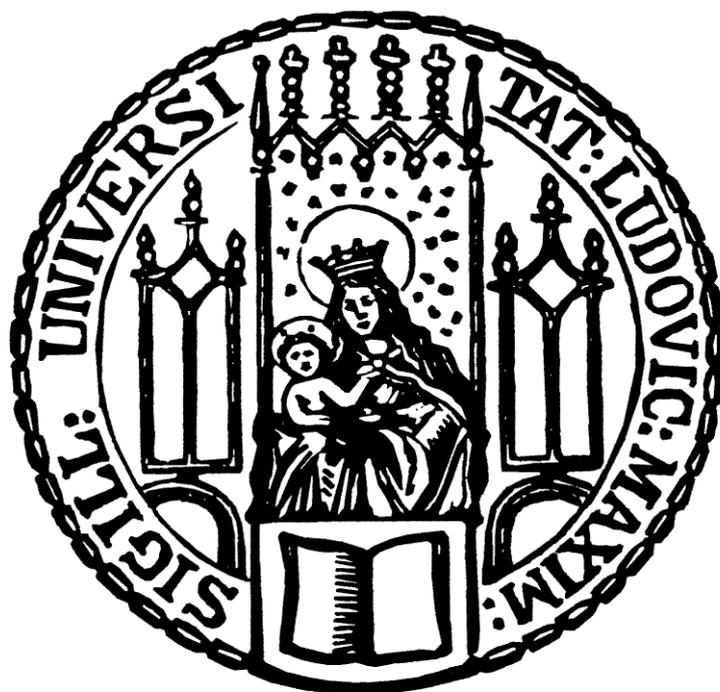


Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Fakultät für
Chemie und Pharmazie der Ludwig-Maximilians-Universität München



**Entwicklung neuer Synthesewege zu den Naturstoffen
Cassiarin A und Zephycandidin A**

Thomas Josef Klaßmüller

aus

Augsburg

2024

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 06.03.2024

Thomas Josef Klaßmüller

Dissertation eingereicht am 12. März 2024

1. Gutachter: Prof. Dr. Franz Bracher

2. Gutachter: Prof. Dr. Simone Moser

Mündliche Prüfung am 30. April 2024

Danksagung

Mein herzlicher Dank gilt Herrn Prof. Dr. Franz Bracher für die Bereitstellung dieser interessanten Themen sowie seine stets großzügige Unterstützung und wohlwollende Förderung dieser Arbeit.

Ein besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. Simone Moser für die Übernahme des Koreferats sowie allen weiteren Mitgliedern der Prüfungskommission, Prof. Dr. Paintner, Prof. Dr. Scherf-Clavel, Prof. Dr. Koch und Prof. Dr. Frieß für die Zeit und Mühe, meine Arbeit zu bewerten.

Dr. Lars Allmendinger und Claudia Glas danke ich für die Aufnahme der NMR-Spektren, Dr. Werner Spahl danke ich für die Messung der Massenspektren. Anna Niedrig danke ich für die Messung der HPLC-Reinheiten und Martina Stadler für die Durchführung der biologischen Testungen meiner Substanzen. Agnes Brem, die als studentische Hilfskraft meine Arbeit unterstützte, danke ich auch.

Allen Mitgliedern des AK Brachers möchte ich für die wunderbare Zeit, die gemeinsamen Momente und die familiäre Atmosphäre danken, in der ich mich als Teil dieser Arbeitsgruppe fühlen durfte. Mein besonderer Dank gilt meinen Laborkollegen Martin Untergehrer, Karl Sauva-geot-Witzku und meinem "Benchnachbarn" Philipp Rühl. Auch möchte ich mich bei Miriam Hollweck bedanken für die gemeinsame Zeit im "Exillabor" während der Coronazeit. Ein herzliches Dankeschön geht auch an die regelmäßigen Teilnehmer unserer Kaffeepausen und Mittagessen (Philipp Rühl, Can Zenger, Pavlos Pelagias, Matthias Frei, Ricky Wirawan, Ina Kunz, Irene Cid und Ferdinand Breu) für die angeregten und anregenden Diskussionen, sei es fachlicher oder persönlicher Natur, für ihre Offenheit und ihre unkomplizierte Hilfe, wenn sie gebraucht wurde. Dank euch wird meine Promotionszeit stets von guten Erinnerungen begleitet sein.

Ein weiterer Dank gebührt Sandra Hemmers für die reibungslose und unkomplizierte Zusammenarbeit bei der Praktikumsbetreuung.

Darüber hinaus möchte ich mich bei meinen Kooperationspartnern bedanken, insbesondere bei Frau Prof. Dr. Gabriele Pradel und ihrem Team für die Durchführung der Tests zur antiplasmodialen Aktivität, bei Frau Prof. Dr. Simone Moser und ihrem Team für die Möglichkeit, an der Weiterentwicklung des Yeast-Three-Hybrid Systems mitzuwirken, sowie bei Dr. Karin Bartel und ihrem Team für die zahlreichen antiproliferativen Tests meiner Substanzen. Ein besonderer Dank geht an Dr. Florian Lengauer für seine Zuverlässigkeit und den konstruktiven, freundschaftlichen Austausch.

Der größte Dank gilt jedoch meinen Eltern Agnes und Herbert und meiner Frau Marina. Ohne eure Förderung, eure Geduld und eure Unterstützung in allen Belangen wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

Veröffentlichungen:

Publikationen:

P. Wang, **T. Klassmueller**, C. Karg, M. Kretschmer, S. Zahler, S. Braig, F. Bracher, A. Vollmar, S. Moser: Using the yeast three-hybrid system for the identification of small molecule – protein interactions with the example of ethinylestradiol.

Biol. Chem. 403(4), 421-431 (**2022**), doi: 10.1515/hsz-2021-0355

T. Klaßmüller, C. Tringali, F. Bracher: A novel approach to 2-arylmethyl-2,3-dihydro-4(1H)-quinazolinones. Total synthesis of the alkaloids Glycozalone-A and Glycozalone-B.

Nat. Prod. Res., 38 (1) 119-127 (**2024**), published online 09. Aug 2022

doi: 10.1080/14786419.2022.2110095

T. Klaßmüller, F. Lengauer, J. Blenninger, F. Geisslinger, K. Bartel and F. Bracher: Zephy-candidine A and synthetic analogues – synthesis and evaluation of biological activity

Eingereicht (März 2024)

Gewidmet

Meinen Eltern Agnes und Herbert

und meiner Frau Marina

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Naturstoffe, Alkaloide und deren Einfluss auf die moderne medizinische Chemie	1
1.2	Cassiarin A: eine neue Leitsubstanz im Kampf gegen Malaria?	6
1.3	Zephycandidin A, ein weiterer vielversprechender Naturstoff aus der Familie der Amarylidaceae	8
1.4	Literaturbekannte Synthesen von Cassiarin A	11
1.5	Literaturbekannte Synthesen von Zephycandidin A	13
2	Themenstellung und Syntheseplanung:	17
2.1	Themenstellung	17
2.1.1	Cassiarin A	17
2.1.2	Zephycandidin A	18
2.2	Konkrete Syntheseplanung	19
2.2.1	Cassiarin A und Analoga: Synthese der Isoxazolbausteine	19
2.2.2	Synthese des Arylmethylketonbausteins und Cyclisierung zum Cassiarin A	22
2.2.3	Syntheseplan zur Darstellung von Zephycandidin A	23
3	Synthesen	26
3.1	Versuche zur Entwicklung einer neuen Syntheseroute zu Cassiarin A über 3,5-disubstituierte Isoxazole	26
3.1.1	Versuche zur Darstellung von 3,5-disubstituierten Isoxazolen über 1,3-dipolare Cycloaddition	26
3.1.2	Versuche zur Darstellung von 3,5-disubstituierten Isoxazolen mittels elektrophiler Cyclisierung	28
3.1.3	Versuche zur Darstellung von 3-Aryl-5-Methylisoxazolen über Palladium-katalysierte Kreuzkupplung	34
3.1.4	Versuche zur Darstellung von Arylmethylketonen mithilfe eines Sulfoxonium-Ylids	39
3.2	Synthese von Cassiarin A und Analoga über die Chromenon-Route nach Morita et al.	43

3.2.1	Optimierung der Synthese des Intermediats Noreugenin	45
3.2.2	Optimierung der Palladium-katalysierten Kreuzkupplung zur Darstellung von 5-Alkynylchromenonen	48
3.2.3	Anellierung zum Cassiarin A über Silber-katalysierte Isochinolin-Synthese	50
3.2.4	Darstellung von Cassiarin A–Analoga mit Variationen an den Positionen 2 und 5	54
3.2.5	Erste biologische Untersuchungen zu Cassiarin A–Analoga	56
3.2.6	Synthese der zweiten Generation Cassiarin A–Analoga	58
3.3	Darstellung von Cassiarin A und Analoga über die Isochinolin-Route nach Gutiérrez et al.	62
3.3.1	Versuch zur Darstellung des MOM-geschützten Benzylbromids A	62
3.3.2	Optimierung der Synthese des unsymmetrischen Isocyanids 123	64
3.3.3	Optimierung der Synthese des 1-Iodisochinolins 124	68
3.3.4	Sonogashira-Kupplung und Cyclisierung zum Cassiarin A	69
3.3.5	Synthese eines Cassiarin A-Analogons mit Variation der 2-Position	70
3.4	Synthese eines derivatisierbaren Cassiarin A-Analogons für ein yeast-three-hybrid screening	71
3.5	Entwicklung einer neuen Syntheseroute zu Zephycandidin A	93
3.5.1	Synthese des 6-Aminophenanthridins	93
3.5.2	Cyclokondensation zum Zephycandidin A	95
3.5.3	Synthese von <i>ortho</i> -Brombenzonitrilen	97
3.5.4	Variationen der Methylendioxy-Struktur und des Rings A	98
3.5.5	Synthese von Variationen am Imidazolring	103
3.6	Yeast three hybrid Screening	106
3.6.1	Allgemeine Methodik des yeast-three-hybrid Screenings	106
3.6.2	Syntheseplanung	108
3.6.3	Synthese der Trimethoprimderivate	109
3.7	Neue Syntheseroute zur Darstellung von Glycozolon A und B	125
4	Biologische Testung	136
4.1	Bestimmung der antimikrobiellen Aktivität mittels Agar-Diffusionstest	136
4.2	Bestimmung der cytotoxischen Aktivität mittels MTT-Test	138

4.2.1	Testergebnisse Cassiarin A und Analoga	140
4.2.2	Testergebnisse Zephy candidin A und Analoga	143
4.2.3	Diskussion der Testergebnisse und Ableitung von Struktur-Aktivitäts-Beziehungen	146
5	Zusammenfassung	152
5.1	Darstellung von Cassiarin A und dessen Analoga	152
5.2	Darstellung von Zephy candidin A und dessen Analoga	161
5.3	Synthese von „chemical tools“ zur Targetidentifizierung mittels yeast-three-hybrid Screening (Y3H)	165
6	Experimenteller Teil	167
6.1	Allgemeine Angaben zur Analytik und präparative Parameter	167
6.2	Allgemeine Synthesevorschriften	170
6.3	Beschreibung der Substanzen	173
6.4	Biologische Testmethoden	265
6.4.1	Agar-Diffusionstest	265
6.4.2	MTT-Test an der HL-60 Zelllinie	266
6.4.3	MTT-Test an MCF-7-, MDA-MB-231-, Jurkat-, HL-60- und CCRF-CEM-Zelllinien durch Dr. Florian Lengauer	266
6.4.4	Testung auf antiplasmodiale Aktivität durch Dr. Julius Ngwa	267
7	Abkürzungsverzeichnis	268
8	Literaturverzeichnis	271

1 Einleitung

1.1 Naturstoffe, Alkaloide und deren Einfluss auf die moderne medizinische Chemie

Die Welt der Pflanzen ist eine unerschöpfliche Quelle für vielfältige Substanzen, die nicht nur das Überleben der Pflanzen selbst sichern, sondern auch von Nutzen für Mensch und Tier sind. Dabei produzieren Pflanzen neben den primären Pflanzenstoffen (Kohlenhydrate, Proteine und Lipide) auch sekundäre. Diese Stoffe, die für das eigentliche Überleben der Pflanzen unter idealisierten Bedingungen nicht notwendig sind, dienen naturgemäß als Waffe gegen Fressfeinde, als Pheromone für potentielle Bestäuber, als Schutz vor UV-Strahlung oder als Kommunikationsmittel innerhalb einer Pflanzengemeinschaft^[1]. Jedoch erwiesen sich bei Untersuchungen und Beobachtungen einige dieser Substanzen physiologisch als sehr aktiv. Diese Aktivität kommt nicht zuletzt durch die Jahrtausende währende Evolution dieser Stoffe, die sich dadurch in ihrer Aktivität kontinuierlich verbesserten, zustande. Nutzten die Menschen zu Beginn ihrer Geschichte noch Pflanzenteile oder ganze Pflanzen, um deren Wirkung zu erhalten, konnten mithilfe der Fortschritte der modernen Chemie und Technologie einzelne Reinsubstanzen isoliert und charakterisiert werden, die für die jeweiligen Wirkungen verantwortlich sind. Zu den ersten Substanzen, die zu Beginn des 19. Jahrhunderts isoliert wurden und noch immer im pharmazeutischen Gebrauch sind, zählen zum Beispiel Morphin (**1**) (1804 Friedrich Sertürner), Atropin (**2**) (1831 Heinrich Mein) und Chinin (**3**) (1820 Pierre-Joseph Pelletier und Joseph Bienaimé Caventon)^[2].

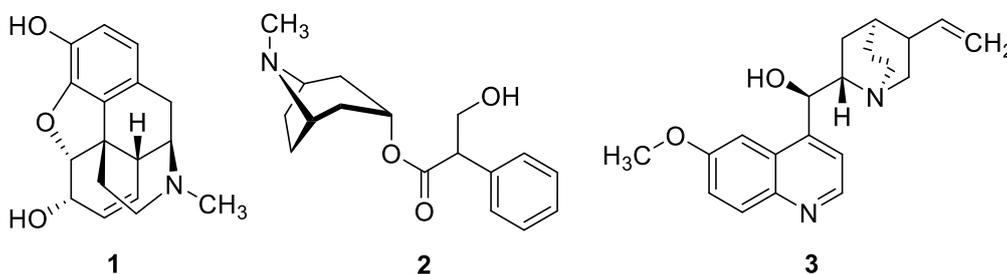


Abbildung 1: Beispiele der ersten als Reinstoffe aus Pflanzen isolierten Naturstoffe: Morphin (**1**), Atropin (**2**) und Chinin (**3**)

Neben ihren potenten biologischen Aktivitäten ist allen genannten Substanzen gemein, dass sie zur Stoffklasse der Alkaloide zählen. Der Begriff Alkaloide wurde 1819 zuerst von Carl Friedrich Wilhelm Meißner verwendet, jedoch von diesem nicht genauer definiert. Aufgrund

Einleitung

der rasanten Zunahme an neu entdeckten Substanzen, die willkürlich als Alkaloide bezeichnet wurden, war diese Stoffklasse in kurzer Zeit zu heterogen, um eine allgemein zufriedenstellende Definition zu finden. Winterstein und Trier bezeichneten die Alkaloide beispielsweise schlichtweg als „basische, stickstoffhaltige Substanzen pflanzlichen oder tierischen Ursprungs“^{[3][4]}. Den Konsens der meisten gängigen Definitionen für Alkaloide fasst S. William Pelletier folgendermaßen zusammen: „Alkaloide sind Naturstoffe, vorzugsweise aus Pflanzen, mit komplexer molekularer Struktur und signifikanter pharmakologischer Aktivität, die ein meist basisches Stickstoffatom als Teil eines heterocyclischen Systems besitzen“^[3]. Gleichzeitig schränkt er jedoch auch ein, dass man Alkaloide „nicht beschreiben kann, man sie jedoch erkennt, wenn man sie sieht“^[3]. Die Eigenschaften eines basischen Stickstoffes macht Alkaloide aus chemischer Sicht besonders interessant, da dieser unter physiologischen Bedingungen protoniert werden kann, was die Wasserlöslichkeit und somit auch die Bioverfügbarkeit verbessern kann. Auch aus präparativer Sicht kann dieser Vorteil genutzt werden, da diese Substanzen durch Säurebehandlung und anschließende Ausfällung aus organischen Lösungsmitteln auch industriell im Multi-Kilogramm-Maßstab einfach als Reinstoffen gewonnen werden können.

Immer leistungsfähigere Trennungs- und Analysemethoden machen heutzutage die Identifizierung kleinster Mengen neuer Naturstoffe aus komplexen Gemischen möglich. Da oftmals eine gewaltige Menge Pflanzenmaterial aufwendig bearbeitet werden müsste, um eine für biologische Testungen ausreichende Menge der Substanzen zu erhalten, ist die Entwicklung von Total- oder Partialsynthesen dieser Stoffe meist unumgänglich. Im Idealfall, der jedoch nur selten eintritt, können Naturstoffe direkt als Arzneistoffe eingesetzt werden. Prominente Beispiele hierfür finden sich vor allem in der Chemotherapie: Paclitaxel (**4**), Trabectedin (**5**), oder die Vinca-Alkaloide Vincristin (**6**) und Vinblastin (**7**)^[5]. Auch außerhalb der Krebstherapie finden sich Naturstoffe als Arzneistoffe wieder, so zum Beispiel das sehr starke Analgetikum Morphin (**2**), das als Leitstruktur die Klasse der Opioid-Analgetika begründete, oder die Antibiotika Benzylpenicillin (**8**) und Erythromycin A (**9**), die zahlreichen β -Lactam- bzw. Makrolidantibiotika als Vorlage dienten.

Einleitung

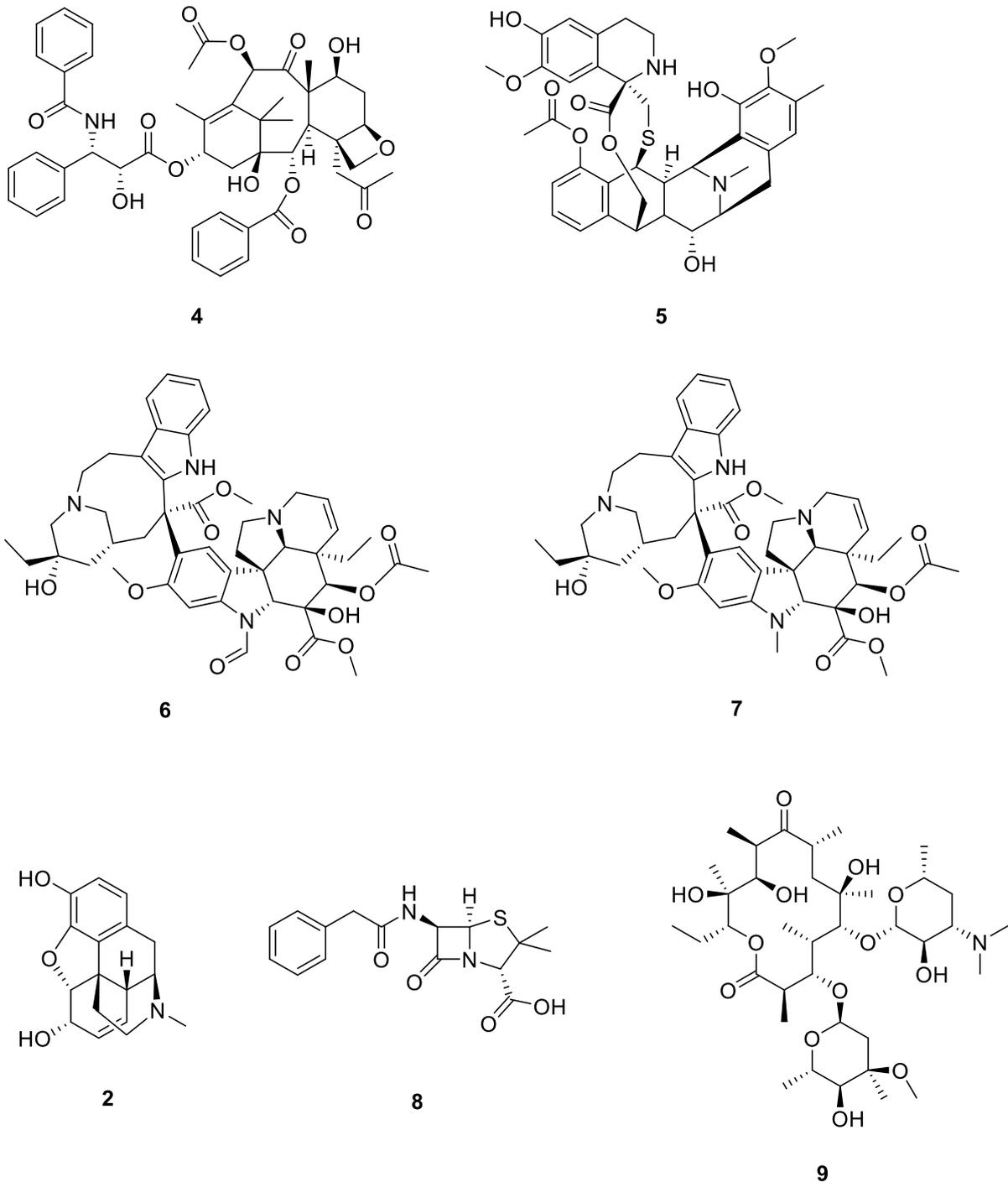


Abbildung 2: Beispiele für Naturstoffe, die direkt als Arzneimittel eingesetzt werden: Paclitaxel (4), Trabectedin (5), Vincristin (6), Vinblastin (7), Morphin (2), Benzylpenicillin (8) und Erythromycin A (9)

Jedoch können ungünstige physikochemische Eigenschaften der Naturstoffe deren direkten Einsatz als Wirkstoff unmöglich machen. Mithilfe einer Total- oder Partialsynthese können sinnvolle und gezielte Veränderungen der Substanz realisiert werden und somit die physikochemischen Eigenschaften verbessert werden. Zusätzlich dazu können durch die Erarbeitung von Struktur-Aktivitäts-Beziehungen die jeweiligen Variationen bewertet werden.

Einleitung

Dadurch können viele Parameter verändert werden, insbesondere die Wasserlöslichkeit, aber auch Selektivität und Aktivität. Auf diese Weise sind aus Naturstoffen als Leitsubstanzen viele zugelassene Arzneistoffe entstanden. Prominente Beispiele sind Chloroquin (**10**), für das Chinin (**3**) Pate stand, und die beiden Zytostatika Topotecan (**14**) und Irinotecan (**15**), die aus Camptothecin (**13**) entwickelt wurden.

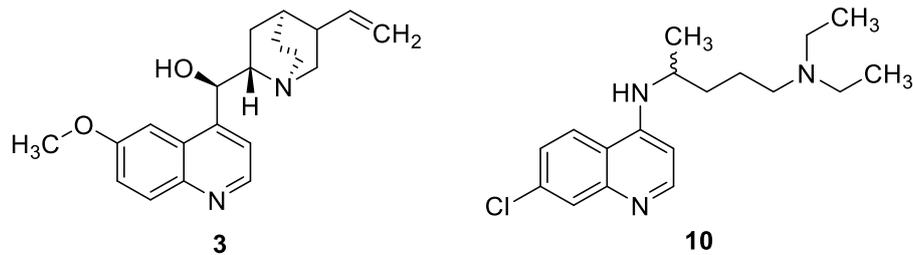


Abbildung 3: Das Antiprotozoikum Chloroquin (**10**), das aus der Leitstruktur Chinin (**3**) entwickelt wurde

Camptothecin (**11**) wurde 1966 von Wani und Wall als pharmakologisch aktive Substanz aus *Camptotheca acuminata* (Nyssaceae) isoliert^[6], nachdem ein Screening des Extraktes aus dieser Pflanze in den 1950er Jahren signifikante antitumorale Aktivität gezeigt hatte^[5]. Jedoch besitzt das Molekül sehr schlechte Löslichkeit in Wasser und gängigen organischen Lösungsmitteln. Diese schlechte Wasserlöslichkeit wollte man seinerzeit durch basische Hydrolyse des Lactonrings umgehen, woraus das Natriumsalz **12** entstand, was jedoch mit einer erheblichen Verschlechterung der cytotoxischen Aktivität einherging.

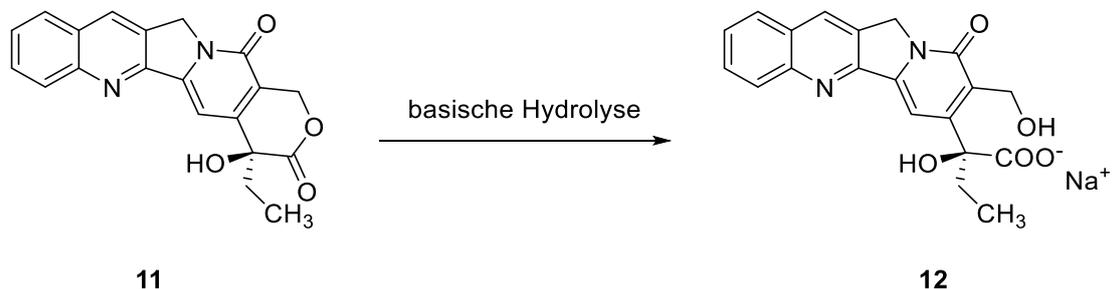


Abbildung 4: Steigerung der Wasserlöslichkeit des Camptothecin (**11**) durch Öffnung des Lactonrings mittels basischer Hydrolyse zum Natriumsalz **12**, was jedoch in einer deutlichen Abnahme der cytotoxischen Aktivität resultierte

Einleitung

Durch das scheinbar unlösliche Problem, die Wasserlöslichkeit bei gleichbleibender Aktivität zu steigern, verloren die Wissenschaftler und Wissenschaftlerinnen zunächst das Interesse am Camptothecin. Die Entschlüsselung des einzigartigen Wirkmechanismus als Topoisomerase I-Inhibitor durch Hsiang et al.^[7] und die Entdeckung des 10-Hydroxycamptothecins, das sogar noch höhere Aktivität als Camptothecin aufweist, wurde das Interesse der Forscher in den 1980er Jahren wieder geweckt. Dadurch waren chemische Variationen an Ring A des Grundkörpers möglich, die zunächst nach intensiver Forschung in der Entwicklung von Topotecan gipfelten, welches heutzutage als Hydrochlorid unter dem Namen Hycamtin[®] als Kapseln oder Infusionslösungen vor allem gegen metastasierte Ovarialkarzinome und kleinzellige Bronchialkarzinome eingesetzt wird. Als zweiter Vertreter dieser Stoffklasse wurde Irinotecan (Campto[®]) entwickelt. Irinotecan wird vor allem zur Behandlung des metastasierten Kolonkarzinoms in Kombination mit 5-Fluorouracil und Folsäure verwendet.

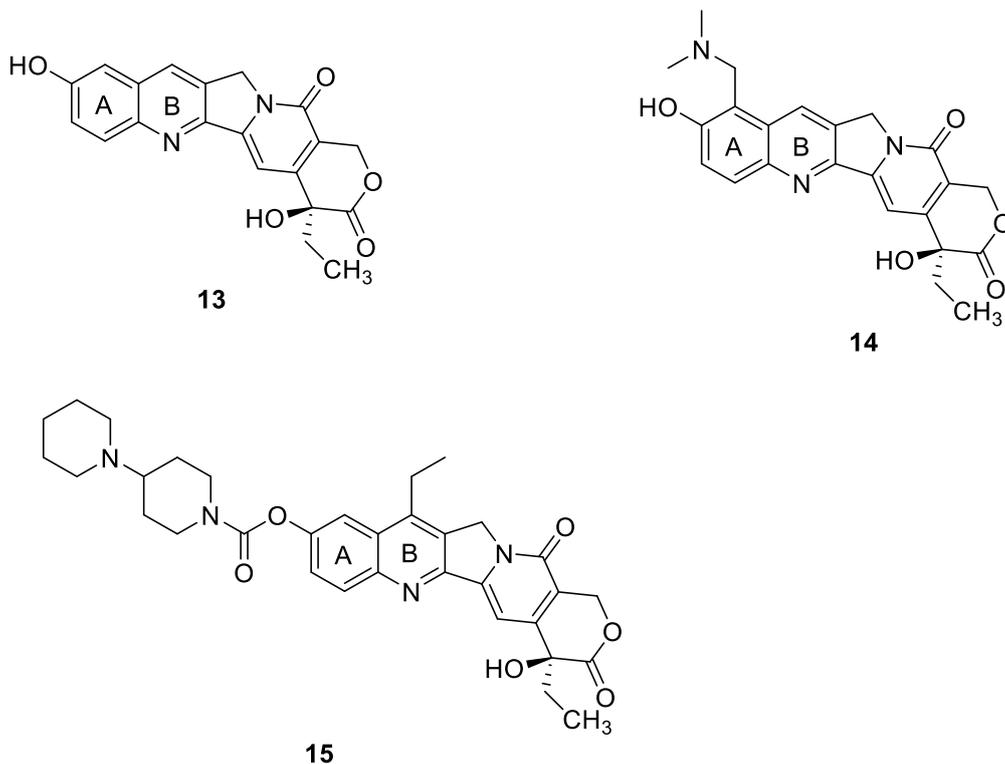


Abbildung 5: Das als Leitstruktur dienende 10-Hydroxycamptothecin (**13**) und die beiden daraus entwickelten Arzneistoffe Topotecan (**14**) mit Variation an Ring A und Irinotecan (**15**) mit Variation an Ring B und der Hydroxygruppe

Diese Entwicklung zeigt, dass die Erforschung neuer Wirkstoffe, die auf Naturstoffe als Leitstrukturen gestützt sind, ein hochaktuelles Thema der modernen Arzneimittelentwicklung darstellt und einen gängigen Arbeitsablauf in selbiger darstellt.

