63 – 7.53 (m, 2H, 2'-H, 6'-H), 7.47 – 7.39 (m, 2H, 3'-H, 5'-H), 7.34 (dd, *J* = 8.0, 1.3 Hz, 1H, 4'''-H), 7.23 (dd, *J* = 5.0, 1.3 Hz, 1H, 2'''-H), 7.22 (dd, *J* = 5.8, 1.2 Hz, 1H, 9'''-H), 7.19 – 7.12 (m, 2H, 6'''-H, 8'''-H), 7.06 (t, *J* = 7.8 Hz, 1H, 3'''-H), 6.95 (td, *J* = 7.5, 1.2 Hz, 1H, 7'''-H), 5.21 (s, 2H, 1''-H)

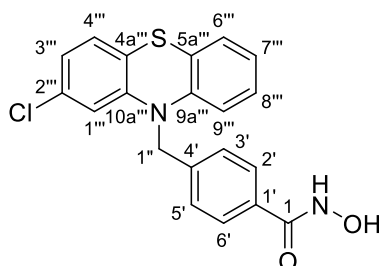
¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆): δ (ppm) = 163.9 (C-1), 145.2 (C-9a'''), 141.1 (C-4'), 140.7 (C-10a'''), 133.3 (C-1'''), 131.8 (C-1'), 129.8 (C-4'''), 128.0 (C-5a'''), 127.8 (C-3', C-5'), 127.6 (C-8'''/6'''), 126.9 (C-6'''/8'''), 126.8 (C-2', C-6'), 126.3 (C-2'''), 125.7 (C-4a'''), 125.3 (C-3'''), 124.0 (C-7'''), 121.0 (C-9'''), 56.5 (C-1'')

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) = 3260, 3060, 2925, 2865, 1636, 1569, 1477, 1448, 1432, 1263, 1198, 1155, 1131, 1087, 1033, 1015, 897, 768, 750, 719, 598

MS (ESI): *m/z* = 417 [M+Cl]⁻, 381 [(³⁵Cl)M-H]⁻

HRMS (ESI): *m/z* = 381.0472 [M-H]⁻ berechnet für C₂₀H₁₄³⁵ClN₂O₂S⁻ 381.0470

HPLC (Methode Id, MeOH): > 99 % (λ = 210 nm), > 99 % (λ = 254 nm)

4-[(2-Chlor-10*H*-phenothiazin-10-yl)methyl]-*N*-hydroxybenzamid (242)C₂₀H₁₅ClN₂O₂SM_r = 382.86

Die Durchführung erfolgte nach Arbeitsvorschrift H. Es wurden 202 mg (0.549 mmol) 4-[(2-Chlor-10*H*-phenothiazin-10-yl)methyl]benzoesäure (**217**) in 0.5 mL trockenem DMF, 190 µL (1.12 mmol) *N,N*-Diisopropylethylamin, 355 mg (0.829 mmol) COMU in 0.5 mL trockenem DMF und 115 mg (1.65 mmol) Hydroxylaminhydrochlorid in 1.0 mL trockenem DMF eingesetzt. Nach einer Reaktionszeit von 42 h wurde Aufarbeitung A befolgt, die Lösung auf Wasser gegeben und dreimal mit Ethylacetat (je 50 mL) extrahiert. Das Rohprodukt wurde mittels Säulenchromatographie (Dichlormethan/Methanol/0.1 % Essigsäure = 99:1:0.1, *R_f* = 0.2) aufgereinigt. Der erhaltene Rückstand nach der Säulenchromatographie wurde erneut in Dichlormethan aufgenommen, wiederholt mit Wasser gewaschen und das Dichlormethan im Vakuum entfernt.

Ausbeute: 44 % 93 mg beiger Feststoff

Schmelzpunkt/-bereich: 168 – 169 °C

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ (ppm) = 11.15 (s, 1H, NHOH), 9.00 (s, 1H, NH), 7.79 – 7.63 (m, 2H, 2'-H, 6'-H), 7.48 – 7.31 (m, 2H, 3'-H, 5'-H), 7.17 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H, 4'''-H), 7.16 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H, 6'''-H), 7.09 (td, *J* = 7.8, 1.5 Hz, 1H, 8'''-H), 6.97 (dd, *J* = 8.2, 1.8 Hz, 1H, 3'''-H), 6.93 (td, *J* = 7.4, 1.0 Hz, 1H, 7'''-H), 6.81 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H, 1'''-H), 6.80 (dd, *J* = 7.8, 1.0 Hz, 1H, 9'''-H), 5.20 (s, 2H, 1''-H)

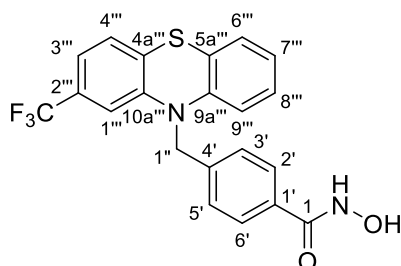
¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆): δ (ppm) = 164.0 (C-1), 145.6 (C-10a'''), 143.5 (C-9a'''), 139.9 (C-4'), 132.2 (C-2'''), 131.7 (C-1'), 127.9 (C-4'''), 127.7 (C-8'''), 127.3 (C-2', C-6'), 127.0 (C-6'''), 126.7 (C-3', C-5'), 123.2 (C-7'''), 122.4 (C-5a'''), 122.3 (C-3'''), 121.8 (C-4a'''), 116.3 (C-9'''), 115.8 (C-1'''), 50.7 (C-1'')

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) = 3243, 3056, 3012, 2904, 2851, 1617, 1566, 1536, 1495, 1464, 1406, 1345, 1248, 1222, 1129, 1110, 1047, 1015, 899, 832, 802, 758

MS (ESI): *m/z* = 383 [(³⁷Cl)M-H]⁻, 381 [(³⁵Cl)M-H]⁻

HRMS (ESI): *m/z* = 381.0474 [M-H]⁻ berechnet für C₂₀H₁₄³⁵ClN₂O₂S⁻ 381.0470

HPLC (Methode Ib, MeOH): 95 % (λ = 210 nm), 95 % (λ = 254 nm)

***N*-Hydroxy-4-{[2-(trifluormethyl)-10*H*-phenothiazin-10-yl]methyl}benzamid (243)**C₂₁H₁₅F₃N₂O₂SM_r = 416.42

Die Durchführung erfolgte nach Arbeitsvorschrift G. Es wurden 153 mg (0.306 mmol) (±)-*N*-[(Tetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)oxy]-4-{[2-(trifluormethyl)-10*H*-phenothiazin-10-yl]methyl}-benzamid (**236**) in 1.5 mL Dichlormethan und 400 µL (1.60 mmol) 4 M Salzsäure in 1,4-Dioxan eingesetzt. Die Aufreinigung erfolgte mittels RP₁₈-Säulenchromatographie (Methanol).

Ausbeute: 16 % 20 mg beiger Feststoff

Schmelzpunkt/-bereich: 91 –93 °C

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ (ppm) = 11.16 (s, 1H, NHOH), 8.99 (s, 1H, NH₂OH), 7.75 – 7.65 (m, 2H, 2'-H, 6'-H), 7.48 – 7.39 (m, 2H, 3'-H, 5'-H), 7.37 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, 4'''-H), 7.24 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H, 3'''-H), 7.19 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H, 6'''-H), 7.12 (t, *J* = 7.7 Hz, 1H, 8'''-H), 7.01 (s, 1H, 1'''-H), 6.97 (t, *J* = 7.5 Hz, 1H, 7'''-H), 6.85 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H, 9'''-H), 5.26 (s, 2H, 1''-H)

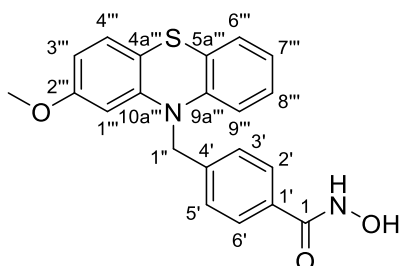
¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆): δ (ppm) = 163.9 (C-1), 144.8 (C-10a'''), 143.5 (C-9a'''), 139.9 (C-4'), 131.6 (C-1'), 128.6 (C-4a'''), 128.1 (q, ²*J*_{C,F} = 31.9 Hz, C-2'''), 128.0 (C-8'''), 127.5 (C-4'''), 127.2 (C-2', C-6'), 127.1 (C-6'''), 126.8 (C-3', C-5'), 123.4 (C-7'''), 122.9 (q, ¹*J*_{C,F} = 272.2 Hz, CF₃), 121.8 (C-5a'''), 119.2 (q, ³*J*_{C,F} = 3.9 Hz, C-3'''), 116.4 (C-9'''), 112.0 (q, ³*J*_{C,F} = 3.8 Hz, C-1'''), 50.7 (C-1'')

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) = 3249, 3066, 2917, 2857, 1638, 1570, 1471, 1445, 1424, 1324, 1251, 1167, 1122, 1082, 1015, 905, 867, 819, 751, 652

MS (ESI): *m/z* = 831 [2M-H]⁻, 415 [M-H]⁻, 266

HRMS (ESI): *m/z* = 415.0736 [M-H]⁻ berechnet für C₂₁H₁₄F₃N₂O₂S⁻ 415.0734

HPLC (Methode II, MeOH): 95 % (λ = 210 nm), 96 % (λ = 254 nm)

***N*-Hydroxy-4-[(2-methoxy-10*H*-phenothiazin-10-yl)methyl]benzamid (244)**C₂₁H₁₈N₂O₃SM_r = 378.45

Die Durchführung erfolgte nach Arbeitsvorschrift H. Es wurden 175 mg (0.482 mmol) 4-[(2-Methoxy-10*H*-phenothiazin-10-yl)methyl]benzoesäure (**219**) in 0.5 mL trockenem DMF, 160 µL (0.941 mmol) *N,N*-Diisopropylethylamin, 302 mg (0.705 mmol) COMU in 0.5 mL trockenem DMF und 101 mg (1.45 mmol) Hydroxylaminhydrochlorid in 0.5 mL trockenem DMF eingesetzt. Nach einer Reaktionszeit von 3 h wurde Aufarbeitung A befolgt, die Lösung auf Ethylacetat gegeben und dreimal mit Wasser (je 50 mL) extrahiert. Das Rohprodukt wurde mittels Säulenchromatographie (Dichlormethan/Methanol/0.1 % Essigsäure = 99:1:0.1, *R_f* = 0.1) aufgereinigt. Der erhaltene Rückstand nach der Säulenchromatographie wurde in Dichlormethan aufgenommen und das Produkt mit *n*-Pentan ausgefällt.

Ausbeute: 48 % 87 mg grauer Feststoff

Schmelzpunkt/-bereich: 150 – 151 °C

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ (ppm) = 11.14 (bs, 1H, NHOH), 9.00 (bs, 1H, NHOH), 7.76 – 7.62 (m, 2H, 2'-H, 6'-H), 7.47 – 7.33 (m, 2H, 3'-H, 5'-H), 7.15 (dd, *J* = 7.5, 1.1 Hz, 1H, 6'''-H), 7.07 (td, *J* = 7.8, 1.1 Hz, 1H, 8'''-H), 7.05 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H, 4'''-H), 6.91 (t, *J* = 7.4 Hz, 1H, 7'''-H), 6.80 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H, 9'''-H), 6.53 (dd, *J* = 8.4, 2.3 Hz, 1H, 3'''-H), 6.36 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H, 1'''-H), 5.18 (s, 2H, 1''-H), 3.61 (s, 3H, OCH₃)

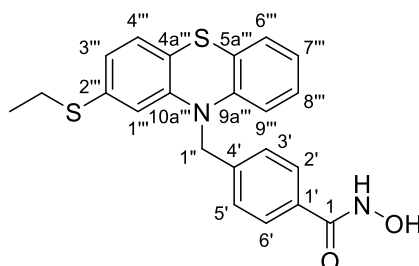
¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆): δ (ppm) = 164.0 (C-1), 159.3 (C-2'''), 145.5 (C-10a'''), 144.0 (C-9a'''), 140.4 (C-4'), 131.6 (C-1'), 127.4 (C-8'''), 127.2 (C-4'''), 127.2 (C-2', C-6'), 126.8 (C-6'''), 126.7 (C-3', C-5'), 123.4 (C-5a'''), 122.7 (C-7'''), 115.9 (C-9'''), 113.4 (C-4a'''), 107.3 (C-3'''), 103.6 (C-1'''), 55.1 (OCH₃), 50.7 (C-1'')

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) = 3242, 3054, 2998, 2938, 2837, 1638, 1604, 1587, 1571, 1468, 1444, 1352, 1307, 1275, 1203, 1175, 1012, 922, 828, 784, 753, 669

MS (ESI): *m/z* = 377 [M-H]⁻

HRMS (ESI): *m/z* = 377.0969 [M-H]⁻ berechnet für C₂₁H₁₇N₂O₃S⁻ 377.0965

HPLC (Methode Id, MeOH): 97 % (λ = 210 nm), > 99 % (λ = 254 nm)

4-[(2-(Ethylthio)-10*H*-phenothiazin-10-yl)methyl]-*N*-hydroxybenzamid (245)C₂₂H₂₀N₂O₂S₂M_r = 408.53

Die Durchführung erfolgte nach Arbeitsvorschrift H. Es wurden 202 mg (0.513 mmol) 4-[(2-(Ethylthio)-10*H*-phenothiazin-10-yl)methyl]benzoesäure (**220**) in 0.5 mL trockenem DMF, 170 μ L (1.00 mmol) *N,N*-Diisopropylethylamin, 336 mg (0.785 mmol) COMU in 0.5 mL trockenem DMF und 108 mg (1.55 mmol) Hydroxylaminhydrochlorid in 0.5 mL trockenem DMF eingesetzt. Nach einer Reaktionszeit von 34 h wurde Aufarbeitung A befolgt, die Lösung auf Wasser gegeben und dreimal mit Ethylacetat (je 50 mL) extrahiert. Das Rohprodukt wurde mittels Säulenchromatographie (Dichlormethan/Methanol/0.1 % Essigsäure = 98:2:0.1, *R_f* = 0.3) aufgereinigt. Der erhaltene Rückstand nach der Säulenchromatographie wurde erneut in Dichlormethan aufgenommen, wiederholt mit Wasser gewaschen und das Dichlormethan im Vakuum entfernt.

Ausbeute: 54 % 114 mg beiger Feststoff

Schmelzpunkt/-bereich: 78 °C

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ (ppm) = 11.15 (s, 1H, NHOH), 9.00 (s, 1H, NH₂OH), 7.73 – 7.68 (m, 2H, 2'-H, 6'-H), 7.42 – 7.37 (m, 2H, 3'-H, 5'-H), 7.16 (dd, *J* = 7.6, 1.5 Hz, 1H, 6'''-H), 7.10 (td, *J* = 7.8, 1.5 Hz, 1H, 8'''-H), 7.08 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H, 4'''-H), 6.93 (td, *J* = 7.5, 1.0 Hz, 1H, 7'''-H), 6.85 (dd, *J* = 8.0, 1.8 Hz, 1H, 3'''-H), 6.83 (dd, *J* = 8.1, 1.0 Hz, 1H, 9'''-H), 6.65 (d, *J* = 1.8 Hz, 1H, 1'''-H), 5.20 (s, 2H, 1''-H), 2.74 (q, *J* = 7.3 Hz, 2H, SCH₂CH₃), 0.99 (t, *J* = 7.3 Hz, 3H, SCH₂CH₃)

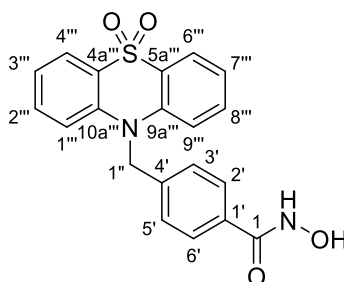
¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆): δ (ppm) = 163.9 (C-1), 144.5 (C-10a'''), 144.1 (C-9a'''), 140.3 (C-4'), 135.4 (C-2'''), 131.5 (C-1'), 127.6 (C-8'''), 127.2 (C-2', C-6'), 127.1 (C-4'''), 126.9 (C-6'''), 126.7 (C-3', C-5'), 122.9 (C-7'''), 122.8 (C-5a'''), 122.5 (C-3'''), 120.0 (C-4a'''), 116.0 (C-9'''), 115.6 (C-1'''), 50.7 (C-1''), 26.3 (SCH₂CH₃), 14.1 (SCH₂CH₃)

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) = 3201, 3058, 2969, 2922, 2865, 1637, 1566, 1465, 1401, 1343, 1254, 1217, 1151, 1131, 1112, 1015, 899, 844, 803, 749

MS (ESI): *m/z* = 815 [2M-H]⁻, 407 [M-H]⁻, 233

HRMS (ESI): *m/z* = 407.0896 [M-H]⁻ berechnet für C₂₂H₁₉N₂O₂S₂⁻ 407.0893

HPLC (Methode Id, MeOH): > 99 % (λ = 210 nm), > 99 % (λ = 254 nm)

4-[(5,5-Dioxo-10*H*-phenothiazin-10-yl)methyl]-*N*-hydroxybenzamid (246) $\text{C}_{20}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_4\text{S}$ $M_r = 380.42$

Die Durchführung erfolgte nach Arbeitsvorschrift G. Es wurden 95 mg (0.20 mmol) (\pm)-4-[(5,5-Dioxo-10*H*-phenothiazin-10-yl)methyl]-*N*-[(tetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)oxy]benzamid (**237**) in 2.0 mL Dichlormethan und 260 μL (1.04 mmol) 4 M Salzsäure in 1,4-Dioxan eingesetzt. Die Entschützungszeit betrug 30 min.

Ausbeute: 66 % 50 mg beiger Feststoff

Schmelzpunkt/-bereich: 94 –95 °C

^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ (ppm) = 11.16 (s, 1H, NHOH), 9.02 (s, 1H, NH), 8.05 (dd, $J = 7.9, 1.5$ Hz, 2H, 4'''-H, 6'''-H), 7.74 – 7.68 (m, 2H, 2'-H, 6'-H), 7.65 (ddd, $J = 8.7, 7.2, 1.6$ Hz, 2H, 2'''-H, 8'''-H), 7.36 (t, $J = 7.5$ Hz, 2H, 3'''-H, 7'''-H), 7.32 (d, $J = 8.6$ Hz, 2H, 1'''-H, 9'''-H), 7.26 – 7.19 (m, 2H, 3'-H, 5'-H), 5.67 (s, 2H, 1''-H)

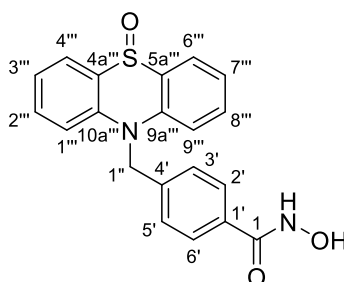
^{13}C NMR (101 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ (ppm) = 163.9 (C-1), 140.4 (C-9a'', C-10a''), 139.1 (C-4'), 133.6 (C-2'', C-8''), 131.9 (C-1'), 127.4 (C-2', C-6'), 126.1 (C-3', C-5'), 123.6 (C-4a'', C-5a''), 122.6 (C-4'', C-6''), 122.3 (C-3'', C-7''), 117.2 (C-1'', C-9''), 51.0 (C-1'')

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ (cm^{-1}) = 3240, 3070, 2924, 2855, 1640, 1589, 1486, 1466, 1376, 1290, 1254, 1166, 1139, 1082, 1024, 1015, 872, 755, 570

MS (ESI): $m/z = 379$ $[\text{M}-\text{H}]^-$

HRMS (ESI): $m/z = 379.0765$ $[\text{M}-\text{H}]^-$ berechnet für $\text{C}_{20}\text{H}_{15}\text{N}_2\text{O}_4\text{S}^-$ 379.0758

HPLC (Methode Ie, MeOH): > 99 % ($\lambda = 210$ nm), > 99 % ($\lambda = 254$ nm)

N-Hydroxy-4-[(5-oxo-10*H*-phenothiazin-10-yl)methyl]benzamid (247)C₂₀H₁₆N₂O₃SM_r = 364.42

Die Durchführung erfolgte nach Arbeitsvorschrift H. Es wurden 198 mg (0.567 mmol) 4-[(5-Oxo-10*H*-phenothiazin-10-yl)methyl]benzoesäure (**222**) in 1.9 mL trockenem DMF, 190 µL (1.12 mmol) *N,N*-Diisopropylethylamin, 369 mg (0.862 mmol) COMU in 0.6 mL trockenem DMF und 119 mg (1.71 mmol) Hydroxylaminhydrochlorid in 0.6 mL trockenem DMF eingesetzt. Nach einer Reaktionszeit von 17 h wurde Aufarbeitung B befolgt und das Rohprodukt mittels Säulenchromatographie (Dichlormethan/Methanol/0.1 % Essigsäure = 94:6:0.1, *R_f* = 0.2) aufgereinigt. Nach weiterem Waschen mit Wasser wurde der Feststoff bei 50 °C getrocknet.

Ausbeute: 50 % 104 mg weißer Feststoff

Schmelzpunkt/-bereich: 212 –213 °C

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ (ppm) = 11.16 (s, 1H, NHOH), 9.02 (s, 1H, NHOH), 8.02 (dd, *J* = 7.7, 1.6 Hz, 2H, 4'''-H, 6'''-H), 7.74 – 7.63 (m, 2H, 2'-H, 6'-H), 7.60 (ddd, *J* = 8.7, 7.1, 1.6 Hz, 2H, 2'''-H, 8'''-H), 7.34 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H, 1'''-H, 9'''-H), 7.30 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H, 3'''-H, 7'''-H), 7.23 – 7.16 (m, 2H, 3'-H, 5'-H), 5.72 (s, 2H, 1''-H)

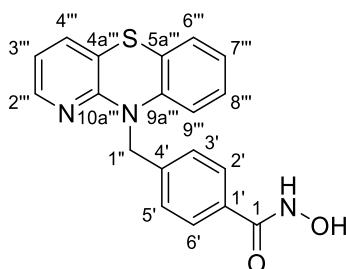
¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆): δ (ppm) = 163.9 (C-1), 139.4 (C-4'), 138.3 (C-9a''', C-10a'''), 133.0 (C-2''', C-8'''), 131.8 (C-1'), 131.1 (C-4''', C-6'''), 127.4 (C-2', C-6'), 126.1 (C-3', C-5'), 124.3 (C-4a''', C-5a'''), 122.1 (C-3''', C-7'''), 116.7 (C-1''', C-9'''), 50.5 (C-1'')

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) = 3155, 3069, 2907, 1651, 1588, 1533, 1488, 1463, 1381, 1318, 1259, 1225, 1150, 1048, 988, 894, 877, 749, 703, 616, 525

MS (ESI): *m/z* = 363 [M-H]⁻

HRMS (ESI): *m/z* = 363.0808 [M-H]⁻ berechnet für C₂₀H₁₅N₂O₃S⁻ 363.0809

HPLC (Methode Ig, MeOH): > 99 % (λ = 210 nm), > 99 % (λ = 254 nm)

4-[(10*H*-Benzo[*b*]pyrido[2,3-*e*][1,4]thiazin-10-yl)methyl]-*N*-hydroxybenzamid (248)C₁₉H₁₅N₃O₂SM_r = 349.41

248 wurde durch zwei unterschiedliche Methoden dargestellt.

Für die Durchführung nach Arbeitsvorschrift G wurden 91 mg (0.21 mmol) (±)-4-[(10*H*-Benzo[*b*]pyrido[2,3-*e*][1,4]thiazin-10-yl)methyl]-*N*-[(tetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)oxy]-benzamid (**238**) in 4.0 mL Dichlormethan und 280 µL (1.12 mmol) 4 M Salzsäure in 1,4-Dioxan eingesetzt. Die Entschützungszeit betrug 30 min.

Für die Durchführung nach Arbeitsvorschrift H wurden 129 mg (0.386 mmol) 4-[(10*H*-Benzo[*b*]pyrido[2,3-*e*][1,4]thiazin-10-yl)methyl]benzoesäure (**223**) in 1.0 mL trockenem DMF, 130 µL (0.764 mmol) *N,N*-Diisopropylethylamin, 252 mg (0.602 mmol) COMU in 0.5 mL trockenem DMF und 81.0 mg (1.18 mmol) Hydroxylaminhydrochlorid in 0.5 mL trockenem DMF eingesetzt. Nach einer Reaktionszeit von 19 h wurde Aufarbeitung B befolgt und das Rohprodukt mittels Säulenchromatographie (Dichlormethan/Methanol/0.1 % Essigsäure = 98:2:0.1, *R_f* = 0.2) aufgereinigt. Nach weiterem Waschen mit Wasser wurde der Feststoff bei 50 °C getrocknet.

Ausbeute:	42 %	31 mg	hellbeiger Feststoff
	(Arbeitsvorschrift G)		
	41 %	56 mg	
	(Arbeitsvorschrift H)		

Schmelzpunkt/-bereich: 173 – 175 °C

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ (ppm) = 11.12 (s, 1H, NHOH), 8.99 (s, 1H, NH₂), 7.93 (d, *J* = 4.7 Hz, 1H, 2''-H), 7.74 – 7.60 (m, 2H, 2'-H, 6'-H), 7.49 (d, *J* = 7.4 Hz, 1H, 4''-H), 7.40 – 7.27 (m, 2H, 3'-H, 5'-H), 7.10 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H, 6''-H), 7.01 (t, *J* = 7.7 Hz, 1H, 8''-H), 6.94 – 6.85 (m, 2H, 3'''-H, 7'''-H), 6.69 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H, 9'''-H), 5.35 (s, 2H, 1''-H)

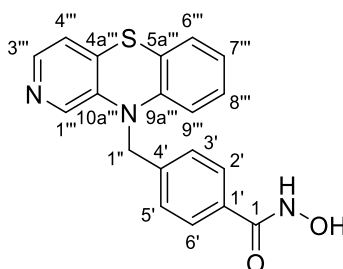
¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆): δ (ppm) = 164.1 (C-1), 153.5 (C-10a'''), 145.2 (C-2'''), 141.7 (C-9a'''), 141.0 (C-4'), 134.6 (C-4'''), 131.2 (C-1'), 127.7 (C-8'''), 127.0 (C-2', C-6'), 126.7 (C-6'''), 126.4 (C-3', C-5'), 123.3 (C-7'''), 119.7 (C-5a'''), 118.6 (C-3'''), 116.1 (C-9'''), 115.6 (C-4a'''), 47.7 (C-1'')

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) = 3256, 3061, 2922, 2855, 1615, 1567, 1485, 1446, 1430, 1409, 1377, 1247, 1224, 1130, 1109, 1045, 1015, 882, 777, 747, 656

MS (ESI): $m/z = 348$ $[M-H]^-$

HRMS (ESI): $m/z = 348.0813$ $[M-H]^-$ berechnet für $C_{19}H_{14}N_3O_2S^-$ 348.0812

HPLC (Methode XI, MeOH): > 99 % ($\lambda = 210$ nm), > 99 % ($\lambda = 254$ nm)

4-[(10*H*-Benzo[*b*]pyrido[3,4-*e*][1,4]thiazin-10-yl)methyl]-*N*-hydroxybenzamid (249)C₁₉H₁₅N₃O₂SM_r = 349.41

Die Durchführung erfolgte nach Arbeitsvorschrift H. Es wurden 170 mg (0.508 mmol) 4-[(10*H*-Benzo[*b*]pyrido[3,4-*e*][1,4]thiazin-10-yl)methyl]benzoesäure (**224**) in 1.5 mL trockenem DMF, 170 µL (1.00 mmol) *N,N*-Diisopropylethylamin, 334 mg (0.780 mmol) COMU in 0.3 mL trockenem DMF und 105 mg (1.51 mmol) Hydroxylaminhydrochlorid in 0.3 mL trockenem DMF eingesetzt. Nach einer Reaktionszeit von 4 h wurde Aufarbeitung B befolgt und das Rohprodukt mittels Säulenchromatographie (Dichlormethan/Methanol/0.1 % Essigsäure = 98:2:0.1, *R_f* = 0.1) aufgereinigt. Nach weiterem Waschen mit Wasser wurde der Feststoff bei 50 °C getrocknet.

Ausbeute: 54 % 96 mg hellbeiger Feststoff

Schmelzpunkt/-bereich: 174 –175 °C

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ (ppm) = 11.17 (s, 1H, NHOH), 9.02 (s, 1H, NHOH), 8.02 (d, *J* = 4.8 Hz, 1H, 3'''-H), 7.88 (s, 1H, 1'''-H), 7.77 – 7.65 (m, 2H, 2'-H, 6'-H), 7.45 – 7.32 (m, 2H, 3'-H, 5'-H), 7.18 (d, *J* = 4.8 Hz, 1H, 4'''-H), 7.14 (d, *J* = 7.4 Hz, 1H, 6'''-H), 7.10 (t, *J* = 7.7 Hz, 1H, 8'''-H), 6.95 (t, *J* = 7.5 Hz, 1H, 7'''-H), 6.80 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H, 9'''-H), 5.23 (s, 2H, 1''-H)

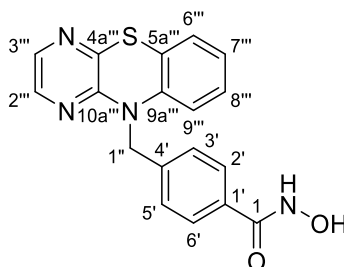
¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆): δ (ppm) = 164.0 (C-1), 143.4 (C-3'''), 143.3 (C-9a'''), 139.7 (C-4'), 139.6 (C-10a'''), 135.9 (C-1'''), 133.1 (C-4a'''), 131.7 (C-1'), 128.2 (C-8'''), 127.3 (C-2', C-6'), 127.1 (C-6'''), 126.6 (C-3', C-5'), 123.2 (C-7'''), 121.1 (C-4'''), 120.2 (C-5a'''), 116.1 (C-9'''), 50.3 (C-1'')

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) = 3195, 3053, 2683, 1634, 1563, 1470, 1444, 1417, 1365, 1313, 1269, 1257, 1217, 1086, 1009, 817, 749, 719, 645, 619, 561

MS (ESI): *m/z* = 350 [M+H]⁺

HRMS (ESI): *m/z* = 350.0958 [M+H]⁺ berechnet für C₁₉H₁₆N₃O₂S⁺ 350.0958

HPLC (Methode Ie, MeOH): > 99 % (λ = 210 nm), > 99 % (λ = 254 nm)

4-[(10*H*-Benzo[*b*]pyrazino[2,3-*e*][1,4]thiazin-10-yl)methyl]-*N*-hydroxybenzamid (250)C₁₈H₁₄N₄O₂SM_r = 350.40

Die Durchführung erfolgte nach Arbeitsvorschrift H. Es wurden 249 mg (0.742 mmol) 4-[(10*H*-Benzo[*b*]pyrazino[2,3-*e*][1,4]thiazin-10-yl)methyl]benzoesäure (**225**) in 2.5 mL trockenem DMF, 250 µL (1.47 mmol) *N,N*-Diisopropylethylamin, 470 mg (1.10 mmol) COMU in 0.5 mL trockenem DMF und 153 mg (2.20 mmol) Hydroxylaminhydrochlorid in 0.5 mL trockenem DMF eingesetzt. Nach einer Reaktionszeit von 13 h wurde Aufarbeitung B befolgt und das Rohprodukt mittels Säulenchromatographie (Dichlormethan/Methanol/0.1 % Essigsäure = 98:2:0.1, *R_f* = 0.2) aufgereinigt. Nach weiterem Waschen mit Wasser wurde der Feststoff im Hochvakuum getrocknet.

Ausbeute: 38 % 100 mg hellgelber Feststoff

Schmelzpunkt/-bereich: 170 – 171 °C

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ (ppm) = 11.14 (s, 1H, NHOH), 9.00 (s, 1H, NHOH), 7.81 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H, 3'''-H), 7.78 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H, 2'''-H), 7.71 – 7.65 (m, 2H, 2'-H, 6'-H), 7.36 – 7.30 (m, 2H, 3'-H, 5'-H), 7.08 (d, *J* = 7.3 Hz, 1H, 6'''-H), 7.01 (t, *J* = 7.7 Hz, 1H, 8'''-H), 6.90 (t, *J* = 7.4 Hz, 1H, 7'''-H), 6.63 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H, 9'''-H), 5.25 (s, 2H, 1''-H)

¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆): δ (ppm) = 164.1 (C-1), 149.3 (C-10a'''), 141.2 (C-4a'''), 139.9 (C-4'), 139.4 (C-9a'''), 138.8 (C-2'''), 136.7 (C-3'''), 131.4 (C-1'), 128.1 (C-8'''), 127.1 (C-2', C-6'), 126.8 (C-6'''), 126.3 (C-3', C-5'), 123.6 (C-7'''), 118.4 (C-5a'''), 116.3 (C-9'''), 47.7 (C-1'')

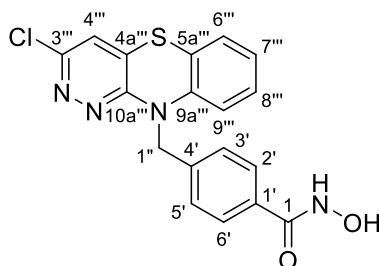
IR (KBr): $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) = 3243, 3060, 2856, 1636, 1614, 1568, 1539, 1498, 1484, 1452, 1400, 1244, 1180, 1144, 1063, 1015, 893, 834, 760, 748, 654

MS (ESI): *m/z* = 349 [M-H]⁻

HRMS (ESI): *m/z* = 349.0769 [M-H]⁻ berechnet für C₁₈H₁₃N₄O₂S⁻ 349.0765

HPLC (Methode Ie, MeOH): > 99 % (λ = 210 nm), > 99 % (λ = 254 nm)

4-[(3-Chlor-10*H*-benzo[*b*]pyridazino[3,4-*e*][1,4]thiazin-10-yl)methyl]-*N*-hydroxybenzamid (251)



$C_{18}H_{13}ClN_4O_2S$

$M_r = 384.84$

Die Durchführung erfolgte nach Arbeitsvorschrift H. Es wurden 199 mg (0.538 mmol) 4-[(3-Chlor-10*H*-benzo[*b*]pyridazino[3,4-*e*][1,4]thiazin-10-yl)methyl]benzoesäure (**226**) in 2.0 mL trockenem DMF, 180 μ L (1.06 mmol) *N,N*-Diisopropylethylamin, 353 mg (0.824 mmol) COMU in 0.5 mL trockenem DMF und 114 mg (1.64 mmol) Hydroxylaminhydrochlorid in 0.5 mL trockenem DMF eingesetzt. Nach einer Reaktionszeit von 18 h wurde Aufarbeitung B befolgt und das Rohprodukt mittels Säulenchromatographie (Dichlormethan/Methanol/0.1 % Essigsäure = 95:5:0.1, $R_f = 0.3$) aufgereinigt. Nach weiterem Waschen mit Wasser wurde der Feststoff im Hochvakuum getrocknet.

Ausbeute: 42 % 87 mg gelber Feststoff

Schmelzpunkt/-bereich: 180 – 182 °C

1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6): δ (ppm) = 11.16 (s, 1H, NHOH), 9.00 (bs, 1H, NHOH), 7.73 – 7.66 (m, 2H, 2'-H, 6'-H), 7.58 (s, 1H, 4''-H), 7.39 – 7.31 (m, 2H, 3'-H, 5'-H), 7.12 (dd, $J = 7.6, 1.5$ Hz, 1H, 6'''-H), 7.06 (td, $J = 7.9, 1.5$ Hz, 1H, 8'''-H), 6.93 (td, $J = 7.5, 0.8$ Hz, 1H, 7'''-H), 6.70 (dd, $J = 8.2, 0.6$ Hz, 1H, 9'''-H), 5.34 (s, 2H, 1''-H)

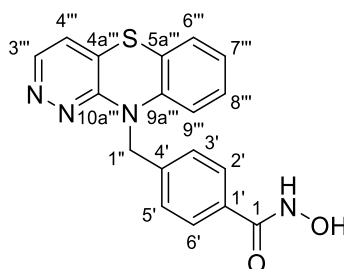
^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6): δ (ppm) = 164.1 (C-1), 154.0 (C-10a'''), 149.9 (C-3'''), 139.7 (C-4'), 139.7 (C-9a'''), 131.4 (C-1'), 130.6 (C-4a'''), 128.6 (C-8'''), 127.1 (C-2', C-6'), 126.8 (C-6'''), 126.3 (C-3', C-5'), 123.8 (C-7'''), 123.6 (C-4'''), 116.7 (C-9'''), 116.6 (C-5a'''), 48.6 (C-1'')

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ (cm $^{-1}$) = 3253, 3150, 3062, 2856, 1636, 1614, 1567, 1539, 1498, 1482, 1448, 1436, 1409, 1315, 1234, 1106, 1077, 1015, 894, 844, 753

MS (ESI): $m/z = 383$ [^{35}Cl]M-H] $^{-}$

HRMS (ESI): $m/z = 383.0375$ [M-H] $^{-}$ berechnet für $C_{18}H_{12}^{35}ClN_4O_2S$ 383.0375

HPLC (Methode Ie, MeOH): > 99 % ($\lambda = 210$ nm), > 99 % ($\lambda = 254$ nm)

4-[(10*H*-Benzo[*b*]pyridazino[3,4-*e*][1,4]thiazin-10-yl)methyl]-*N*-hydroxybenzamid (252)C₁₈H₁₄N₄O₂SM_r = 350.40

Die Durchführung erfolgte nach Arbeitsvorschrift H. Es wurden 327 mg (0.975 mmol) 4-[(10*H*-Benzo[*b*]pyridazino[3,4-*e*][1,4]thiazin-10-yl)methyl]benzoesäure (**227**) in 1.5 mL trockenem DMF, 330 µL (1.94 mmol) *N,N*-Diisopropylethylamin, 629 mg (1.47 mmol) COMU in 1.0 mL trockenem DMF und 207 mg (2.98 mmol) Hydroxylaminhydrochlorid in 1.0 mL trockenem DMF eingesetzt. Nach einer Reaktionszeit von 2 h wurde Aufarbeitung B befolgt und das Rohprodukt mittels Säulenchromatographie (Dichlormethan/Methanol/0.1 % Essigsäure = 94:6:0.1, *R_f* = 0.3) aufgereinigt. Nach weiterem Waschen mit Wasser wurde der Feststoff bei 40 °C getrocknet.

Ausbeute: 37 % 127 mg hellgelber Feststoff

Schmelzpunkt/-bereich: 165 – 166 °C

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ (ppm) = 11.15 (s, 1H, NHOH), 8.99 (s, 1H, NH₂OH), 8.51 (d, *J* = 5.0 Hz, 1H, 3'''-H), 7.71 – 7.66 (m, 2H, 2'-H, 6'-H), 7.36 (d, *J* = 4.9 Hz, 1H, 4'''-H), 7.35 – 7.32 (m, 2H, 3'-H, 5'-H), 7.12 (dd, *J* = 7.7, 1.5 Hz, 1H, 6'''-H), 7.06 (ddd, *J* = 8.5, 7.6, 1.5 Hz, 1H, 8'''-H), 6.92 (td, *J* = 7.5, 1.0 Hz, 1H, 7'''-H), 6.72 (dd, *J* = 8.3, 1.1 Hz, 1H, 9'''-H), 5.41 (s, 2H, 1''-H)

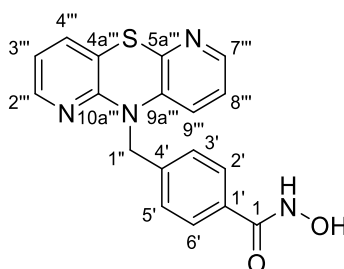
¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆): δ (ppm) = 164.1 (C-1), 154.6 (C-10a'''), 147.3 (C-3'''), 140.3 (C-9a'''), 140.2 (C-4'), 131.3 (C-1'), 128.4 (C-8'''), 127.1 (C-2', C-6'), 126.8 (C-6'''), 126.4 (C-3', C-5'), 126.3 (C-4a'''), 123.7 (C-4'''), 123.6 (C-7'''), 117.4 (C-5a'''), 116.6 (C-9'''), 48.3 (C-1'')

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) = 3188, 3068, 2866, 1636, 1553, 1529, 1484, 1446, 1417, 1395, 1324, 1290, 1223, 1155, 1105, 1013, 895, 844, 749

MS (ESI): *m/z* = 351 [M+H]⁺

HRMS (ESI): *m/z* = 351.0910 [M+H]⁺ berechnet für C₁₈H₁₅N₄O₂S⁺ 351.0910

HPLC (Methode Ic, MeOH): > 99 % (λ = 210 nm), > 99 % (λ = 254 nm)

4-[(10*H*-Dipyrido[2,3-*b*:2',3'-*e*][1,4]thiazin-10-yl)methyl]-*N*-hydroxybenzamid (253)C₁₈H₁₄N₄O₂SM_r = 350.40

Die Durchführung erfolgte nach Arbeitsvorschrift H. Es wurden 191 mg (0.570 mmol) 4-[(10*H*-Dipyrido[2,3-*b*:2',3'-*e*][1,4]thiazin-10-yl)methyl]benzoesäure (**228**) in 1.0 mL trockenem DMF, 190 µL (1.12 mmol) *N,N*-Diisopropylethylamin, 375 mg (0.876 mmol) COMU in 0.6 mL trockenem DMF und 120 mg (1.73 mmol) Hydroxylaminhydrochlorid in 0.6 mL trockenem DMF eingesetzt. Nach einer Reaktionszeit von 26 h wurde Aufarbeitung B befolgt und das Rohprodukt mittels Säulenchromatographie (Dichlormethan/Methanol/0.1 % Essigsäure = 98:2:0.1, *R_f* = 0.1) aufgereinigt. Nach weiterem Waschen mit Wasser wurde der Feststoff bei 50 °C getrocknet.