1.2 Cassiarin A: eine neue Leitsubstanz im Kampf gegen Malaria?

Weltweit breiten sich immer mehr Malariaerreger aus, die immer häufiger gegen die zugelassenen Medikamente Resistenzen aufweisen^{[8][9]}. Daher ist die Forschung an neueren Wirkstoffen gegen diese Krankheit von internationaler Bedeutung. Einen wissenschaftlichen Meilenstein im Kampf gegen Malaria errang das Artemisinin, ein Naturstoff gewonnen aus der Pflanze *Artemisia annua* (Asteraceae). Die Entdeckung und Charakterisierung in den 1970er Jahren und die Entwicklung von Derivaten des Artemisinins, die anschließend weltweit als Arzneimittel zugelassen wurden, brachten der Entdeckerin Tu Youyou im Jahr 2015 den Nobelpreis für Medizin und Physiologie ein^[10].

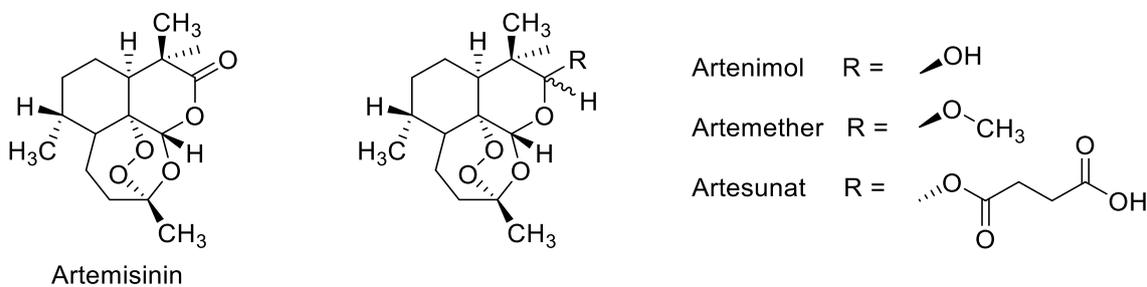


Abbildung 6: Struktur des Artemisinins und die bekanntesten Derivate davon, die aktuell gegen *Malaria tropica* in Kombinationstherapien im Einsatz sind

Doch nahmen mit vermehrter Anwendung dieser Stoffklasse unglücklicherweise auch die Resistenzen gegen Artemisininderivate zu, obwohl diese vorwiegend in Kombinationstherapien mit anderen Malariamedikamenten, sogenannten ACT (**A**rtemisinin based **c**ombination **t**herapy), eingesetzt werden, weshalb aus dem einstmaligen scharfen Schwert ein mit der Zeit immer stumpferes wird^[11]. Obwohl die Forschung an Malaria-Impfstoffen in den letzten Jahren deutlich intensiviert wurde^[12] und einige vielversprechenden Kandidaten bereits klinische Studien durchlaufen, findet sich aktuell noch kein Impfstoff auf dem Markt^[13]. Auch durch diese noch fehlende Prävention dieser potentiell lebensbedrohlichen Krankheit steht die Entwicklung neuer, medikamentöser Therapiemöglichkeiten von *Malaria tropica* bei vielen forschenden Arbeitsgruppen weltweit auf der Tagesordnung.

In Indonesien wird die Pflanze *Cassia siamea* (Leguminosae) – dort besser unter dem Namen „Johar“ bekannt – in der traditionellen Medizin als Heilmittel gegen Malaria verwendet. In diversen *in vitro*- und *in vivo*-Studien konnte die antiplasmodiale Aktivität der Blätter verschiedener *Cassia*-Arten gezeigt werden, wobei für *Cassia siamea* die höchste antimalariale Aktivität detektiert wurde. Im Jahr 2007 konnten Morita et al.^[14] die beiden Naturstoffe Cassi-

Einleitung

arin A und B (**16** und **17**) mit ihrem in Naturstoffen einzigartigen Tricyclus aus den Blättern von *Cassia siamea* isolieren und die antimalariale Aktivität mit dem Testverfahren nach Traeger und Jensen^[15] bestimmen. Dabei wurde gegen den Malariaerreger *Plasmodium falciparum* für Cassiarin A ein IC₅₀-Wert von 0,023 µM ermittelt. Für Cassiarin B konnte ein IC₅₀-Wert von 22 µM bestimmt werden. Jedoch wurde im Rahmen dieser Aktivitätsbestimmung versäumt, gängige Malariawirkstoffe zu testen, um diese Testergebnisse mit vergleichbaren Daten einordnen zu können. Jedoch kann zum Vergleich für Chloroquin als gängigsten Wirkstoff gegen Malaria ein IC₅₀-Wert von 0,015 µM in der Literatur gefunden werden^[16].

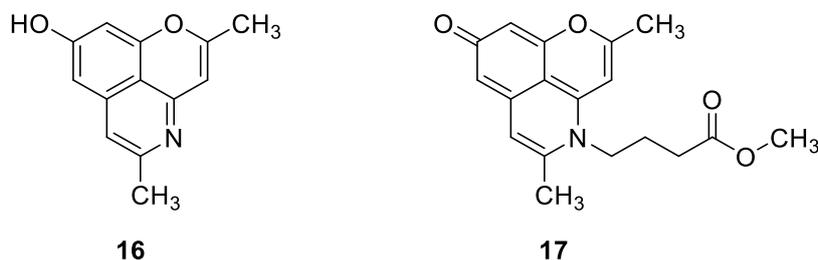


Abbildung 7: Die von Morita et al.^[14] aus *Cassia siamea* isolierten Naturstoffe Cassiarin A (**16**) und Cassiarin B (**17**) mit antiplasmodialer Aktivität gegenüber *Plasmodium falciparum*

Die Tatsache, dass die Aktivität von Cassiarin A diesen Daten nach zu urteilen mit der des Chloroquin vergleichbar ist, hat in den darauffolgenden Jahren viele Forschungsgruppen weltweit dazu animiert die Forschung an Cassiarin A zu intensivieren. Mehrere Studien bestätigten die antimalariale Aktivität von Cassiarin A^{[14][17]}. Matsumoto et al. zeigten zudem in einer Studie an Blutgefäßen von Ratten, dass Cassiarin A auch vasodilatierende Aktivität zeigt^[18]. Eine erste Untersuchung von Struktur-Aktivitäts-Beziehungen von Cassiarin A lieferten Luesakul et al. im Jahr 2014^[19]. Diese nahmen die Ähnlichkeit von Cassiarin A mit dem in den USA als Zytostatikum zugelassenen tricyclischen Naphthalimid-Analogen Amonafide (**18**) zum Anlass Derivate des Cassiarin A zu synthetisieren und diese auf ihre cytotoxische Aktivität gegenüber mehreren Krebszelllinien zu untersuchen (vgl. Abbildung 8). Dabei wurden insgesamt 12 neue Verbindungen durch Funktionalisierung der Hydroxygruppe - zu Estern oder Ethern – synthetisiert und anschließend getestet. Lediglich drei dieser Verbindungen zeigten schwache bis moderate Cytotoxizität, wobei Cassiarin A selbst gegenüber allen Zelllinien inaktiv war.

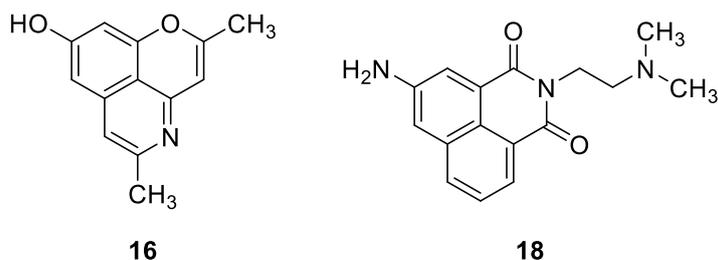


Abbildung 8: Strukturähnlichkeit zwischen Cassiarin A (**16**) und dem Zytostatikum Amonafide (**18**)

Insgesamt betrachtet wurde für Cassiarin A eine breite Basis an Grundlagenforschung betrieben. Jedoch wurden bisher dessen Struktur-Aktivitäts-Beziehungen gegenüber *Plasmodium falciparum* und diversen Tumorzelllinien nur in genannter Arbeit von Luesakul et al. untersucht, weshalb darauf in dieser Arbeit das Hauptaugenmerk gelegt werden soll.

1.3 Zephyrandin A, ein weiterer vielversprechender Naturstoff aus der Familie der Amaryllidaceae

Im Jahr 1990 isolierten Pettit et al.^[20] ein Gemisch mehrerer Naturstoffe aus den Zwiebeln von *Zephyranthes candida* (Amaryllidaceae) und konnten erstmals deren cytotoxische Aktivität nachweisen. Weitere 15 Alkaloide wurden im Jahr 2012 von Luo et al.^[21] aus allen Pflanzenteilen derselben Pflanze isoliert. Von diesen Alkaloiden zeigten vier gegen verschiedene Zelllinien eine höhere cytotoxische Aktivität als Cisplatin, das in diesem Assay als Positivkontrolle verwendet wurde. Diese Ergebnisse unterstreichen die Forschungsergebnisse anderer Arbeitsgruppen, die vielen Vertretern der Pflanzenfamilie der Amaryllidaceae cytotoxische Eigenschaften attestieren^{[22][23][24][25][26]}. Die meisten dieser aktiven Substanzen leiten sich vom Trisphaeridin (**19**) oder vom Lycorin (**20**) ab. Diese Verbindungen tauchen in den meisten Pflanzen dieser Familie auf und dienten bereits mehreren Forschungsgruppen als Leitstrukturen zur Weiterentwicklung cytotoxisch aktiver Substanzen^[27]. Neben der cytotoxischen Aktivität zeigen einige dieser Verbindungen auch Acetylcholinesterase (AChE) hemmende Aktivität, insbesondere Galanthamin (**21**)^[28]. Aus diesem Grund werden aktuell diverse Alkaloide der Amaryllidaceae als potentielle Therapeutika gegen Morbus Alzheimer untersucht^[29].

Einleitung

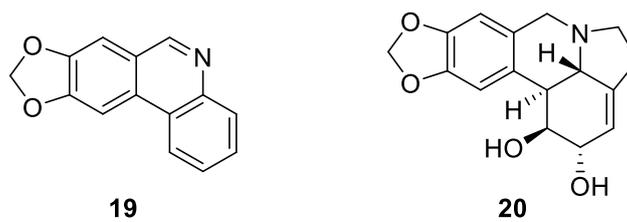


Abbildung 9: Die Alkaloide Trisphaeridin (**19**) und Lycorin (**20**), die in den meisten Pflanzen der Familie der Amarylidaceae vorkommen

Im Jahr 2016 wurde von Zhan et al. aus ganzen, getrockneten Pflanzen von *Zephyrantes candida* eine neue Substanz isoliert, das Zephycandidin A (**21**)^[30]. Diese Verbindung stellte das erste natürlich vorkommende Imidazo[1,2-f]phenanthridin dar und ist bis heute der einzige in der Natur aufgefundene Vertreter dieser Stoffklasse.

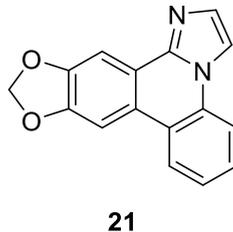


Abbildung 10: Strukturformel von Zephycandidin A, dem ersten natürlich vorkommenden Imidazo[1,2-f]phenanthridin-Alkaloid

Durch Untersuchungen an verschiedenen Krebszelllinien - gegenüber Cisplatin als Referenz – konnte eine vielversprechende cytotoxische Aktivität von Zephycandidin A (**21**) festgestellt werden (vgl. Abbildung 11). Weiter in dieser Arbeit durchgeführte Studien deuten auch darauf hin, dass die Zellen überwiegend apoptotisch zu Grunde gehen, der genaue Mechanismus ist jedoch unbekannt.

Einleitung

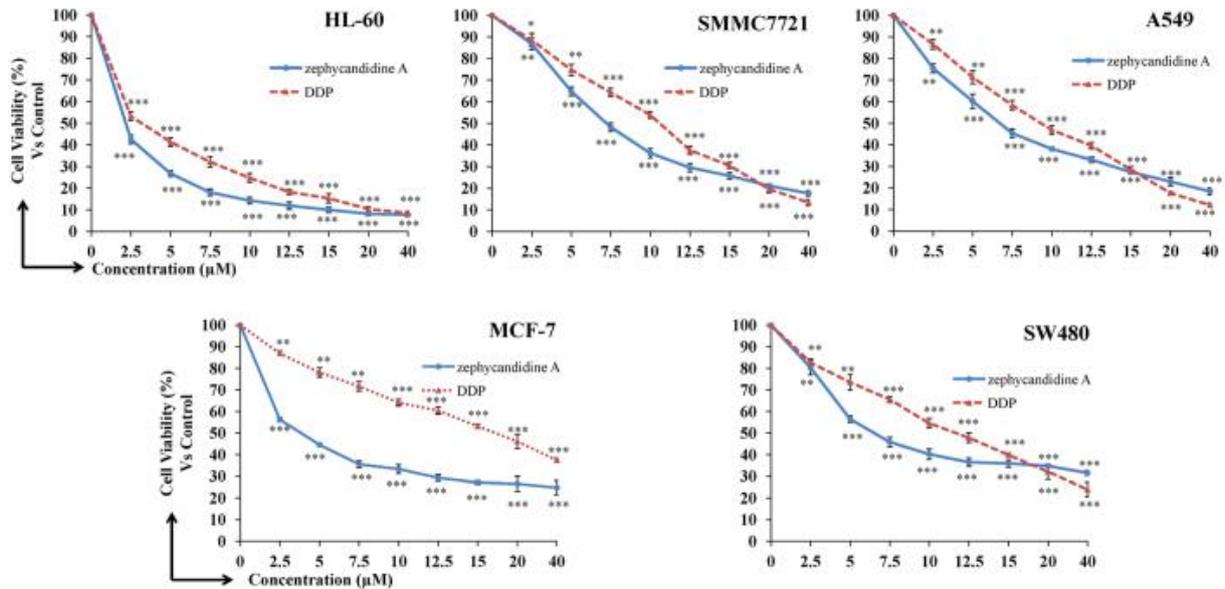


Abbildung 11: Testung auf cytotoxische Aktivität von Zhan et al. ^[30] gegenüber den Zelllinien HL-60 (humane myeloische Leukämie), SMMC 7721 (Leberzellkarzinom), A549 (Lungenkarzinom), MCF-7 (Mammakarzinom) und SW480 (Kolonkarzinom); Zephycandidine A ist in blau, Cisplatin in rot dargestellt

Auch Untersuchungen zur AChE-inhibierenden Aktivität wurden durchgeführt. Bei einem IC_{50} -Wert von 128 μM im Vergleich zu Galanthamin als Positivkontrolle ($IC_{50} = 1,02 \mu\text{M}$) kann diese Aktivität allerdings als vernachlässigbar angesehen werden. Auch hier deuten die bisher publizierten Daten darauf hin, dass eine weitere Untersuchung von Struktur-Aktivitäts-Beziehungen zu vielversprechenden Ergebnissen hinsichtlich cytotoxischer Aktivität führen könnte.

1.4 Literaturbekannte Synthesen von Cassiarin A

Cassiarin A wurde bereits 2007 von Morita et al.^[14] isoliert und charakterisiert, zudem sind auch aktuell schon mehrere Möglichkeiten zur Darstellung beschrieben. Rudyanto et al. beschrieben bereits 2008 die erste Totalsynthese^[31]. Ausgehend von Methyl-2,4-dihydroxy-6-iodbenzoat (**23**), welches in vier Schritten synthetisiert wurde, verläuft diese Route in drei Schritten – nach Schützung der Hydroxygruppen mit Methoxymethylchlorid, über Sonogashira-Reaktion mit Propin zu **24** und Cyclisierung - zum entsprechenden Isocumarin **25**. Nach Umsetzung zum Isochinolinon (**26**) in ammoniak-alkalischem Milieu kann durch Triflierung und Sonogashira-Kupplung das Alkin **27** erhalten werden, welches mithilfe von 10-prozentiger Salzsäure zum Cassiarin A (**16**) cyclisiert werden kann.

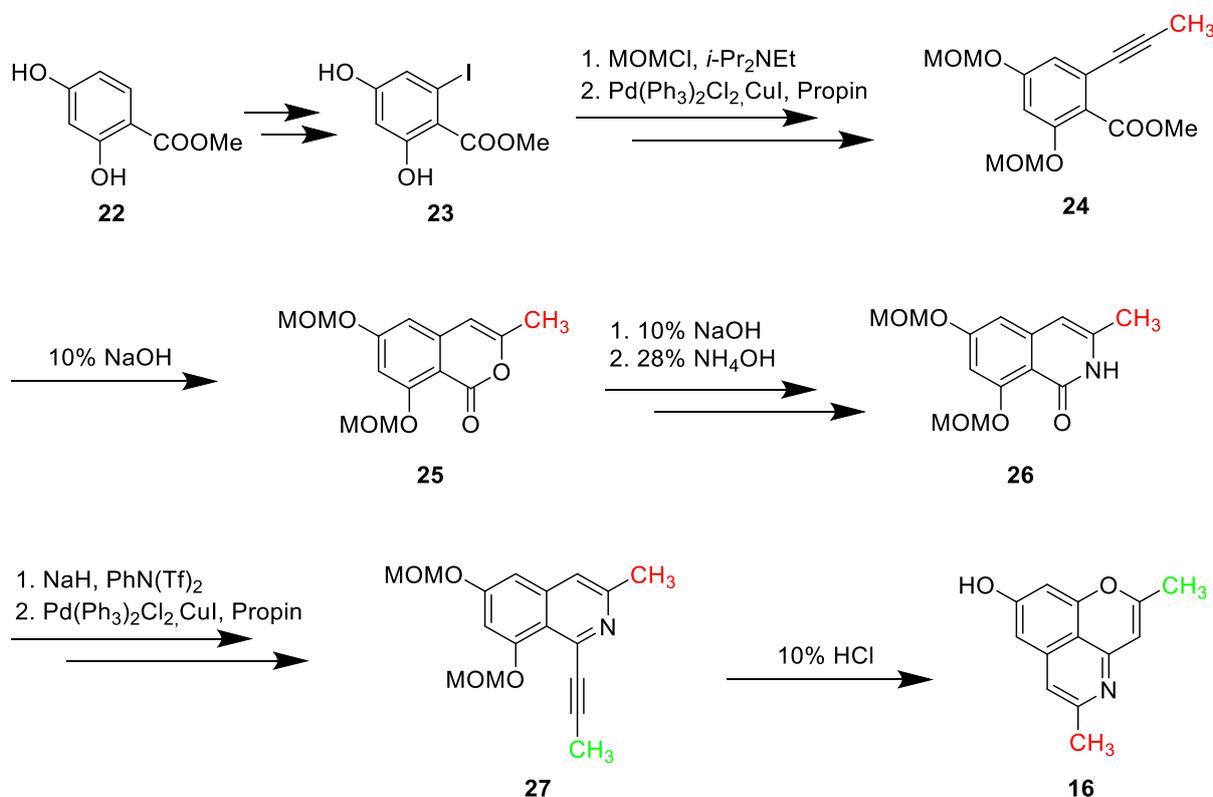


Abbildung 12: Erste Totalsynthese von Cassiarin A (**16**) nach Rudyanto et al.^[31].

Einen anderen Ansatz verfolgten Yao et al.^[32] mit einer Synthese über ein Chromenon-Intermediat. Nach Synthese von 5,7-Dihydroxy-2-methyl-4*H*-chromen-4-on (**28**) über eine einstufige Synthese nach Murti et al.^[33] konnte nach Schützung, Triflierung zu **29** und Sonogashira-Kupplung das entsprechende Alkin (**30**) erhalten werden. Cassiarin A konnte über silberkatalysierten Ringschluss und nach Reaktion mit gasförmigem Ammoniak zu **31** und Entschützung mit Salzsäure in einem Arbeitsgang dargestellt werden. Dieselbe Route mit

Einleitung

leicht veränderten Bedingungen verwendeten auch Morita et al.^[17]. Ausgehend vom selben 5-Alkynylchromenon **30** wurde in dieser Methode die Dreifachbindung zum Arylmethylketon hydratisiert. Das Keton **32** reagierte daraufhin in einer intramolekularen Kondensationsreaktion unter Zusatz von Ammoniumacetat gefolgt von saurer Entschützung der MOM-Schutzgruppe zum Cassiarin A (**16**).

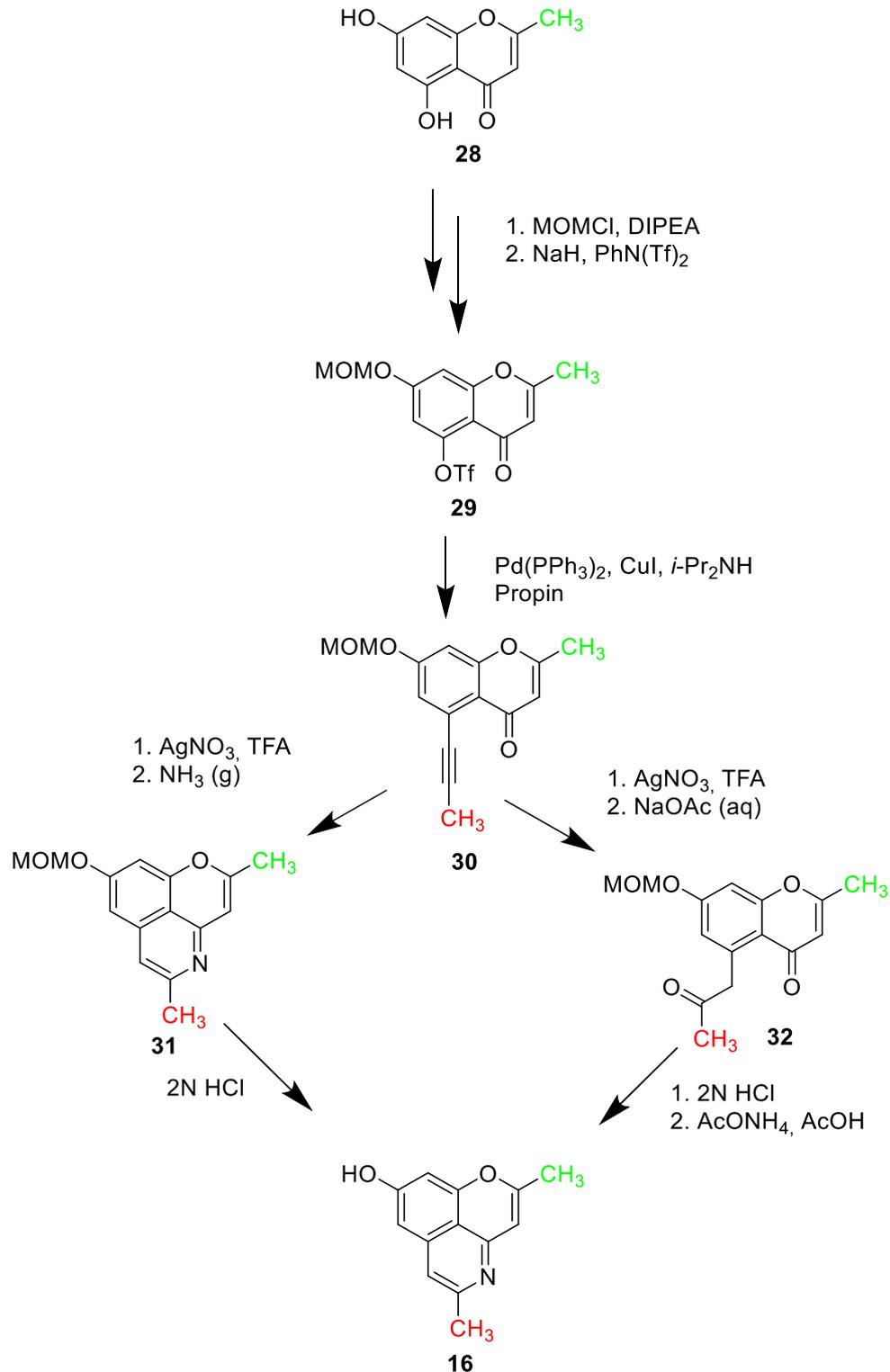


Abbildung 13: Darstellung von Cassiarin A nach Yao et al.^[32] (links) und Morita et al.^[17] (rechts)

Einleitung

Eine weitere Möglichkeit zur Synthese entwickelten Gutiérrez et al.^[34] im Jahr 2016. Hierbei wurde das CH-azide Tosylmethylisocyanid (TosMIC) vom nach Literatur synthetisierten Benzylbromid **34**^[35] mit Methyljodid an der gleichen Position unter Bildung des Isonitrils **35** asymmetrisch alkyliert. Dieses konnte mit N-Iodsuccinimid und anschließender Alkalibehandlung unter Abspaltung der Tosylgruppe zum 1-Iodisochinolin **36** cyclisiert werden. Nach Sonogashira-Kupplung mit Propin zum Alkin **27** und anschließender saurer Entschützung und Cyclisierung konnte Cassiarin A (**16**) in guter Ausbeute erhalten werden.

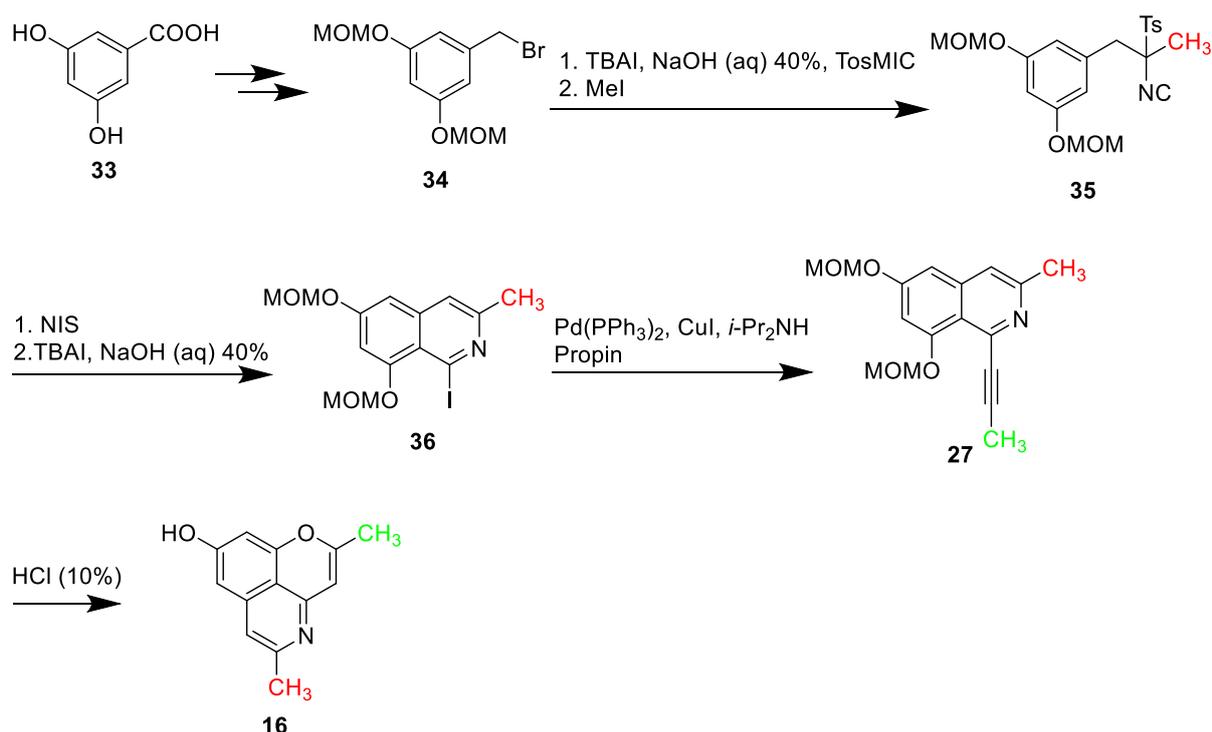


Abbildung 14: Darstellung von Cassiarin A nach Gutiérrez et al.^[34]

Zudem erarbeiteten Kanputhorn et al.^[36] eine partialsynthetische Darstellung von Cassiarin A aus Barakol, einem weiteren Naturstoff aus *Cassia siamea*.