Ausbeute: 58 % 116 mg beiger Feststoff

Schmelzpunkt/-bereich: 167 – 168 °C

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ (ppm) = 11.13 (s, 1H, NHOH), 8.99 (s, 1H, NHOH), 7.90 (d, *J* = 4.5 Hz, 1H, 2'''-H), 7.88 (d, *J* = 4.5 Hz, 1H, 7'''-H), 7.72 – 7.65 (m, 2H, 2'-H, 6'-H), 7.48 (d, *J* = 7.3 Hz, 1H, 4'''-H), 7.36 – 7.28 (m, 2H, 3'-H, 5'-H), 6.97 (dd, *J* = 8.0, 4.6 Hz, 1H, 8'''-H), 6.89 (dd, *J* = 7.2, 4.9 Hz, 1H, 3'''-H), 6.85 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H, 9'''-H), 5.29 (s, 2H, 1''-H)

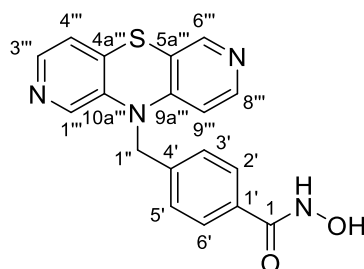
¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆): δ (ppm) = 164.1 (C-1), 151.5 (C-10a'''), 145.3 (C-2'''), 142.9 (C-5a'''), 142.6 (C-7'''), 140.1 (C-4'), 137.6 (C-9a'''), 134.8 (C-4'''), 131.4 (C-1'), 127.1 (C-2', C-6'), 126.3 (C-3', C-5'), 122.4 (C-8'''), 121.7 (C-9'''), 118.8 (C-3'''), 115.1 (C-4a'''), 47.3 (C-1'')

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) = 3164, 3054, 2989, 2864, 1631, 1571, 1551, 1526, 1438, 1404, 1374, 1279, 1209, 1129, 1010, 894, 784, 747, 724, 614

MS (ESI): *m/z* = 349 [M-H]⁻

HRMS (ESI): *m/z* = 349.0766 [M-H]⁻ berechnet für C₁₈H₁₃N₄O₂S⁻ 349.0765

HPLC (Methode Ie, MeOH): > 99 % (λ = 210 nm), > 99 % (λ = 254 nm)

4-[(10*H*-Dipyrido[3,4-*b*:3',4'-*e*][1,4]thiazin-10-yl)methyl]-*N*-hydroxybenzamid (254)C₁₈H₁₄N₄O₂SM_r = 350.40

Die Durchführung erfolgte nach Arbeitsvorschrift H. Es wurden 139 mg (0.414 mmol) 4-[(10*H*-Dipyrido[3,4-*b*:3',4'-*e*][1,4]thiazin-10-yl)methyl]benzoesäure (**229**) in 1.6 mL trockenem DMF, 140 µL (0.823 mmol) *N,N*-Diisopropylethylamin, 263 mg (0.614 mmol) COMU in 0.5 mL trockenem DMF und 87.0 mg (1.25 mmol) Hydroxylaminhydrochlorid in 0.6 mL trockenem DMF eingesetzt. Nach einer Reaktionszeit von 69 h wurde Aufarbeitung B befolgt und das Rohprodukt mittels Säulenchromatographie (Dichlormethan/Methanol/0.1 % Essigsäure = 97:3:0.1, *R_f* = 0.2) aufgereinigt. Nach weiterem Waschen mit Diethylether wurde der Feststoff bei 50 °C getrocknet.

Ausbeute: 60 % 87 mg weißer Feststoff

Schmelzpunkt/-bereich: 180 – 181 °C

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ (ppm) = 11.18 (bs, 1H, NHOH), 9.03 (bs, 1H, NH₂OH), 8.12 (d, *J* = 5.7 Hz, 1H, 8'''-H), 8.12 (s, 1H, 6'''-H), 8.05 (d, *J* = 4.9 Hz, 1H, 3'''-H), 7.85 (s, 1H, 1'''-H), 7.78 – 7.69 (m, 2H, 2'-H, 6'-H), 7.41 – 7.32 (m, 2H, 3'-H, 5'-H), 7.20 (d, *J* = 4.9 Hz, 1H, 4'''-H), 6.66 (d, *J* = 5.6 Hz, 1H, 9'''-H), 5.25 (s, 2H, 1''-H)

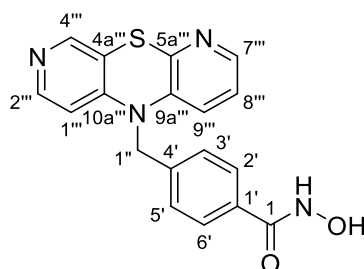
¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆): δ (ppm) = 163.9 (C-1), 149.7 (C-9a'''), 149.6 (C-8'''), 146.3 (C-6'''), 144.4 (C-3'''), 138.5 (C-4'), 137.7 (C-10a'''), 136.1 (C-1'''), 132.0 (C-4a'''), 131.9 (C-1'), 127.4 (C-2', C-6'), 126.4 (C-3', C-5'), 121.6 (C-4'''), 116.0 (C-5a'''), 110.1 (C-9'''), 49.7 (C-1'')

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) = 3162, 3059, 2996, 2853, 1655, 1624, 1586, 1550, 1473, 1422, 1372, 1284, 1236, 1189, 1043, 1012, 896, 831, 818, 613, 558

MS (ESI): *m/z* = 364, 351 [M+H]⁺, 264

HRMS (ESI): *m/z* = 351.0911 [M+H]⁺ berechnet für C₁₈H₁₅N₄O₂S⁺ 351.0910

HPLC (Methode If, MeOH): > 99 % (λ = 210 nm), > 99 % (λ = 254 nm)

4-[(5*H*-Dipyrido[2,3-*b*:4',3'-*e*][1,4]thiazin-5-yl)methyl]-*N*-hydroxybenzamid (255)C₁₈H₁₄N₄O₂SM_r = 350.40

Die Durchführung erfolgte nach Arbeitsvorschrift H. Es wurden 206 mg (0.614 mmol) 4-[(5*H*-Dipyrido[2,3-*b*:4',3'-*e*][1,4]thiazin-5-yl)methyl]benzoesäure (**230**) in 1.9 mL trockenem DMF, 210 µL (1.23 mmol) *N,N*-Diisopropylethylamin, 393 mg (0.918 mmol) COMU in 0.6 mL trockenem DMF und 128 mg (1.84 mmol) Hydroxylaminhydrochlorid in 0.6 mL trockenem DMF eingesetzt. Nach einer Reaktionszeit von 70 h wurde Aufarbeitung B befolgt und das Rohprodukt mittels Säulenchromatographie (Dichlormethan/Methanol/0.1 % Essigsäure = 92:8:0.1, *R_f* = 0.3) aufgereinigt. Nach weiterem Waschen mit Wasser wurde der Feststoff bei 50 °C getrocknet.

Ausbeute: 46 % 98 mg hellgelber Feststoff

Schmelzpunkt/-bereich: 213 – 215 °C

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ (ppm) = 11.20 (s, 1H, NHOH), 9.04 (bs, 1H, NHOH), 8.18 (bs, 1H, 4'''-H), 8.13 (bs, 1H, 2'''-H), 7.99 (dd, *J* = 4.7, 1.2 Hz, 1H, 7'''-H), 7.77 – 7.70 (m, 2H, 2'-H, 6'-H), 7.37 – 7.30 (m, 2H, 3'-H, 5'-H), 7.07 (dd, *J* = 8.3, 4.7 Hz, 1H, 8'''-H), 6.97 (dd, *J* = 8.3, 1.2 Hz, 1H, 9'''-H), 6.64 (d, *J* = 5.7 Hz, 1H, 1'''-H), 5.18 (s, 2H, 1''-H)

¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆): δ (ppm) = 163.8 (C-1), 149.6 (C-10a'''), 147.6 (C-2'''), 144.3 (C-4'''), 143.8 (C-7'''), 143.7 (C-5a'''), 138.1 (C-4'), 137.4 (C-9a'''), 131.9 (C-1'), 127.4 (C-2', C-6'), 126.3 (C-3', C-5'), 122.7 (C-8'''), 122.4 (C-9'''), 117.6 (C-4a'''), 109.8 (C-1'''), 50.1 (C-1'')

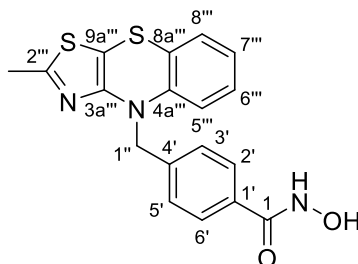
IR (KBr): $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) = 3145, 3041, 2928, 2799, 1656, 1592, 1553, 1496, 1448, 1420, 1379, 1274, 1254, 1212, 1185, 1130, 1055, 1013, 883, 808, 779, 730, 684, 611

MS (ESI): *m/z* = 349 [M-H]⁻

HRMS (ESI): *m/z* = 349.0763 [M-H]⁻ berechnet für C₁₈H₁₃N₄O₂S⁻ 349.0765

HPLC (Methode Ig, MeOH): > 99 % (λ = 210 nm), > 99 % (λ = 254 nm)

***N*-Hydroxy-4-[(2-methyl-4*H*-benzo[*b*]thiazolo[4,5-*e*][1,4]thiazin-4-yl)methyl]benzamid
(256)**


 $\text{C}_{18}\text{H}_{15}\text{N}_3\text{O}_2\text{S}_2$
 $M_r = 369.46$

Die Durchführung erfolgte nach Arbeitsvorschrift H. Es wurden 137 mg (0.387 mmol) 4-[(2-Methyl-4*H*-benzo[*b*]thiazolo[4,5-*e*][1,4]thiazin-4-yl)methyl]benzoesäure (**231**) in 1.0 mL trockenem DMF, 130 μL (0.764 mmol) *N,N*-Diisopropylethylamin, 245 mg (0.572 mmol) COMU in 0.5 mL trockenem DMF und 81.0 mg (1.17 mmol) Hydroxylaminhydrochlorid in 0.5 mL trockenem DMF eingesetzt. Nach einer Reaktionszeit von 25 h wurde Aufarbeitung B befolgt und das Rohprodukt mittels Säulenchromatographie (Dichlormethan/Methanol/0.1 % Essigsäure = 99:1:0.1, $R_f = 0.1$) aufgereinigt. Nach weiterem Waschen mit Wasser wurde der Feststoff bei 50 °C getrocknet.

Ausbeute: 43 % 62 mg hellbrauner Feststoff

Schmelzpunkt/-bereich: 167 – 169 °C

^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ (ppm) = 11.14 (s, 1H, NHOH), 8.99 (s, 1H, NH), 7.73 – 7.66 (m, 2H, 2'-H, 6'-H), 7.43 – 7.37 (m, 2H, 3'-H, 5'-H), 7.02 – 6.94 (m, 2H, 6'''-H, 8'''-H), 6.82 (td, $J = 7.5, 1.1$ Hz, 1H, 7'''-H), 6.61 (dd, $J = 8.1, 1.1$ Hz, 1H, 5'''-H), 5.21 (s, 2H, 1''-H), 2.52 (s, 3H, CH_3)

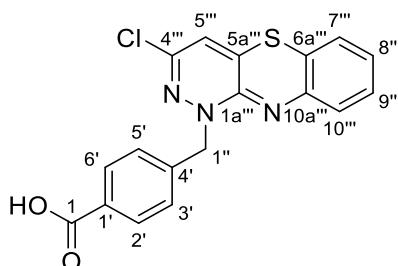
^{13}C NMR (101 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ (ppm) = 164.1 (C-1), 163.3 (C-2'''), 151.8 (C-3a'''), 143.0 (C-4a'''), 141.1 (C-4'), 131.5 (C-1'), 128.0 (C-6'''/8'''), 127.1 (C-2', C-6'), 127.1 (C-8'''/6'''), 126.4 (C-3', C-5'), 122.9 (C-7'''), 118.4 (C-8a'''), 114.9 (C-5'''), 94.7 (C-9a'''), 49.2 (C-1''), 19.3 (CH_3)

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ (cm^{-1}) = 3244, 3058, 3017, 2912, 2854, 1616, 1568, 1539, 1497, 1469, 1385, 1284, 1246, 1180, 1015, 946, 895, 845, 746, 670

MS (ESI): $m/z = 368$ [$\text{M}-\text{H}$] $^-$

HRMS (ESI): $m/z = 368.0534$ [$\text{M}-\text{H}$] $^-$ berechnet für $\text{C}_{18}\text{H}_{14}\text{N}_3\text{O}_2\text{S}_2^-$ 368.0533

HPLC (Methode Ib, MeOH): 96 % ($\lambda = 210$ nm), 96 % ($\lambda = 254$ nm)

4-[(3-Chlor-1*H*-benzo[*b*]pyridazino[3,4-*e*][1,4]thiazin-1-yl)methyl]benzoesäure (259) $C_{18}H_{12}ClN_3O_2S$ $M_r = 369.82$

Die Durchführung erfolgte nach Arbeitsvorschrift D. Es wurden 118 mg (0.307 mmol) 4-[(3-Chloro-1*H*-benzo[*b*]pyridazino[3,4-*e*][1,4]thiazin-1-yl)methyl]benzoesäuremethylester (**257**), 380 μ L (0.760 mmol) 2 M Natriumhydroxid-Lösung in 2.0 mL eines 1,4-Dioxan/Wasser-Gemisches (1:1) verwendet. Nach einer Reaktionszeit von 24 h bei 60 °C wurde der erhaltene Feststoff bei 50 °C getrocknet.

Ausbeute: 75 % 86 mg orangeroter Feststoff

Schmelzpunkt/-bereich: 276 °C

1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6): δ (ppm) = 12.95 (bs, 1H, COOH), 7.97 – 7.90 (m, 2H, 2'-H, 6'-H), 7.52 – 7.45 (m, 2H, 3'-H, 5'-H), 6.91 (td, $J = 7.6, 1.6$ Hz, 1H, 9'''-H), 6.81 (dd, $J = 7.8, 1.6$ Hz, 1H, 7'''-H), 6.74 (td, $J = 7.5, 1.3$ Hz, 1H, 8'''-H), 6.64 (dd, $J = 7.9, 1.3$ Hz, 1H, 10'''-H), 6.59 (s, 1H, 5'''-H), 4.99 (s, 2H, 1''-H)

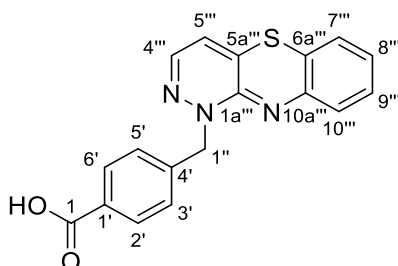
^{13}C NMR (126 MHz, DMSO- d_6): δ (ppm) = 167.5 (C-1), 147.9 (C-1a'''), 142.6 (C-10a'''), 140.9 (C-4'), 138.2 (C-4'''/5a'''), 137.6 (C-5a'''/4'''), 130.8 (C-1'), 129.5 (C-2', C-6'), 128.4 (C-9'''), 128.0 (C-3', C-5'), 126.3 (C-10'''), 124.8 (C-7'''), 124.4 (C-8'''), 116.7 (C-5'''), 116.6 (C-6a'''), 54.6 (C-1'')

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ (cm^{-1}) = 3065, 2925, 2852, 2668, 2554, 1690, 1611, 1528, 1495, 1464, 1423, 1288, 1184, 1093, 940, 880, 753, 715

MS (ESI): $m/z = 370$ [^{37}Cl]M-H] $^-$, 368 [^{35}Cl]M-H] $^-$

HRMS (ESI): $m/z = 368.0268$ [M-H] $^-$ berechnet für $C_{18}H_{11}^{35}ClN_3O_2S^-$ 368.0266

HPLC (Methode V, DMSO): > 99 % ($\lambda = 210$ nm), > 99 % ($\lambda = 254$ nm)

4-[(1*H*-Benzo[*b*]pyridazino[3,4-*e*][1,4]thiazin-1-yl)methyl]benzoesäure (260)C₁₈H₁₃N₃O₂SM_r = 335.38

Die Durchführung erfolgte nach Arbeitsvorschrift D. Es wurden 137 mg (0.392 mmol) 4-[(1*H*-Benzo[*b*]pyridazino[3,4-*e*][1,4]thiazin-1-yl)methyl]benzoesäuremethylester (**258**), 490 µL (0.980 mmol) 2 M Natriumhydroxid-Lösung in 3.0 mL eines 1,4-Dioxan/Wasser-Gemisches (1:1) verwendet. Nach einer Reaktionszeit von 16 h bei 50 °C wurde der erhaltene Feststoff bei 50 °C getrocknet.

Ausbeute: 96 % 126 mg orangeroter Feststoff

Schmelzpunkt/-bereich: 250 °C

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ (ppm) = 12.91 (s, 1H, COOH), 7.97 – 7.90 (m, 2H, 2'-H, 6'-H), 7.52 – 7.46 (m, 2H, 3'-H, 5'-H), 7.12 (d, *J* = 4.4 Hz, 1H, 4'''-H), 6.85 (td, *J* = 7.4, 2.0 Hz, 1H, 9'''-H), 6.73 – 6.64 (m, 2H, 7'''-H, 8'''-H), 6.57 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H, 10'''-H), 6.34 (d, *J* = 4.4 Hz, 1H, 5'''-H), 5.03 (s, 2H, 1''-H)

¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆): δ (ppm) = 167.1 (C-1), 149.5 (C-1a'''), 143.4 (C-10a'''), 141.8 (C-4'), 138.6 (C-4'''), 134.1 (C-5a'''), 129.8 (C-1'), 129.4 (C-2', C-6'), 128.1 (C-3', C-5', C-9'''), 125.8 (C-10'''), 124.7 (C-7'''), 123.8 (C-8'''), 117.2 (C-6a'''), 116.8 (C-5'''), 54.6 (C-1'')

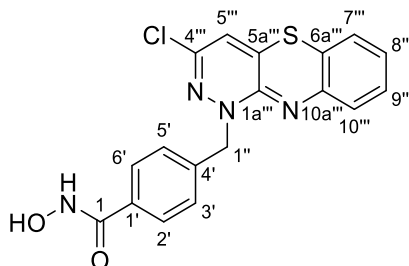
IR (KBr): $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) = 3067 2957, 2884, 2672, 2552, 1703, 1611, 1529, 1463, 1426, 1315, 1293, 1252, 1178, 1101, 876, 826, 751, 708

MS (ESI): *m/z* = 336 [M+H]⁺

HRMS (ESI): *m/z* = 336.0803 [M+H]⁺ berechnet für C₁₈H₁₄N₃O₂S⁺ 336.0801

HPLC (Methode VIII, MeOH): > 99 % (λ = 210 nm), > 99 % (λ = 254 nm)

**4-[(3-Chlor-1*H*-benzo[*b*]pyridazino[3,4-*e*][1,4]thiazin-1-yl)methyl]-*N*-hydroxybenzamid
(261)**



$C_{18}H_{13}ClN_4O_2S$

$M_r = 384.84$

Die Durchführung erfolgte nach Arbeitsvorschrift H. Es wurden 68 mg (0.18 mmol) 4-[(3-Chlor-1*H*-benzo[*b*]pyridazino[3,4-*e*][1,4]thiazin-1-yl)methyl]benzoesäure (**259**) in 1.7 mL trockenem DMF, 60 μ L (0.35 mmol) *N,N*-Diisopropylethylamin, 0.117 g (0.273 mmol) COMU in 0.2 mL trockenem DMF und 37 mg (0.53 mmol) Hydroxylaminhydrochlorid in 0.2 mL trockenem DMF eingesetzt. Nach einer Reaktionszeit von 37 h wurde Aufarbeitung B befolgt und das Rohprodukt mittels Säulenchromatographie (Dichlormethan/Methanol/0.1 % Essigsäure = 94:6:0.1, $R_f = 0.5$) aufgereinigt. Nach weiterem Waschen mit Wasser wurde der Feststoff bei 50 °C getrocknet.