1.5 Literaturbekannte Synthesen von Zephycandidin A

Im Laufe der Arbeit an diesem Projekt wurden mehrere Möglichkeiten zur Darstellung von Zephycandidin A publiziert. Die erste davon – eine Partialsynthese - veröffentlichten Murphy et al. im Jahr 2020^[37]. Ausgehend vom Alkaloid Haemanthamin wurde das [1,3]Dioxolo[4,5-*j*]phenanthridin durch thermische Zersetzung bei 190 – 195°C für 24 h in 20% Ausbeute er-

Einleitung

halten. Anschließend wurde **B** mit 1,2-Dibromethan 7 Tage lang bei 90°C gerührt, um das Salz **C** zu erhalten. Dieses wurde bei -78°C zu flüssigem Ammoniak gegeben, anschließend bei -33°C zum Rückfluss erwärmt und wieder auf -78°C gekühlt. Nach Zugabe von Braunstein und Natriumcarbonat im Überschuss wurde das Gemisch erneut auf -33°C erwärmt, eine Stunde gerührt und anschließend auf Raumtemperatur erwärmt, um den Ammoniak abdampfen zu lassen. Das Gemisch wurde danach in Toluol 3 h zum Rückfluss erhitzt, um Zephycandidin A (**21**) in 54% Ausbeute zu erhalten^[38]. Sowohl die Aufwändigkeit und Dauer der Synthese als auch die fehlende Möglichkeit Analoga über diese Route darzustellen, lassen die partialsynthetische Darstellung von Zephycandidin A nicht attraktiv erscheinen.

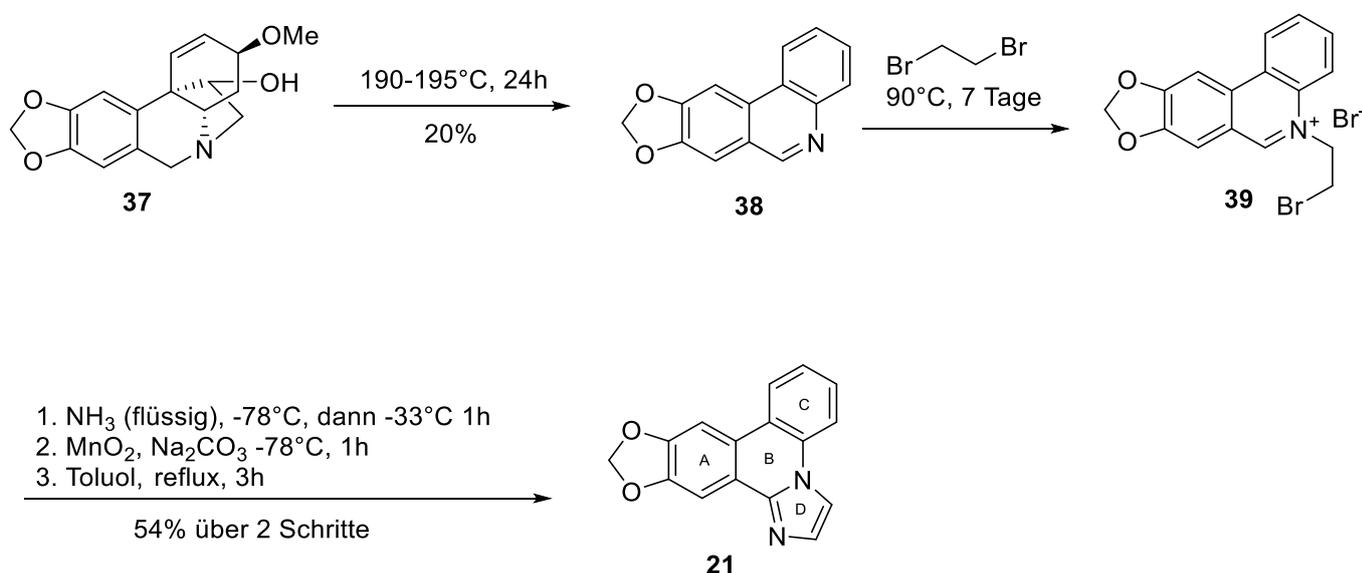


Abbildung 15: Erste partialsynthetische Darstellung von Zephycandidin A nach Murphy et al.^[37]

Den ersten totalsynthetischen Zugang beschrieben Sheng et al.^[39] im Jahr 2022. Die erste Möglichkeit umfasste hierbei die Palladium-katalysierte „doppelte Kreuzkupplung“ eines 2-Arylimidazols (**41**) mit einem 1,2-dihalogenierten Benzen (**42**), was allerdings zu einem Gemisch zweier Isomere (**21** und **43**) führte, welches nur aufwändig mittels präparativer HPLC aufgetrennt werden konnte. Eine weitere Darstellungsmöglichkeit wurde durch die Kreuzkupplungsreaktion eines 2-(2-Bromaryl)imidazols (**44**) mit 2-Iodphenylboronsäure (**46**) beschrieben. Diese Reaktion vermied durch den regioselektiven Charakter die Bildung von Isomeren, konnte aber aufgrund der geringen Ausbeute (25% im letzten Schritt) und der harschen Bedingungen (36 Stunden Reaktionszeit bei 110°C) nicht überzeugen.

Einleitung

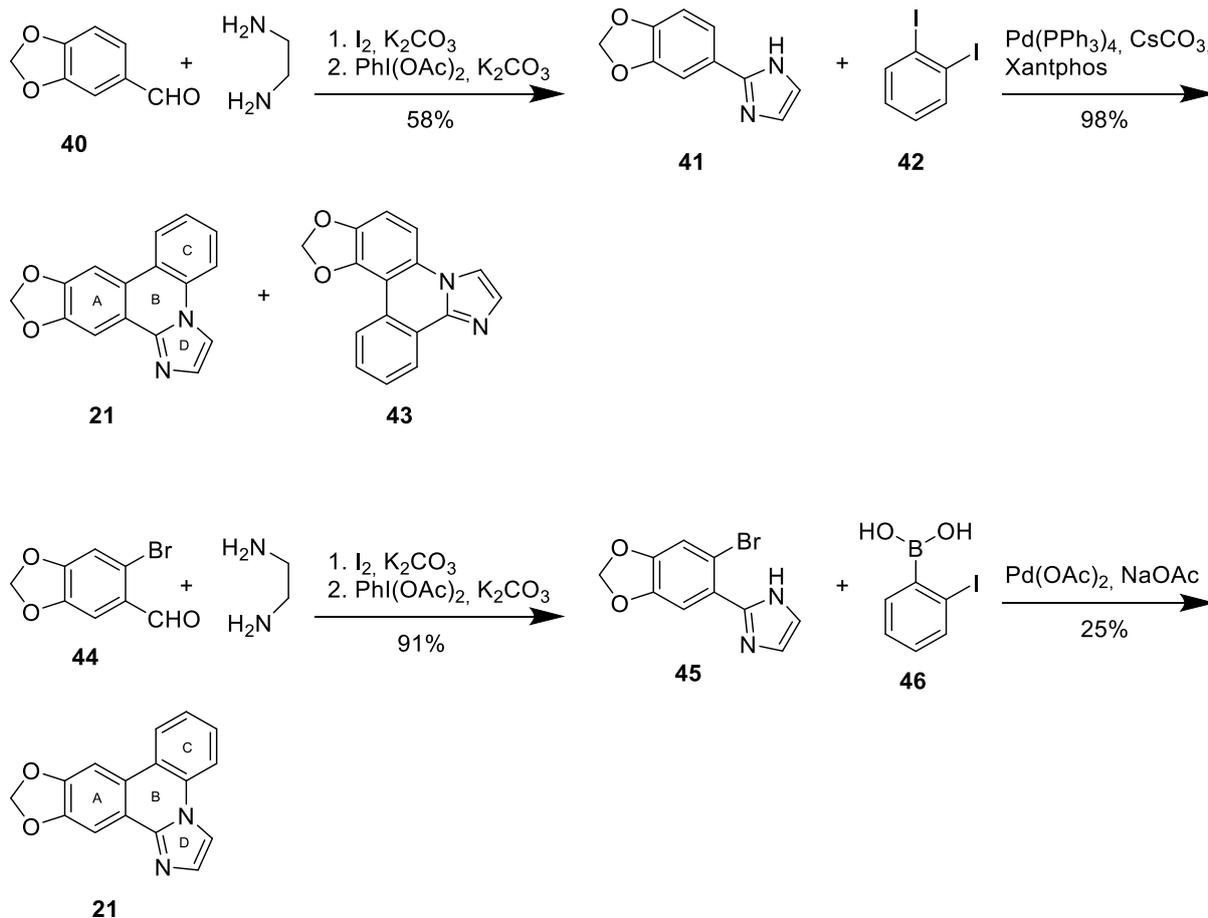


Abbildung 16: Erste vollsynthetische Darstellungen von Zephyrandin A nach Sheng et al.^[39]

Ebenfalls im Jahr 2022 publizierten Lee et al. die Synthese des Imidazo[1,2-*f*]phenanthridin Grundkörpers aus 2-(2-Bromaryl)imidazolen und Cyclohexan-1,3-dion (**46**), katalysiert durch einen recyclebaren Eisen-Silicium Katalysator in Anwesenheit von L-Prolin mit anschließender oxidativer Aromatisierung^[40]. Insbesondere der Aromatisierungsschritt ist hier sehr aufwändig, benötigt eine Vielzahl an Arbeitsschritten und Chemikalien und erfordert ebenfalls hohe Temperaturen. Zudem sind bei dieser Route Variationen an Ring C nur sehr eingeschränkt realisierbar.

Einleitung

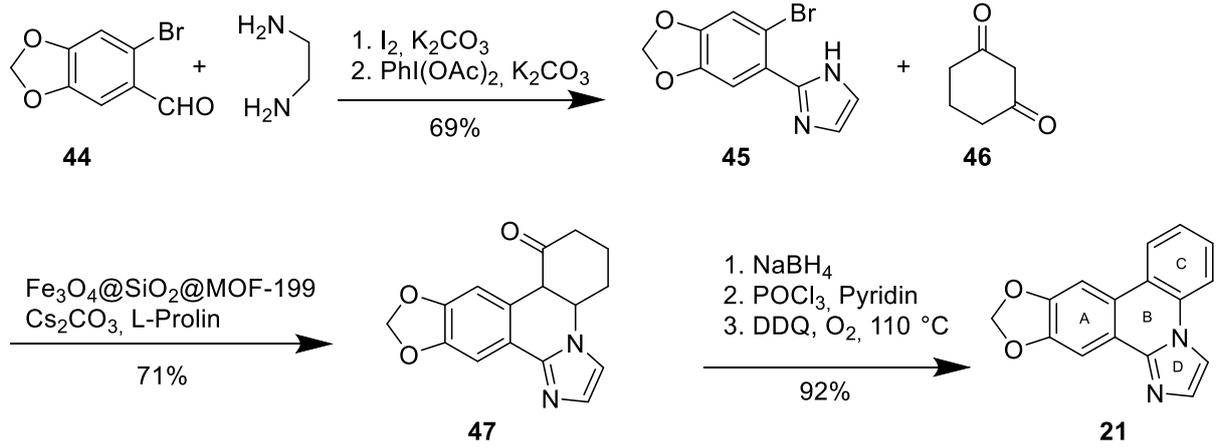


Abbildung 17: Darstellung von Zephycandidin A nach Lee et al.^[41]

2 Themenstellung und Syntheseplanung:

2.1 Themenstellung

Ziel dieser Dissertation war es, wie oben beschrieben, neue und elegante Synthesewege zur Darstellung der Naturstoffe Cassiarin A und Zephycandidin A zu entwickeln, Analoga der jeweiligen Naturstoffe zu synthetisieren und deren biologische Aktivität zu bestimmen, um Aussagen über die jeweiligen Struktur-Aktivitäts-Beziehungen treffen zu können. Dabei sollten auch bereits bestehende Syntheserouten auf ihre Robustheit untersucht werden und als Basis zur Synthese weiterer Analoga dienen.

2.1.1 Cassiarin A

Als Grundlage für neue Darstellungsmethoden von Cassiarin A und Analoga sollte hierbei die Arbeit von Kamlah^[42] dienen, der es in ihrer Dissertation im Arbeitskreis Bracher gelang, mittels reduktiver Ringöffnung von Isoxazolen *Z*-Enaminoketonen zu synthetisieren und diese zu 1,3,4-trisubstituierten β -Carbolen umzusetzen.

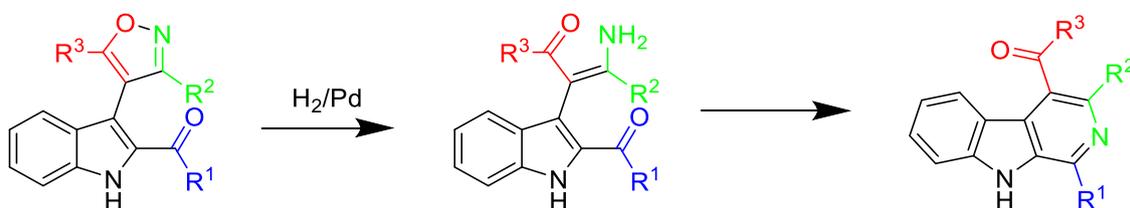


Abbildung 18: Reduktive Ringöffnung des Isoxazols und Cyclokondensation zur Synthese von 1,3,4-trisubstituierten β -Carbolen nach Kamlah^[42]

Adaptiert auf die Synthese von Cassiarin A ergibt sich ein zentraler Schritt, der – analog der Arbeit von Kamlah – mittels katalytischer Hydrierung eine Öffnung eines Isoxazolrings zum entsprechenden *Z*-Enaminoketon und die gleichzeitige Entschützung der beiden Benzylschutzgruppen zur Folge hat. Durch eine spontane oder säurekatalysierte doppelte Kondensation (vgl. Abbildung 19) sollte das Cassiarin A entstehen. Mithilfe dieser Route sollten durch Variation der Reste an der 4- bzw. 5-Position des Isoxazols (R¹, R²) bzw. Variation der Oxomethylgruppe (-CH₂-CO-R³) auf einfachem Wege mehrere Analoga des Cassiarin A synthetisiert werden. Besonderes Augenmerk sollte hierbei auf die Variation der Positionen 2, 3 und 5 im Cassiarin A gelegt werden.

Themenstellung und Syntheseplanung:

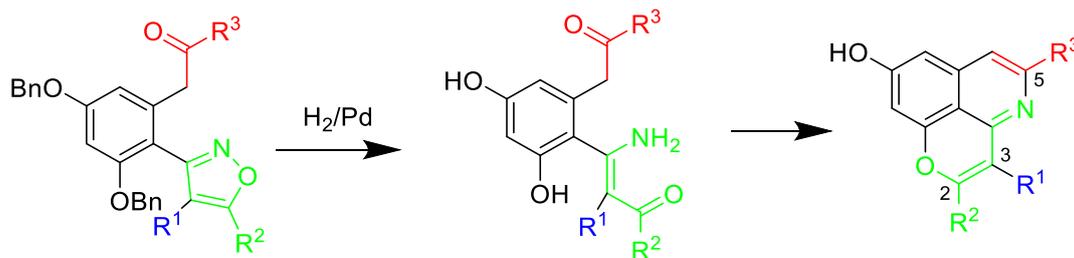


Abbildung 19: Geplante reduktive Ringöffnung des Isoxazols und doppelte Cyclokondensation zu Cassiarin A und Analoga

Die dafür benötigten Isoxazole sollten aus kommerziell erwerblichen oder aus Aldehyden synthetisierten Oximen über Nitriloxide mittels Huisgen-Cycloaddition mit geeigneten Alkinen dargestellt werden. Als alternative Route wurden andere Isoxazolsynthesen in Betracht gezogen, sowie eine mögliche Biarylsynthese aus dem entsprechenden Benzen- und Isoxazol-Baustein.

Ein alternativer Zugang zu neuartigen Analoga des Cassiarin A ist interessant, da der Naturstoff nachgewiesene, starke antiplasmodiale und vasorelaxierende Aktivität^[17] zeigt. Literaturbekannte Synthesen zielten jedoch bisher lediglich auf die Darstellung von Cassiarin A selbst ab, untersuchten diese Routen jedoch nicht auf ihre Anwendbarkeit auf Analoga mit anderen Resten. Zudem ist ein Zugang zu Cassiarin A-Analoga zwar mit Variationen an 2- und 5-Position (hier als R² für die 2-Position und R³ für die 5-Position dargestellt) mit literaturbekannten Synthesen möglich, Variationen an Position 3 (hier als R¹ dargestellt; R¹ = H in Cassiarin A) sind jedoch bisher mit keiner publizierten Syntheseroute ohne weiteres möglich. Variationen an dieser Ringposition würden einen noch tieferen Einblick in Struktur-Aktivitäts-Beziehungen erlauben.

2.1.2 Zephycandidin A

In einem weiteren Projekt wurde die Synthese des Naturstoffs Zephycandidin A bearbeitet. Der Stoff, dessen genaue Strukturformel lediglich gestützt auf berechnete NMR-Spektren postuliert wurde^[30], sollte durch eine Totalsynthese und anschließende Analytik bestätigt werden. Geplant war hierbei die Synthese von 6-Aminophenanthridinen ausgehend von kommerziell verfügbaren oder einfach darstellbaren 2-Brombenzonnitrilen mittels Suzuki-Miyaura Kreuzkupplung und spontaner, intramolekularer nukleophiler Addition der Aminogruppe an das Nitril in einem Schritt. Eine anschließende Kondensationsreaktion mit Chloracetaldehyd sollte zum Zephycandidin A und Analoga führen. Diese Route zur Darstellung

Themenstellung und Syntheseplanung:

von Imidazo[1,2-f]phenanthridinen wurde bereits von Zhang et al.^[43] und Noto et al.^[44] publiziert, aber bisher noch nicht auf die Synthese von Zephyrcandidin A angewendet.

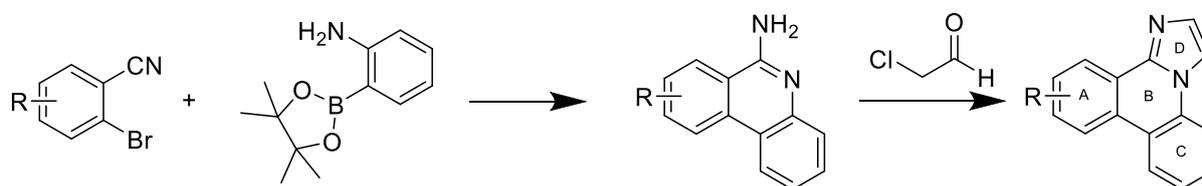


Abbildung 20: Geplante Darstellung von Zephyrcandidin A-Analoga in zwei Schritten

Auch vom Zephyrcandidin A sollten mehrere Analoga dargestellt werden – zunächst mit Variationen an Ring A und Ring D – und auf ihre zytotoxische Aktivität untersucht werden, um tiefere Einblicke in die Struktur-Aktivitäts-Beziehungen zu erhalten.

Mithilfe eines yeast-three-hybrid screenings (vgl. Kapitel 3.6) sollten zum Ende beider Projekte Zielstrukturen, die für die Aktivität bzw. den Wirkmechanismus verantwortlich sind, entdeckt werden. Dafür sollten in Kooperation mit Prof. Dr. Simone Moser die Verbindungen, die für das entsprechende Experiment nötig sind – ein mit einem Triethylglycollinker funktionalisiertes Trimethoprim-Derivat - synthetisiert und dem Kooperationspartner zur Verfügung gestellt werden.

2.2 Konkrete Syntheseplanung

2.2.1 Cassiarin A und Analoga: Synthese der Isoxazolbausteine

Der zentrale Baustein für die geplante Syntheseroute zu Cassiarin A sind 3,5-disubstituierte Isoxazole. Für deren Synthese wurden mehrere Möglichkeiten ins Auge gefasst. Die beste Methode sollte über Musterreaktionen beginnend mit 2,4,6-Trimethoxybenzaldehyd ermittelt werden und anschließend auf die Syntheseroute des Cassiarin A (vgl. Abbildung 19) adaptiert werden (Abbildung 21). Zunächst sollte die Darstellung über die klassische 1,3-dipolare Cycloaddition (Huisgen Reaktion) versucht werden. Dabei sollte das aus 2,4,6-Trimethoxybenzaldehyd dargestellte Benzaloxim mit N-Chlorsuccinimid und Triethylamin^[45], Phenyliod(III)bis(trifluoacetat) (PIFA)^[46] oder Ammoniumcer(IV)-nitrat^[47] *in situ* zum Nitriloxid umgesetzt werden und anschließend mit Propin zum entsprechenden 5-Methylisoxazol reagieren. Eine weitere Möglichkeit, die in Betracht gezogen wurde, ist die Umsetzung eines

Themenstellung und Syntheseplanung:

α,β -ungesättigten Ketons mit *N*-Hydroxy-4-toluolsulfonsäureamid^[48]. Als dritte potenzielle Musterreaktion sollte die von Waldo und Larock^[49] publizierte Methode zur Darstellung von 3,4,5-trisubstituierten Isoxazolen untersucht werden. Dabei sollte nach Grignard-Reaktion des 2,4,6-Trimethoxybenzaldehyds mit Propinylmagnesiumbromid und Oxidation des resultierenden Alkohols zum Keton die Reaktion zum *Z*-*O*-Methyloxim erfolgen. Eine anschließende Umsetzung mit Iodmonochlorid sollte zur Cyclisierung zum entsprechenden 4-Iodisoxazol führen, welches – für die Synthese von Cassiarin A nötig – mit Butyllithium nach wässriger Aufarbeitung dehalogeniert werden sollte^[50]. Diese Darstellungsmöglichkeit fällt einerseits durch mehr Syntheseschritte auf, schien aber dennoch praktikabel, da durch die Einführung des Iodsubstituenten eine einfache Möglichkeit geschaffen wird, über Palladium-katalysierte Kreuzkupplungen andere Reste für die Synthese von höher substituierten Cassiarin A - Analoga einzuführen.

Themenstellung und Syntheseplanung:

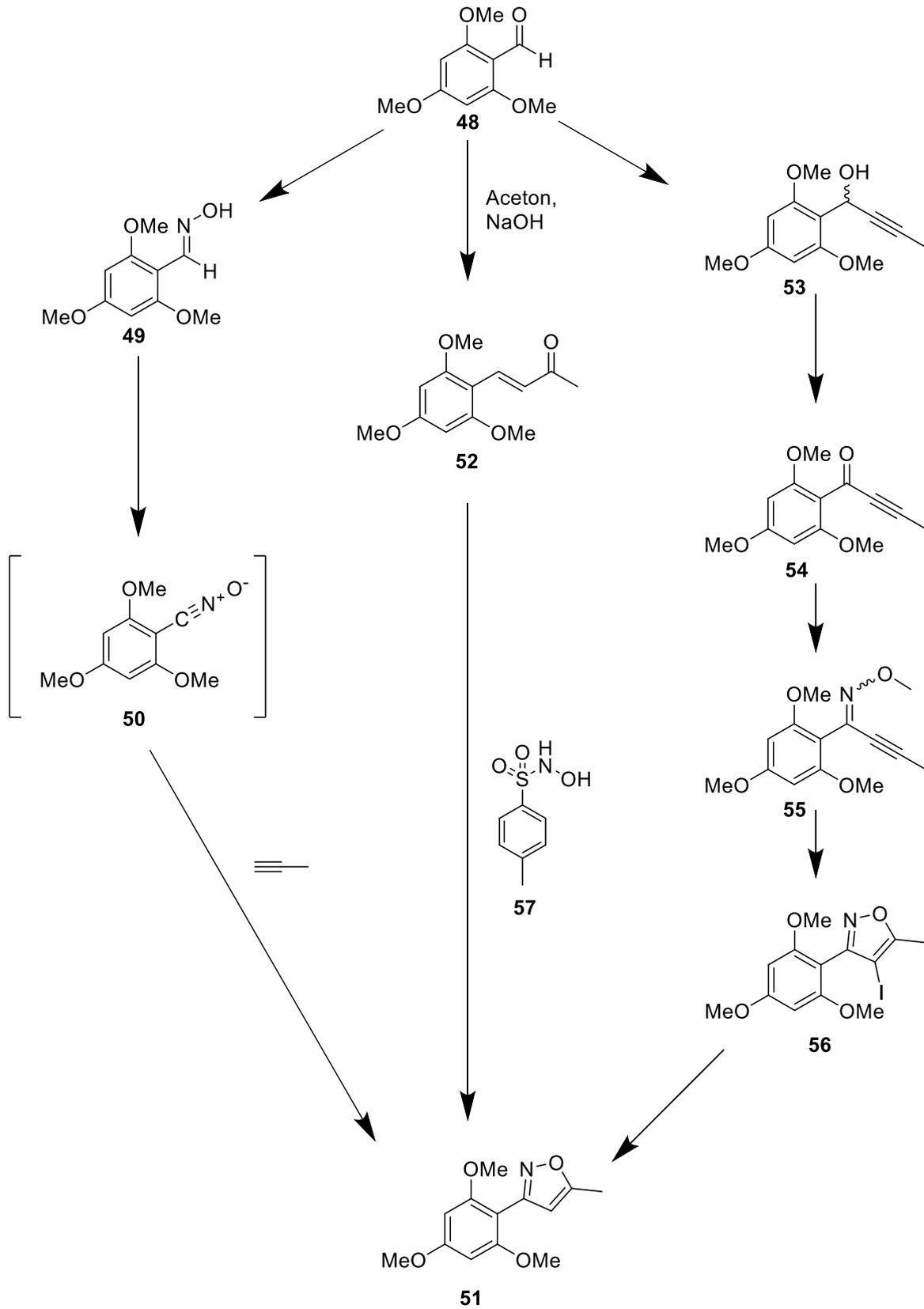


Abbildung 21: Geplante Musterreaktionen zum Aufbau des Isoxazolbausteins

2.2.2 Synthese des Arylmethylketonbausteins und Cyclisierung zum Cassiarin A

Der Baustein **59** sollte nach zweifacher Benzylschützung von 2,4,6-Trihydroxybenzaldehyd (**58**) in ortho- und para-Position gewonnen werden^[51]. Nach Schützung der dritten Hydroxygruppe mit einer MOM-Schutzgruppe und anschließender geeigneter Isoxazolynthese (vgl. Abbildung 21), sollte die MOM-Gruppe selektiv sauer entschützt werden. Die entstandene Hydroxygruppe sollte im Folgenden zum entsprechenden Triflat umgesetzt werden, um das Triflat **61** zu erhalten.