Ausbeute: 42 % 29 mg orangeroter
Feststoff

Schmelzpunkt/-bereich: 176 – 177 °C

1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6): δ (ppm) = 11.19 (s, 1H, $NHOH$), 9.02 (s, 1H, $NHOH$), 7.80 – 7.67 (m, 2H, 2'-H, 6'-H), 7.52 – 7.40 (m, 2H, 3'-H, 5'-H), 6.91 (t, $J = 7.5$ Hz, 1H, 9'''-H), 6.81 (d, $J = 7.5$ Hz, 1H, 7'''-H), 6.75 (t, $J = 7.4$ Hz, 1H, 8'''-H), 6.65 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H, 10'''-H), 6.58 (s, 1H, 5'''-H), 4.97 (s, 2H, 1''-H)

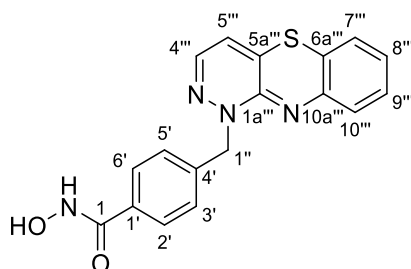
^{13}C NMR (126 MHz, DMSO- d_6): δ (ppm) = 164.0 (C-1), 147.9 (C-1a'''), 142.6 (C-10a'''), 139.4 (C-4'), 138.1 (C-4'''/5a'''), 137.5 (C-5a'''/4'''), 132.0 (C-1'), 128.4 (C-9'''), 128.0 (C-3', C-5'), 127.1 (C-2', C-6'), 126.3 (C-10'''), 124.8 (C-7'''), 124.3 (C-8'''), 116.7 (C-5'''), 116.6 (C-6a'''), 54.5 (C-1'')

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ (cm^{-1}) = 3239, 3065, 2935, 2848, 1613, 1526, 1494, 1463, 1373, 1341, 1288, 1260, 1153, 1091, 1015, 939, 880, 832, 752, 715

MS (ESI): m/z = 385 [$(^{37}Cl)M-H$] $^-$, 383 [$(^{35}Cl)M-H$] $^-$

HRMS (ESI): m/z = 383.0377 [$M-H$] $^-$ berechnet für $C_{18}H_{12}^{35}ClN_4O_2S$ 383.0375

HPLC (Methode Ib, MeOH): > 99 % ($\lambda = 210$ nm), > 99 % ($\lambda = 254$ nm)

4-[(1*H*-Benzo[*b*]pyridazino[3,4-*e*][1,4]thiazin-1-yl)methyl]-*N*-hydroxybenzamid (262) $C_{18}H_{14}N_4O_2S$ $M_r = 350.40$

Die Durchführung erfolgte nach Arbeitsvorschrift H. Es wurden 85 mg (0.25 mmol) 4-[(1*H*-Benzo[*b*]pyridazino[3,4-*e*][1,4]thiazin-1-yl)methyl]benzoesäure (**260**) in 1.0 mL trockenem DMF, 80 μ L (0.47 mmol) *N,N*-Diisopropylethylamin, 160 mg (0.374 mmol) COMU in 0.5 mL trockenem DMF und 53 mg (0.76 mmol) Hydroxylaminhydrochlorid in 0.5 mL trockenem DMF eingesetzt. Nach einer Reaktionszeit von 44 h wurde Aufarbeitung B befolgt und das Rohprodukt mittels Säulenchromatographie (Dichlormethan/Methanol/0.1 % Essigsäure = 96:4:0.1, $R_f = 0.3$) aufgereinigt. Nach weiterem Waschen mit Wasser wurde der Feststoff bei 50 °C getrocknet.

Ausbeute: 20 % 18 mg orangeroter Feststoff

Schmelzpunkt/-bereich: 132 – 133 °C

^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6): δ (ppm) = 11.17 (s, 1H, NHOH), 9.02 (s, 1H, NH), 7.77 – 7.69 (m, 2H, 2'-H, 6'-H), 7.47 – 7.42 (m, 2H, 3'-H, 5'-H), 7.12 (d, $J = 4.3$ Hz, 1H, 4'''-H), 6.86 (ddd, $J = 7.8, 6.9, 1.9$ Hz, 1H, 9'''-H), 6.71 (dd, $J = 7.7, 2.0$ Hz, 1H, 7'''-H), 6.68 (td, $J = 7.7, 1.2$ Hz, 1H, 8'''-H), 6.58 (dd, $J = 7.9, 1.2$ Hz, 1H, 10'''-H), 6.35 (d, $J = 4.3$ Hz, 1H, 5'''-H), 5.01 (s, 2H, 1''-H)

^{13}C NMR (126 MHz, DMSO- d_6): δ (ppm) = 164.1 (C-1), 149.6 (C-1a'''), 143.4 (C-10a'''), 139.9 (C-4'), 138.6 (C-4'''), 134.0 (C-5a'''), 131.9 (C-1'), 128.1 (C-9'''), 128.1 (C-3', C-5'), 127.0 (C-2', C-6'), 125.8 (C-10'''), 124.7 (C-7'''), 123.8 (C-8'''), 117.2 (C-6a'''), 116.8 (C-5'''), 54.6 (C-1'')

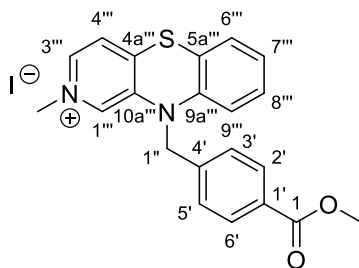
IR (KBr): $\tilde{\nu}$ (cm^{-1}) = 3356, 3142, 3069, 2892, 1682, 1527, 1501, 1463, 1334, 1251, 1154, 1111, 1019, 954, 879, 818, 742, 714, 653

MS (ESI): $m/z = 351$ [$\text{M}+\text{H}$] $^+$

HRMS (ESI): $m/z = 351.0913$ [$\text{M}+\text{H}$] $^+$ berechnet für $\text{C}_{18}\text{H}_{15}\text{N}_4\text{O}_2\text{S}^+$ 351.0910

HPLC (Methode II, MeOH): 96 % ($\lambda = 210$ nm), 96 % ($\lambda = 254$ nm)

10-[4-(Methoxycarbonyl)benzyl]-2-methyl-10*H*-benzo[*b*]pyrido[3,4-*e*][1,4]thiazin-2-ium iodid (263)



$C_{21}H_{19}IN_2O_2S$

$M_r = 490.36$

602 mg (1.73 mmol) 4-[(10*H*-Benzo[*b*]pyrido[3,4-*e*][1,4]thiazin-10-yl)methyl]benzoesäuremethylester (**206**) wurden in 30 mL eines Lösungsmittelgemisches aus Aceton und Ethanol (6.5:1) gelöst und mit 540 μ L (8.67 mmol) Methyljodid versetzt. Die Lösung wurde 14 h zum Rückfluss erhitzt und anschließend das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Weitere Aufreinigungsschritte waren nicht erforderlich.

Ausbeute: 99 % 838 mg gelbe Kristalle

Schmelzpunkt/-bereich: 171 °C

1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6): δ (ppm) = 8.35 (d, J = 6.3 Hz, 1H, 3'''-H), 8.11 (s, 1H, 1'''-H), 7.98 – 7.92 (m, 2H, 2'-H, 6'-H), 7.81 (d, J = 6.3 Hz, 1H, 4'''-H), 7.57 – 7.51 (m, 2H, 3'-H, 5'-H), 7.19 (dd, J = 7.7, 1.4 Hz, 1H, 6'''-H), 7.11 (td, J = 7.8, 1.5 Hz, 1H, 8'''-H), 7.00 (td, J = 7.5, 1.0 Hz, 1H, 7'''-H), 6.77 (dd, J = 8.3, 1.0 Hz, 1H, 9'''-H), 5.25 (s, 2H, 1''-H), 4.06 (s, 3H, N-CH₃), 3.83 (s, 3H, COOCH₃)

^{13}C NMR (126 MHz, DMSO- d_6): δ (ppm) = 165.9 (C-1), 145.1 (C-4a'''), 142.9 (C-10a'''), 140.6 (C-4'), 140.4 (C-9a'''), 138.6 (C-3'''), 129.6 (C-2', C-6'), 129.3 (C-1'''), 129.1 (C-8'''), 128.8 (C-1'), 127.5 (C-6'''), 127.1 (C-3', C-5'), 124.8 (C-7'''), 123.1 (C-4'''), 118.3 (C-5a'''), 117.3 (C-9'''), 52.2 (COOCH₃), 50.7 (C-1''), 47.3 (N-CH₃)

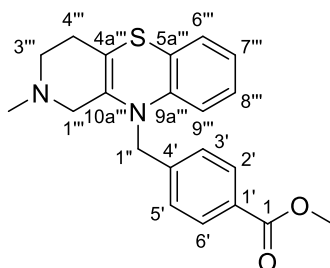
IR (KBr): $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) = 3135, 3026, 2941, 1708, 1612, 1505, 1473, 1442, 1380, 1289, 1229, 1188, 1133, 1111, 1083, 1016, 852, 766, 750

MS (ESI): m/z = 363 [M+H]⁺, 214

HRMS (ESI): m/z = 363.1163 [M+H]⁺ berechnet für C₂₁H₁₉N₂O₂S⁺ 363.1162

HPLC (Methode IV, MeCN): > 99 % (λ = 210 nm), > 99 % (λ = 254 nm)

4-[(2-Methyl-1,2,3,4-tetrahydro-10*H*-benzo[*b*]pyrido[3,4-*e*][1,4]thiazin-10-yl)methyl]benzoesäuremethylester (264)



$C_{21}H_{22}N_2O_2S$

$M_r = 366.48$

In 49 mL Ethanol wurden 816 mg (1.66 mmol) 10-[4-(Methoxycarbonyl)benzyl]-2-methyl-10*H*-benzo[*b*]pyrido[3,4-*e*][1,4]-thiazin-2-ium iodid (**263**) suspendiert und auf -15 °C gekühlt. Zum Reaktionsgemisch wurde eine Suspension von 196 mg (5.18 mmol) Natriumborhydrid in 8.0 mL Ethanol über einen Zeitraum von 1 h zugetropft. Anschließend wurde 2 h bei -15 °C und 22 h bei Raumtemperatur gerührt. Dann wurde das Reaktionsgemisch auf Eiswasser gegossen und dreimal mit Dichlormethan (je 50 mL) ausgeschüttelt. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit gesättigter wässriger Kochsalzlösung gewaschen und über Magnesiumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und das Rohprodukt mittels Säulenchromatographie (Dichlormethan/Methanol = 98:2, $R_f = 0.2$) aufgereinigt.

Ausbeute: 74 % 450 mg gelbes Öl

1H NMR (400 MHz, CD_2Cl_2): δ (ppm) = 8.01 – 7.95 (m, 2H, 2'H, 6'-H), 7.54 – 7.49 (m, 2H, 3'-H, 5'-H), 7.02 – 6.95 (m, 2H, 6'''-H, 8'''-H), 6.83 (td, $J = 7.5, 1.1$ Hz, 1H, 7'''-H), 6.65 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H, 9'''-H), 5.33 (s, 2H, 1''-H), 3.87 (s, 3H, $COOCH_3$), 2.91 (t, $J = 2.2$ Hz, 2H, 1'''-H), 2.47 (t, $J = 5.8$ Hz, 2H, 3'''-H), 2.26 (tt, $J = 5.7, 2.3$ Hz, 2H, 4'''-H), 2.23 (s, 3H, N- CH_3)

^{13}C NMR (101 MHz, CD_2Cl_2): δ (ppm) = 167.2 (C-1), 146.2 (C-9a'''), 144.5 (C-4'), 135.2 (C-10a'''), 130.3 (C-2', C-6'), 129.8 (C-1'), 127.3 (C-8'''/C-6'''), 127.2 (C-3', C-5'), 127.2 (C-6'''/C-8'''), 125.9 (C-5a'''), 123.0 (C-7'''), 115.5 (C-9'''), 107.4 (C-4a'''), 56.0 (C-1'''), 52.5 (C-3'''), 50.9 ($COOCH_3$), 45.5 (C-1''), 30.2 (N- CH_3), 29.6 (C-4''')

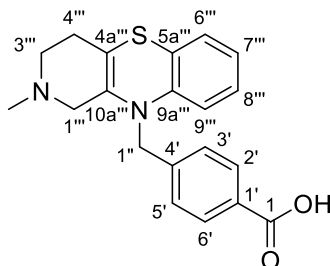
IR (Film): $\tilde{\nu}$ (cm^{-1}) = 3061, 2949, 2845, 2790, 1719, 1668, 1612, 1577, 1474, 1435, 1369, 1281, 1191, 1110, 1019, 971, 890, 845, 753

MS (ESI): $m/z = 383, 367 [M+H]^+, 363$

HRMS (ESI): $m/z = 367.1474 [M+H]^+$ berechnet für $C_{21}H_{23}N_2O_2S^+$ 367.1475

HPLC (Methode IIIa, MeCN): 97 % ($\lambda = 210$ nm), 97 % ($\lambda = 254$ nm)

4-[(2-Methyl-1,2,3,4-tetrahydro-10*H*-benzo[*b*]pyrido[3,4-*e*][1,4]thiazin-10-yl)methyl]-benzoesäure (265)



$C_{20}H_{20}N_2O_2S$

$M_r = 352.45$

Die Durchführung erfolgte nach Arbeitsvorschrift D. Es wurden 299 mg (0.816 mmol) 4-[(2-Methyl-1,2,3,4-tetrahydro-10*H*-benzo[*b*]pyrido[3,4-*e*][1,4]thiazin-10-yl)methyl]-benzoesäuremethylester (**264**), 500 μ L (1.00 mmol) 2 M Natriumhydroxid-Lösung in 6.0 mL eines 1,4-Dioxan/Wasser-Gemisches (1:1) eingesetzt. Nach einer Reaktionszeit von 13 h bei Raumtemperatur und 6 h bei 60 °C wurde der erhaltene Feststoff bei 60 °C getrocknet.

Ausbeute: 73 % 210 mg hellgelber Feststoff

Schmelzpunkt/-bereich: 150 – 151 °C

1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6): δ (ppm) = 7.92 – 7.86 (m, 2H, 2'-H, 6'-H), 7.53 – 7.46 (m, 2H, 3'-H, 5'-H), 7.03 – 6.94 (m, 2H, 6'''-H, 8'''-H), 6.82 (t, $J = 7.4$ Hz, 1H, 7'''-H), 6.74 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H, 9'''-H), 4.88 (s, 2H, 1''-H), 2.96 (s, 2H, 1'''-H), 2.44 (t, $J = 5.7$ Hz, 2H, 3'''-H), 2.18 (s, 3H, CH₃), 2.16 (t, $J = 5.7$ Hz, 2H, 4'''-H)

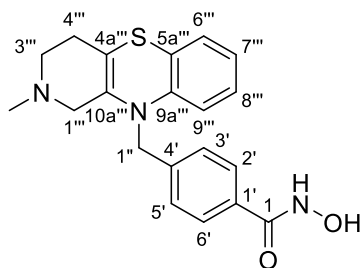
^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6): δ (ppm) = 167.2 (C-1), 145.1 (C-9a'''), 143.8 (C-4'), 135.0 (C-10a'''), 129.7 (C-1'), 129.5 (C-2', C-6'), 126.9 (C-8'''/C-6'''), 126.6 (C-3', C-5'), 126.4 (C-6'''/C-8'''), 124.0 (C-5a'''), 122.4 (C-7'''), 115.1 (C-9'''), 104.7 (C-4a'''), 54.8 (C-1'''), 51.3 (C-3'''), 48.9 (C-1''), 44.7 (CH₃), 29.1 (C-4''')

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) = 3062, 2918, 2847, 2790, 1664, 1609, 1578, 1474, 1453, 1366, 1292, 1243, 1170, 1125, 1040, 1017, 994, 862, 771, 745, 703

MS (ESI): $m/z = 397$ [M+Formiat]⁻, 351 [M-H]⁻

HRMS (ESI): $m/z = 351.1173$ [M-H]⁻ berechnet für C₂₀H₁₉N₂O₂S⁻ 351.1173

HPLC (Methode IIIC, MeOH): > 99 % ($\lambda = 210$ nm), > 99 % ($\lambda = 254$ nm)

N-Hydroxy-4-[(2-methyl-1,2,3,4-tetrahydro-10H-benzo[b]pyrido[3,4-e][1,4]thiazin-10-yl)methyl]benzamid (266)C₂₀H₂₁N₃O₂SM_r = 367.47

Die Durchführung erfolgte nach Arbeitsvorschrift H. Es wurden 310 mg (0.880 mmol) 4-[(2-Methyl-1,2,3,4-tetrahydro-10H-benzo[b]pyrido[3,4-e][1,4]thiazin-10-yl)methyl]benzoesäure (**265**) in 3.0 mL trockenem DMF, 300 µL (1.76 mmol) *N,N*-Diisopropylethylamin, 578 mg (1.35 mmol) COMU in 1.0 mL trockenem DMF und 185 mg (2.66 mmol) Hydroxylaminhydrochlorid in 1.0 mL trockenem DMF eingesetzt. Nach einer Reaktionszeit von 13 h wurde Aufarbeitung B befolgt und das Rohprodukt mittels Säulenchromatographie (Dichlormethan/Methanol = 96:4, *R_f* = 0.2) aufgereinigt. Nach weiterem Waschen mit Wasser wurde der Feststoff im Hochvakuum getrocknet.

Ausbeute: 37 % 119 mg hellgelber Feststoff

Schmelzpunkt/-bereich: 114 – 117 °C

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ (ppm) = 11.15 (bs, 1H, NHOH), 9.02 (bs, 1H, NHOH), 7.74 – 7.66 (m, 2H, 2'-H, 6'-H), 7.49 – 7.42 (m, 2H, 3'-H, 5'-H), 7.02 – 6.94 (m, 2H, 6'''-H, 8'''-H), 6.82 (t, *J* = 7.4 Hz, 1H, 7'''-H), 6.75 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H, 9'''-H), 4.85 (s, 2H, 1''-H), 2.95 (s, 2H, 1'''-H), 2.42 (t, *J* = 5.7 Hz, 2H, 3'''-H), 2.18 (s, 3H, CH₃), 2.16 (t, *J* = 5.6 Hz, 2H, 4''')

¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆): δ (ppm) = 164.0 (C-1), 145.1 (C-9a'''), 142.0 (C-4'), 135.2 (C-10a'''), 131.5 (C-1'), 127.1 (C-2', C-6'), 126.9 (C-8'''/C-6'''), 126.4 (C-3', C-5'), 126.4 (C-6'''/C-8'''), 124.0 (C-5a'''), 122.4 (C-7'''), 115.1 (C-9'''), 104.6 (C-4a'''), 54.9 (C-1'''), 51.4 (C-3'''), 48.7 (C-1''), 44.8 (CH₃), 29.2 (C-4''')

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) = 3201, 3057, 2941, 2844, 2793, 1661, 1570, 1474, 1443, 1366, 1288, 1250, 1218, 1137, 1014, 896, 751

MS (ESI): *m/z* = 368 [M-H]⁻

HRMS (ESI): *m/z* = 368.1431 [M+H]⁺ berechnet für C₂₀H₂₂N₃O₂S⁺ 368.1427

HPLC (Methode Ib, MeOH): > 99 % (λ = 210 nm), > 99 % (λ = 254 nm)

6.4 ARBEITSMETHODEN DER BIOLOGISCHEN TESTUNG

6.4.1 AGAR-DIFFUSIONSTEST

Von den zu testenden Verbindungen wurden 1 %ige (m/V) Stammlösungen in Dimethylsulfoxid hergestellt und davon jeweils 3.0 µL auf Testplättchen (Durchmesser 6 mm) der Fa. Macherey-Nagel aufgetragen, was einer Menge von 30 µg Substanz pro Testplättchen entspricht. Das antimykotisch wirksame Clotrimazol und das antibiotisch aktive Tetracyclinhydrochlorid wurden als Referenzsubstanzen verwendet. Von diesen Referenzen wurden 1 %ige (m/V) Stammlösungen in Methanol hergestellt. Jeweils 3.0 µL dieser Referenzlösungen wurden auf Testplättchen aufgetragen, was ebenfalls einer Menge von 30 µg Substanz pro Testplättchen entspricht. Zur Bestimmung des Blindwerts wurde 3.0 µL reines Dimethylsulfoxid auf das Testplättchen gegeben. Die Testplättchen wurden vor dem Aufbringen auf die Testplatten 24 h zum Trocknen ausgelegt.