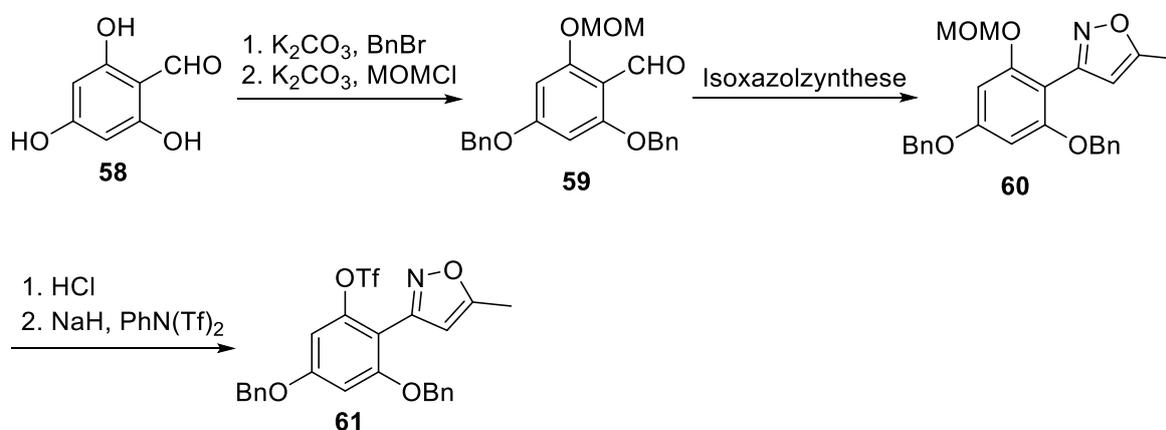


Abbildung 22: Geplante Synthese des entsprechenden Triflats aus 2,4,6-Trihydroxybenzaldehyd

Zhao et al.^[52] entwickelten eine Methode zur Darstellung von Benzylcarbinolen ausgehend von Bromaromaten. Die Autoren beschreiben die regioselektive Ringöffnung von Methyloxiran (**62**) mit Zink, Triethylaminhydrochlorid und katalytischen Mengen Natriumiodid, woraus *in situ* 1-Iodpropan-2-ol (**63**) entsteht. Dieses reagiert anschließend mit einem Bromaromaten in einer Nickel-katalysierten Kreuzkupplung mit Bipyridin als Ligand zum entsprechenden Benzylcarbinol (**64**). Obwohl für diese Reaktion in erster Linie Bromaromaten als Beispiele dienen, findet sich auch ein Beispiel für die erfolgreiche Umsetzung mit einem Triflat als Edukt. Diese Methode sollte mit Methyloxiran als Epoxid auf die Syntheseroute adaptiert werden, um Cassiarin A zu synthetisieren. Die Verwendung anderer Epoxide gäbe folglich andere Reste an dieser Position. Der aus dieser Reaktion synthetisierte sekundäre Alkohol **64** sollte anschließend mittels geeigneter Oxidationsmittel wie z.B. PCC oder Braunstein zum Arylmethylketon **65** oxidiert werden (Abbildung 23).

Themenstellung und Syntheseplanung:

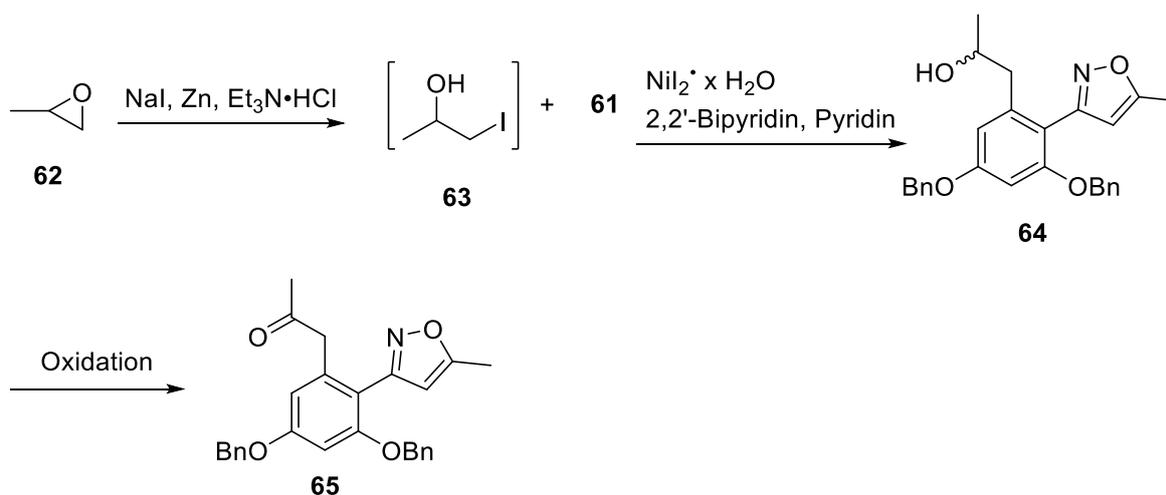


Abbildung 23: Geplante Synthese des Arylmethylketon **65** nach dem Protokoll von Zhao et al.^[52]

Anschließend sollten mittels katalytischer Hydrierung (Hydrogenolyse) sowohl der Isoxazolring zum Enaminoketon gespalten als auch die beiden Benzylschutzgruppen entschützt werden, woraufhin die doppelte Kondensationsreaktion zum Cassiarin A entweder spontan oder mittels Säurekatalyse stattfinden sollte (vgl. Abbildung 19).

2.2.3 Syntheseplan zur Darstellung von Zephycandidin A

Da zu Beginn der Arbeit an diesem Projekt keine Synthesen dieses Alkaloids bekannt waren, sollte eine möglichst einfache Route entwickelt werden Zephycandidin A und mehrere Analoga zu synthetisieren. Da die Imidazo[1,2-f]phenanthridin Grundstruktur wegen ihrer Rigidität und der Bereitschaft mit Platin oder Iridium elektrolumineszierende Komplexe zu bilden^[43]^[44] bereits aus dem Forschungsgebiet der OLED-Technik bekannt ist^[43], wurde auf Basis der veröffentlichten Herstellungsmethoden ein Syntheseplan erarbeitet. Dieser fußte v.a. auf der Publikation von Zhang et al.^[43]. Dabei sollte aus 6-Brom-1,3-benzodioxol-5-carbonitril (**66**) mittels Suzuki-Miyaura Kreuzkupplung und spontaner, intramolekularer nukleophiler Addition der Aminogruppe an das Nitril das entsprechende 6-Aminophenanthridin **67** dargestellt werden. Durch anschließende Umsetzung mit Chloracetaldehyd in Anwesenheit einer Base nach einem Protokoll von Noto et al.^[44] sollte Zephycandidin A (**21**) in 2 Schritten synthetisiert werden (Abbildung 24).

Themenstellung und Syntheseplanung:

Der Synthesepfad setzt sich folglich aus zwei in der Literatur beschriebenen Reaktionen zusammen, die aber für die Synthese von Zephyricandin A in dieser Kombination noch nicht verwendet wurden. Durch Kombination der beiden in der Literatur etablierten Methoden sollte eine einfache und schnelle Synthese des Zephyricandin A möglich sein.

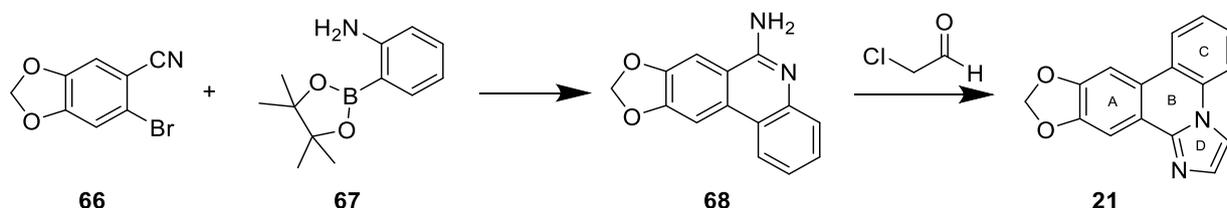


Abbildung 24: Geplante Synthese von Zephyricandin A

Diese Route wurde vor allem deshalb präferiert, da Variationen an Ring A und C durch geeignete Wahl der Substituenten an beiden aromatischen Edukten der Suzuki-Miyaura Kreuzkupplung einfach möglich sein sollten. Auch Variationen am Imidazolring lassen sich unter den gleichen Reaktionsbedingungen herstellen. Allgemein beschreiben Nishizeki et al. in ihrem Patent die Umsetzung von α -halogenierten Carbonylverbindungen mit 6-Aminophenanthridinen in Anwesenheit von Natriumcarbonat^[53]. Nach Kondensation der Aminogruppe des 6-Aminophenanthridins und der Carbonylgruppe des Reaktionspartners und nukleophiler Substitution können diverse Substituenten am Imidazolring eingeführt werden.

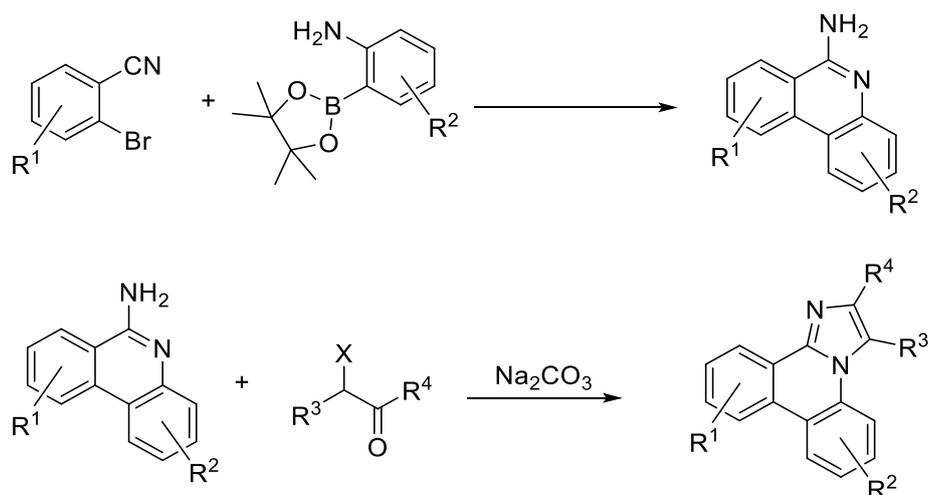


Abbildung 25: Mögliche Strukturvariationen von Zephyricandin A durch Verwendung unterschiedlicher aromatischer Edukte (erster Reaktionsschritt) und von unterschiedlichen α -halogenierten Carbonylverbindungen

Themenstellung und Syntheseplanung:

Auch eine weitere Methode zur Variation des Imidazolrings sollte untersucht werden. Grundlegend ist die Veröffentlichung von Narva et al.^[54], die eine oxidative, regioselektive Anellierung verschiedener Aldehyde an 6-Aminophenantridine beschrieben. Dadurch kann jedoch lediglich die 3-Position des Imidazolrings variiert werden (Abbildung 26).

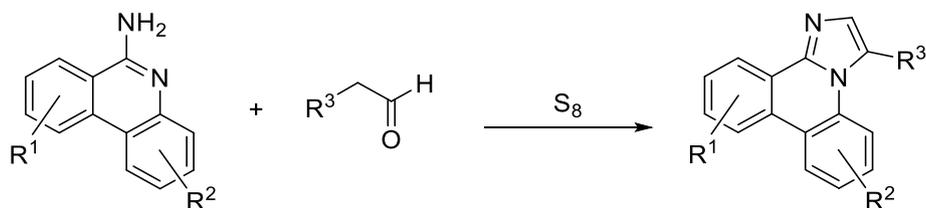


Abbildung 26: Weitere Variationsmöglichkeit nach dem Protokoll von Narva et al.^[54], mit der nur die 3-Position am Imidazolring variiert werden kann

In dieser Arbeit sollten zunächst neue Substituenten an Ring A und am Imidazolring untersucht werden, um eine Basis zur weiteren Untersuchung von Struktur-Aktivitäts-Beziehungen zu erlangen.

3 Synthesen

3.1 Versuche zur Entwicklung einer neuen Syntheseroute zu Cassiarin A über 3,5-disubstituierte Isoxazole

3.1.1 Versuche zur Darstellung von 3,5-disubstituierten Isoxazolen über 1,3-dipolare Cycloaddition

Zunächst sollte die Machbarkeit der Isoxazolsynthese in einer Modellreaktion an 2,4,6-trimethoxylierten Aromaten untersucht werden. Da in der Literatur keine Beispiele für derartige Verbindungen zu finden waren, sollte ein eigener Plan zur Darstellung solcher Verbindungen entwickelt werden. Als erste und gängigste Möglichkeit Isoxazole darzustellen wurde die Synthese über eine 1,3-dipolare Cycloaddition – auch Huisgen-Reaktion oder (2+3) Cycloaddition genannt – untersucht.

Allgemein betrachtet reagiert bei diesem Reaktionstyp ein 1,3-Dipol mit einem Dipolarophil zu einem 5-gliedrigen Heterozyklus^[55]. Die Verschiebung der π -Elektronen – vier π -Elektronen der dipolaren Verbindung und zwei π -Elektronen des Dipolarophils – erfolgt dabei pericyclisch^[56]. Der Mechanismus der Reaktion wurde durch die Arbeit von Rolf Huisgen in den 1960er Jahren aufgeklärt^[56]. Dieser Reaktionstyp wurde über die Jahre weiterentwickelt und gipfelte vorläufig in der Verleihung des Nobelpreises 2022 für die Entwicklung der „click-Chemie“, einer bestimmten Form der 1,3-dipolaren-Cycloaddition (verliehen an Carolyn Bertozzi, Morten Meldal und Barry Sharpless).

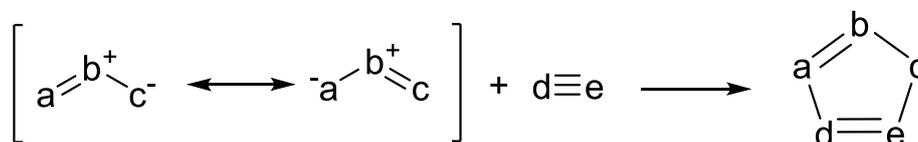


Abbildung 27: Allgemeines Reaktionsschema einer 1,3-dipolaren Cycloaddition mit einem Alkin oder Nitril als Dipolarophil nach Huisgen^[56]

Konkret auf diese Route angewendet wird das Oxim **49**, welches mithilfe von Hydroxylamin aus dem entsprechenden Benzaldehyd gebildet wurde, zum Nitriloxid (dem 1,3-Dipol) oxidiert und anschließend mit einem Alkin (dem Dipolarophil) zum entsprechenden Isoxazolderivat umgesetzt. Dabei sollte das Nitriloxid *in situ* aus dem Oxim gebildet werden und nach

Zugabe des Alkins direkt weiterreagieren. Dazu wurden mehrere Oxidationsmittel für die Bildung des Nitriloxids, die bereits früher an anderen Beispielen in unserem Arbeitskreis erfolgreich eingesetzt wurden, untersucht. Zu Beginn wurde die Halogenierung des Oxims mithilfe von NCS und anschließender Dehydrohalogenierung des Hydroximidoylchlorids näher betrachtet. Dazu wurden gemäß einem Protokoll von Grundmann und Dean^[57] das entsprechende 2,4,6-Trimethoxybenzaloxim (49) mit N-Chlorsuccinimid (NCS) und Triethylamin in Chloroform unter Stickstoffatmosphäre gemischt. Die Untersuchung des Gemisches mittels ASAP Massenspektrometrie legte nahe, dass sich das Nitriloxid **50** gebildet hatte, da die Masse des entsprechenden Nitriloxids detektiert wurde. Danach wurde Propin (als 1M Lösung in THF) zugegeben, jedoch fand keine Reaktion statt. Anschließend wurde versucht zumindest das Nitriloxid **50** aufzureinigen, was aber aufgrund der Instabilität der Verbindung misslang. Um die Bildung des Isoxazols **51** anzuregen, wurde das Gemisch nach Alkinzugabe 6 h zum Rückfluss erhitzt, was jedoch ebenfalls nicht zum gewünschten Ergebnis führte. Um auszuschließen, dass die Isoxazolbildung durch Nebenprodukte der Dehydrohalogenierung zum Nitriloxid behindert wurde, wurden andere Methoden zur Erzeugung des Nitriloxids untersucht. Dafür wurden PIFA^[46] Ammoniumcer(IV)nitrat^[47] und die Zugabe von wässriger Natriumhypochlorit-Lösung verwendet. Bei Reaktionen mit PIFA und Natriumhypochlorit-Lösung konnte dasselbe Ergebnis beobachtet werden. Auch mit diesen beiden Reagenzien scheint das Nitriloxid **50** zu entstehen, jedoch fand hier ebenfalls keine Umsetzung mit Propin (als 1M Lösung in THF) statt. Nach erneutem Versuch das Nitriloxid **51** mittels Säulenchromatographie zu isolieren, konnte auch hier lediglich ein undefinierbares Produktgemisch erhalten werden. Da im Versuch mit Ammoniumcer(IV)nitrat als Oxidationsmittel das Edukt nahezu quantitativ zurückgewonnen werden konnte, liegt der Verdacht nahe, dass hier bereits die Umsetzung zum Nitriloxid **50** ausblieb. Eine mögliche Erklärung für das Ausbleiben der Cyclisierungsreaktion ist die Schwächung des Dipols durch die drei Methoxygruppen in ortho- bzw. para-Position. Durch den +M-Effekt dieser Gruppen wird die positive Ladung am Kohlenstoff anscheinend so stark geschwächt, dass die Cyclisierung ausbleibt (Abbildung 28).

Synthesen

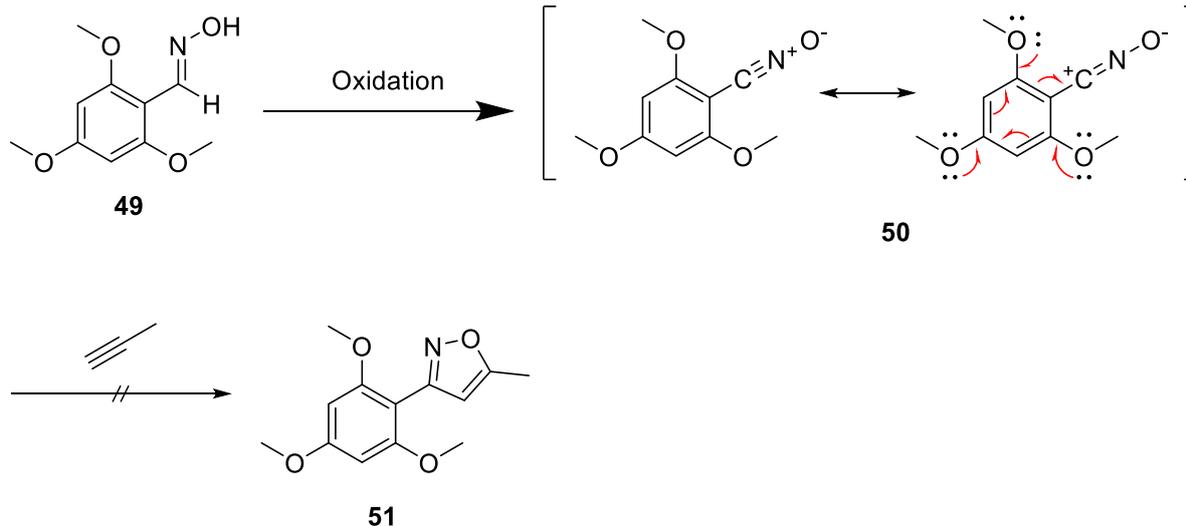


Abbildung 28: Schwächung des Dipols **50** durch den mesomeren Effekt der drei Methoxygruppen (rot) und folglich Abschwächung der positiven Ladung am Kohlenstoff sowie ausbleibende Cycloadition mit Propin zum Isoxazol **51**

3.1.2 Versuche zur Darstellung von 3,5-disubstituierten Isoxazolen mittels elektrophiler Cyclisierung

Nachdem die Isoxazolsynthese auf dem oben beschriebenen Weg nicht möglich war, wurde die Route nach Tang et al.^[48] untersucht. Diese beschrieben die Umsetzung von α,β -ungesättigten Ketonen oder Aldehyden mit *N*-Hydroxy-4-toluolsulfonsäureamid (TsNHOH) in Anwesenheit von Kaliumcarbonat zu 3,5-disubstituierten Isoxazolen. (Abbildung 29)

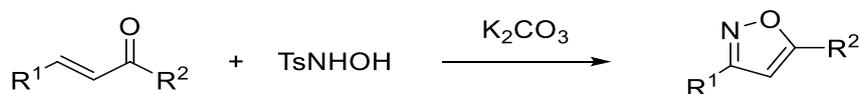


Abbildung 29: Allgemeines Reaktionsschema zur Darstellung von 3,5-disubstituierten Isoxazolen nach Tang et al.^[48]

Dem postulierten Mechanismus zufolge beginnt die Reaktion mit einem nukleophilen Angriff von *N*-Hydroxy-4-toluolsulfonsäureamid (**57**) an der elektrophilen Position des Michael-Systems von **A**. Nach Deprotonierung durch eine geeignete Base wird die Tosylgruppe als Abgangsgruppe eliminiert, um das β -Ketooxim **B** zu erhalten. Nach Cyclisierung und Aromatisierung durch Dehydratisierung kann das entsprechende Isoxazol **D** erhalten werden.

Synthesen

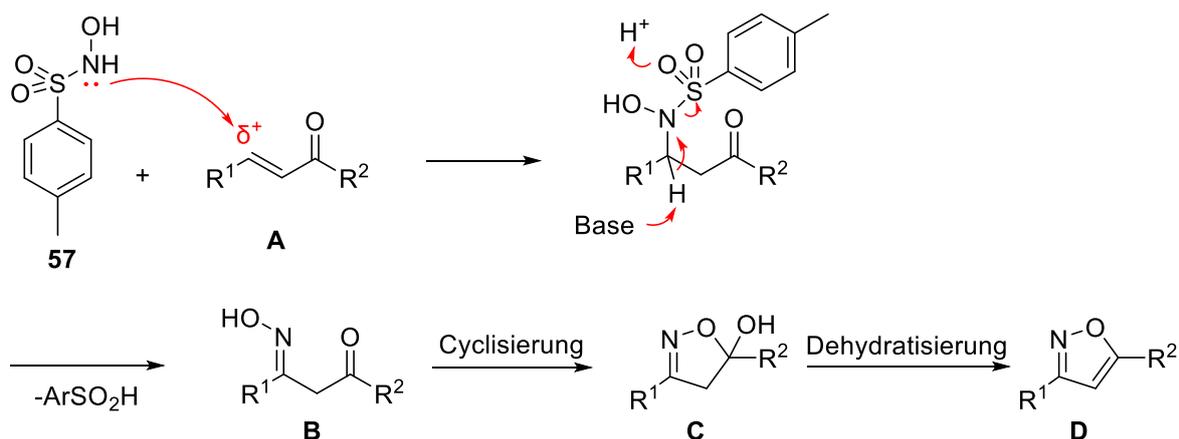


Abbildung 30: Postulierter Reaktionsmechanismus für die in Abbildung 29 beschriebene Reaktion nach Tang et al.^[48], eigene Darstellung

Konkretisiert auf die Musterreaktion zur Darstellung des Isoxazolbausteins **51** (Abbildung 31) wurde zunächst 2,4,6-Trimethoxybenzaldehyd (**48**) mittels Claisen-Schmidt-Kondensation mit Aceton und Natronlauge zum entsprechenden α,β -ungesättigten Keton **52** umgesetzt^[58]. Anschließende Reaktion mit *N*-Hydroxy-4-toluolsulfonsäureamid und Kaliumcarbonat in einem Gemisch aus Methanol und Wasser bei 60°C lieferte auch nach einer Reaktionszeit von 48 h kein Isoxazol-Produkt (**51**). Lediglich das gesamte Edukt (**52**) konnte zurückgewonnen werden. In einem weiteren Versuch wurde 72 Stunden zum Rückfluss erhitzt, wobei ebenfalls nur das gesamte Startmaterial (**52**) zurückgewonnen werden konnte.

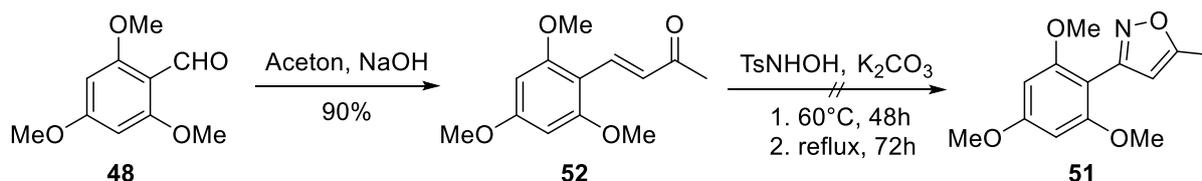


Abbildung 31: Versuchte Darstellung des Isoxazols **51** nach dem Protokoll von Tang et al.^[48]

Ein Grund für das Scheitern der Reaktion könnte sein, dass die positive Partialladung der β -Position des α,β -ungesättigten Ketons **52** durch den dreifachen +M-Effekt der Methoxygruppen derart geschwächt ist, dass das *N*-Hydroxy-4-toluolsulfonsäureamid nicht angreifen kann. Dadurch könnte die Elektrophilie der Position so weit gesenkt sein, dass es zu keiner Reaktion kommt.

Aufgrund der bis dahin erfolglosen Versuche das Isoxazol aufzubauen, wurde die Syntheseroute nach Waldo und Larock^[49] als letzte Möglichkeit favorisiert. Diese beschrieben die

Synthesen

elektrophile Cyclisierung von 2-Alkin-1-on O-methyloximen (**A**) mit einem entsprechenden Elektrophil (E-X) – in der Publikation wurden I₂, Br₂, ICl und PhSeBr verwendet – zum 4-halogenierten (**B**) oder – bei Nutzung von PhSeBr – zum 4-selenylierten Isoxazol (**B**). Essentiell für die Reaktion ist laut den Autoren zudem, dass der Oximether **A** in Z-Konfiguration vorliegt.

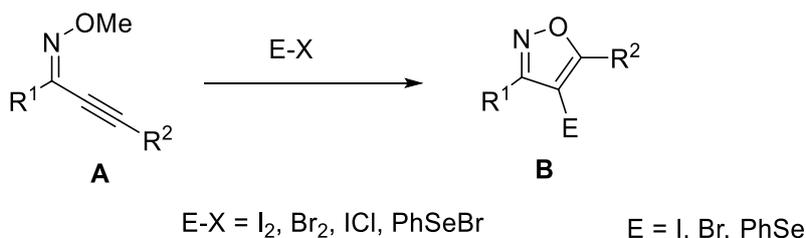


Abbildung 32: Allgemeines Reaktionsschema des elektrophilen Cyclisierung nach Waldo und Larock^[49], eigene Darstellung

Ausgehend vom 2,4,6-Trimethoxybenzaldehyd (**48**) konnte nach Grignard-Reaktion mit kommerziell erwerblichem Propin-1-ylmagnesiumbromid (0,5M in THF) und anschließender Oxidation des gebildeten sekundären Alkohols **53** mit Braunstein das Keto-Alkin **54** in 65% Ausbeute erhalten werden. Nach Reaktion mit O-Methylhydroxylaminhydrochlorid mit wasserfreiem Natriumsulfat und Pyridin in Methanol konnte der Oximether **55** in lediglich 17% Ausbeute und zudem als Gemisch aus E/Z-Isomeren erhalten werden. Obwohl erwartet wurde, dass die Reaktion klar definiert ablaufen würde, konnte man mittels DC-Kontrolle viele undefinierbare Nebenprodukte erkennen. Die anschließende elektrophile Cyclisierung mit Iodmonochlorid lieferte das Iodisoxazol **56** in 36% Ausbeute. Auch zahlreiche Versuche zu Optimierung der Ausbeute der Oximethers **55** (aufgelistet in Tabelle 1) lieferten eine geringere Ausbeute oder gar kein Produkt.