Die Pilze und Bakterien wurden von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DMSZ) in Braunschweig bezogen und entsprechend der mitgelieferten Vorschriften in Flüssigkultur angezüchtet. Als Nährmedium wurde für *Candida glabrata*, *Hyphopichia burtonii*, *Yarrowia lipolytica*, *Escherichia coli* und *Pseudomonas marginalis* ein All-Culture Agar (AC-Agar) der Fa. Sigma verwendet. Für die Herstellung des Nährmediums wurden 35 g AC-Agar und 20 g Agar in 1.0 L Wasser suspendiert und anschließend autoklaviert. Für *Streptococcus entericus* wurde ein Agar aus 10.0 g Caseinpepton, 5.0 g Hefeextrakt, 5.0 g Glucose und 5.0 g Natriumchlorid in 1.0 L Wasser gelöst, welcher ebenfalls autoklaviert wurde. Unter sterilen Arbeitsbedingungen wurden je 15 mL des noch warmen, flüssigen Agars in Petrischalen gefüllt und dann mindestens 1 h bei 8 °C gekühlt, bis der Agar erstarrt war. Für den Schimmelpilz *Aspergillus niger* diente ein Potato Agar als Nährmedium. Hierzu wurden zur Herstellung 32 g Potato Dextrose Agar und 20 g Agar in 1.0 L Wasser suspendiert und autoklaviert. Unter sterilen Arbeitsbedingungen wurden ebenfalls je 15 mL des noch warmen, flüssigen Agars in Petrischalen gefüllt und dann mindestens 1 h bei 8 °C gekühlt.

Eine Vorkultur des jeweiligen Mikroorganismus wurde 1:10 verdünnt und durch Vergleiche mit dem 0.5-McFarland-Standard auf eine Keimdichte von 10^8 Bakterien/mL, 5×10^6 Pilzzellen/mL bzw. 5×10^7 Hefeorganismen/mL eingestellt. Auf die erstarrten Agar-Böden wurde mithilfe eines Applikatorenstäbchens eine definierte Menge der eingestellten Mikroorganismensuspension ausgestrichen und sofort mit vier Substanzplättchen, sowie dem als Blindwert und dem als Referenz präparierten Plättchen belegt. Anschließend wurden die präparierten Agar-Platten 36 h bei 32.1 °C (für Bakterien) beziehungsweise bei 28.0 °C (für Pilze) inkubiert. Der Durchmesser der Hemmhöfe wurde manuell ausgemessen.

6.4.2 MTT-TEST

Der Test wurde an Zellen der humanen Leukämie Zelllinie HL-60 durchgeführt. Die Dichte der Zellsuspension wurde auf 9×10^5 Zellen/mL eingestellt. Hierzu wurde die aktuelle Zelldichte der Kultur mittels einer Hämozyten-Zählkammer (Fuchs-Rosenthal) bestimmt und die Zellsuspension in einer Petrischale auf die erforderliche Zelldichte mit Medium verdünnt. Anschließend wurden in einer 96-Wellplatte je 99 μ L Zellsuspension pro Well ausgesät und 24 h bei 37 °C im Brutschrank inkubiert.

Von den zu untersuchenden Testsubstanzen wurden jeweils 10 mM Stammlösungen in Dimethylsulfoxid hergestellt. Diese wurden sechsmal nacheinander im Verhältnis 1:1 verdünnt. Mit diesen Lösungen wurde dann die finale Konzentration im Well hergestellt. Zur Bestimmung des Nullwerts wurde 1 μ L Dimethylsulfoxid eingesetzt. Der Blindwert wurde durch Verwendung von reinem Nährmedium erhalten. Die Negativkontrolle enthielt ausschließlich Medium, HL-60 Zellen und 1 μ L Dimethylsulfoxid. Als Positivkontrolle wurde eine Triton® X-100-Lösung in einer Endkonzentration von 1 μ g/mL zugesetzt. Von jeder Testlösung bzw. von reinem Dimethylsulfoxid oder der Triton® X-100-Lösung wurden je 1 μ L in je ein Well, welches schon mit 99 μ L einer HL-60 Zellsuspension befüllt war, pipettiert und 24 h bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Danach wurde jedes Well mit 10 μ L MTT-Lösung (5 mg MTT in 1.0 mL Phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) pH 7.4) versetzt und weitere 2 h unter den oben angeführten Bedingungen inkubiert. Nach Zugabe von 190 μ L Dimethylsulfoxid wurde die Patte nach einer Stunde unter Lichtschutz und permanenten Rütteln photometrisch bei einer Wellenlänge von 570 nm (Referenzwellenlänge 630 nm) in einem ELISA-Reader (Dynex Technologies) vermessen. Die statistische Auswertung sowie die Berechnung der IC₅₀-Werte erfolgte mithilfe der Prism® 4 Software (GraphPad).

Im ersten Durchgang wurden bei einer Konzentration von jeweils 100 μ M potenziell zytotoxische Substanzen gesichtet. Zeichnete sich in diesem Screening für eine Verbindung ein IC₅₀-Wert kleiner oder gleich 50 μ M ab, wurden weitere Verdünnungen (50 μ M, 25 μ M, 12.5 μ M, 6.25 μ M und 3.125 μ M) angefertigt und vermessen, um den IC₅₀-Wert zu ermitteln. Jedes Experiment wurde in dreifacher Ausfertigung durchgeführt.

6.4.3 TESTUNG AUF LYSIN-DEACETYLASE INHIBITORISCHE AKTIVITÄT

6.4.3.1 TESTUNG AN DEN REKOMBINANTEN ENZYMEN KDAC1 UND KDAC6

Diese Experimente wurden in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Manfred Jung am Institut für Pharmazeutische Wissenschaften an der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg durchgeführt.

Die Testung wurde in 96-well Mikrotiterplatten (OptiPlate™-96 F, Perkin Elmer) mit der dazugehörigen Abdeckung (Clear Microplate lid™, Perkin Elmer) durchgeführt. Vor der Testung der Verbindungen wurde die Aktivität der rekombinant hergestellten Lysin-Deacetylasen (Fa. Biomol) überprüft. Dies gewährleistet die Verwendung der optimalen Enzymkonzentration im Testsystem, bei der annähernd ein linearer Substratumsatz erfolgt. Dazu wurden für den Enzymumsatz verschiedene Verdünnungen der Enzyme in KDAC-Assay-Puffer (50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 1 mM MgCl₂ und 1 mg/mL BSA) hergestellt und jeweils ZMAL in einer finalen Konzentration von 10.5 µM und insgesamt 5 % Dimethylsulfoxid zugesetzt. Als 100 % Umsatz wurde eine Konzentration von 10.5 µM AMC eingesetzt. Zur Bestimmung des Blindwerts wurde KDAC-Assay-Puffer unter anteilig gleichem Zusatz von ZMAL (10.5 µM) eingesetzt. Nach einer Inkubationszeit von 90 min bei 37 °C wurde jeweils 60 µL einer Stopp-Lösung bestehend aus 5 µL 33 µM Trichostatin A (TSA), 10 µL Trypsin (6 mg/mL) in Trypsin-Puffer (Tris-HCl 50 mM, pH 8.0, NaCl 100 mM) und 45 µL Trypsin-Puffer dazugegeben und anschließend weitere 20 min bei 37 °C inkubiert. Die Fluoreszenzintensität wurde bei λ_{EX} = 390 nm und λ_{EM} = 460 nm mit dem Plattenlesegerät POLARstar OPTIMA mit der Software FluoStar Optima (BMG Labtech) gemessen. Die Aktivität des Enzyms wurde aus dem Verhältnis der relativen Fluoreszenzeinheit (RFU) des Enzymumsatzes und der RFU des 100 % Umsatzes nach folgender Formel ermittelt.

$$\text{Enzymaktivität [\%]} = \frac{\text{RFU (Enzymumsatz)}}{\text{RFU (100 \% Umsatz)}} \cdot 100$$

Zur Testung der Verbindungen wurden aus einer Stammlösung der jeweiligen Verbindung mit Dimethylsulfoxid verschiedene Verdünnungen hergestellt und zu den Enzym-Lösungen zugesetzt. Die Reaktion wurde dann mit ZMAL (10.5 µM) gestartet. Zur Überprüfung eines möglichen Einflusses von Dimethylsulfoxid wurde eine DMSO-Kontrolle bestehend aus gleichen Anteilen Enzymlösung, Dimethylsulfoxid und ZMAL verwendet. Der Blindwert sowie der 100 % Umsatz wurde wie zuvor beschrieben mit untersucht. Die Mikrotiterplatte wurde 90 min bei 37 °C inkubiert und dann die Stopp-Lösung zugesetzt. Nach einer weiteren Inkubationszeit von 20 min bei 37 °C wurde die Fluoreszenzintensität bei λ_{EX} = 390 nm und λ_{EM} = 460 nm gemessen. Die Enzymhemmung wurde aus dem Verhältnis der relativen Fluoreszenzeinheit (RFU) der Verbindung und der RFU der DMSO-Kontrolle nach nachstehender Formel bestimmt.

$$\text{Enzymhemmung [\%]} = 100 - \frac{\text{RFU (Verbindung)}}{\text{RFU (DMSO - Kontrolle)}} \cdot 100$$

Die IC₅₀-Werte der getesteten Verbindungen wurden mithilfe der Software Prism (GraphPad) oder OriginPro (OriginLab) bestimmt. Es wurde ein nichtlinearer Fit durch Aufstellung einer sigmoidalen Dosis-Wirkungs-Kurve mit halblogarithmischer Auftragung durchgeführt. Die

Testungen erfolgten mit acht verschiedenen Konzentrationen der Verbindungen in Dreifachbestimmung.

6.4.3.2 TESTUNG AM REKOMBINANTEN ENZYMEN KDAC8

Diese Experimente wurden in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Manfred Jung am Institut für Pharmazeutische Wissenschaften an der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg durchgeführt.

Das rekombinante KDAC8 Enzym wurde in der Arbeitsgruppe von Dr. Christophe Romier am IGBMC der Universität Straßburg hergestellt. Die Testung wurde mittels eines kommerziell erhältlichen FLUOR DE LYS® HDAC fluorometric activity assay kit (BML-KI178, Fa. Enzo Life Sciences) gemäß den Angaben des Herstellers auf einer 96-well Mikrotiterplatte durchgeführt. Dazu wurden verschiedene Konzentrationen der Verbindungen jeweils zusammen mit Enzymlösung und FLUOR DE LYS® Substrate für 90 min bei 37 °C inkubiert. Nach Zusatz der FLUOR DE LYS® Entwicklerlösung wurde ein weiteres Mal für 45 min bei 30 °C inkubiert. Die Messung der Fluoreszenz erfolgte bei $\lambda_{\text{Ex}} = 390 \text{ nm}$ und $\lambda_{\text{Em}} = 460 \text{ nm}$.

Die Bestimmung der IC₅₀-Werte erfolgte wie bei der Testung an KDAC1 und KDAC6 (Kapitel 6.4.3.1) beschrieben.

6.4.4 ZELLULÄRE TESTUNG AUF LYSIN-DEACETYLASE INHIBITORISCHE AKTIVITÄT

Diese Experimente wurden in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Manfred Jung am Institut für Pharmazeutische Wissenschaften an der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg durchgeführt.

Dazu wurden HL-60 Zellen (ATCC CCL-240) in RPMI-1640 Medium mit 10 % (v/v) FBS Gold, 2 mM L-Glutamin, 100 U/mL Penicillin und 100 µg/mL Streptomycin kultiviert. In eine 12-Well Platte wurden je Well 2.5×10^5 Zellen ausgesät und unmittelbar verschiedene Verdünnungen der zu testenden Verbindungen dazu gegeben. Anschließend wurde bei 37 °C und 5 % CO₂ für 4 h inkubiert. Dann wurde der Inhalt der Wells in Eppendorf-Röhrchen überführt und 5 min bei 500 g bei Raumtemperatur zentrifugiert. Die Zellen wurden mit Phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) gewaschen und danach für die Zellyse mit 90 µL SDS-Puffer (62.5 mM Tris-HCl (pH 6.8 bei 25 °C), 2 % (m/v) SDS, 10 % (v/v) Glycerol, 50 mM Dithiothreitol, 0.01 % (v/v) Bromphenolblau) versetzt. Nach Behandlung mit Ultraschall für 5 min wurde 5 min auf 95 °C erhitzt. Danach wurde das Zellextrakt direkt für die SDS-PAGE verwendet oder bis zur Weiterverwendung bei -20 °C eingefroren.

Zur Auftrennung der Proteine mittels Gelelektrophorese wurden je 7 μL des Zellextrakts auf ein frisch hergestelltes 12.5 %iges Polyacrylamidgel (Zusammensetzung gemäß Tab. 17) aufgetragen.

Reagenz	Sammelgel	Trenngel
Bidest. Wasser	1.75 mL	2.0 mL
Trenngelpuffer	–	1.5 mL
Sammelgelpuffer	0.75 mL	–
Acrylamid (30 %)	0.5 mL	2.5 mL
Tetramethylethyldiamin	3 μL	6 μL
APS (10 %)	30 μL	60 μL

Tab. 17: Zusammensetzung des Polyacrylamidgels.

Es wurde für 15 min eine Spannung von 80 V und anschließend für ca. 75 min eine Spannung von 160 V angelegt. Die Proteine wurden unter Standard-Pufferbedingungen (Trenngelpuffer pH 8.7, Sammelgelpuffer pH 6.8, Laufpuffer pH 8.3) und Verwendung des Mini-PROTEAN® Tetra Cells und des PowerPac™Basics (Fa. Bio-Rad) aufgetrennt. Zur Kontrolle des Molekulargewichts wurde der ColorPlus™Prestained Protein Ladder (Fa. New England BioLabs Inc.) verwendet. Nach dem Waschen der Gele mit bidest. Wasser wurden die Proteine mithilfe des Trans-Blot® Turbo™ Transfer Systems (Fa. Bio-Rad) bei 1.3 A und 25 V für 7 min auf vorgefertigte 0.2 μm Mini-Format Nitrocellulose-Membranen (Fa. Bio-Rad) übertragen. Die Membranen wurden dreimal jeweils für 5 min mit Tris-gepufferter Salzlösung pH 7.6 mit Tween (TBS-T 0.1 %) gewaschen. Zum Blocken der Membranen wurden diese für 1 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4 °C mit 5 % Milchpulver in TBS-T 0.1 % versetzt und dann erneut dreimal jeweils für 5 min mit TBS-T 0.1 % gewaschen. Zur Immundetektion der Membranen wurden diese für 4 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4 °C mit dem primären Antikörper Anti-acetyl- α -Tubulin (T7451-200UL, 1:1000, Fa. Sigma-Aldrich), verdünnt in 3 % Milchpulver in TBS-T 0.1 %, inkubiert. Darauf folgte ein weiterer Waschvorgang der Membranen mit TBS-T 0.1 % (dreimal für jeweils 5 min), um nicht gebundene primären Antikörper zu entfernen. Der sekundäre Antikörper Anti-mouse-IgG-HRP (1:2000, Fa. Sigma-Aldrich), verdünnt in 3 % Milchpulver in TBS-T 0.1 % wurde 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert und im Anschluss daran die Membranen dreimal jeweils für 5 min mit TBS-T 0.1 % gewaschen. Zur Detektion wurden die Membranen für 5 min lichtgeschützt mit dem Clarity Western ECL Substrat (Fa. Bio-Rad) versetzt. Das emittierte Licht wurde anschließend mithilfe des FUSION SL™ (Vilber Lourmat) detektiert und mit der FUSION-CAPT Software (Vilber Lourmat) ausgewertet.

Nach erfolgter Detektion des acetylierten Tubulins wurde der gesamte Vorgang in gleicher Weise mit dem primären Antikörper Anti-acetyl-Histon H3 (06-599, 1:2000, Fa. Merck) und dem sekundären Antikörper Anti-rabbit-IgG-HRP (1:5000, Fa. Sigma-Aldrich) zur Detektion des acetylierten Histons H3 wiederholt. In gleicher Vorgehensweise wurde mit dem primären Antikörper Anti-GAPDH (69545-200 UL, 1:5000, Fa. Sigma-Aldrich) und dem sekundären Antikörper Anti-rabbit-IgG-HRP (1:10000, Fa. Sigma-Aldrich) verfahren, um die Lademenge zu kontrollieren.

6.4.5 COMPUTERBASIERTE METHODEN

Diese Experimente wurden in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Wolfgang Sippl am Institut für Pharmazie an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg durchgeführt.

Die für die Dockingstudien verwendeten Kristallstrukturen der humanen KDAC1 (hKDAC1, PDB ID 5ICN)^[277], der humanen KDAC6 (hKDAC6, PDB ID 5EDU) sowie KDAC6 aus *Danio rerio* (zKDAC6, PDB ID 5EF7, 5G0I)^[32] wurden von der Proteindatenbank PDB bezogen. Aufgrund der Ähnlichkeit zu den Zielverbindungen dieser Arbeit wurden für die Dockingstudien Co-Kristallstrukturen von Benzylhydroxamsäuren verwendet. Die Proteine wurden für die Dockingstudien mittels Schrödinger Protein Preparation Wizard vorbereitet, indem Wasserstoffatome hinzugefügt, der Protonierungsstatus angepasst und eine Minimierung des Proteins durchgeführt wurde. Die Verbindungen wurden mittels dem Programm MOE vorbereitet. Der Protonierungsstatus der Verbindungen wurde unter Verwendung des Protonate3D Protokolls in MEO auf pH 7 angepasst und eine Deprotonierung der Hydroxamsäuren angenommen. Mehrere energieminierte Konformationen innerhalb eines Energiefensters von 5 kcal/mol wurden als Startpunkt in MOE erzeugt. Das Docking der Verbindungen erfolgte mit dem Programm GLIDE.

6.4.6 KRISTALLISATIONSMETHODEN

Diese Experimente wurden von Prof. Dr. David W. Christianson am Department Chemie an der Universität in Pennsylvania durchgeführt.

Die gesammelten kristallographischen Daten der Co-Kristallstruktur von zKDAC6 mit Verbindung **248** und die Verfeinerungsstatistik sind in Tab. 18 aufgelistet.

<i>Danio rerio</i> KDAC6 CD2–248	
<i>Unit Cell</i>	
Space group	C222 ₁
<i>a</i> , <i>b</i> , <i>c</i> (Å)	101.3, 170.9, 151.4
α , β , γ (°)	90.0, 90.0, 90.0
<i>Data Collection</i>	
Resolution (Å)	56.66–2.70
Total/unique no. of reflections	98541 / 34541
$R_{\text{merge}}^{\text{a,b}}$	0.178 (0.566)
$R_{\text{p.i.m.}}^{\text{a,c}}$	0.125 (0.413)
$CC_{1/2}^{\text{a,d}}$	0.887 (0.521)
$I/\sigma(I)^{\text{a}}$	5.5 (2.6)
Redundancy ^a	2.9 (2.7)
Completeness (%) ^a	95.5 (96.3)
<i>Refinement</i>	
No. of reflections used in refinement/test set	34495 / 1717
$R_{\text{work}}^{\text{a,e}}$	0.209 (0.291)
$R_{\text{free}}^{\text{a,e}}$	0.228 (0.306)
No. of nonhydrogen atoms:	
protein	8412
ligand	84
solvent	222
Average <i>B</i> -factors (Å ²)	
protein	21
ligand	25
solvent	21
Root-mean-square deviation from ideal geometry	
bonds (Å)	0.003
angles (°)	0.8
Ramachandran plot (%) ^f	
favored	97.21
allowed	2.70
outliers	0.09

^aValues in parentheses refer to the data from the highest resolution shell. ^b $R_{\text{merge}} = \sum_{hkl} \sum_i |I_{i,hkl} - \langle I \rangle_{hkl}| / \sum_{hkl} \sum_i I_{i,hkl}$, where $\langle I \rangle_{hkl}$ is the average intensity calculated for reflection *hkl* from replicate measurements. ^c $R_{\text{p.i.m.}} = (\sum_{hkl} (1/(N-1))^{1/2} \sum_i |I_{i,hkl} - \langle I \rangle_{hkl}|) / \sum_{hkl} \sum_i I_{i,hkl}$, where $\langle I \rangle_{hkl}$ is the average intensity calculated for reflection *hkl* from replicate measurements and *N* is the number of reflections. ^dPearson correlation coefficient between random half-datasets. ^e $R_{\text{work}} = \sum ||F_o| - |F_c|| / \sum |F_o|$ for reflections contained in the working set. $|F_o|$ and $|F_c|$ are the observed and calculated structure factor amplitudes, respectively. R_{free} is calculated using the same expression for reflections contained in the test set held aside during refinement. ^fCalculated with PROCHECK.

Tab. 18: Kristallographische Daten und Verfeinerungsstatistik.

7 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

A	Ampere
Å	Angström
Abb.	Abbildung
Ac	Acetyl
AMC	7-Amino-4-methylcoumarin
APAH	acetylpolyamine amidohydrolase
APS	Ammoniumperoxodisulfat
Ar	Aryl
α -TAT1	α -Tubulin- <i>N</i> -Acetyltransferase 1
Boc	<i>tert</i> -Butyloxycarbonyl
bs	breites Singulett
BSA	Bovines Serumalbumin
°C	Grad Celsius
Cbz	Carboxybenzyl
(z)CD	(zebrafish) catalytic domain
COMU	(1-Cyano-2-ethoxy-2-oxoethylidenaminoxy)dimethylamino-morpholino-carbenium hexafluorophosphat
CoREST	co-repressor for element-1-silencing transcription factor
d	Dublett
δ	chemische Verschiebung in ppm
DBPO	Dibenzoylperoxid
dd	Dublett vom Dublett
DC	Dünnschichtchromatographie
DIC	<i>N,N</i> -Diisopropylcarbodiimid
DIPEA	<i>N,N</i> -Diisopropylethylamin
DMAP	<i>N,N</i> -Dimethylaminopyridin
DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DPPent	1,5-Bis(diphenylphosphin)pentan
DSM	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen
EDC	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid

EI	electron impact ionisation (Elektronenstoßionisation)
EMA	European Medicines Agency
eq.	Äquivalent/e
ESI	electrospray ionisation (Elektronensprayionisation)
et al.	et alia (und andere)
Et ₃ N	Triethylamin
EtOH	Ethanol
eV	Elektronenvolt
EWG	Electron Withdrawing group
Exp.	Experiment
g	Gramm
FDA	Food and Drug Administration
FT	Fourier Transformation
Foxp3	forkhead box p3
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GR	Glucocorticoidrezeptor
h	Stunde/n
H[Nummer]	Histon [Nummer]
Hal.	Halogen
HAT	Histonacetyltransferase
HATU	O-(-7-Azabenzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-tetramethyluronium-hexafluorophosphat
HBTU	O-(Benzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-tetramethyluronium-hexafluorophosphat
Hda1	histone deacetylase 1
HDAH	deacetylase-like amidohydrolase
HDAC	Histondeacetylase
Het-Ar	heteroaromatisches Aryl
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Coherence
HOAc	Essigsäure
HOBT	1-Hydroxybenzotriazol
HPLC	High Performance Liquid Chromatography (Hochleistungsflüssigkeitschromatographie)
HPOB	N-hydroxy-4-(2-[(2-hydroxyethyl)(phenyl)amino]-2-oxoethyl)benzamid
HRMS	High Resolution Mass Spectrometry (hochaufgelöste Massenspektrometrie)
HRP	horseradish peroxidase

HSF1	heat shock transcription factor 1
HSP90	heat shock protein 90
Hz	Hertz
IC ₅₀	Konzentration des Inhibitors, bei der ein halbmaximaler Effekt am Enzym beobachtet wird
IgG	Immunglobulin G
IR	Infrarot
<i>J</i>	Kopplungskonstante in Hertz
λ	Wellenlänge
KAT	Lysin-Acetyltransferase
(h/z)KDAC	(human/zebrafish)Lysin-Deacetylase
kV	Kilovolt
LDA	Lithiumdiisopropylamid
LiHMDS	Lithiumhexamethyldisilazid
Lit.	Literatur
m	Multiplett
M	molar [mol/L]
[M] ⁺	Massenpeak bei EI
[M±H] [±]	Massenpeak bei ESI
Me	Methyl
MeCN	Acetonitril
MEF2	myocyte enhancer factor 2
MeLi	Methylithium
MeOH	Methanol
min	Minute/n
M _r	relative molare Masse
MTS	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2 <i>H</i> -tetrazolium
mg	Milligramm
mL	Milliliter
µg	Mikrogramm
µL	Mikroliter
µM	mikromolar
MS	Massenspektrometrie
MW	Mikrowelle

m/z	Masse pro Ladungseinheit
$\tilde{\nu}$	Wellenzahl
<i>n</i> -BuLi	<i>n</i> -Butyllithium
NBS	<i>N</i> -Bromsuccinimid
N-CoR	nuclear receptor co-repressor
NES	nuclear export signal
NLS	nuclear localization signal
NOE	Nuclear Overhauser Effect
nM	nanomolar
NuRD	nucleosome remodelling and deacetylation
mM	millimolar
nm	nanometer
NAD(P)	Nicotin-Adenin-Dinukleotid (Phosphat)
N-Het	N-Heterocyclus
n.i.	no inhibition
NMR	Nuclear Magnetic Resonance (kernmagnetische Resonanz)
NOE	Nuclear Overhauser Effect
Oxyma	Hydroxyiminocyanessigsäureethylester
p.a.	pro analysi
Pd(PPh ₃) ₄	Tetrakis(triphenylphosphin)palladium(0)
Pd(PPh ₃) ₂ Cl ₂	Bis(triphenylphosphin)palladium(II) Dichlorid
ppm	parts per million
<i>p</i> -TsOH	<i>p</i> -Toluolsulfonsäure
q	Quartett
<i>R_f</i>	Retentionsfaktor
RFU	relativen Fluoreszenzeinheit
RP	reversed phase
Rpd3	reduced potassium dependence 3 (Hefeprotein)
RT	Raumtemperatur
s	Singulett
SAHA	Suberoylanilide hydroxamic acid
SAR	structure-activity relationship
SDS-Page	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
SE14	serine-glutamte tetradcapeptide repeat

sec	Sekunde
SMC3	structural maintenance of chromosome 3
SMRT	silencing mediator of retinoid and thyroid receptors
t	Triplett
Tab.	Tabelle
<i>tert</i>	tertiär
TBAF	Tetrabutylammoniumfluorid
TBS-T	Tris-gepufferte Salzlösung mit Tween® 20
TFA	Trifluoressigsäure
THF	Tetrahydrofuran
THP	Tetrahydropyran
TMS-CF ₃	Trimethyl(trifluormethyl)silan
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
u.a.	und andere
UV	Ultraviolett
vs.	versus
ZBG	Zink-bindende Gruppe
ZMAL	Z-(ε-Acetyl)lysin-7-amino-4-methylcumarin
ZMTFAL	Z-(ε-Trifluoracetyl)lysin-7-amino-4-methylcumarin
ZnF	Zinkfingerdomäne
W	Watt

Aminosäure	Dreibuchstabencode	Einbuchstabencode
Asparagin	Asn	N
Aspartat	Asp	D
Cystein	Cys	C
Glycin	Gly	G
Histidin	His	H
Leucin	Leu	L
Phenylalanin	Phe	F
Prolin	Pro	P
Serin	Ser	S
Tyrosin	Tyr	Y

8 LITERATURVERZEICHNIS

- [1] International Human Genome Sequencing Consortium, *Nature* **2004**, 431, 931-945.
- [2] www.mpg.de.
- [3] T. Maniatis, B. Tasic, *Nature* **2002**, 418, 236-243.
- [4] C. T. Walsh, S. Garneau-Tsodikova, G. J. Gatto, *Angewandte Chemie* **2005**, 117, 7508-7539.
- [5] B. Polevoda, F. Sherman, *Genome Biology* **2002**, 3, 1-6.
- [6] K. K. Starheim, K. Gevaert, T. Arnesen, *Trends in Biochemical Sciences* **2012**, 37, 152-161.
- [7] V. G. Allfrey, R. Faulkner, A. E. Mirsky, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1964**, 51, 786-794.
- [8] J. Baeza, M. J. Smallegan, J. M. Denu, *ACS Chemical Biology* **2015**, 10, 122-128.
- [9] K. T. Smith, J. L. Workman, *Nature Biotechnology* **2009**, 27, 917-919.
- [10] C. Choudhary, C. Kumar, F. Gnad, M. L. Nielsen, M. Rehman, T. C. Walther, J. V. Olsen, M. Mann, *Science* **2009**, 325, 834-840.
- [11] Y. Xiong, K.-L. Guan, *The Journal of Cell Biology* **2012**, 198, 155-164.
- [12] V. J. Starai, I. Celic, R. N. Cole, J. D. Boeke, J. C. Escalante-Semerena, *Science* **2002**, 298, 2390-2392.
- [13] E. Verdin, M. Ott, *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **2014**, 16, 258-264.
- [14] K. Luger, A. W. Mäder, R. K. Richmond, D. F. Sargent, T. J. Richmond, *Nature* **1997**, 389, 251-260.
- [15] S. W. Harshman, N. L. Young, M. R. Parthun, M. A. Freitas, *Nucleic Acids Research* **2013**, 41, 9593-9609.
- [16] J. D. Watson, F. H. C. Crick, *Nature* **1953**, 171, 737-738.
- [17] L. Mariño-Ramírez, M. G. Kann, B. A. Shoemaker, D. Landsman, *Expert Review of Proteomics* **2005**, 2, 719-729.
- [18] J. A. Latham, S. Y. R. Dent, *Nature Structural & Molecular Biology* **2007**, 14, 1017-1024.
- [19] Z. Su, J. M. Denu, *ACS Chemical Biology* **2016**, 11, 564-574.
- [20] M. Shogren-Knaak, H. Ishii, J.-M. Sun, M. J. Pazin, J. R. Davie, C. L. Peterson, *Science* **2006**, 311, 844-847.
- [21] M. D. Shahbazian, M. Grunstein, *Annual Review of Biochemistry* **2007**, 76, 75-100.
- [22] B. D. Strahl, C. D. Allis, *Nature* **2000**, 403, 41-45.
- [23] C. L. Brooks, W. Gu, *Protein & Cell* **2011**, 2, 456-462.
- [24] J. Luo, M. Li, Y. Tang, M. Laszkowska, R. G. Roeder, W. Gu, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2004**, 101, 2259-2264.
- [25] I. Yu, C. P. Garnham, A. Roll-Mecak, *The Journal of Biological Chemistry* **2015**, 290, 17163-17172.
- [26] C. Janke, J. Chloë Bulinski, *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **2011**, 12, 773-786.
- [27] L. Li, X.-J. Yang, *Cellular and Molecular Life Sciences* **2015**, 72, 4237-4255.
- [28] B. T. Scroggins, K. Robzyk, D. Wang, M. G. Marcu, S. Tsutsumi, K. Beebe, R. J. Cotter, S. Felts, D. Toft, L. Karnitz, N. Rosen, L. Neckers, *Molecular Cell* **2007**, 25, 151-159.
- [29] I. Gregoret, Y.-M. Lee, H. V. Goodson, *Journal of Molecular Biology* **2004**, 338, 17-31.
- [30] X.-J. Yang, E. Seto, *Nature reviews. Molecular cell biology* **2008**, 9, 206-218.
- [31] C. Seidel, M. Schneckeburger, M. Dicato, M. Diederich, *Epigenomics* **2015**, 7, 103-118.
- [32] Y. Hai, D. W. Christianson, *Nature Chemical Biology* **2016**, 12, 741-747.
- [33] J. E. Bolden, M. J. Peart, R. W. Johnstone, *Nature Reviews Drug Discovery* **2006**, 5, 769-784.
- [34] M. S. Finnin, J. R. Donigian, A. Cohen, V. M. Richon, R. A. Rifkind, P. A. Marks, R. Breslow, N. P. Pavletich, *Nature* **1999**, 401, 188-193.
- [35] J. R. Somoza, R. J. Skene, B. A. Katz, C. Mol, J. D. Ho, A. J. Jennings, C. Luong, A. Arvai, J. J. Buggy, E. Chi, J. Tang, B.-C. Sang, E. Verner, R. Wynands, E. M. Leahy, D. R. Dougan, G. Snell, M. Navre, M. W. Knuth, R. V. Swanson, D. E. McRee, L. W. Tari, *Structure* **2004**, 12, 1325-1334.

- [36] P. M. Lombardi, K. E. Cole, D. P. Dowling, D. W. Christianson, *Current Opinion in Structural Biology* **2011**, *21*, 735-743.
- [37] Y. Miyake, J. J. Keusch, L. Wang, M. Saito, D. Hess, X. Wang, B. J. Melancon, P. Helquist, H. Gut, P. Matthias, *Nature Chemical Biology* **2016**, *12*, 748-754.
- [38] R. D. W. Kelly, S. M. Cowley, *Biochemical Society Transactions* **2013**, *41*, 741-749.
- [39] P. J. Watson, L. Fairall, G. M. Santos, J. W. R. Schwabe, *Nature* **2012**, *481*, 335-340.
- [40] A. Lahm, C. Paolini, M. Pallaoro, M. C. Nardi, P. Jones, P. Neddermann, S. Sambucini, M. J. Bottomley, P. Lo Surdo, A. Carfí, U. Koch, R. De Francesco, C. Steinkühler, P. Gallinari, *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2007**, *104*, 17335-17340.
- [41] E. Verdin, F. Dequiedt, H. G. Kasler, *Trends in Genetics* **2003**, *19*, 286-293.
- [42] A. J. M. d. Ruijter, A. H. v. Gennip, H. N. Caron, S. Kemp, A. B. P. v. Kuilenburg, *Biochemical Journal* **2003**, *370*, 737-749.
- [43] X.-J. Yang, S. Grégoire, *Molecular and Cellular Biology* **2005**, *25*, 2873-2884.
- [44] L. Gao, M. A. Cueto, F. Asselbergs, P. Atadja, *Journal of Biological Chemistry* **2002**, *277*, 25748-25755.
- [45] Y. Zhang, B. Gilquin, S. Khochbin, P. Matthias, *Journal of Biological Chemistry* **2006**, *281*, 2401-2404.
- [46] Y. Kawaguchi, J. J. Kovacs, A. McLaurin, J. M. Vance, A. Ito, T.-P. Yao, *Cell* **2003**, *115*, 727-738.
- [47] N. R. Bertos, B. Gilquin, G. K. T. Chan, T. J. Yen, S. Khochbin, X.-J. Yang, *Journal of Biological Chemistry* **2004**, *279*, 48246-48254.
- [48] D. Girdwood, D. Bumpass, O. A. Vaughan, A. Thain, L. A. Anderson, A. W. Snowden, E. Garcia-Wilson, N. D. Perkins, R. T. Hay, *Molecular Cell* **2003**, *11*, 1043-1054.
- [49] P. Ana, F. Isabelle, B. Yolande, T. Liqun, V. Mark, K. Maria, T.-M. Luz E., L. Zhi, B. Veronique, M. Sylvie, Y. Xiang Jiao, W. John H., *The Journal of Biological Chemistry* **2009**, *284*, 30264-30274.
- [50] J. J. Westendorf, S. K. Zaidi, J. E. Cascino, R. Kahler, A. J. van Wijnen, J. B. Lian, M. Yoshida, G. S. Stein, X. Li, *Molecular and Cellular Biology* **2002**, *22*, 7982-7992.
- [51] W. Zhang, B. C. Kone, *American Journal of Physiology* **2002**, *283*, 904-911.
- [52] W. Kendra A., Z. Mu, X. Shengyan, H. Chen, W. Jheng-Yu, Z. Shengping, R. Meagan, C. Adrienne D., D. Channing J., F. Bin, K. John, H. Eric, B. Gerold, N. Santo V., M. Patrick, W. Chuangui, B. Wenlong, Z. Xiaohong, *The Journal of Biological Chemistry* **2013**, *288*, 33156-33170.
- [53] Y. Liu, L. Peng, E. Seto, S. Huang, Y. Qiu, *The Journal of Biological Chemistry* **2012**, *287*, 29168-29174.
- [54] S. M. L. Gantt, C. Decroos, M. S. Lee, L. E. Gullett, C. M. Bowman, D. W. Christianson, C. A. Fierke, *Biochemistry* **2016**, *55*, 820-832.
- [55] Y. Zhang, N. Li, C. Caron, G. Matthias, D. Hess, S. Khochbin, P. Matthias, *The EMBO Journal* **2003**, *22*, 1168-1179.
- [56] J. J. Kovacs, P. J. M. Murphy, S. Gaillard, X. Zhao, J.-T. Wu, C. V. Nicchitta, M. Yoshida, D. O. Toft, W. B. Pratt, T.-P. Yao, *Molecular Cell* **2005**, *18*, 601-607.
- [57] X. Zhang, Z. Yuan, Y. Zhang, S. Yong, A. Salas-Burgos, J. Koomen, N. Olashaw, J. T. Parsons, X.-J. Yang, S. R. Dent, T.-P. Yao, W. S. Lane, E. Seto, *Molecular Cell* **2007**, *27*, 197-213.
- [58] B. J. North, B. L. Marshall, M. T. Borra, J. M. Denu, E. Verdin, *Molecular Cell* **2003**, *11*, 437-444.
- [59] C. Hubbert, A. Guardiola, R. Shao, Y. Kawaguchi, A. Ito, A. Nixon, M. Yoshida, X.-F. Wang, T.-P. Yao, *Nature* **2002**, *417*, 455-458.
- [60] H. Ouyang, Y. O. Ali, M. Ravichandran, A. Dong, W. Qiu, F. MacKenzie, S. Dhe-Paganon, C. H. Arrowsmith, R. G. Zhai, *Journal of Biological Chemistry* **2012**, *287*, 2317-2327.
- [61] J. Y. Lee, H. Koga, Y. Kawaguchi, W. Tang, E. Wong, Y. S. Gao, U. B. Pandey, S. Kaushik, E. Tresse, J. Lu, J. P. Taylor, A. M. Cuervo, T. P. Yao, *The EMBO Journal* **2010**, *29*, 969-980.
- [62] C. Boyault, Y. Zhang, S. Fritah, C. Caron, B. Gilquin, S. H. Kwon, C. Garrido, T.-P. Yao, C. Vourc'h, P. Matthias, S. Khochbin, *Genes & Development* **2007**, *21*, 2172-2181.
- [63] R. B. Parmigiani, W. S. Xu, G. Venta-Perez, H. Erdjument-Bromage, M. Yaneva, P. Tempst, P. A. Marks, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2008**, *105*, 9633-9638.