Synthesen

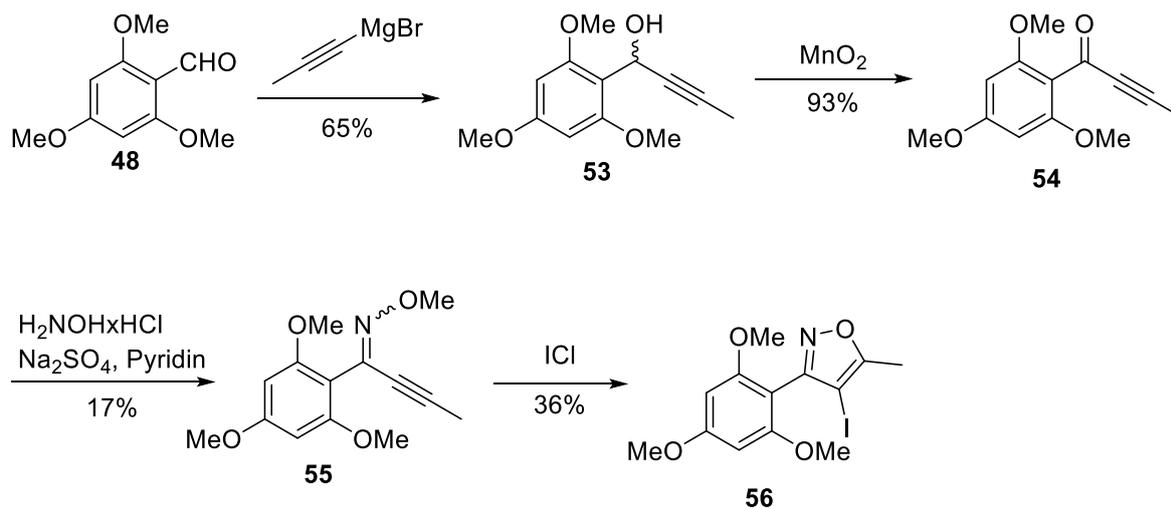


Abbildung 33: Darstellung des 4-iodierten-3,5-disubstituierten Isoxazols **56** in Anlehnung an ein Protokoll von Waldo und Larock^[49]

Versuchsnummer	Äquivalente NH ₂ OH·HCl	Temperatur	Reaktionszeit	Lösungsmittel	Zusätze	Ausbeute von 55
1	1,5	45°C	18h	Methanol	Na ₂ SO ₄ , Pyridin	12%
2	3	45°C	18h	Methanol	Na ₂ SO ₄ , Pyridin	17%
3	5	45°C	18h	Methanol	Na ₂ SO ₄ , Pyridin	16%
4	3	Rückfluss	16h	Methanol	Na ₂ SO ₄ , Pyridin	14%
5	3	45°C	16h	Methanol	-	Keine Reaktion
6	3	45°C	16h	Methanol	Triethylamin	17%
7	3	0°C	24h	Methanol	Na ₂ SO ₄ , Pyridin	Keine Reaktion
8	3	45°C	16h	DMF	Na ₂ SO ₄ , Pyridin	12%
9	3	45°C	16h	DCM	Na ₂ SO ₄ , Pyridin	7%
10	3	45°C	16h	THF	Na ₂ SO ₄ , Pyridin	9%
11	3	45°C	16h	Dioxan	Na ₂ SO ₄ , Pyridin	11%

Tabelle 1: Versuche zur Optimierung der Synthese des Oximethers **55**

Synthesen

Da als Edukt für die Synthese des Iodisoxazols das E/Z-Gemisch des Oximethers **55** eingesetzt wurde, jedoch laut Publikation^[49] lediglich das Z-Isomer zum Isoxazol zyklisieren kann, ist die niedrige Ausbeute an Isoxazol **56** nicht verwunderlich, zumal 60% Edukt zurückgewonnen werden konnten. Obwohl über diese Route eine Isoxazolsynthese grundsätzlich möglich war, wurde diese Route wegen der vielen Reaktionschritte und der schlechten Ausbeuten nicht weiter verfolgt.

Da bereits alle Musterreaktionen des Isoxazol **56** mit einem Trimethoxyphenyl-Substituenten an C-3 aufzubauen scheiterten, wurde von weiteren Versuchen den Isoxazolbaustein direkt aus dem trisubstituierten Benzaldehyd **48** aufzubauen Abstand genommen. Die folgende Abbildung 34 dient als übersichtliche Zusammenfassung der bisher durchgeführten Musterreaktionen. Da am ursprünglichen Synthesepfad (siehe Kapitel 2.2.1) festgehalten werden sollte, sollten andere Möglichkeiten zur Darstellung geeigneter 3,5-disubstituierter Isoxazole erarbeitet werden.

Synthesen

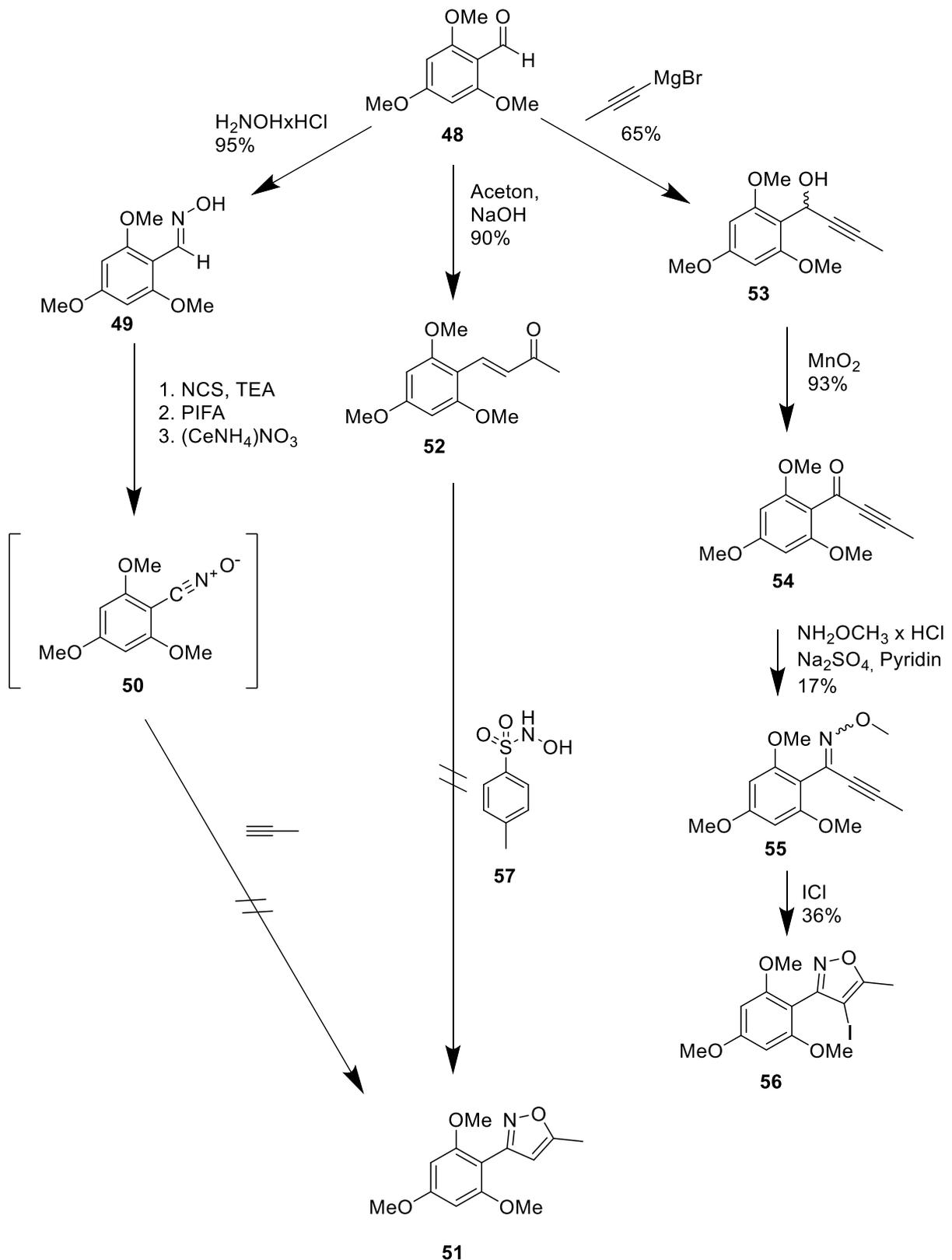


Abbildung 34: Übersicht der Versuche zur Synthese des 3,5-disubstituierten Isoxazols **51**. Der linke Ast stellt die Darstellung über eine 1,3-dipolare Cycloaddition, der mittlere Ast die Darstellung nach dem Protokoll von Tang et al.^[48] und der rechte Ast die elektrophile Cyclisierung nach Waldo und Larock^[49] dar.

3.1.3 Versuche zur Darstellung von 3-Aryl-5-Methylisoxazolen über Palladium-katalysierte Kreuzkupplung

Nachdem die Versuche, den 3-Arylisoxazolbaustein **51** direkt aus einem aromatischen Aldehyd zu synthetisieren (Abbildung 34) eingestellt worden waren, sollte ein anderer Ansatz der Synthese erarbeitet werden. Dieser verfolgt die Darstellung über eine Biarylsynthese, in diesem Fall eine Suzuki-Kupplung. Dazu sollte zunächst ein 3-halogeniertes-5-substituiertes Isoxazol (**73**) nach dem Protokoll von Chiarino^[59] (Abbildung 38) aufgebaut werden. Als zweiter Baustein sollte der *ortho*-bromierte Benzaldehyd **69** aufgebaut werden. Um die Suzuki-Kupplung durchführen zu können, muss einer der beiden Reaktionspartner ein Boronsäurederivat tragen. Welcher Reaktionspartner hierbei die Boronsäure bzw. den Boronsäurepinacolester trägt, wurde bei der Planung zunächst offengelassen, da sich solche Bausteine grundsätzlich aus Bormaromaten herstellen lassen. Daraus ergeben sich zwei Möglichkeiten, die in Abbildung 35 als Übersicht aufgezeigt werden:

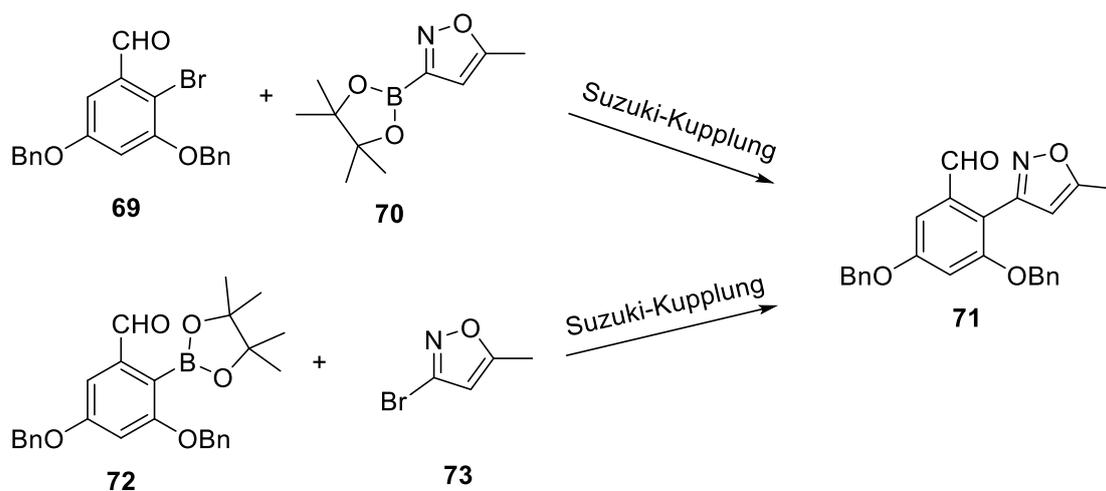


Abbildung 35: Angepasste Synthesepfade zur Darstellung des 3,5-disubstituierten Isoxazols **71** mittels Suzuki-Kupplung. Dabei trägt entweder der Aldehyd-Baustein **72** oder die Isoxazol-Verbindung **70** den für die Suzuki-Kupplung erforderlichen Boronsäure-Pinacolester

Grundlegende Überlegung dafür, hier einen substituierten Benzaldehyd **69** bzw. **72** als Baustein einzusetzen ist, dass der Aldehyd **71** die Möglichkeit bietet, dass die für die weitere Synthese benötigte Acetylgruppe (vgl. Abbildung 19, Kapitel 2.1.1) mittels Henry-Reaktion und anschließender Nef-Reaktion aus diesem darzustellen sein sollte. Dabei wird bei der Henry-Reaktion – auch bekannt als Nitro-Aldol-Reaktion^[60] – zunächst Nitroethan an den Aldehyd **71** addiert^[61]. Da Essigsäure als Lösungsmittel fungiert, wird die β -Hydroxynitro-Verbindung **74** direkt dehydratisiert, wobei das entsprechende Nitroalken **75**

Synthesen

entsteht. In der darauf folgenden „oxidativen Hydrolyse“^[62] kann die Nitro-Gruppe in Anwesenheit von Eisen in die Carbonylverbindung **65** umgewandelt werden^[62]. Dies stellt eine Weiterentwicklung der Nef-Reaktion dar. Berühmtheit erlangten diese Namensreaktionen in Kombination unter anderem durch die Anwendbarkeit auf die Synthese von MDMA (Methylenedioxyamphetamin)^[63].

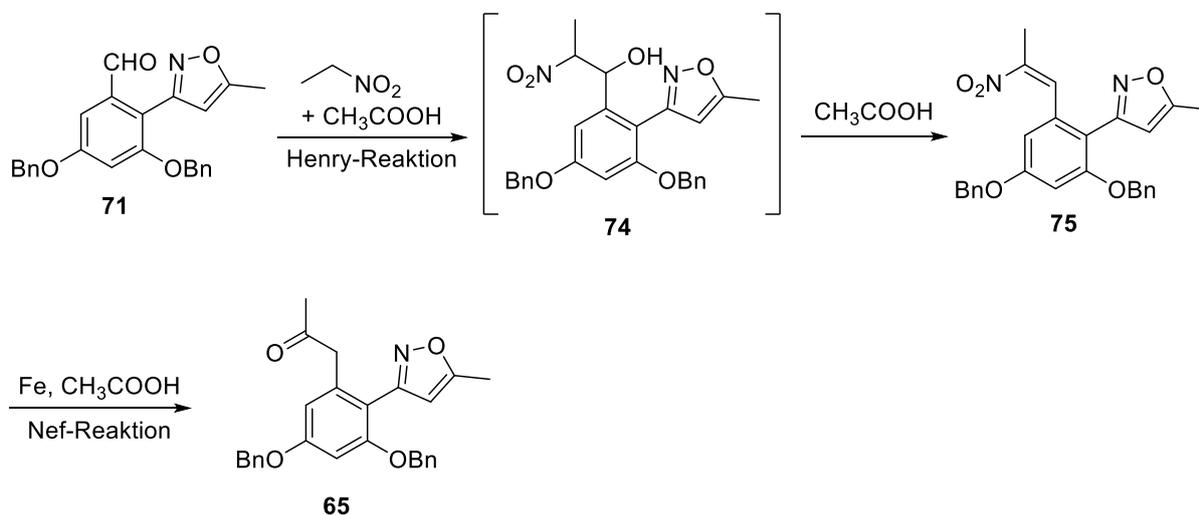


Abbildung 36: Synthesepfad zur Darstellung des Arylacetylbausteins **65** (vgl. Kapitel 2.1.1 Abbildung 19) aus dem in Abbildung 35 gezeigten Aldehyd **71** mittels Henry-Reaktion und anschließender Nef-Reaktion

Der Aldehyd **69** (Abbildung 35) wurde nach dem Protokoll von Carreras et al.^[64] synthetisiert. Die beiden Hydroxygruppen des kommerziell erwerblichen 3,5-Dihydroxymethylbenzoats (**76**) wurden mittels Williamson-Ethersynthese zunächst in quantitativer Ausbeute benzyliert. Anschließend wurde der Methylester **77** mit Lithiumaluminiumhydrid zum Benzylalkohol **78** reduziert. Nach Bromierung von Verbindung **79** mit NBS wurde der entstandene Alkohol **79** mit PCC zum Aldehyd **69** oxidiert.

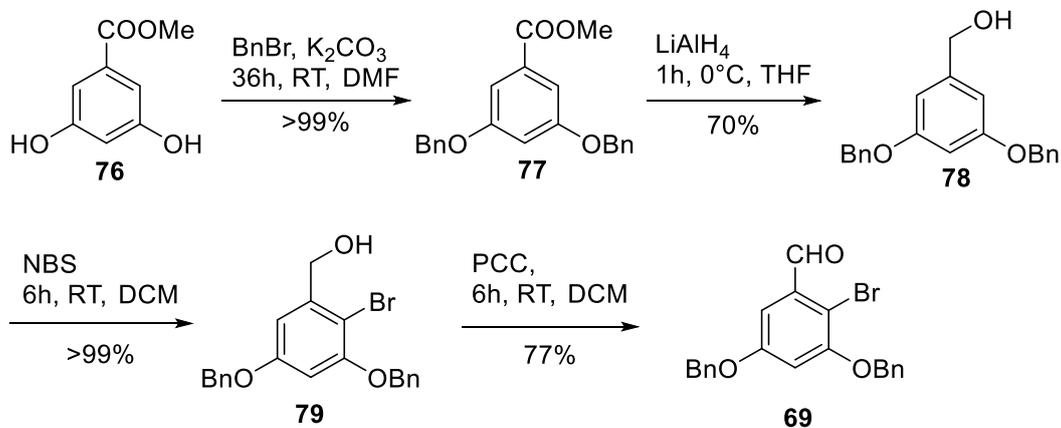


Abbildung 37: Darstellung des Aldehyds **69**, der für die in Abbildung 35 gezeigte Synthese des Isoxazols **78** benötigt wird

Synthesen

Als zweiter Synthesebaustein sollte das 3-Brom-5-phenylisoxazol (**82**) synthetisiert werden. Obwohl dieses nicht für die Synthese von Cassiarin A geeignet war – dafür müsste die 5-Position mit einer Methylgruppe substituiert sein – wurde es für die folgende Musterreaktion ausgewählt, da in der Literatur detaillierte Informationen zu Synthese, Analytik und physikalischen Eigenschaften dieser Substanz zu finden waren^{[59][65][66]}. Die Darstellung des für die Synthese von Cassiarin A eigentlich benötigten 3-Brom-5-methylisoxazols war hingegen lediglich schwammig in einer Publikation aus dem Jahr 1969^[67] und zudem in italienischer Sprache beschrieben. Würde sich die Musterreaktion als praktikabel herausstellen, sollte eine Synthesemöglichkeit auf Basis der Arbeiten von Chiarino et al.^[59], nach deren Protokoll auch **82** (Abbildung 38) - wie im Folgenden beschrieben - synthetisiert wurde, erarbeitet werden. Für die Synthese von **82** wurde kommerziell erwerbliches Dibromformaldoxim (**80**) verwendet, welches mit Phenylacetylen (**81**) unter Zusatz von Natriumcarbonat in einer Huisgen-Cycloaddition (vgl. Kapitel 3.1.1) in guter Ausbeute zum Isoxazol **82** reagiert, das nach Umkristallisation aus siedendem n-Hexan in Form gelber Kristalle gewonnen werden konnte.

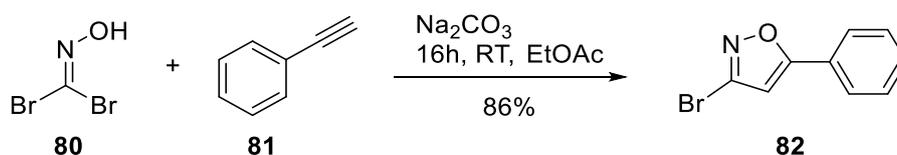


Abbildung 38: Darstellung von 3-Brom-5-phenylisoxazol (**82**) nach einem Protokoll von Chiarino et al.^[59]

Da für eine Suzuki-Reaktion aus den wie in Abbildung 39 aufgezeigten Bausteinen keine Literaturstelle zu finden war, sollte eine eigene Methode entwickelt werden. Grundlegend dafür war ein Protokoll von Lu et al.^[68], welches in einer Musterreaktion aus kommerziell erwerblicher 2-Formylphenylboronsäure (**83**) und dem 3-bromierten Isoxazol **82** erprobt werden sollte. Zunächst wurde nach einem Standard-Protokoll für Suzuki-Kupplungen die Boronsäure **83** in THF gelöst und wässrige Kaliumcarbonat-Lösung (2 M) zugegeben. Anschließend wurde Pd(PPh₃)₄ und **82** zugegeben und das Reaktionsgemisch unter Stickstoffatmosphäre 16 Stunden bei 80°C gerührt, wobei ein komplexes Gemisch einer Vielzahl von Produkten entstand, von denen keines genauer charakterisiert werden konnte. Nachdem die Musterreaktion auf diese Weise nicht erfolgreich war, wurde versucht, durch Veränderung einzelner Parameter (siehe Tabelle 2) das 3,5-Diarylisoxazol **84** zu generieren, was jedoch misslang.

Synthesen

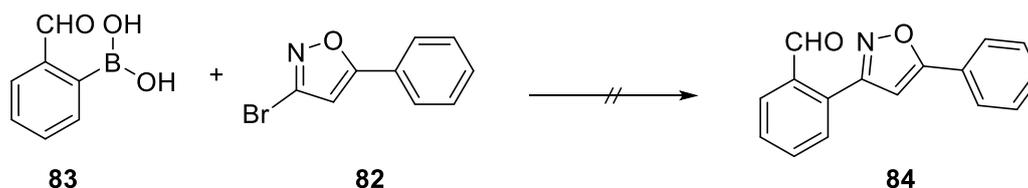


Abbildung 39: Musterreaktion zur Darstellung von **84** mittels Suzuki-Kupplung, die einzelnen Syntheseparameter sind in Tabelle 2 aufgeführt

Katalysator	Temperatur	Lösungsmittel	Base	Ausbeute 84
Pd(PPh ₃) ₄	80°C	THF	K ₂ CO ₃ (2M in Wasser)	0%
PdCl ₂ (dppf)	80°C	THF	K ₂ CO ₃ (2M in Wasser)	0%
Pd(OAc) ₂	80°C	THF	K ₂ CO ₃ (2M in Wasser)	0%
Pd(PPh ₃) ₄	80°C	DMF	K ₂ CO ₃ (2M in Wasser)	0%
Pd(PPh ₃) ₄	80°C	DMF	Triethylamin	0%
Pd(PPh ₃) ₄	80°C	DMSO	Triethylamin	0%
Pd(PPh ₃) ₄	RT	THF	Triethylamin	Keine Reaktion
Pd(PPh ₃) ₄	80°C	Dioxan	Triethylamin	0%

Tabelle 2: Versuch zur Optimierung der Parameter der in Abbildung 39 gezeigten Suzuki-Kupplung; alle Reaktionen wurden mit äquimolaren Mengen der Edukte **82** und **83** durchgeführt, die Reaktionsdauer betrug jeweils 16 Stunden; bei Durchführung bei Raumtemperatur erfolgte keine Reaktion und die Edukte **82** und **83** konnten zurückgewonnen werden

Dabei wurden verschiedene Katalysatoren, verschiedene Lösungsmittel und verschiedene Basen untersucht. In keinem Ansatz konnte das gewünschte Produkt **84** isoliert werden, wobei bei jedem Versuch – abgesehen der Reaktion bei Raumtemperatur - ein komplexes Substanzgemisch entstand. Bei Durchführung bei Raumtemperatur fand keine Reaktion statt und die Edukte **82** und **83** konnten jeweils wieder isoliert werden. Da in jedem Versuch ein Gemisch vieler Produkte entstand und keines davon isoliert und charakterisiert werden konnte, wurde diese Möglichkeit der Darstellung von 3-Arylisoxazol-Intermediaten für die Synthese von Cassiarin A und Analoga verworfen.

Da die Darstellung des 3-Aryl-5-Methylisoxazols **71** (Abbildung 35) auf diese Weise nicht möglich war, sollte unter Umkehrung der Polaritäten der Partner für die Suzuki-Kupplung das 3-Brom-5-phenylisoxazol (**82**) an 3-Position mit einem Boronsäurepinacolester versehen werden, mit dem anschließend die Suzuki-Kreuzkupplung mit dem ortho-bromierten Aldehyd **69** (Abbildung 37) versucht werden sollte. Da für die 3-Bromierung an Isoxazolen lediglich eine Literaturstelle zu finden war – ein Patent aus dem Jahr 2019, zudem auf Chinesisch^[69] –

Synthesen

sollte auch hier eine eigene Methode erarbeitet werden. Die von Kamlah^[42] in ihrer Doktorarbeit verwendete Vorschrift zur Synthese von Isoxazol-4-boronsäurepinacolestern sollte auf die Synthese von Isoxazol-3-boronsäurepinacolestern angewendet werden. Diese beschreibt einen Brom-Lithium-Austausch von 3,5-disubstituierten-4-bromierten Isoxazolen mit *n*-Butyllithium bei -78°C in THF und anschließende Umsetzung mit Isopropoxy-pinacolboran zu Isoxazol-4-boronsäurepinacolester in sehr guten Ausbeuten.

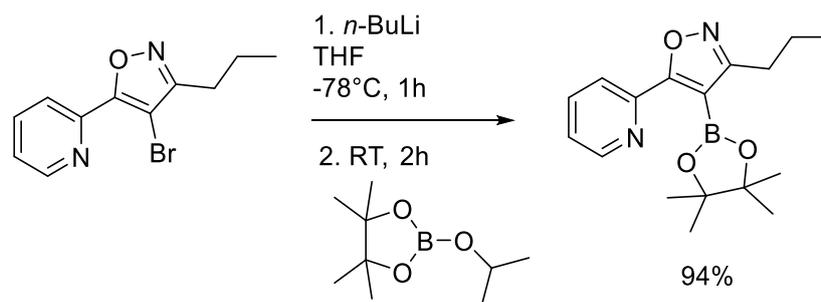


Abbildung 40: Darstellung von Isoxazol-4-boronsäurepinacolestern an einem Beispiel aus der Dissertation von Kamlah^[42], eigene Darstellung

Mit dem Wissen, dass Isoxazole prinzipiell diese Reaktionsbedingungen tolerieren, wurde versucht unter denselben Reaktionsbedingungen das - wie in Abbildung 38 gezeigt - synthetisierte 3-Brom-5-phenylisoxazol (**82**) an 3-Position zu borylieren. Hierbei wurde **82** in THF gelöst und unter Stickstoffatmosphäre auf -78°C gekühlt. Nach Zugabe von *n*-BuLi (2,5 M in Hexan) wurde Isopropoxy-pinacolboran zugegeben und die Lösung 2 Stunden gerührt. Als Ergebnis dieser Reaktion (Abbildung 41) wurde erneut ein komplexes Gemisch aus unterschiedlichen, nicht genauer charakterisierbaren Stoffen erhalten, wovon keines das erwünschte Produkt darstellte. Zur näheren Untersuchung der Reaktion wurde der Brom-Lithium-Austausch genauer beleuchtet. Hierbei wurde das 3-Brom-5-phenylisoxazol (**82**) in wasserfreiem THF gelöst und unter Stickstoffatmosphäre auf -78°C gekühlt. Anschließend wurde *n*-Butyllithium (1M in THF) zugegeben und die Lösung 30 Minuten gerührt. Mit einer Spritze wurde dann eine geringe Menge entnommen und in 0,2 mL Wasser aufgenommen. Anschließend wurden 0,2 mL Ethylacetat zugegeben und die organische Phase mittels Dünnschichtchromatographie untersucht. Zu erwarten war nach diesem Quenching das dehalogenierte Isoxazol **86**. Eine Vielzahl von neu entstandenen Substanzen lässt darauf schließen, dass bei der Reaktion viele unerwünschte Nebenreaktionen ablaufen und die Bildung des Produkts behindern. Da *n*-Butyllithium nicht nur als Lithierungsreagenz für einen Brom-Lithium-Austausch, sondern auch als starke Base eingesetzt werden kann, wären Säure-Base Reaktionen als Konkurrenzreaktionen zum Brom-Lithium-Austausch denkbar. Da das Isoxazol **82** jedoch keine aziden Protonen besitzt, scheint diese Erklärung unwahr-

scheinlich. Warum der Halogen-Lithium-Austausch nicht definiert abläuft, konnte nicht abschließend geklärt werden.

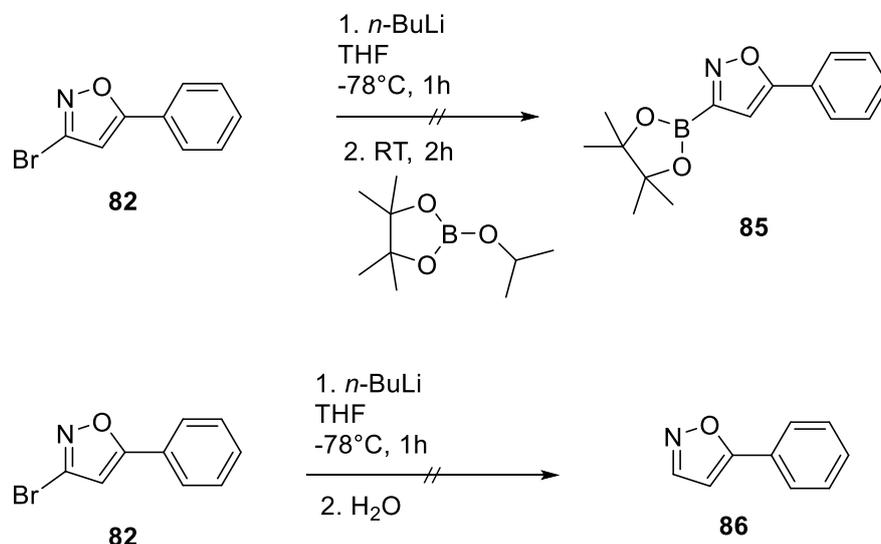


Abbildung 41: Versuch zur Borylierung von **82** nach einer Vorschrift von Kamlah^[42] (oben) und Untersuchung des Brom-Lithium-Austausches (unten)

Nachdem der Versuch der Biarylsynthese und der Versuch das Isoxazol **82** an 3-Position zu borylieren gescheitert waren, sollte ein letzter Weg untersucht werden, um Cassiarin A über die in Kapitel 2.1.1 (Abbildung 19) beschriebene Isoxazol-Route darzustellen.

3.1.4 Versuche zur Darstellung von Arylmethylketonen mithilfe eines Sulfoxonium-Ylids

Im Jahr 2017 publizierten Xu et al.^[70] und Barday et al.^[71] unabhängig voneinander eine von der Methodik her identische neue Möglichkeit zur Synthese von Arylmethylketonen mithilfe von Sulfoxonium-Yliden. Dabei wird mithilfe einer dirigierenden Gruppe unter Rhodium-Katalyse die ortho-ständige CH-Gruppe aktiviert, so dass sie mithilfe eines Sulfoxonium-Ylids unter Ausbildung eines Arylmethylketons funktionalisiert werden kann.

Synthesen

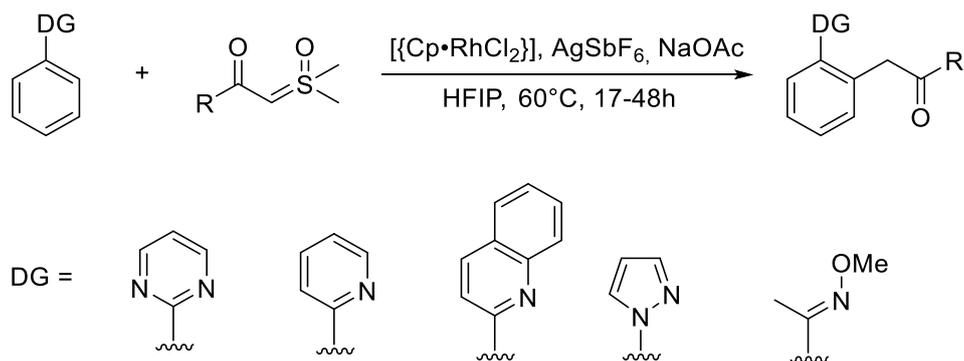


Abbildung 42: Darstellung von Arylmethylketonen mittels Sulfoxonium-Yliden nach Barday et al.^[71]

Als dirigierende Gruppen wurden Pyridin, Pyrimidin, Chinolin, Pyrazol und *O*-Methyloxim untersucht. Der von Xu et al.^[70] postulierte Mechanismus deutet darauf hin, dass für diese ortho-Funktionalisierung unter CH-Aktivierung eine dirigierende Gruppe mit einem Stickstoff an 2-Position unerlässlich ist. Hierbei postulieren die Autoren die Bildung eines rhodacyclischen Zwischenprodukts (**B**), das durch Cyclometallierung des Rhodiumkatalysators Cp^{*}RhCl₂ zusammen mit 2-Phenylpyridin (**A**) entsteht, wobei HCl frei wird. Die anschließende Reaktion mit dem Sulfoxoniumylid **C** ergibt die Rhodium(III)alkylverbindung **D**, die nach α -Eliminierung von DMSO in der Rhodium- α -oxo-Carbenspezies **E** resultiert. Durch „migratorische Insertion“^[70] der Rhodium-Aryl-Bindung in das aktivierte Carben entsteht Verbindung **F**. Anschließende Protolyse setzt das Produkt **G** frei, wobei der Katalysator regeneriert wird (Abbildung 43).

Synthesen

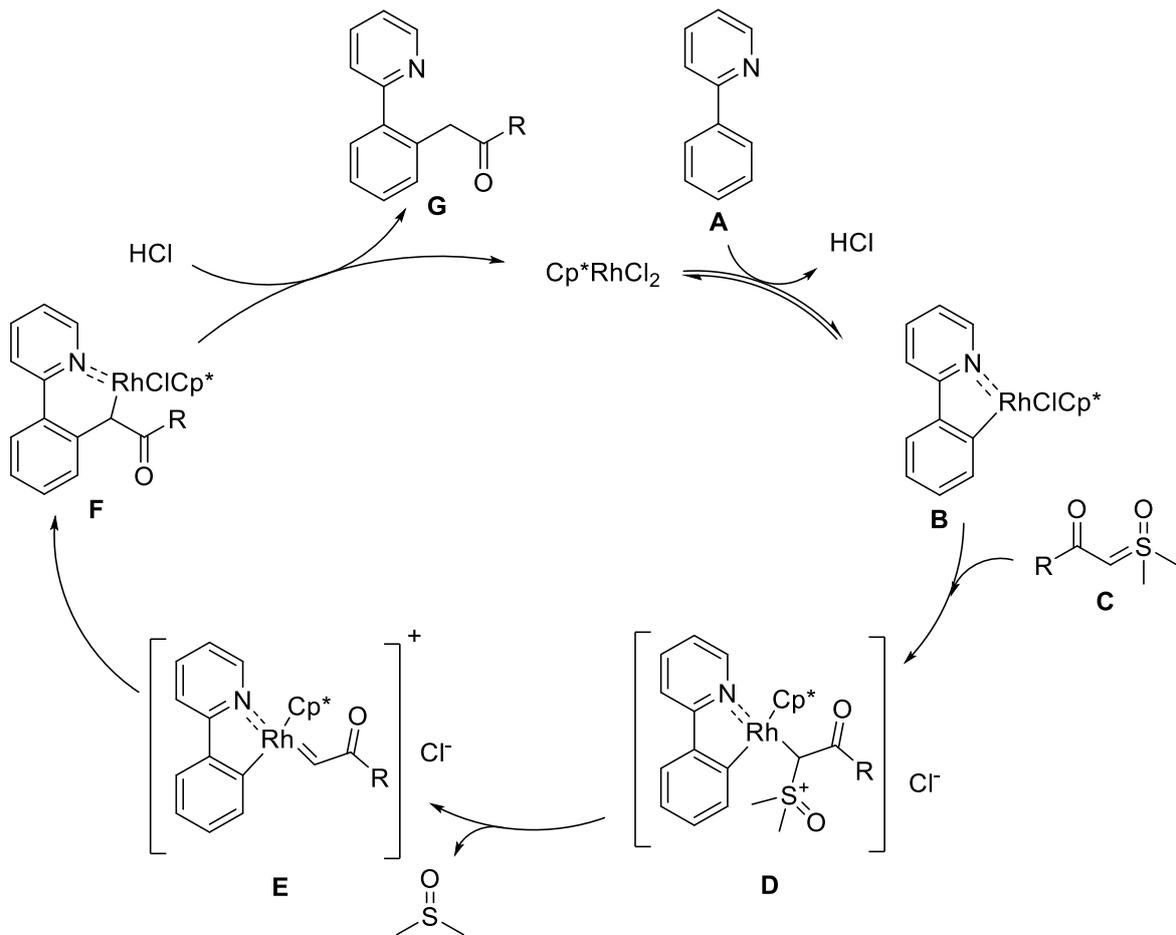


Abbildung 43: Postulierter Mechanismus der ortho-Funktionalisierung unter CH-Aktivierung am Beispiel von 2-Phenylpyridin nach Xu et al.^[70], eigene Darstellung

Da auch bei 3-Arylisoxazolen das Stickstoffatom des Isoxazols in vermutlich geeigneter Position liegt, sollte die Methode für die Darstellung von Cassiarin A angepasst und untersucht werden.

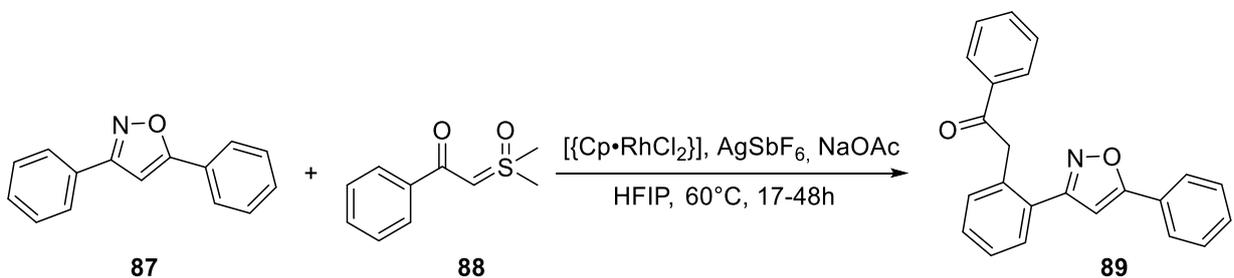


Abbildung 44: Geplante Darstellung des Arylmethylketons **89** mit Hilfe eines Sulfoxoniumylids **88** mit einem Isoxazol als dirigierender Gruppe am Aromaten

Synthesen

Dazu sollte ebenfalls mit einer Musterreaktion untersucht werden, ob ein repräsentatives 3-Arylisoxazol unter den publizierten Bedingungen die entsprechende Kupplung eingehen kann. Für diesen Zweck wurde das 3,5-Diphenylisoxazol (**87**) nach einem Protokoll von Pusch und Opatz^[72] synthetisiert. Dazu wurde Dibenzoylmethan (**90**) zusammen mit Hydroxylamin-Hydrochlorid in einem Gemisch aus Wasser und Ethanol (1:1) 6 Stunden zum Rückfluss erhitzt, was das Isoxazol **87** in 93% Ausbeute lieferte. Als zweiter Baustein wurde das Sulfoxoniumylid **88** nach einer Vorschrift von Xu et al.^[70] synthetisiert. Hierfür wurde Benzoylchlorid (**91**) in THF mit Kalium-*tert*-butanolat und Trimethylsulfoxoniumiodid– aufgrund der Lichtempfindlichkeit der Sulfoxonium-Ylide^[73] - unter Lichtausschluss zum Rückfluss erhitzt. So konnte **88** mittels FSC ebenfalls unter Lichtausschluss – die Glassäule wurde mit Aluminiumfolie ummantelt - in 91% Ausbeute gewonnen werden.

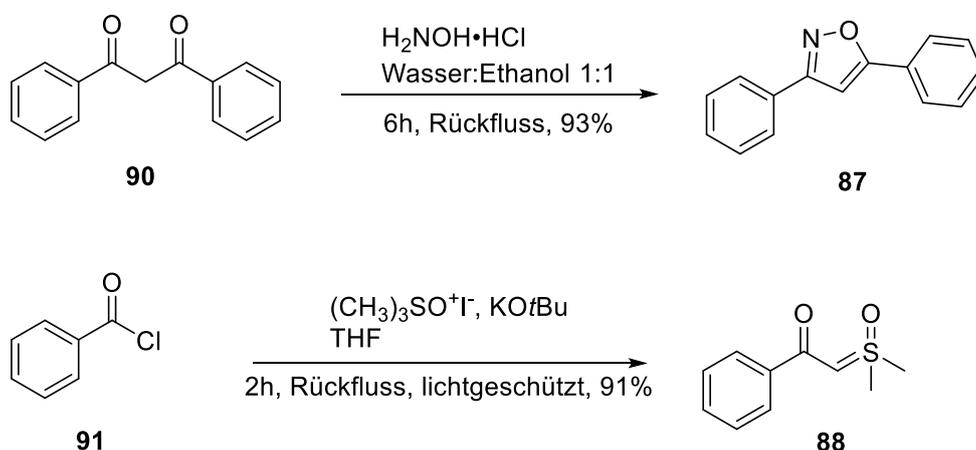


Abbildung 45: Darstellung des Isoxazols **87** und des Sulfoxoniumylids **88**, die für in Abbildung 44 gezeigte Modellreaktion benötigt werden

Um die Modellreaktion (Abbildung 44) durchzuführen, wurden nach dem Protokoll von Barday et al.^[71] Silberhexafluoroantimonat und (Pentamethylcyclopentadienyl)rhodium (III)dichlorid in HFIP (Hexafluorisopropanol) suspendiert und das Isoxazol **87**, Natriumacetat, das Sulfoxonium-Ylid **88** und weiteres HFIP zugegeben. Nach einer Reaktionszeit von 48 Stunden bei 60°C unter Lichtausschluss konnten beide Edukte (**87** und **88**) nahezu quantitativ zurückgewonnen werden. Auch ein weiterer Versuch, bei dem das Reaktionsgemisch für 48 Stunden auf 90°C unter Lichtausschluss gerührt wurde, lieferte kein Produkt und beide Edukte **87** und **88** konnten zurückgewonnen werden. Folglich scheinen Isoxazole als dirigierende Gruppen unter diesen Bedingungen für diesen Reaktionstyp nicht geeignet zu sein.

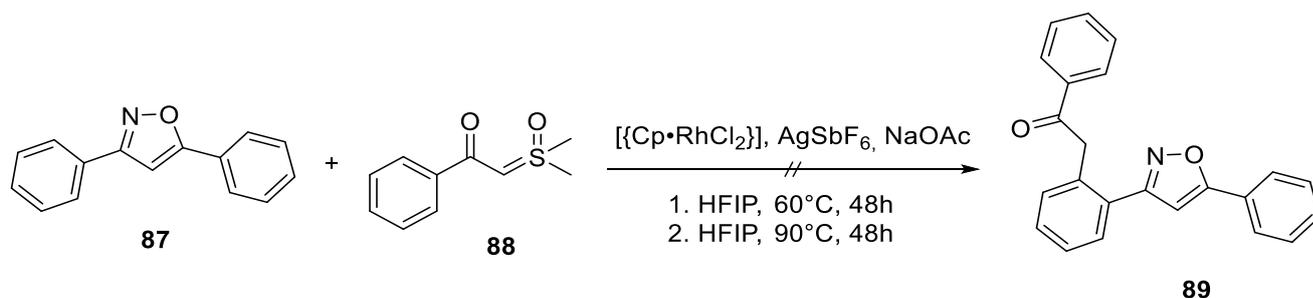


Abbildung 46: Gescheiterter Versuch der Rh-katalysierten Oxomethylierung mittels Sulfoxoniumylid und Verwendung eines Isoxazols als dirigierende Gruppe

Nachdem über Monate erfolglos versucht wurde durch Untersuchungen mithilfe von Musterreaktionen eine neue Syntheseroute für Cassiarin A über Isoxazol-Intermediate zu entwickeln, wurden die Bemühungen diesbezüglich eingestellt. Dabei scheiterten mehrere etablierte Darstellungsvarianten für 3,5-disubstituierte Isoxazole (Kapitel 3.1.1) unter den getesteten Bedingungen oder konnten in ihrer Ausbeute nicht optimiert werden, um mit der Praktikabilität etablierter Routen konkurrieren zu können (vgl. Kapitel 3.1.2 electrophile Cyclisierung, Abbildung 33). Auch über eine Palladium-katalysierte Kreuzkupplung war eine Synthese benötigter Intermediate nicht möglich (Kapitel 3.1.3). Somit wurde von der Entwicklung einer neuen Syntheseroute über Isoxazol-Intermediate Abstand genommen und bereits etablierte Routen verbessert und für die Darstellung von Analoga des Cassiarin A verwendet.

3.2 Synthese von Cassiarin A und Analoga über die Chromenon-Route nach Morita et al.

Nachdem die Etablierung einer neuen Route zur Synthese von Cassiarin A über Isoxazol-Intermediate gescheitert war, sollten bereits literaturbekannte Methoden verwendet werden, um sie auf ihre Robustheit und Praktikabilität zu untersuchen und auch Analoga des Cassiarin A zu synthetisieren. Dazu wurden zunächst die Routen nach Morita et al.^[17] und Yao^[32] – zwei prinzipiell sehr ähnliche Routen - genauer beleuchtet (vgl. Kapitel 1.4).

Synthesen

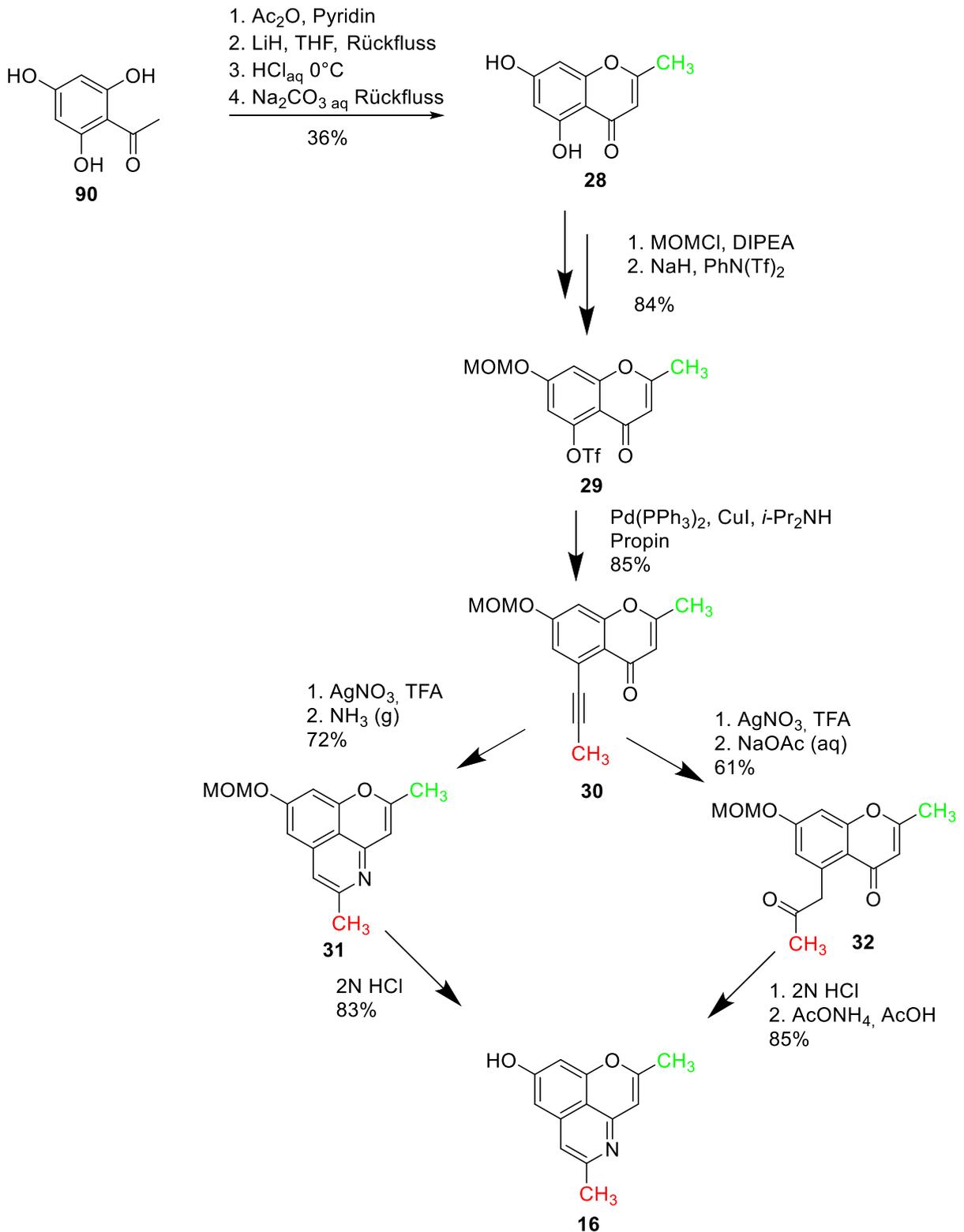


Abbildung 47: Darstellung von Cassiarin A (**16**) nach Yao et al.^[32] (links) und Morita et al.^[17] (rechts)

Nach erster Analyse der Verbesserungsmöglichkeiten der Routen fallen besonders zwei Optimierungsmöglichkeiten auf: zum einen ist die Darstellung des 5,7-Dihydroxy-2-methyl-4H-chromen-4-ons **28** über eine Allan-Robinson-Kondensation aus 2,4,6-

Trihydroxyacetophenon (**90**) und Acetanhydrid mit einer Reaktionszeit von zwei Tagen, vier Arbeitsschritten und einer Ausbeute von lediglich 36%^[33] nicht optimal; zum anderen sind die Schritte zur finalen Cyclisierung zu umständlich. Beide Protokolle arbeiten mit 1,2-Dichlorethan, einem höchst toxischen Lösungsmittel, die Reaktionstemperatur beträgt -24°C und die Reaktion muss unter Schutzgasatmosphäre ablaufen. Zusätzlich wurde von Yao et al.^[32] gasförmiger Ammoniak als Reaktionspartner verwendet (vgl. Abbildung 47).

3.2.1 Optimierung der Synthese des Intermediats Noreugenin

Zunächst wurde die Darstellung des Chromenons **28** (auch unter dem Namen Noreugenin bekannt) optimiert, indem eine eigene Methode im Mikrowellenreaktor entworfen wurde. Die Reaktion folgt dabei der Chemie einer klassischen Allan-Robinson-Kondensation, die bereits im Jahr 1924 vom späteren Nobelpreisträger Robert Robinson (1886-1975) und seinem Schüler James Allan publiziert wurde^[74] und noch heute auf dem Gebiet der Flavonoidsynthese genutzt wird. Dabei reagiert allgemein ein 2-Hydroxyacetophenon mit einem Anhydrid in Anwesenheit einer Base zum Chromenon. Dabei variieren die Ausbeuten sehr stark, da mit der Kostanecki-Acylierung eine Konkurrenzreaktion abläuft, die die gleichen Reaktionsbedingungen erfordert. Im Gegensatz zur Allan-Robinson-Reaktion liefert die Kostanecki-Acylierung jedoch kein Chromenon sondern ein Coumarin. Bei Betrachtung der postulierten Reaktionsmechanismen^[75] – in Abbildung 48 am Beispiel von 2-Hydroxyacetophenon (**91**) und Acetanhydrid mit Natriumacetat als Base gezeigt - wird deutlich, dass die Anellierung des neuen Rings nach Acetylierung der Hydroxygruppe auf zwei verschiedene Arten zustande kommen kann. Bei der gewünschten Allan-Robinson-Reaktion greift das aus dem Methylketon durch Tautomerisierung gebildete Enol intramolekular die Ester-Carboxylgruppe an was in der Verbindung **E** resultiert. Durch Deprotonierung von **E** durch Natriumacetat und anschließende Eliminierung von Wasser entsteht so das Chromenon **94**. Der Mechanismus der Kostanecki-Acylierung beginnt ebenfalls mit einer Tautomerisierung, hier jedoch am Ester, was zu Verbindung **A** führt. Durch intramolekularen Angriff am Keton und folglich Anellierung zu **B** wird ebenfalls durch Deprotonierung durch Natriumacetat und anschließender Eliminierung von Wasser das Coumarin **93** erhalten. Theoretisch sollte die Allan-Robinson-Reaktion bevorzugt ablaufen, da der Anteil des in der Enol-Form vorliegenden Esters **A** deutlich geringer sein sollte.

Synthesen

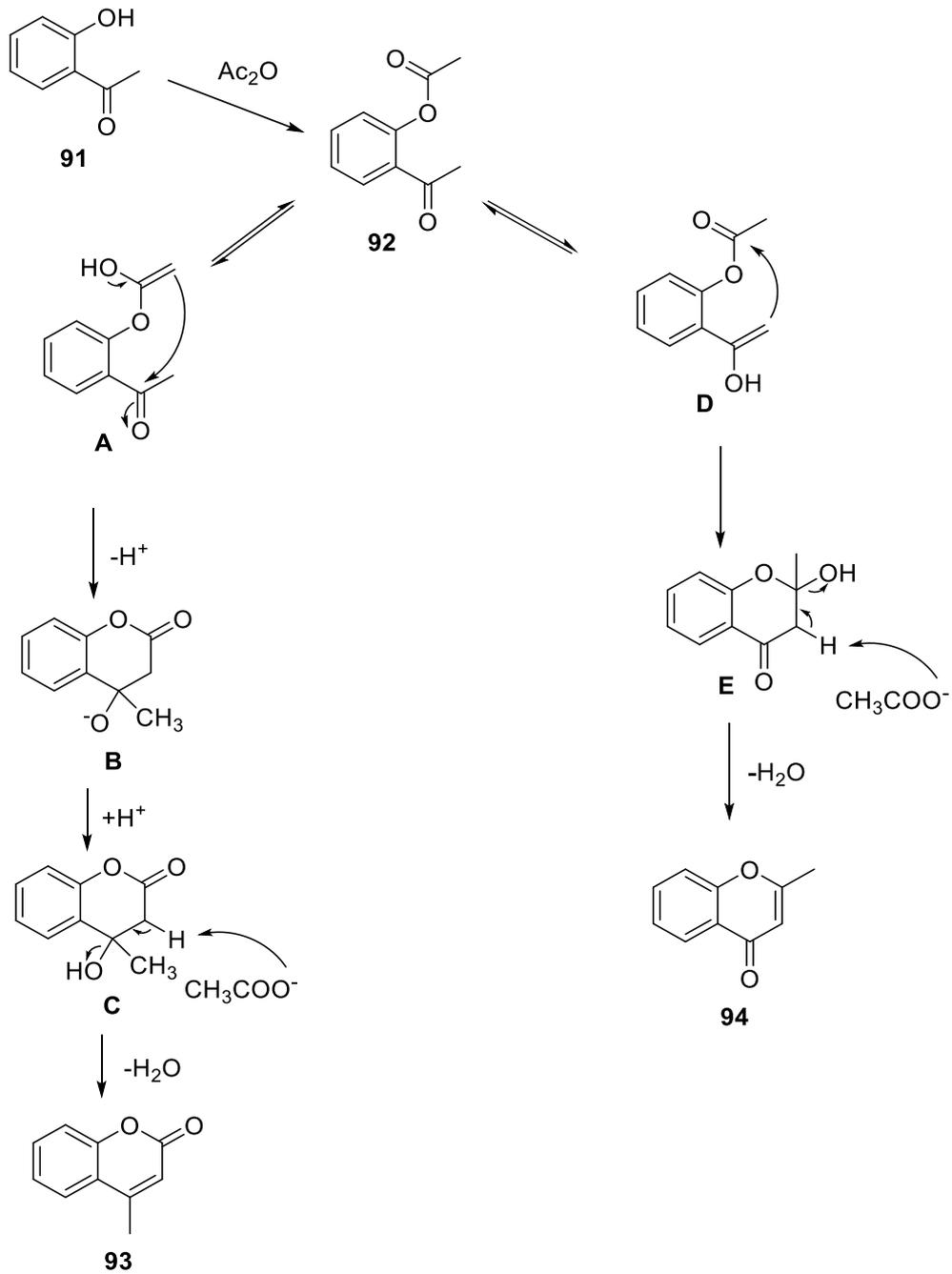


Abbildung 48: Reaktionsmechanismen der Kostanecki-Acylierung mit Coumarin **93** als Produkt (links) und der Allan-Robinson-Reaktion mit Chromenon **94** als Produkt (rechts)

Um die Reaktion zu optimieren, sollte die Allan-Robinson-Reaktion in einem Mikrowellenreaktor durchgeführt werden, wobei mehrere Parameter getestet wurden (vgl. Tabelle 3). Das daraus gewonnene Rohprodukt wurde anschließend drei Stunden mit Kaliumcarbonat zum Rückfluss erhitzt und dadurch zum Chromenon **28** deacetyliert. (Abbildung 49) Dabei sollte auch versucht werden die Entstehung des Coumarins **97** möglichst gering zu halten.