- [64] U. H. Beier, L. Wang, R. Han, T. Akimova, Y. Liu, W. W. Hancock, *Science Signaling* **2012**, 5, 1-17.
- [65] G. I. Aldana-Masangkay, K. M. Sakamoto, *Journal of Biomedicine and Biotechnology* **2011**, 2011, 1-10.
- [66] E. F. d. Zoeten, L. Wang, K. V. Butler, U. H. Beier, T. Akimova, H. Sai, J. E. Bradner, R. Mazitschek, A. P. Kozikowski, P. Matthias, W. W. Hancock, *Molecular and Cellular Biology* **2011**, 31, 2066-2078.
- [67] C. d'Ydewalle, E. Bogaert, V. D. L. Bosch, *Traffic* **2012**, 13, 771-779.
- [68] C. Simões-Pires, V. Zwick, A. Nurisso, E. Schenker, P.-A. Carrupt, M. Cuendet, *Molecular Neurodegeneration* **2013**, 8, 1-16.
- [69] M. A. Rivieccio, C. Brochier, D. E. Willis, B. A. Walker, M. A. D'Annibale, K. McLaughlin, A. Siddiq, A. P. Kozikowski, S. R. Jaffrey, J. L. Twiss, R. R. Ratan, B. Langley, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2009**, 106, 19599-19604.
- [70] J.-H. Tseng, L. Xie, S. Song, Y. Xie, L. Allen, D. Ajit, J.-S. Hong, X. Chen, R. B. Meeker, T. J. Cohen, *Cell Reports*, 20, 2169-2183.
- [71] C. Kim, H. Choi, E. S. Jung, W. Lee, S. Oh, N. L. Jeon, I. Mook-Jung, *PLOS ONE* **2012**, 7, 1-7.
- [72] C. d'Ydewalle, J. Krishnan, D. M. Chiheb, P. Van Damme, J. Irobi, A. P. Kozikowski, P. V. Berghe, V. Timmerman, W. Robberecht, L. Van Den Bosch, *Nature Medicine* **2011**, 17, 968-974.
- [73] Y.-T. Chen, X.-F. Zang, J. Pan, X.-L. Zhu, F. Chen, Z.-B. Chen, Y. Xu, *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* **2012**, 39, 751-758.
- [74] D. Waltregny, L. de Leval, W. Glénisson, S. Ly Tran, B. J. North, A. Bellahcène, U. Weidle, E. Verdin, V. Castronovo, *The American Journal of Pathology* **2004**, 165, 553-564.
- [75] D. Waltregny, W. Glenisson, S. L. Tran, B. J. North, E. Verdin, A. Colige, V. Castronovo, *FASEB Journal* **2005**, 19, 966-990.
- [76] D. E. Olson, N. D. Udeshi, N. A. Wolfson, C. A. Pitcairn, E. D. Sullivan, J. D. Jaffe, T. Svinkina, T. Natoli, X. Lu, J. Paulk, P. McCarren, F. F. Wagner, D. Barker, E. Howe, F. Lazzaro, J. P. Gale, Y.-L. Zhang, A. Subramanian, C. A. Fierke, S. A. Carr, E. B. Holson, *ACS Chemical Biology* **2014**, 9, 2210-2216.
- [77] N. Alam, L. Zimmerman, Noah A. Wolfson, Caleb G. Joseph, Carol A. Fierke, O. Schueler-Furman, *Structure* **2016**, 24, 458-468.
- [78] B. J. Wilson, A. M. Tremblay, G. v. Deblois, G. Sylvain-Drolet, V. Giguère, *Molecular Endocrinology* **2010**, 24, 1349-1358.
- [79] M. A. Deardorff, M. Bando, R. Nakato, E. Watrin, T. Itoh, M. Minamino, K. Saitoh, M. Komata, Y. Katou, D. Clark, K. E. Cole, E. De Baere, C. Decroos, N. Di Donato, S. Ernst, L. J. Francey, Y. Gyftodimou, K. Hirashima, M. Hullings, Y. Ishikawa, C. Jaulin, M. Kaur, T. Kiyono, P. M. Lombardi, L. Magnaghi-Jaulin, G. R. Mortier, N. Nozaki, M. B. Petersen, H. Seimiya, V. M. Siu, Y. Suzuki, K. Takagaki, J. J. Wilde, P. J. Willems, C. Prigent, G. Gillissen-Kaesbach, D. W. Christianson, F. J. Kaiser, L. G. Jackson, T. Hirota, I. D. Krantz, K. Shirahige, *Nature* **2012**, 489, 313-317.
- [80] J. Wu, C. Du, Z. Lv, C. Ding, J. Cheng, H. Xie, L. Zhou, S. Zheng, *Digestive Diseases and Sciences* **2013**, 58, 3545-3553.
- [81] J. Li, S. Chen, R. A. Cleary, R. Wang, O. J. Gannon, E. Seto, D. D. Tang, *American Journal of Physiology-Cell Physiology* **2014**, 307, 288-295.
- [82] A. Chakrabarti, I. Oehme, O. Witt, G. Oliveira, W. Sippl, C. Romier, R. J. Pierce, M. Jung, *Trends in Pharmacological Sciences* **2015**, 36, 481-492.
- [83] I. Oehme, H. E. Deubzer, D. Wegener, D. Pickert, J.-P. Linke, B. Hero, A. Kopp-Schneider, F. Westermann, S. M. Ulrich, A. von Deimling, M. Fischer, O. Witt, *Clinical Cancer Research* **2009**, 15, 91-99.
- [84] M. A. Deardorff, N. J. Porter, D. W. Christianson, *Protein Science* **2016**, 25, 1965-1976.
- [85] M. Marek, S. Kannan, A.-T. Hauser, M. Moraes Mourão, S. Caby, V. Cura, D. A. Stolfa, K. Schmidtkunz, J. Lancelot, L. Andrade, J.-P. Renaud, G. Oliveira, W. Sippl, M. Jung, J. Cavarelli, R. J. Pierce, C. Romier, *PLOS Pathogens* **2013**, 9, 1-15.

- [86] M. Yoshida, M. Kijima, M. Akita, T. Beppu, *Journal of Biological Chemistry* **1990**, *265*, 17174-17179.
- [87] B. S. Mann, J. R. Johnson, M. H. Cohen, R. Justice, R. Pazdur, *The Oncologist* **2007**, *12*, 1247-1252.
- [88] P. A. Marks, R. Breslow, *Nature Biotechnology* **2007**, *25*, 84-90.
- [89] G. Wu, M. Swanson, A. Talla, D. Graham, J. Strizki, D. Gorman, R. J. O. Barnard, W. Blair, O. S. Søggaard, M. Tolstrup, L. Østergaard, T. A. Rasmussen, R.-P. Sekaly, N. M. Archin, D. M. Margolis, D. J. Hazuda, B. J. Howell, *JCI Insight* **2017**, *2*, 1-11.
- [90] S. P. Iyer, F. F. Foss, *The Oncologist* **2015**, *20*, 1084-1091.
- [91] K. M. VanderMolen, W. McCulloch, C. J. Pearce, N. H. Oberlies, *The Journal of Antibiotics* **2011**, *64*, 525-531.
- [92] R. Furumai, A. Matsuyama, N. Kobashi, K.-H. Lee, M. Nishiyama, H. Nakajima, A. Tanaka, Y. Komatsu, N. Nishino, M. Yoshida, S. Horinouchi, *Cancer Research* **2002**, *62*, 4916-4921.
- [93] O. A. O'Connor, S. Horwitz, T. Masszi, A. V. Hoof, P. Brown, J. Doorduijn, G. Hess, W. Jurczak, P. Knoblauch, S. Chawla, G. Bhat, M. R. Choi, J. Walewski, K. Savage, F. Foss, L. F. Allen, A. Shustov, *Journal of Clinical Oncology* **2015**, *33*, 2492-2499.
- [94] M. P. Fenichel, *JNCI: Journal of the National Cancer Institute* **2015**, *107*, 5-7.
- [95] Y. Shi, M. Dong, X. Hong, W. Zhang, J. Feng, J. Zhu, L. Yu, X. Ke, H. Huang, Z. Shen, Y. Fan, W. Li, X. Zhao, J. Qi, H. Huang, D. Zhou, Z. Ning, X. Lu, *Annals of Oncology* **2015**, *26*, 1766-1771.
- [96] M. Mottamal, S. Zheng, T. Huang, G. Wang, *Molecules* **2015**, *20*, 3898-3941.
- [97] A. P. Kozikowski, K. V. Butler, *Current Pharmaceutical Design* **2008**, *14*, 505-528.
- [98] D. Wang, P. Helquist, O. Wiest, *The Journal of Organic Chemistry* **2007**, *72*, 5446-5449.
- [99] S. Shen, A. P. Kozikowski, *ChemMedChem* **2016**, *11*, 15-21.
- [100] L. Goracci, N. Deschamps, G. M. Randazzo, C. Petit, C. Dos Santos Passos, P.-A. Carrupt, C. Simões-Pires, A. Nurisso, *Scientific Reports* **2016**, *6*, 1-12.
- [101] M. Fournel, C. Bonfils, Y. Hou, P. T. Yan, M.-C. Trachy-Bourget, A. Kalita, J. Liu, A.-H. Lu, N. Z. Zhou, M.-F. Robert, J. Gillespie, J. J. Wang, H. Ste-Croix, J. Rahil, S. Lefebvre, O. Moradei, D. Delorme, A. R. MacLeod, J. M. Besterman, Z. Li, *Molecular Cancer Therapeutics* **2008**, *7*, 759-768.
- [102] S. D. Kattar, L. M. Surdi, A. Zabierek, J. L. Methot, R. E. Middleton, B. Hughes, A. A. Szewczak, W. K. Dahlberg, A. M. Kral, N. Ozerova, J. C. Fleming, H. Wang, P. Secrist, A. Harsch, J. E. Hamill, J. C. Cruz, C. M. Kenific, M. Chenard, T. A. Miller, S. C. Berk, P. Tempest, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2009**, *19*, 1168-1172.
- [103] J. C. Bressi, A. J. Jennings, R. Skene, Y. Wu, R. Melkus, R. D. Jong, S. O'Connell, C. E. Grimshaw, M. Navre, A. R. Gangloff, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2010**, *20*, 3142-3145.
- [104] L. Whitehead, M. R. Dobler, B. Radetich, Y. Zhu, P. W. Atadja, T. Claiborne, J. E. Grob, A. McRiner, M. R. Pancost, A. Patnaik, W. Shao, M. Shultz, R. Tichkule, R. A. Tommasi, B. Vash, P. Wang, T. Stams, *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2011**, *19*, 4626-4634.
- [105] A. S. Madsen, H. M. E. Kristensen, G. Lanz, C. A. Olsen, *ChemMedChem* **2014**, *9*, 614-626.
- [106] M. Ilies, D. P. Dowling, P. M. Lombardi, D. W. Christianson, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2011**, *21*, 5854-5858.
- [107] J. M. Ontoria, S. Altamura, A. Di Marco, F. Ferrigno, R. Laufer, E. Muraglia, M. C. Palumbi, M. Rowley, R. Scarpelli, C. Schultz-Fademrecht, S. Serafini, C. Steinkühler, P. Jones, *Journal of Medicinal Chemistry* **2009**, *52*, 6782-6789.
- [108] M. Ondetti, B. Rubin, D. Cushman, *Science* **1977**, *196*, 441-444.
- [109] M. Whittaker, C. D. Floyd, P. Brown, A. J. H. Gearing, *Chemical Reviews* **1999**, *99*, 2735-2776.
- [110] L. Vesci, E. Bernasconi, F. M. Milazzo, R. D. Santis, E. Gaudio, I. Kwee, A. Rinaldi, S. Pace, V. Carollo, G. Giannini, F. Bertoni, *Oncotarget* **2014**, *6*, 5735-5748.
- [111] J. H. Kalin, H. Zhang, S. Gaudrel-Grosay, G. Vistoli, A. P. Kozikowski, *ChemMedChem* **2012**, *7*, 425-439.
- [112] H. Glatt, M. Protic-Sabljic, F. Oesch, *Science* **1983**, *220*, 961-963.

- [113] D. T. Vogl, N. Raje, S. Jagannath, P. Richardson, P. Hari, R. Orlowski, J. G. Supko, D. Tamang, M. Yang, S. S. Jones, C. Wheeler, R. J. Markelewicz, S. Lonial, *Clinical Cancer Research* **2017**, *23*, 3307-3315.
- [114] B. Hackanson, L. Rimmele, M. Benkißer, M. Abdelkarim, M. Fliegauf, M. Jung, M. Lübbert, *Leukemia Research* **2012**, *36*, 1055-1062.
- [115] Y. Zhang, S. Kwon, T. Yamaguchi, F. Cubizolles, S. Rousseaux, M. Kneissel, C. Cao, N. Li, H.-L. Cheng, K. Chua, D. Lombard, A. Mizeracki, G. Matthias, F. W. Alt, S. Khochbin, P. Matthias, *Molecular and Cellular Biology* **2008**, *28*, 1688-1701.
- [116] S. J. Haggarty, K. M. Koeller, J. C. Wong, C. M. Grozinger, S. L. Schreiber, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2003**, *100*, 4389-4394.
- [117] K. V. Butler, J. Kalin, C. Brochier, G. Vistoli, B. Langley, A. P. Kozikowski, *Journal of the American Chemical Society* **2010**, *132*, 10842-10846.
- [118] T. Hideshima, J. E. Bradner, J. Wong, D. Chauhan, P. Richardson, S. L. Schreiber, K. C. Anderson, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2005**, *102*, 8567-8572.
- [119] L. Santo, T. Hideshima, A. L. Kung, J.-C. Tseng, D. Tamang, M. Yang, M. Jarpe, J. H. van Duzer, R. Mazitschek, W. C. Ogier, D. Cirstea, S. Rodig, H. Eda, T. Scullen, M. Canavese, J. Bradner, K. C. Anderson, S. S. Jones, N. Raje, *Blood* **2012**, *119*, 2579-2589.
- [120] Z. Wang, Y. Leng, J. Wang, H.-M. Liao, J. Bergman, P. Leeds, A. Kozikowski, D.-M. Chuang, *Scientific Reports* **2016**, *6*, 1-12.
- [121] L. Zhang, Liu, Cui, Wu, Jie, Tao, Jing-jing, Sui, Xiao-long, Yao, Zhi-gang, Xu, Yan-feng, Huang, Lan, Zhu, Hua, Sheng, Shu-li, Qin, Chuan, *Journal of Alzheimer's disease* **2014**, *41*, 1193-1205.
- [122] J. H. Kalin, K. V. Butler, T. Akimova, W. W. Hancock, A. P. Kozikowski, *Journal of Medicinal Chemistry* **2012**, *55*, 639-651.
- [123] J.-H. Lee, A. Mahendran, Y. Yao, L. Ngo, G. Venta-Perez, M. L. Choy, N. Kim, W.-S. Ham, R. Breslow, P. A. Marks, *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2013**, *110*, 15704-15709.
- [124] N. J. Porter, A. Mahendran, R. Breslow, D. W. Christianson, *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2017**, *114*, 13459-13464.
- [125] K. KrennHrubec, B. L. Marshall, M. Hedglin, E. Verdin, S. M. Ulrich, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2007**, *17*, 2874-2878.
- [126] S. Balasubramanian, J. Ramos, W. Luo, M. Sirisawad, E. Verner, J. J. Buggy, *Leukemia* **2008**, *22*, 1026-1034.
- [127] T. Suzuki, Y. Ota, M. Ri, M. Bando, A. Gotoh, Y. Itoh, H. Tsumoto, P. R. Tatum, T. Mizukami, H. Nakagawa, S. Iida, R. Ueda, K. Shirahige, N. Miyata, *Journal of Medicinal Chemistry* **2012**, *55*, 9562-9575.
- [128] M. E. Morgenstern, *Masterarbeit LMU München* **2017**.
- [129] F. F. Wagner, D. E. Olson, J. P. Gale, T. Kaya, M. Weïwer, N. Aidoud, M. Thomas, E. L. Davoine, B. C. Lemerrier, Y.-L. Zhang, E. B. Holson, *Journal of Medicinal Chemistry* **2013**, *56*, 1772-1776.
- [130] J. Senger, J. Melesina, M. Marek, C. Romier, I. Oehme, O. Witt, W. Sippl, M. Jung, *Journal of Medicinal Chemistry* **2016**, *59*, 1545-1555.
- [131] G. V. Kapustin, G. Fejér, J. L. Gronlund, D. G. McCafferty, E. Seto, F. A. Etzkorn, *Organic Letters* **2003**, *5*, 3053-3056.
- [132] K.-C. Hsu, C.-Y. Liu, T. E. Lin, J.-H. Hsieh, T.-Y. Sung, H.-J. Tseng, J.-M. Yang, W.-J. Huang, *Scientific Reports* **2017**, *7*, 1-13.
- [133] C. M. Pavlik, C. Y. B. Wong, S. Ononye, D. D. Lopez, N. Engene, K. L. McPhail, W. H. Gerwick, M. J. Balunas, *Journal of Natural Products* **2013**, *76*, 2026-2033.
- [134] Q. Liu, W. Lu, M. Ma, J. Liao, A. Ganesan, Y. Hu, S. Wen, P. Huang, *RSC Advances* **2015**, *5*, 1109-1112.
- [135] P. Jiao, P. Jin, C. Li, L. Cui, L. Dong, B. Pan, W. Song, L. Ma, J. Dong, L. Song, X. Jin, F. Li, M. Wan, Z. Lv, Q. Geng, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2016**, *26*, 4679-4683.
- [136] D. S. Bolotin, N. A. Bokach, V. Y. Kukushkin, *Coordination Chemistry Reviews* **2016**, *313*, 62-93.

- [137] M. T. Tavares, S. Shen, T. Knox, M. Hadley, Z. Kutil, C. Bařinka, A. Villagra, A. P. Kozikowski, *ACS Medicinal Chemistry Letters* **2017**, *8*, 1031-1036.
- [138] M. Molteni, A. Volonterio, M. Zanda, *Organic Letters* **2003**, *5*, 3887-3890.
- [139] A. Deutsch, C. Wagner, C. Deutsch, A. Hoffmann-Röder, *European Journal of Organic Chemistry* **2016**, *2016*, 930-945.
- [140] Shen X, G. RW, *Journal of Chromatography A* **1997**, *777*, 261-265.
- [141] Y. Wang, R. L. Stowe, C. E. Pinello, G. Tian, F. Madoux, D. Li, L. Y. Zhao, J.-L. Li, Y. Wang, Y. Wang, H. Ma, P. Hodder, W. R. Roush, D. Liao, *Chemistry & Biology* **2015**, *22*, 273-284.
- [142] H. Fischer, G. Leopoldi, *Zeitschrift für analytische Chemie* **1936**, *107*, 241-269.
- [143] A. Porcheddu, G. Giacomelli, *Synthesis of oximes and hydroxamic acids*, John Wiley & Sons, Patai's Chemistry of Functional Groups, **2008**.
- [144] R. Deziel, S. Leit, P. Beaulieu, Y. A. Chantigny, J. Mancuso, P. Tessier, G. Shapiro, R. Chesworth, D. Smil, *EP 2 343 286 A1* **2011**.
- [145] D. Diedrich, A. Hamacher, C. G. W. Gertzen, L. A. Alves Avelar, G. J. Reiss, T. Kurz, H. Gohlke, M. U. Kassack, F. K. Hansen, *Chemical Communications* **2016**, *52*, 3219-3222.
- [146] C. Y. Ho, E. Strobel, J. Ralbovsky, R. A. Galemme, *The Journal of Organic Chemistry* **2005**, *70*, 4873-4875.
- [147] S. W. Remiszewski, L. C. Sambucetti, P. Atadja, K. W. Bair, W. D. Cornell, M. A. Green, K. L. Howell, M. Jung, P. Kwon, N. Trogani, H. Walker, *Journal of Medicinal Chemistry* **2002**, *45*, 753-757.
- [148] S. S. Nikam, B. E. Komberg, D. R. Johnson, A. M. Doherty, *Tetrahedron Letters* **1995**, *36*, 197-200.
- [149] R. Schwalm, H. Binder, D. Funhoff, *Journal of Applied Polymer Science* **2000**, *78*, 208-216.
- [150] F. Thaler, M. Varasi, A. Abate, G. Carenzi, A. Colombo, C. Bigogno, R. Boggio, R. D. Zuffo, D. Rapetti, A. Resconi, N. Regalia, S. Vultaggio, G. Dondio, S. Gagliardi, S. Minucci, C. Mercurio, *European Journal of Medicinal Chemistry* **2013**, *64*, 273-284.
- [151] W. König, R. Geiger, *Chemische Berichte* **1970**, *103*, 788-798.
- [152] E. Valeur, M. Bradley, *Chemical Society Reviews* **2008**, *38*, 606-631.
- [153] A. El-Faham, F. Albericio, *Chemical Reviews* **2011**, *111*, 6557-6602.
- [154] H. D. Jakubke, C. Klessen, *Journal für Praktische Chemie* **1977**, *319*, 159-162.
- [155] L. Carpine, H. Imazumi, A. El-Faham, F. Ferrer, C. Zhang, *Angewandte Chemie* **2002**, *41*, 441-445.
- [156] F. Albericio, J. M. Bofill, A. El-Faham, S. A. Kates, *The Journal of Organic Chemistry* **1998**, *63*, 9678-9683.
- [157] A. El-Faham, R. S. Funosas, R. Prohens, F. Albericio, *Chemistry – A European Journal* **2009**, *15*, 9404-9416.
- [158] R. Ottria, S. Casati, P. Ciuffreda, *Chemistry and Physics of Lipids* **2012**, *165*, 705-711.
- [159] E. Tyrrell, P. Brawn, M. Carew, I. Greenwood, *Tetrahedron Letters* **2011**, *52*, 369-372.
- [160] R. Subirós-Funosas, L. Nieto-Rodríguez, K. J. Jensen, F. Albericio, *Journal of Peptide Science* **2013**, *19*, 408-414.
- [161] A. Pernille Tofteng, S. L. Pedersen, D. Staerk, K. J. Jensen, *Chemistry – A European Journal* **2012**, *18*, 9024-9031.
- [162] N. R. Panguluri, Basavaprabhu, V. V. Sureshbabu, *International Journal of Peptide Research and Therapeutics* **2014**, *20*, 377-384.
- [163] W.-Q. Liu, M. Vidal, C. Olszowy, E. Million, C. Lenoir, H. Dhôtel, C. Garbay, *Journal of Medicinal Chemistry* **2004**, *47*, 1223-1233.
- [164] T. Sakamoto, Y. Kondo, D. Uchiyama, H. Yamanaka, *Tetrahedron* **1991**, *47*, 5111-5118.
- [165] T. Tremmel, F. Bracher, *Tetrahedron* **2015**, *71*, 4640-4646.
- [166] C.-T. Yang, J. Han, J. Liu, M. Gu, Y. Li, J. Wen, H.-Z. Yu, S. Hu, X. Wang, *Organic & Biomolecular Chemistry* **2015**, *13*, 2541-2545.
- [167] R. M. Srivastava, M. C. Pereira, W. W. M. Faustino, K. Coutinho, J. V. dos Anjos, S. J. de Melo, *Monatshefte für Chemie - Chemical Monthly* **2009**, *140*, 1319-1324.