Synthesen

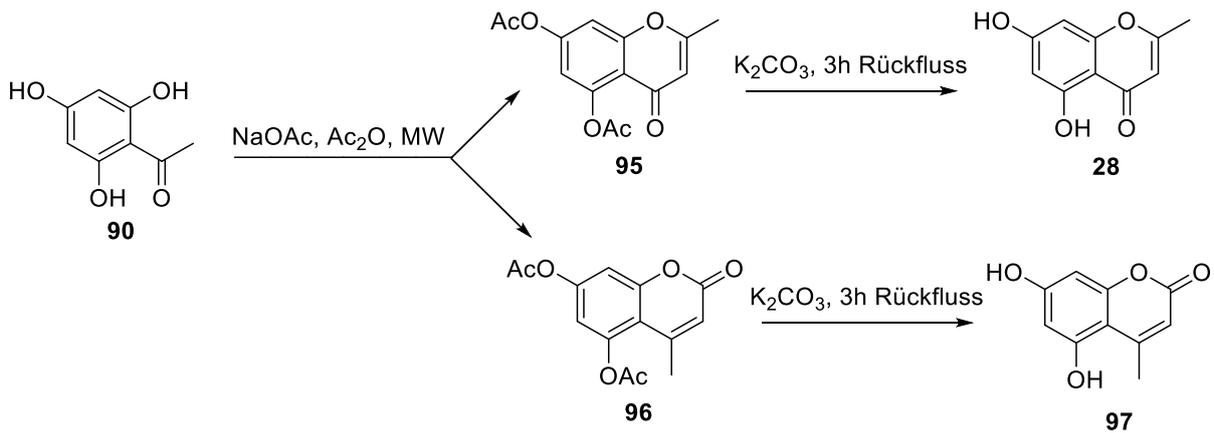


Abbildung 49: Optimierung der Synthese des Chromenons **28** mithilfe eines Mikrowellenreaktors mit zu erwartender Nebenreaktion zum Coumarin **97**

Leistung [W]	Temperatur [°C]	Dauer [min]	Ausbeute 28	Ausbeute 97
100	100	60	22%	15%
200	100	60	36%	30%
200	60	60	29%	30%
200	180	60	41%	0%
200	180	90	36%	0%
200	180	40	54%	0%

Tabelle 3: Versuche zur Optimierung der Darstellung von Noreugenin (**28**) mit Veränderung der Parameter am Mikrowellenreaktor

Durch systematische Optimierung der Parameter (vgl. Tabelle 3) konnte die Ausbeute von Noreugenin (**28**) auf 54% gesteigert werden, wobei die Reaktionszeit auf knapp vier Stunden reduziert werden konnte. Ein weiterer Vorteil der Methode ist, dass alle entstandenen Nebenprodukte derart polar sind, dass sie bei dem gewählten Fließmittelgemisch nicht eluieren, was den Aufwand für die anschließende Säulenchromatographie auf ein Minimum reduziert. Überraschenderweise entstand bei hohen Temperaturen im Mikrowellenreaktor kein Coumarin **97**. Durch die Reaktion im Mikrowellenreaktor konnte also nicht nur die Ausbeute gesteigert, sondern auch die Konkurrenzreaktion unterdrückt werden.

3.2.2 Optimierung der Palladium-katalysierten Kreuzkupplung zur Darstellung von 5-Alkynylchromenonen

Die anschließende Schützung der 7-Hydroxygruppe des Chromenons **28** (Abbildung 50) mit Methoxymethylchlorid unter Zusatz einer schwachen organischen Base wurde analog dem Protokoll nach Morita et al.^[17] durchgeführt. Wichtig in diesem Schritt ist die entsprechende Base so zu wählen, dass sie nicht stark genug ist, die Hydroxygruppe der 5-Position zu deprotonieren, um die gewünschte Selektivität zu erreichen. Da das Proton der 5-Hydroxygruppe durch die Carbonylgruppe an Position 4 über eine Wasserstoffbrückenbindung stabilisiert wird, lässt sich dieses Proton mit schwachen Basen nicht leicht entfernen. Für die Deprotonierung der 7-Hydroxygruppe eignen sich organische Basen wie Triethylamin, DIPEA (Diisopropylethylamin) oder DIPA (Diisopropylamin), während die Deprotonierung der 5-Hydroxygruppe lediglich mit starken Basen wie Natriumhydrid oder mit Carbonat bei hohen Temperaturen gelingt. Anschließend wurde die Hydroxygruppe in 5-Position gemäß der Literatur^[17] mit Natriumhydrid und mit *N*-Phenyl-bis(trifluoromethansulfonimid) zu Verbindung **29** trifliert. Eine nahezu quantitative Ausbeute und eine Reaktionszeit von nur zwei Stunden machen hier eine Optimierung überflüssig.

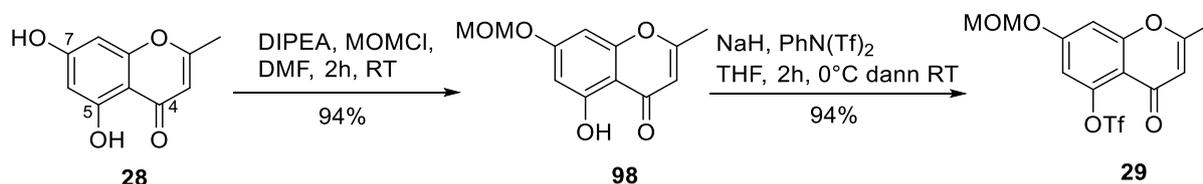


Abbildung 50: Schützung der 7-Hydroxygruppe und anschließende Triflierung der 5-Hydroxygruppe^[17]

Während in den beiden eingangs erwähnten Protokollen^{[32][17]} für die anschließende Sonogashira-Reaktion Propin *in situ* generiert werden musste, konnte für diese Arbeiten das neuerdings kommerziell erwerbbar Propin als 1M-Lösung in DMF verwendet werden. Da in beiden Literaturstellen für **30** eine gute Ausbeute von jeweils über 80% beschrieben war, sollten die Reaktionsbedingungen übernommen werden. Dazu wurde das Triflat **29** mit Tetraäthylammoniumiodid, Kupfer(I)iodid und Tetrakis(triphenylphosphin)palladium(0) in einem Gemisch aus DMF/Triethylamin gelöst und die Propin-Lösung zugegeben. Nach einer Reaktionszeit von 16 Stunden wurde neben dem gewünschten Produkt eine Vielzahl an Nebenprodukten detektiert, die den Aufwand der Isolation des Arylalkins **30** deutlich erhöhten (lange Säule, viel Lösungsmittel, lange Arbeitszeit). Die Bildung der Vielzahl an Nebenprodukten

könnte vor allem an der Carbonylgruppe an Position 4 liegen. Das Sauerstoffatom könnte durch elektrostatische Wechselwirkung (in Abbildung 51 in Rot dargestellt) mit dem Palladiumatom nach der oxidativen Addition interagieren, wodurch die Bindung zwischen dem Chromenon und dem Palladium stabiler ist. Dies könnte zu späterer Zeit im Reaktionsmechanismus^[76] die Folge haben, dass die *trans/cis*-Isomerisierung nicht vollständig ablaufen kann, da der Bewegungsradius der Liganden, der für die Isomerisierung nötig ist, eingeschränkt wird. Auch könnte die Stabilität der Palladium-Kohlenstoff-Bindung etwas erhöht werden, was die Bereitschaft des Palladiums zur reduktiven Eliminierung schwächen könnte. Sollte die Reaktion an diesen Stellen stoppen oder es zu weiteren Nebenreaktionen kommen, könnte so die große Zahl an Nebenprodukten erklärt werden.

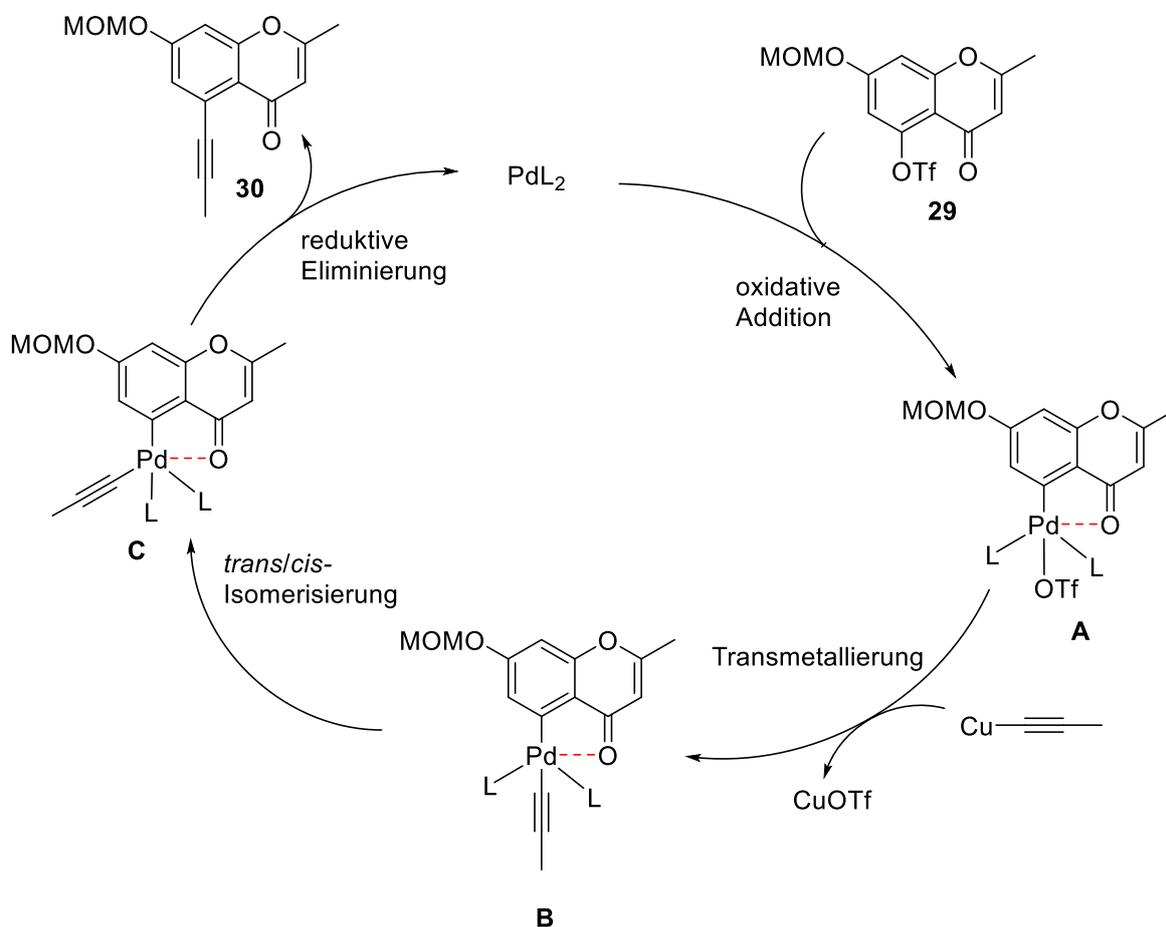


Abbildung 51: Reaktionsmechanismus der Sonogashira-Reaktion am Beispiel von **29** mit Propin, mögliche Wechselwirkungen zwischen Palladium und Sauerstoff in Rot dargestellt

Auch bei diesem Reaktionsschritt wurde durch Veränderung mehrerer Parameter (vgl. Tabelle 4) versucht die Ausbeute zu steigern. Auffällig war, dass nahezu alle Versuche unabhängig von den variierten Parametern die gleichen Reaktionsverläufe (besonders Farbänderun-

gen des Reaktionsgemisches und Zeitpunkt der Farbänderungen waren stets gleich) und auch sehr ähnliche Ausbeuten lieferten. Lediglich bei Erwärmen auf 80°C konnte eine deutliche Verschlechterung der Ausbeute beobachtet werden, wobei auch mittels DC-Kontrolle noch deutlich mehr Nebenprodukte detektiert werden konnten.

Katalysator	Temperatur	Lösungsmittel	Base	Zusatz	Ausbeute 30
Pd(PPh ₃) ₄	RT	DMF	TEA	TBAI	44%
Pd(OAc) ₂	RT	DMF	TEA	TBAI	38%
Pd(PPh ₃) ₂ Cl ₂	RT	DMF	TEA	TBAI	31%
Pd(PPh ₃) ₄	80°C	DMF	TEA	TBAI	17%
Pd(PPh ₃) ₄	RT	DMF	TEA	-	40%
Pd(PPh ₃) ₄	RT	THF	TEA	TBAI	38%
Pd(PPh ₃) ₄	RT	DMF	DIPEA	TBAI	39%

Tabelle 4: Versuche zur Optimierung der Sonogashira-Reaktion (Abbildung 51)

Da das Alkinylchromenon **30** erhalten werden konnte, die Reaktion jedoch nicht verbessert werden konnte, wurde die Route im Weiteren fortgesetzt.

3.2.3 Anellierung zum Cassiarin A über Silber-katalysierte Isochinolin-Synthese

Das Hauptaugenmerk der Optimierung sollte jedoch auf der Verbesserung des finalen Cyclisierungsschrittes zum Cassiarin A liegen (vgl. Abbildung 47). Dabei sollte eine Methode erarbeitet werden, mit der das Cassiarin A in einem Schritt ausgehend vom Alkinylchromenon **30** erhalten werden konnte. Grundlegend für diese Synthese war eine neuartige Möglichkeit Isochinoline zu synthetisieren, die von Reddy et al.^[77] im Jahr 2015 publiziert wurde. Darin beschreiben die Autoren die silberkatalysierte Anellierung von *o*-(1-Alkynyl)arylaldehyden oder – ketonen (**A**) mithilfe von Ammoniumacetat zu Isochinolinen (**B**) bei Raumtemperatur (vgl. Abbildung 52). Diese Reaktion sollte ausgehend vom Alkinylchromenon **30** das MOM-geschützte Cassiarin A (**31**) liefern, welches in einem letzten Arbeitsgang mit wässriger Mineralsäure – z.B. Salzsäure - hydrolysiert werden sollte, um Cassiarin A (**16**) zu erhalten (vgl. Abbildung 41). Offen gelassen wurde zunächst, ob das Zwischenprodukt **31** isoliert werden müsse oder direkt zu **16** umgesetzt werden kann.

Synthesen

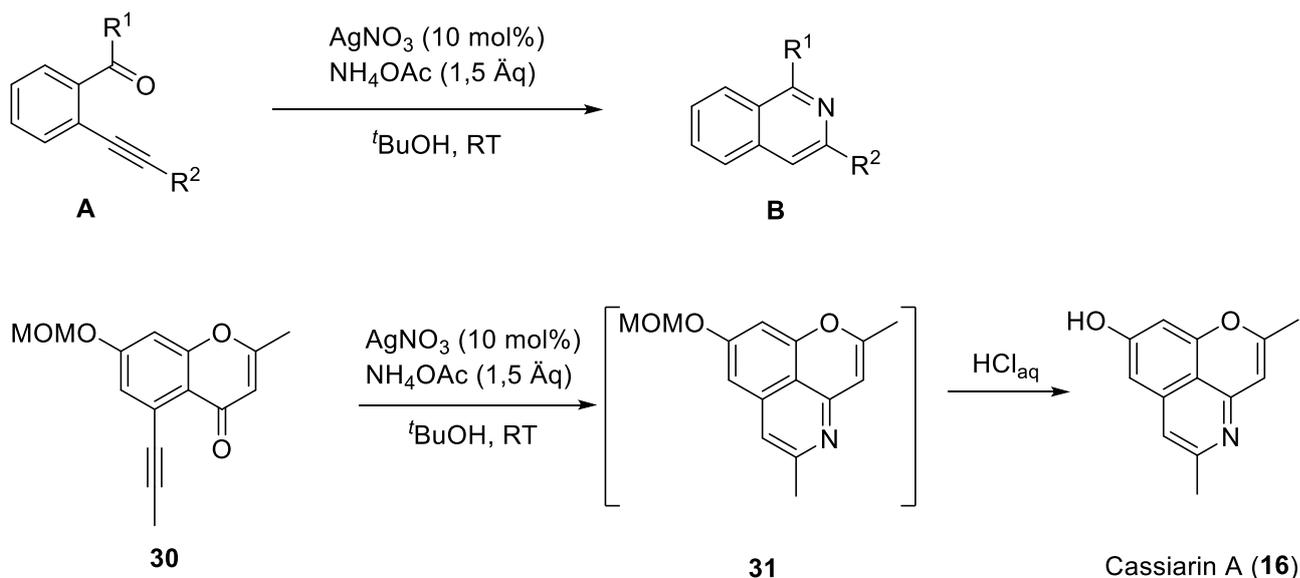


Abbildung 52: Silberkatalysierte Darstellung von Isochinolinen nach Reddy et al.^[77] (oben) und geplante Anwendung auf die Darstellung von Cassiarin A (unten)

In einem ersten Versuch wurde das Alkynylchromenon **30** in *tert*-Butanol gelöst und Silbernitrat und Ammoniumacetat zugegeben. Um sicher zu gehen, dass das Lösungsmittel nicht fest wird – der Schmelzpunkt von *tert*-Butanol beträgt 26°C –, wurde das Gemisch auf 40°C erwärmt und über Nacht gerührt. Die DC-Kontrolle zeigte, dass **30** komplett verbraucht war und ein neuer, blau fluoreszierender Hauptspot gebildet wurde, welcher mithilfe von ASAP-Massenspektrometrie als das Zwischenprodukt **31** identifiziert werden konnte. Anschließend wurde direkt ein fünffacher Überschuss Salzsäure (6M in Wasser) zugegeben und die Suspension gerührt bis **31** komplett verbraucht war. Diese Methode lieferte Cassiarin A (**16**) in lediglich 4% Ausbeute, wobei viele unidentifizierbare Nebenprodukte entstanden. Anscheinend werden durch die direkte Zugabe von wässriger Salzsäure in das Gemisch viele weitere Nebenreaktionen gefördert, die die Bildung von **16** behindern. Da eine „one-pot“-Reaktion offensichtlich nicht möglich war, sollte **31** mittels flüssig-flüssig-Extraktion von den wasserlöslichen Bestandteilen befreit werden und anschließend als Rohprodukt zu **16** umgesetzt werden. Dazu wurde die Cyclisierungs-Reaktion erneut durchgeführt. Nachdem die DC-Kontrolle erneut zeigte, dass **30** verbraucht war und sich drei neue Spots gebildet hatten, von dem einer bei Bestrahlung mit UV-Licht (254 nm) blau fluoreszierte, wurde eine flüssig-flüssig-Extraktion mit Wasser und Dichlormethan/Isopropanol (4:1) durchgeführt und die organische Phase zur Trockene eingengt. Das gewonnene Rohprodukt wurde anschließend in einer Mischung aus Methanol und Salzsäure (6M in Wasser) im Verhältnis 1:1 gelöst und 16 Stunden bei Raumtemperatur gerührt, wobei Cassiarin A in 43% Gesamtausbeute bezogen auf **30** gewonnen werden konnte.

Synthesen

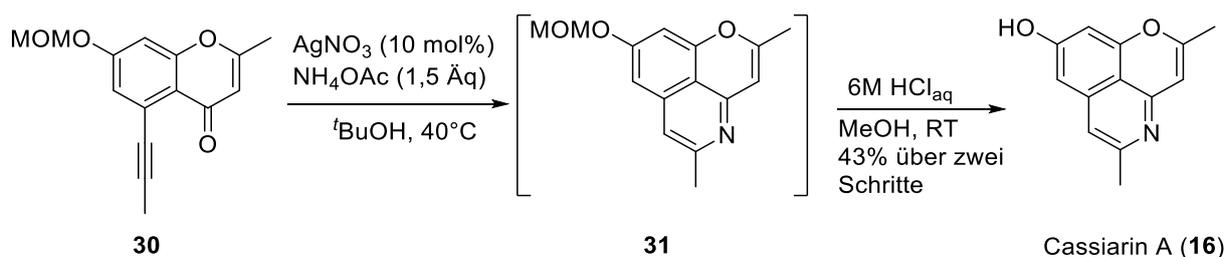


Abbildung 53: Durchführung der Anellierung zum tricyclischen Cassiarin A (**16**) angelehnt an ein Protokoll zur Synthese von Isochinolinen von Reddy et al.^[77]

Im Vergleich zu den eingangs beschriebenen Syntheserouten (Abbildung 47) konnte der Anellierungsschritt deutlich verkürzt werden und überzeugt trotz der überschaubaren Ausbeute von 43% durch die einfache Handhabung, da ohne Schutzgas gearbeitet werden kann und die eingesetzten Chemikalien deutlich ungiftiger und auch günstiger sind. Zudem fallen durch die direkte Umsetzung zeitraubende Aufreinigungsschritte weg.

Durch die oben beschriebenen systematischen Optimierungen konnten die Syntheserouten basierend auf den Arbeiten von Morita et al.^[17] und Yao et al.^[32] auf fünf Schritte verkürzt werden, wobei das Cassiarin A in einer Gesamtausbeute von 9% ausgehend vom 2,4,6-Trihydroxyacetophenon (**90**) dargestellt werden konnte. Eine Übersicht über die gesamte Syntheseroute ist in der folgenden Abbildung 54 gezeigt:

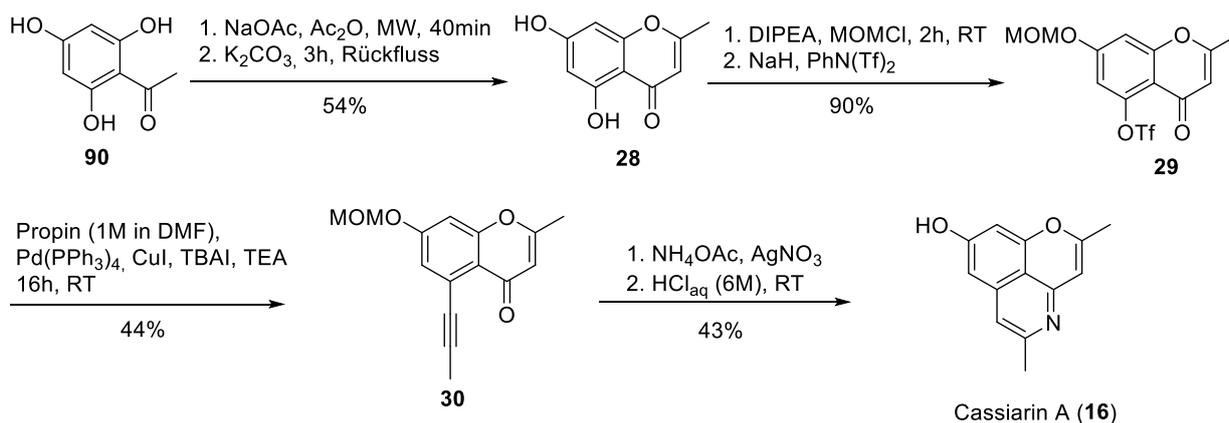


Abbildung 54: Darstellung von Cassiarin A mittels modifizierter Syntheseroute basierend auf den Arbeiten von Morita et al. und Yao et al.

Besonders auffällig waren die Lösungseigenschaften des Cassiarin A. War es in allen gängigen organischen Lösungsmitteln bei Raumtemperatur nahezu unlöslich (Aceton, Acetonitril, Dichlormethan, Chloroform, Diethylether, Tetrahydrofuran, Methanol, Ethanol, Dimethylsulfoxid), ließ es sich in einer Mischung aus Dichlormethan und Methanol im Verhältnis 4:1 rela-

Synthesen

tiv gut lösen. Das Eluentengemisch für die Säulenchromatographie wurde somit auf ein Verhältnis von 10:1 (Dichlormethan/Methanol) festgelegt, was zwar eine deutliche Verschlechterung der Löslichkeit zur Folge hatte, aber zu annehmbaren Aufreinigungsergebnissen führte. Da die Substanz aufgrund ihrer Rigidität bei Bestrahlung mit UV-Licht (Wellenlänge 365 nm) stark blau fluoresziert, konnte die Fluoreszenz der Substanz während der Chromatographie auf der Säule und in den Reagenzgläsern beobachtet werden (vgl. Abbildung 55). Mithilfe einer Verdünnungsreihe konnte gezeigt werden, dass die Fluoreszenz der Substanz ab einer Konzentration von ca. 1 µg/mL für das menschliche Auge sichtbar wird.

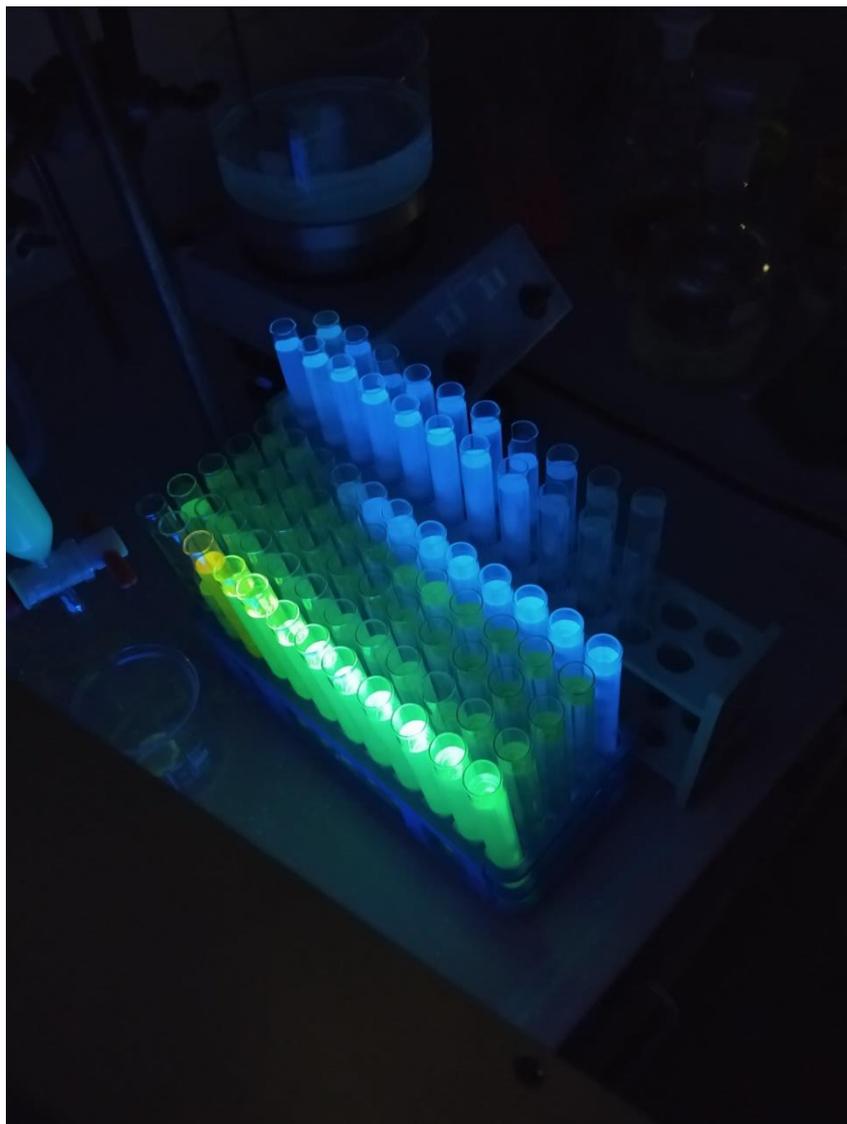


Abbildung 55: Sichtbare hellblaue Fluoreszenz der gesammelten Fraktionen nach der säulenchromatographischen Aufreinigung von Cassiarin A (**16**) bei Bestrahlung mit UV-Licht (365 nm Wellenlänge)

3.2.4 Darstellung von Cassiarin A–Analoga mit Variationen an den Positionen 2 und 5

Nachdem die modifizierte Syntheseroute etabliert war, sollten mehrere Analoga des Cassiarin A synthetisiert und anschließend auf ihre jeweilige antiplasmodiale Aktivität gegenüber Chloroquin als Referenz getestet werden. Wie in Kapitel 2.1.1 beschrieben, sollte dabei der Fokus auf Variationen an der 2- und 5-Position im Cassiarin A gelegt werden. Auf Basis der oben beschriebenen Syntheseroute sollten durch Veränderung der Alkinbausteine, die in der Sonogashira-Reaktion eingesetzt werden, andere Substituenten an der 5-Position eingeführt werden (vgl. Abbildung 56). Dazu wurde Propin in der Kupplungsreaktion mit dem Triflat **29** durch kommerziell erwerbliches *N*-(*tert*-Butoxycarbonyl)propargylamin (**99**) ersetzt. Das resultierende Boc-geschützte Amin **100** wurde analog der Reaktion in Abbildung 53 zum Cassiarin A–Analogon **101** cyclisiert, wobei bei Reaktion mit wässriger Salzsäure nicht nur die Methoxymethyl-Schutzgruppe sondern auch gleichzeitig die Boc-Schutzgruppe hydrolysiert wird. Nach Neutralisierung des Reaktionsgemisches mit Triethylamin konnte **101** als freies Amin gewonnen werden. Aufgrund der physiko-chemischen Eigenschaften von **100** war eine Isolierung und Charakterisierung mit Säulenchromatographie nicht möglich. Auch nach zwei Versuchen mit verschiedenen Fließmitteln (zunächst Isohexan:Ethylacetat 1:1, anschließend DCM:MeOH 20:1 mit 0,5% TEA) konnte **100** nicht analysenrein isoliert werden. Daher war für diesen Syntheseschritt weder die Bestimmung der Ausbeute noch die analytische Charakterisierung von **100** möglich. Somit konnte nur die Gesamtausbeute über zwei Schritte bestimmt werden. Diese lag bei lediglich 7%.