- [168] Y. Wada, H. Nagasaki, M. Tokuda, K. Orito, *The Journal of Organic Chemistry* **2007**, 72, 2008-2014.
- [169] C. W. G. Fishwick, J. M. Sanderson, J. B. C. Findlay, *Tetrahedron Letters* **1994**, 35, 4611-4614.
- [170] G. K. S. Prakash, A. K. Yudin, *Chemical Reviews* **1997**, 97, 757-786.
- [171] J. Wiedemann, T. Heiner, G. Mloston, G. K. S. Prakash, G. A. Olah, *Angewandte Chemie International Edition* **1998**, 37, 820-821.
- [172] A. Makriyannis, S. P. Nikas, S. O. Alapafuja, V. G. Shukla, *WO 2008/013963 A2* **2008**.
- [173] D. S. Stewart, P. Y. Savechenkov, Z. Dostalova, D. C. Chiara, R. Ge, D. E. Raines, J. B. Cohen, S. A. Forman, K. S. Bruzik, K. W. Miller, *Journal of Medicinal Chemistry* **2011**, 54, 8124-8135.
- [174] F. A. J. Kerdesky, B. W. Horrom, *Synthetic Communications* **1991**, 21, 2203-2205.
- [175] H. Feuer, B. F. Vincent, R. S. Bartlett, *The Journal of Organic Chemistry* **1965**, 30, 2877-2880.
- [176] S. Bugge, S. J. Kaspersen, S. Larsen, U. Nonstad, G. Bjørkøy, E. Sundby, B. H. Hoff, *European Journal of Medicinal Chemistry* **2014**, 75, 354-374.
- [177] A. Sasse, B. Sadek, X. Ligneau, S. Elz, H. H. Pertz, P. Luger, C. R. Ganellin, J.-M. Arrang, J.-C. Schwartz, W. Schunack, H. Stark, *Journal of Medicinal Chemistry* **2000**, 43, 3335-3343.
- [178] R. Braslau, M. O. Anderson, F. Rivera, A. Jimenez, T. Haddad, J. R. Axon, *Tetrahedron* **2002**, 58, 5513-5523.
- [179] V. Molteni, X. Li, J. Nabakka, F. Liang, J. Wityak, A. Koder, L. Vargas, R. Romeo, N. Mitro, P. A. Mak, H. M. Seidel, J. A. Haslam, D. Chow, T. Tuntland, T. A. Spalding, A. Brock, M. Bradley, A. Castrillo, P. Tontono, E. Saez, *Journal of Medicinal Chemistry* **2007**, 50, 4255-4259.
- [180] Y. S. Park, J. Choi, D. Kim, B. Lee, H. Suh, J. H. Kim, *Molecular Crystals and Liquid Crystals* **2011**, 550, 294-303.
- [181] A. Bombrun, G. Casi, *Tetrahedron Letters* **2002**, 43, 2187-2190.
- [182] A. Li, Y. Mishra, M. Malik, Q. Wang, S. Li, M. Taylor, D. E. Reichert, R. R. Luedtke, R. H. Mach, *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2013**, 21, 2988-2998.
- [183] M. Righi, A. Bedini, G. Piersanti, F. Romagnoli, G. Spadoni, *The Journal of Organic Chemistry* **2011**, 76, 704-707.
- [184] T. A. Popp, F. Bracher, *Synthesis* **2015**, 47, 3333-3338.
- [185] W. Kuhn, *US 6624330 B2* **2003**.
- [186] L. Hamann, *Bachelorarbeit LMU München* **2016**.
- [187] B. T. Haddou, S. Béni, S. Hosztafi, D. Malfacini, G. Calo, H. Schmidhammer, M. Spetea, *PLOS ONE* **2014**, 9, 1-9.
- [188] F. S. Wekesa, N. Phadke, C. Jahier, D. B. Cordes, M. Findlater, *Synthesis* **2014**, 46, 1046-1051.
- [189] D. Clarke, B. C. Gilbert, P. Hanson, C. M. Kirk, *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2* **1978**, 1103-1110.
- [190] M. Larrosa, C. Guerrero, R. Rodríguez, J. Cruces, *Synlett* **2010**, 2010, 2101-2105.
- [191] J. F. Egger, G. F. Holland, R. A. Volkmann, *US 4738972* **1988**.
- [192] J. J. Eisch, S. K. Dua, C. A. Kovacs, *The Journal of Organic Chemistry* **1987**, 52, 4437-4444.
- [193] G. Médard, *Tetrahedron* **2014**, 70, 186-196.
- [194] D. L. J. Clive, J. Wang, *The Journal of Organic Chemistry* **2004**, 69, 2773-2784.
- [195] A. P. Tamiz, E. R. Whittemore, R. M. Woodward, R. B. Upasani, J. F. W. Keana, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **1999**, 9, 1619-1624.
- [196] S. E. Kiruthika, P. T. Perumal, *Organic Letters* **2014**, 16, 484-487.
- [197] T. E. Müller, M. Beller, *Chemical Reviews* **1998**, 98, 675-703.
- [198] K. Kumar, D. Michalik, I. Garcia Castro, A. Tillack, A. Zapf, M. Arlt, T. Heinrich, H. Böttcher, M. Beller, *Chemistry – A European Journal* **2004**, 10, 746-757.
- [199] M. Utsunomiya, J. F. Hartwig, *Journal of the American Chemical Society* **2004**, 126, 2702-2703.
- [200] D. Jaspers, S. Doye, *Synlett* **2011**, 2011, 1444-1448.
- [201] C. Munro-Leighton, S. A. Delp, N. M. Alsop, E. D. Blue, T. B. Gunnoe, *Chemical Communications* **2008**, 111-113.
- [202] A. Heutling, F. Pohlki, I. Bytschkov, S. Doye, *Angewandte Chemie* **2005**, 44, 2951-2954.
- [203] M. H. S. A. Hamid, J. M. J. Williams, *Chemical Communications* **2007**, 725-727.
- [204] N. Iranpoor, H. Firouzabadi, N. Nowrouzi, D. Khalili, *Tetrahedron* **2009**, 65, 3893-3899.

- [205] A. R. Katritzky, F. Saczewski, C. M. Marson, *The Journal of Organic Chemistry* **1985**, *50*, 1351-1355.
- [206] A. R. Katritzky, N. Shobana, P. A. Harris, *Tetrahedron Letters* **1991**, *32*, 4247-4248.
- [207] A. R. Katritzky, S. Strah, S. A. Belyakov, *Tetrahedron* **1998**, *54*, 7167-7178.
- [208] V. Werner, M. Ellwart, A. J. Wagner, P. Knochel, *Organic Letters* **2015**, *17*, 2026-2029.
- [209] J. P. Patel, A.-H. Li, H. Dong, V. L. Korlipara, M. J. Mulvihill, *Tetrahedron Letters* **2009**, *50*, 5975-5977.
- [210] K. Vögerl, D. N. Ong, F. Bracher, *Synthesis* **2018**, *49*, A-H.
- [211] M. Movassaghi, M. D. Hill, *Organic Letters* **2008**, *10*, 3485-3488.
- [212] A. K. Kiang, F. G. Mann, A. F. Prior, A. Topham, *Journal of the Chemical Society* **1956**, *268*, 1319-1331.
- [213] A. D. Billimoria, M. P. Cava, *The Journal of Organic Chemistry* **1994**, *59*, 6777-6782.
- [214] M. A. Wrobel, *Dissertation LMU München* **2014**.
- [215] A. Bernthsen, *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft* **1883**, *16*, 2896-2904.
- [216] E. A. Weiss, M. J. Tauber, R. F. Kelley, M. J. Ahrens, M. A. Ratner, M. R. Wasielewski, *Journal of the American Chemical Society* **2005**, *127*, 11842-11850.
- [217] R. Y. Lai, X. Kong, S. A. Jenekhe, A. J. Bard, *Journal of the American Chemical Society* **2003**, *125*, 12631-12639.
- [218] H.-W. Rhee, S. J. Choi, S. H. Yoo, Y. O. Jang, H. H. Park, R. M. Pinto, J. C. Cameselle, F. J. Sandoval, S. Roje, K. Han, D. S. Chung, J. Suh, J.-I. Hong, *Journal of the American Chemical Society* **2009**, *131*, 10107-10112.
- [219] T. Ito, A. Kondo, S. Terada, S.-i. Nishimoto, *Journal of the American Chemical Society* **2006**, *128*, 10934-10942.
- [220] C. M. Murphy, H. Ravner, N. L. Smith, *Industrial & Engineering Chemistry* **1950**, *42*, 2479-2489.
- [221] Z.-Q. Liu, Y.-Z. Tang, D. Wu, *Journal of Physical Organic Chemistry* **2009**, *22*, 1009-1014.
- [222] B. Morak-Młodawska, K. Pluta, A. N. Matralis, A. P. Kourounakis, *Archiv der Pharmazie* **2010**, *343*, 268-273.
- [223] H. Becker, H. Vogel, *Chemical Engineering & Technology* **2006**, *29*, 931-936.
- [224] Z.-S. Huang, H. Meier, D. Cao, *Journal of Materials Chemistry C* **2016**, *4*, 2404-2426.
- [225] E. A. Onoabedje, U. C. Okoro, D. W. Knight, *Journal of Heterocyclic Chemistry* **2017**, *54*, 206-214.
- [226] S. P. Massie, *Chemical Reviews* **1954**, *54*, 797-833.
- [227] K. Pluta, B. Morak-Młodawska, M. Jeleń, *European Journal of Medicinal Chemistry* **2011**, *46*, 3179-3189.
- [228] G. C. González-Muñoz, M. P. Arce, B. López, C. Pérez, A. Romero, L. d. Barrio, M. D. Martín-de-Saavedra, J. Egea, R. León, M. Villarroja, M. G. López, A. G. García, S. Conde, M. I. Rodríguez-Franco, *European Journal of Medicinal Chemistry* **2011**, *46*, 2224-2235.
- [229] C. Korth, B. C. H. May, F. E. Cohen, S. B. Prusiner, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2001**, *98*, 9836-9841.
- [230] M. Viveiros, M. Martins, I. Couto, J. Kristiansen, J. Molnar, L. Amaral, *In Vivo* **2005**, *19*, 733-736.
- [231] D. Bellus, *Science of Synthesis* **2004**, *17*, 160-221.
- [232] K. Pluta, M. Jeleń, B. Morak-Młodawska, M. Zimecki, J. Artym, M. Kocięba, E. Zaczyńska, *European Journal of Medicinal Chemistry* **2017**, *138*, 774-806.
- [233] I. A. Silberg, G. Cormos, D. Oniciu, *Advances in Heterocyclic Chemistry* **2006**, *90*, 205-237.
- [234] E. Holzmänn, *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft* **1888**, *21*, 2056-2071.
- [235] F. Manabu, *Bulletin of the Chemical Society of Japan* **1959**, *32*, 296-299.
- [236] M. Terdic, *Justus Liebigs Annalen der Chemie* **1971**, *746*, 200-206.
- [237] Z. Wang, *Comprehensive Organic Name Reactions and Reagents* **2010**, *589*, 2609-2614.
- [238] L. Kaim, L. Grimaud, *Molecular Rearrangements in Organic Synthesis* **2015**, *19*, 629-660.
- [239] E. A. Nodiff, M. Hausman, *The Journal of Organic Chemistry* **1964**, *29*, 2453-2455.
- [240] O. R. Rodig, R. E. Collier, R. K. Schlatter, *Journal of Medicinal Chemistry* **1966**, *9*, 116-120.
- [241] A. Roe, J. A. Montgomery, W. A. Yarnall, V. A. Hoyle, *The Journal of Organic Chemistry* **1956**, *21*, 28-31.

- [242] R. Galbreath, R. Ingham, *The Journal of Organic Chemistry* **1958**, *23*, 1804-1806.
- [243] D. Ma, Q. Geng, H. Zhang, Y. Jiang, *Angewandte Chemie International Edition* **2010**, *49*, 1291-1294.
- [244] C. Dai, X. Sun, X. Tu, L. Wu, D. Zhan, Q. Zeng, *Chemical Communications* **2012**, *48*, 5367-5369.
- [245] T. Dahl, C. W. Tornøe, B. Bang-Andersen, P. Nielsen, M. Jørgensen, *Angewandte Chemie International Edition* **2008**, *47*, 1726-1728.
- [246] P. R. Sharma, V. Gupta, D. C. Gautam, R. R. Gupta, *Heterocyclic Communications* **2002**, *8*, 195-198.
- [247] N. Sharma, R. Gupta, M. Kumar, R. R. Gupta, *Journal of Fluorine Chemistry* **1999**, *98*, 153-157.
- [248] H. Gilman, R. D. Nelson, *Journal of the American Chemical Society* **1953**, *75*, 5422-5425.
- [249] B. Kutscher, H. R. Dieter, H.-G. Trömer, B. Bartz, J. Engel, A. Kleemann, *Liebigs Annalen der Chemie* **1995**, *1995*, 591-592.
- [250] A. J. Saggiomo, P. N. Craig, M. Gordon, *Journal of Organic Chemistry* **1958**, *23*, 1906-1909.
- [251] C. O. Okafor, *Journal of Heterocyclic Chemistry* **1981**, *18*, 405-407.
- [252] F. Yoneda, T. Ohtaka, Y. Nitta, *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* **1966**, *14*, 698-706.
- [253] E. Reimann, *Methods of Organic Chemistry* **1980**, *4*, 364-410.
- [254] O. R. Rodig, R. E. Collier, R. K. Schlatter, *The Journal of Organic Chemistry* **1964**, *29*, 2652-2658.
- [255] B. Morak-Młodawska, K. Pluta, *Heterocycles* **2007**, *71*, 1347-1361.
- [256] C. O. Okafor, U. C. Okoro, *Dyes and Pigments* **1991**, *16*, 149-163.
- [257] B. Morak-Młodawska, K. Pluta, M. Latocha, K. Suwińska, M. Jeleń, D. Kuśmierz, *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry* **2016**, *31*, 1512-1519.
- [258] Cassella Farbwerke Mainkur AG, *FR 1401481 A* **1965**.
- [259] J. W. Worley, K. W. Ratts, K. L. Cammack, *The Journal of Organic Chemistry* **1975**, *40*, 1731-1734.
- [260] F. H. Clarke, G. B. Silverman, C. M. Watnick, N. Sperber, *The Journal of Organic Chemistry* **1961**, *26*, 1126-1132.
- [261] W. S. Saari, D. W. Cochran, Y. C. Lee, E. L. Cresson, J. P. Springer, M. Williams, J. A. Totaro, G. G. Yarbrough, *Journal of Medicinal Chemistry* **1983**, *26*, 564-569.
- [262] S. K. Dubey, J. M. Seda, E. E. Knaus, *European journal of medicinal chemistry-Chimica therapeutica* **1984**, *19*, 371-373.
- [263] T. Mosmann, *Journal of Immunological Methods* **1983**, *65*, 55-63.
- [264] M. V. Berridge, A. S. Tan, K. D. McCoy, R. Wang, *Biochemica* **1996**, *4*, 14-19.
- [265] A. Min, S.-A. Im, D. K. Kim, S.-H. Song, H.-J. Kim, K.-H. Lee, T.-Y. Kim, S.-W. Han, D.-Y. Oh, T.-Y. Kim, M. J. O'Connor, Y.-J. Bang, *Breast Cancer Research* **2015**, *17*, 1-13.
- [266] J. Senger, *Universität Freiburg* **2016**.
- [267] S. Dreyer-Schmitt, *TU München* **2009**.
- [268] B. Heltweg, J. Trapp, M. Jung, *Methods* **2005**, *36*, 332-337.
- [269] B. Heltweg, F. Dequiedt, E. Verdin, M. Jung, *Analytical Biochemistry* **2003**, *319*, 42-48.
- [270] D. Wegener, F. Wirsching, D. Riester, A. Schwienhorst, *Chemistry & Biology* **2003**, *10*, 61-68.
- [271] A.-T. Hauser, J. M. Gajer, M. Jung, *Methods in Molecular Biology* **2013**, *981*, 211-227.
- [272] B. Heltweg, F. Dequiedt, B. L. Marshall, C. Brauch, M. Yoshida, N. Nishino, E. Verdin, M. Jung, *Journal of Medicinal Chemistry* **2004**, *47*, 5235-5243.
- [273] D. Riester, D. Wegener, C. Hildmann, A. Schwienhorst, *Biochemical and Biophysical Research Communications* **2004**, *324*, 1116-1123.
- [274] T. Heimbürg, F. R. Kolbinger, P. Zeyen, E. Ghazy, D. Herp, K. Schmidtkunz, J. Melesina, T. B. Shaik, F. Erdmann, M. Schmidt, C. Romier, D. Robaa, O. Witt, I. Oehme, M. Jung, W. Sippl, *Journal of Medicinal Chemistry* **2017**, *60*, 10188-10204.
- [275] N. Khan, M. Jeffers, S. Kumar, C. Hackett, F. Boldog, N. Khramtsov, X. Qian, E. Mills, Stanny C. Berghs, N. Carey, Paul W. Finn, Laura S. Collins, A. Tumber, James W. Ritchie, Peter B. Jensen, Henri S. Lichenstein, M. Sehested, *Biochemical Journal* **2008**, *409*, 581-589.
- [276] U. K. Laemmli, *Nature* **1970**, *227*, 680-685.
- [277] P. J. Watson, C. J. Millard, A. M. Riley, N. S. Robertson, L. C. Wright, H. Y. Godage, S. M. Cowley, A. G. Jamieson, B. V. L. Potter, J. W. R. Schwabe, *Nature Communications* **2016**, *7*, 1-13.

- [278] S. Bay, G. Makhloufi, C. Janiak, T. J. J. Müller, *Beilstein Journal of Organic Chemistry* **2014**, *10*, 1006-1016.
- [279] Y. Xiao, G. L. Araldi, Z. Zhao, A. Reddy, S. Karra, N. Brugger, D. Fischer, E. Palmer, B. Bao, S. D. McKenna, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2008**, *18*, 821-824.
- [280] A. A. El-Hamamy, J. Hill, J. Townend, *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1* **1983**, 573-580.
- [281] J. Mokrosz, A. Bojarski, S. Charakchieva-Minol, B. Duszynska, M. Mokrosz, M. Paluchowska, *Archiv der Pharmazie* **1995**, *328*, 604-608.
- [282] J. D. Albright, V. G. DeVries, E. E. Largis, T. G. Miner, M. F. Reich, S. A. Schaffer, R. G. Shepherd, J. Upeslakis, *Journal of Medicinal Chemistry* **1983**, *26*, 1378-1393.
- [283] R. E. Manning, *US 3963780 A* **1976**.
- [284] C. E. Brown, J. McNulty, C. Bordon, R. Yolken, L. Jones-Brando, *Organic & Biomolecular Chemistry* **2016**, *14*, 5951-5955.
- [285] E. Winterfeldt, *Chemische Berichte* **1963**, *96*, 3349-3358.
- [286] S. Sabelle, E. Metais, *US2006/5320A1* **2006**.
- [287] C. J. Evoniuk, G. d. P. Gomes, S. P. Hill, S. Fujita, K. Hanson, I. V. Alabugin, *Journal of the American Chemical Society* **2017**, *139*, 16210-16221.
- [288] E. A. Nodiff, P. N. Craig, *The Journal of Organic Chemistry* **1961**, *26*, 824-828.
- [289] K. Sakamoto, S. Kiriki, T. Ogawa, M. Shinohara, *Vol. US2012/302675 A1*, **2012**.
- [290] C. L. Jones, E. Njomen, B. Sjögren, T. S. Dexheimer, J. J. Tepe, *ACS Chemical Biology* **2017**, *12*, 2240-2247.
- [291] G. Shapiro, J. Moncuso, T. Pierre, S. Leit, R. Deziel, S. David, C. Richard, Y. A. Chantigny, B. Patrick, *WO 2008/055068 A2* **2008**.