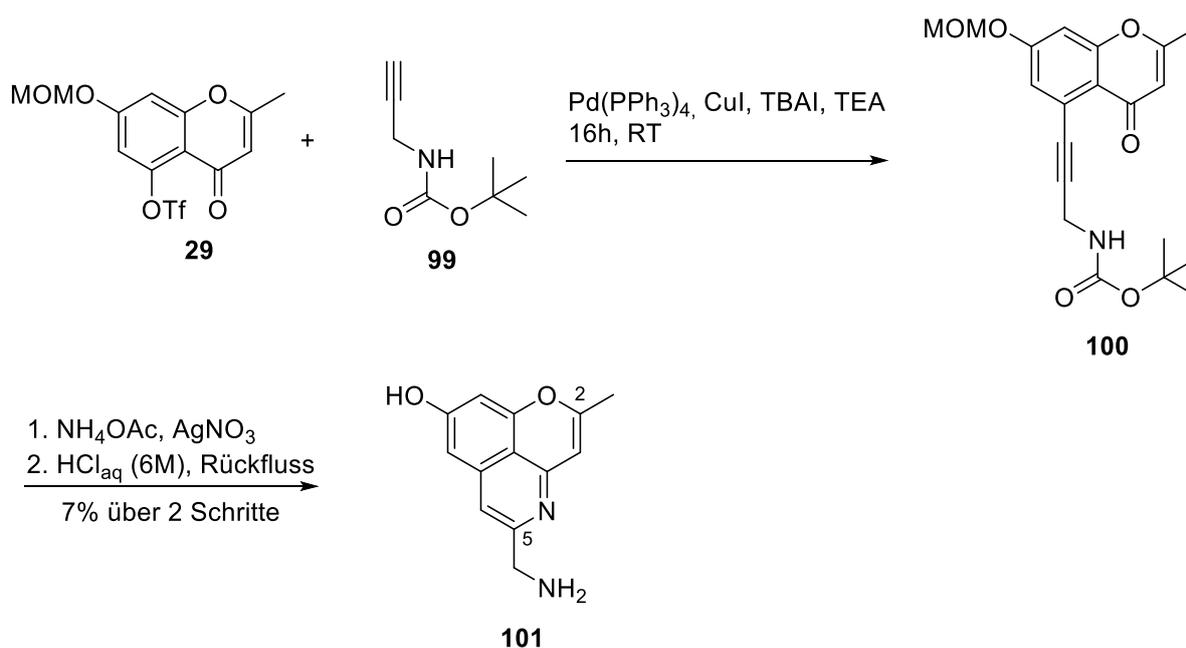


Abbildung 56: Darstellung des ersten Cassiarin A–Analogons **101** über die zuvor etablierte Route

Synthesen

Variationen der 2-Position sollten zunächst durch kommerziell erwerbliche Edukte abgedeckt werden, da man hier auf einen vielseitigen Pool aus Naturstoffen (z.B. Flavone, Flavonole, Flavanone oder Isoflavone) zurückgreifen kann. Daher wurde als Edukt statt Noreugenin (Abbildung 50 **28**) zunächst das Flavonoid Chrysin (**102**, Abbildung 57) gewählt, da es kostengünstig in großer Menge zu beschaffen war. Da hierbei lediglich der Methylrest durch einen Phenylrest ausgetauscht wurde, konnte die gesamte weitere Syntheseroute zwanglos übernommen werden. Auch hier wurde zunächst regioselektiv eine Hydroxygruppe mit einer MOM-Schutzgruppe versehen und die verbliebene Hydroxygruppe anschließend trifliert, was das Aryltriflat **103** in 98% über zwei Schritte lieferte. Durch Sonogashira-Reaktion mit verschiedenen Alkinen konnten die Alkynylchromenone **104**, **105** und **106** erhalten werden, die anschließend zu den Cassiarin A–Analoga cyclisiert wurden. Auf diese Weise konnten die Verbindungen **107**, **108** und **109** in Gesamtausbeuten im Bereich zwischen 7% und 15% dargestellt werden.

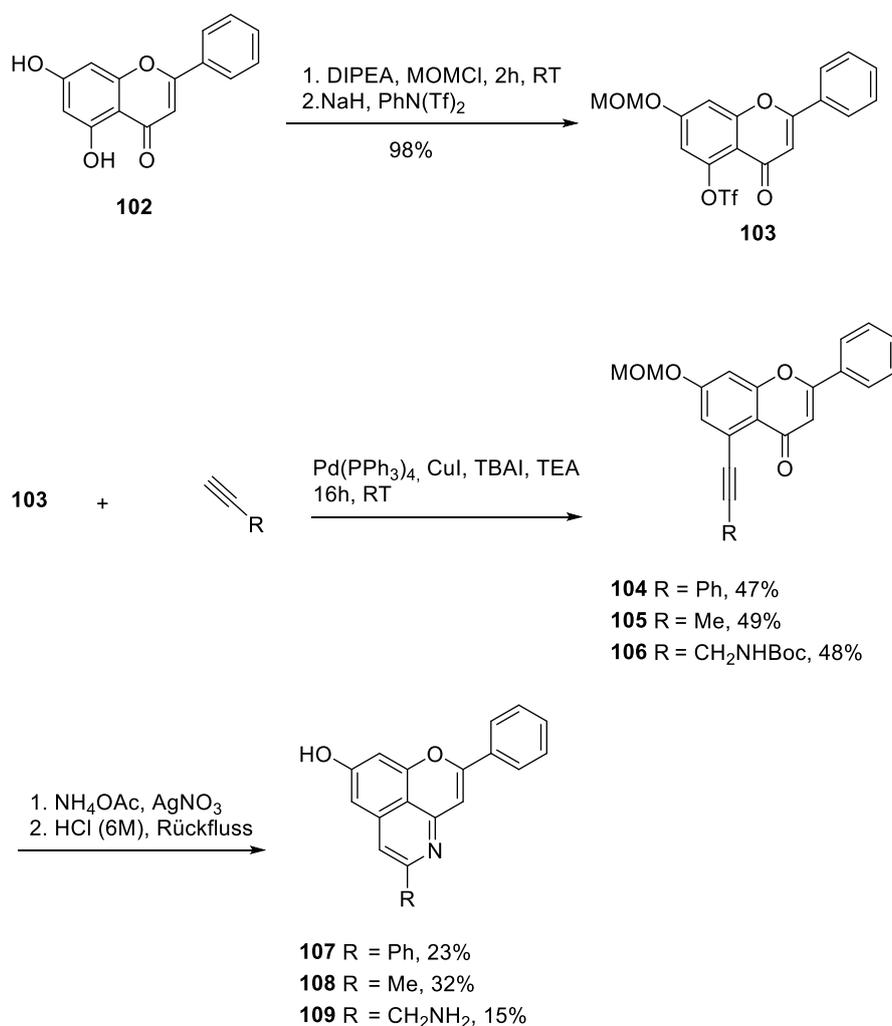
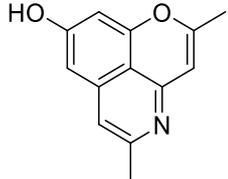
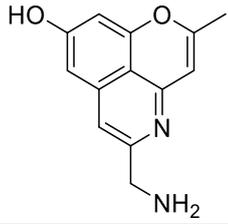
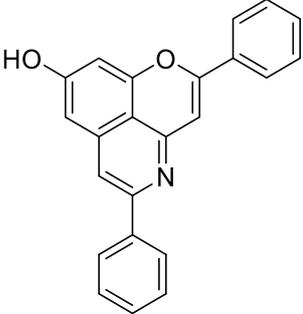


Abbildung 57: Darstellung der Cassiarin A–Analoga **107**, **108** und **109** mit Chrysin (**102**) als Ausgangsstoff

3.2.5 Erste biologische Untersuchungen zu Cassiarin A–Analoga

Nachdem Cassiarin A und die ersten Analoga davon synthetisiert worden waren, sollte die erste Generation der Substanzen auf ihre biologische Aktivität hin untersucht werden. Dazu sollte zunächst – Cassiarin A wird als antiplasmodial aktive Substanz^[14] beschrieben – die antiplasmodiale Aktivität gegen Chloroquin-sensitive (3D7) und –resistente (DD2) Zelllinien von *Plasmodium falciparum* im Rahmen einer Kooperation mit Prof. Dr. Gabriele Pradel (RWTH Aachen) getestet werden (die Ergebnisse sind in Tabelle 5 aufgelistet). Die Testungen wurden von Dr. Julius Ngwa als Triplikate durchgeführt, wobei alle Substanzen gegen die Zelllinie 3D7, aber lediglich die vielversprechendsten Kandidaten (IC_{50} (3D7) $\leq 1 \mu\text{M}$) auch gegen die Chloroquin-resistente Zelllinie DD2 getestet wurden. Hieraus sollten erste Erkenntnisse zur antiplasmodialen Aktivität gewonnen werden, um anschließend weitere, verbesserte Generationen von Cassiarin A–Analoga zu synthetisieren.

Substanznummer	Strukturformel	IC_{50} -Werte gegen <i>Plasmodium falciparum</i> (3D7) [μM]	IC_{50} -Werte gegen <i>Plasmodium falciparum</i> (DD2) [μM]
Cassiarin A (16)		$18,0 \pm 6,9$	-
101		$11,4 \pm 3,5$	-
107		$2,4 \pm 0,4$	-

Synthesen

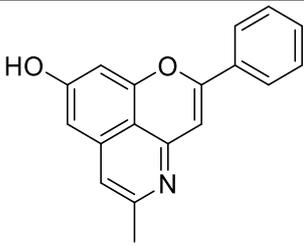
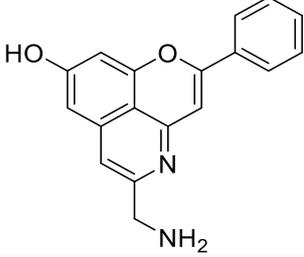
108		$0,7 \pm 0,2$	$0,9 \pm 0,1$
109		$0,6 \pm 0,2$	$1,6 \pm 0,2$
Chloroquin		$0,021 \pm 0,005$	-

Tabelle 5: Ergebnisse der biologischen Testung auf antiplasmodiale Aktivität gegen Chloroquin-sensitive (3D7) und Chloroquin-resistente (DD2) Zelllinien von *Plasmodium falciparum* mit Chloroquin als Referenz, durchgeführt von Dr. Julius Ngwa (RWTH Aachen) nach einer in der Arbeitsgruppe etablierte Methode^[78]

Aus den IC₅₀-Werten lässt sich sehr deutlich ablesen, dass der Phenylrest an 2-Position des Cassiarin A die Aktivität deutlich erhöht (Substanzen **107**, **108**, **109**). Die Anwesenheit eines großen Phenylrestes an 5-Position – wie bei **107** der Fall – verringert die Aktivität im Vergleich zu den anderen Substanzen. Offensichtlich werden an 5-Position also nur relativ kleine Reste toleriert, wobei die Verbindungen **108** und **109** sehr ähnliche IC₅₀-Werte gegen die 3D7-Zelllinie zeigen, jedoch **108** gegenüber der Chloroquin-resistenten Variante DD2 immer noch ähnlich potent ist. Festzuhalten ist aus diesen ersten Ergebnissen, dass die antiplasmodiale Aktivität gegenüber der Leitsubstanz etwa um den Faktor 30 gesteigert werden konnte. Jedoch zeigte sich auch, dass das in der Therapie etablierte Arzneimittel Chloroquin ebenfalls ca. 30 mal potenter ist als **109**, das aktivste Cassiarin A–Analogon aus dieser ersten Reihe.

Da Luesakul et al.^[19] in ihrer Arbeit die Cytotoxizität von Cassiarin A–Analoga beschrieben, wurden die Substanzen auch in einem in unserem Arbeitskreis etablierten MTT-Assay auf cytotoxische Aktivität untersucht. Dabei fiel auf, dass die antiplasmodial aktivsten Substanzen gleichzeitig auch enormes cytotoxisches Potential besitzen. Der IC₅₀-Wert von **107** lag bei 8,99 µM, der von **109** sogar bei 2,20 µM gegenüber einer HL60-Zelllinie (Leukämie). Um diese Werte zu bestätigen, wurde mit Dr. Florian Lengauer (LMU München, Arbeitsgruppe Dr. Karin Bartel) ein weiterer Kooperationspartner zur Untersuchung der zytotoxischen Aktivitäten herangezogen. Im Rahmen dieser Kooperation wurden die Substanzen **16**, **101**, **107**, **108** und **109** auf ihre Aktivitäten gegenüber Jurkat (T-Zell-Leukämie) und MCF-7 (Brust-

krebs) Zelllinien getestet und deren Apoptoserate bestimmt (die Ergebnisse sind in Kapitel 4.2.1 und die Methodik in Kapitel 6.4.3 beschrieben). Aus diesen Arbeiten wurde deutlich, dass die cytotoxische Aktivität stark mit den antiplasmodialen korreliert, weswegen der Fokus für weitere Generationen von Cassiarin A–Analoga auf der Verbesserung der cytotoxischen Aktivität liegen sollte. Diese Entscheidung wurde getroffen, da ein potentieller antiplasmodialer Wirkstoff mit erheblicher cytotoxischer Aktivität keinen Nutzen hat, ein potentieller cytotoxischer Wirkstoff mit antiplasmodialen Eigenschaften hingegen schon.

3.2.6 Synthese der zweiten Generation Cassiarin A–Analoga

Da terminale polare Gruppen wie die Amine in den Substanzen **101** und **109** einen aktivitätssteigernden Effekt haben, sollte die 5-Position auch mit Hydroxymethyl- (**110**) und Hydroxyethylresten (**111**) versehen werden. Zudem sollte untersucht werden, wie sich substituierte Aromaten an 2-Position auf die Aktivität auswirken. Dazu sollte als Ausgangsstoff Apigenin (**112**) dienen und nach der in Kapitel 3.2 beschriebenen etablierten Route das Cassiarin A–Analogon **113** liefern. Da das *N*-Boc geschützte Propargylamin (**99**), das zur Synthese der 5-Aminomethyl-substituierten Cassiarine **101** und **109** verwendet wurde (vgl. Abbildung 56 und 57) relativ teuer ist, wurde für die weitere Untersuchung das günstige Propin (1M in DMF) verwendet, was in einer 5-Methylgruppe resultiert. Durch die relativ ähnlichen Aktivitäten von **108** und **109** (vgl. Tabelle 5) sollten daher zunächst 5-Methyl-substituierte Cassiarine getestet werden, wobei bei hoher Aktivität der 5-Methylrest anschließend durch einen 5-Aminomethylrest substituiert und die neu entstandene Substanz getestet werden sollte.

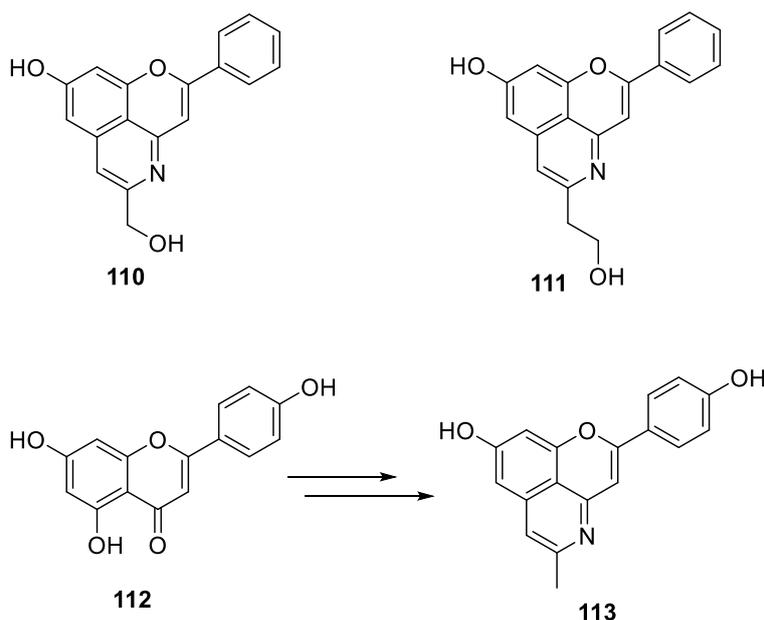


Abbildung 58: Geplante Cassiarin A–Analoga der „zweiten Generation“

Synthesen

Für die Synthese von **110** und **111** konnte erneut das aus Chrysin (**102**) gewonnene MOM-geschützte Triflat **103** als Startmaterial eingesetzt werden. Anschließend wurden in akzeptablen Ausbeuten mittels Sonogashira-Reaktion mit Propargylalkohol bzw. 3-Butin-1-ol die Alkynylchromenone **114** und **115** gewonnen (Abbildung 59). Die silberkatalysierte Anellierung mit Silbernitrat und Ammoniumacetat und anschließende Entschützung mit 6M Salzsäure lieferte unter Standardbedingungen die Substanzen **110** und **111** in 14% bzw. 12% Ausbeute. Die schlechten Ausbeuten im finalen Cyclisierungsschritt lassen sich damit begründen, dass die Verbindungen **110** und **111** sehr stark mit Kieselgel interagierten und sich nur sehr schwer von der Säule eluieren ließen. Da von beiden Molekülen für die spektroskopische Analytik und biologischen Testungen genug Substanz gewonnen werden konnte, wurden keine weiteren Versuche unternommen die Ausbeuten zu steigern.

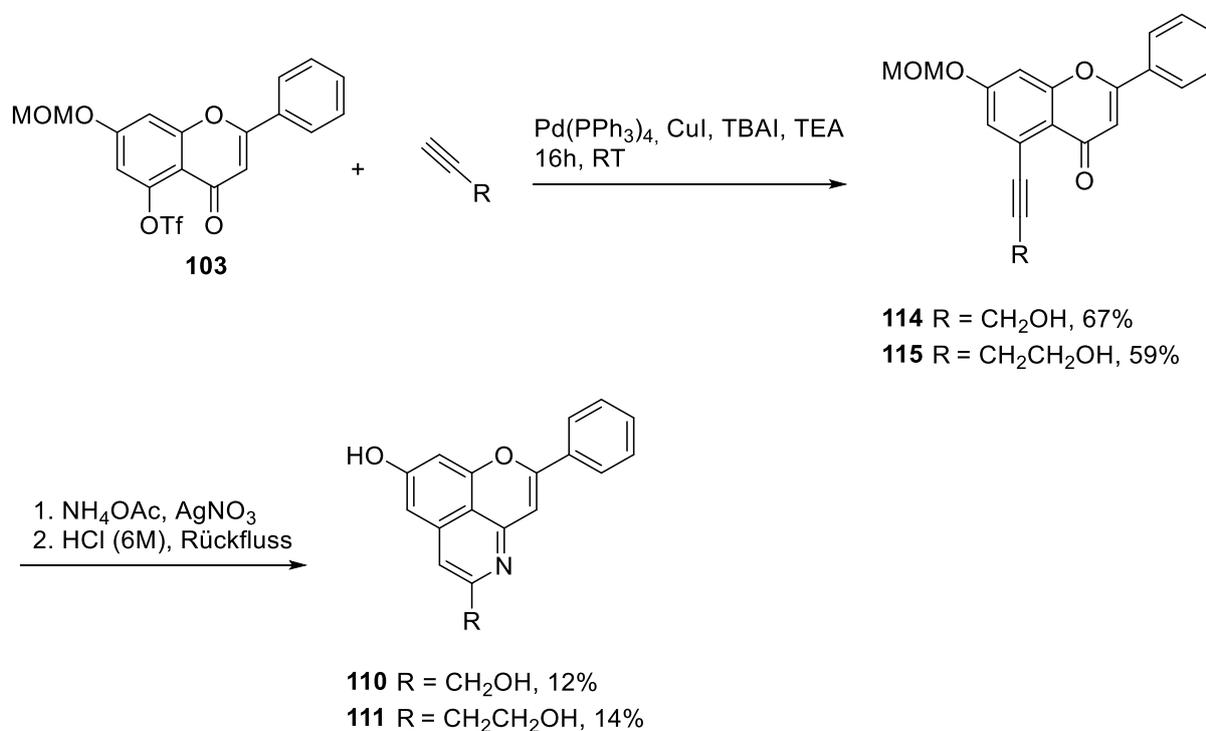


Abbildung 59: Darstellung der Cassiarin A–Analoge **110** und **111**

Für die Synthese von **113** (Abbildung 60) kann mit Apigenin (**112**) das Edukt günstig gekauft werden. Auch für diese Darstellung wurde die in Kapitel 3.2 etablierte Syntheseroute verwendet. Nach MOM-Schützung – in diesem Fall wurden zwei Äquivalente Methoxymethylchlorid verwendet, um auch die Hydroxygruppe am Aromaten an C-2 zu schützen – wurde das geschützte Chromenon **116** trifliert. Nachdem das Triflat **117** so gewonnen werden konnte, wurde es mit Propin (1M in DMF) mithilfe einer Sonogashira-Reaktion gekuppelt, woraus Verbindung **118** entstand. Die finale silberkatalysierte Anellierung und Entschützung lieferte

Synthesen

113 in 19% Ausbeute. Ein Problem der Syntheseroute war die schlechte Löslichkeit aller Verbindungen in den etablierten Lösungsmitteln, was zwar durch eine Erhöhung der Lösungsmittelmenge leicht behoben werden konnte, jedoch in einem deutlich größeren Arbeitsaufwand resultierte. Besonders die Isolierung bereitete hier erheblichen Mehraufwand. Da die Syntheseprodukte durch Umkristallisation nicht gereinigt werden konnten, da sie nicht gut kristallisierten, mussten sie mittels Säulenchromatographie gereinigt werden, was einen enormen Verbrauch an Lösungsmittel, Kieselgel und Arbeitszeit nach sich zog.

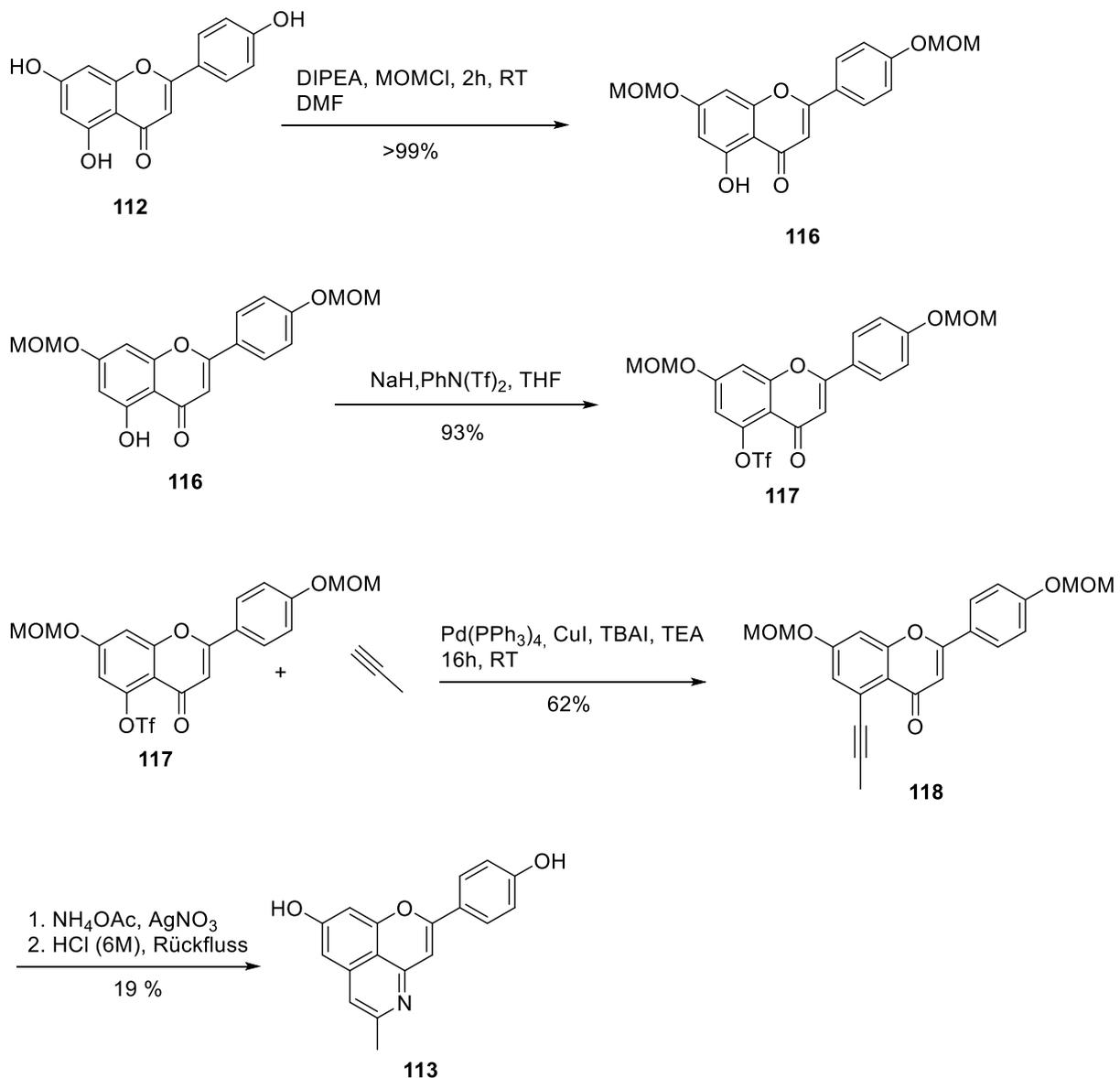


Abbildung 60: Darstellung des Cassiarin A–Analogons **113** beginnend bei Apigenin (**112**)

Die Ergebnisse der biologischen Testung auf cytotoxische Aktivität (vgl Kapitel 6.4.2 und 6.4.3) zeigen, dass die Substanzen **110**, **111** und **113** keine verbesserte Aktivität gegenüber den bisher besten Verbindungen **108** und **109** mit sich bringen.

Über die optimierte Syntheseroute basierend auf den Arbeiten von Morita et al.^[17] und Yao et al.^[32] lassen sich neue Substituenten an der 5-Position des Cassiarin A–Grundkörpers durch Variationen der für die Sonogashira-Reaktion benötigten Alkine sehr einfach realisieren. Ausgehend von den Triflaten **29** (Abbildung. 56) und **103** (Abbildung. 57) sind mit Sonogashira-Reaktion und folgender Anellierung/Deprotektion nur zwei Schritte zum Cassiarin A–Analogon erforderlich. Die erhaltenen Ausbeuten sind für eine etablierte Syntheseroute im präparativen Maßstab zwar nicht zufriedenstellend, für die Synthese geringer Mengen für die Durchführung von Aktivitätstests im Zellmodell jedoch ausreichend. Nur bedingt geeignet ist diese Route jedoch für die Darstellung von Analoga des Cassiarin A mit Variationen der 2-Position, da diese bereits zu Beginn der Synthese eingeführt werden müssen (vgl. Abbildung 47). Da die biologischen Testergebnisse darauf schließen lassen, dass größere Reste als Aminomethyl-Substituenten die Aktivität verringern, scheinen die Möglichkeiten zur Optimierung der Aktivität an dieser Stelle relativ gering. Daher sollte der weitere Fokus auf der Einführung neuer Substituenten an 2-Position liegen. Dafür sollte eine – ebenfalls im Prinzip literaturbekannte - Syntheseroute näher beleuchtet und untersucht werden, die im nächsten Kapitel vorgestellt wird.

3.3 Darstellung von Cassiarin A und Analoga über die Isochinolin-Route nach Gutiérrez et al.

3.3.1 Versuch zur Darstellung des MOM-geschützten Benzylbromids A

Da Variationen der 2-Position immer zu Beginn der in Kapitel 3.2 beschriebenen Syntheseroute eingeführt werden müssen, sollte für Variabilität an dieser Position auf eine Route zurückgegriffen werden, bei der der Rest an dieser Position später in der Synthesefolge eingeführt wird. Daher wurde die Synthese nach Gutiérrez et al.^[34] näher beleuchtet und auf Optimierungsmöglichkeiten untersucht. Diese Autoren beschreiben die Darstellung des substituierten Benzylbromids A nach einer literaturbekannten Methode nach Gester et al.^[79]. Die anschließende Umsetzung mit Iodmethan und Tosylmethylisocyanid (auch bekannt als TosMIC oder Van-Leusen-Reagenz) liefert das Isocyanid B. Nach elektrophiler Cyclisierung mit NBS zum iodierten Isochinolin C wird dieses mit Propin in einer Sonogashira-Reaktion zu D gekuppelt. Zuletzt können Entschützung der MOM-Schutzgruppen und gleichzeitige 6-*endo*-dig Cyclisierung mithilfe von 10 prozentiger Salzsäure erreicht werden, woraus Cassiarin A (16) resultiert.

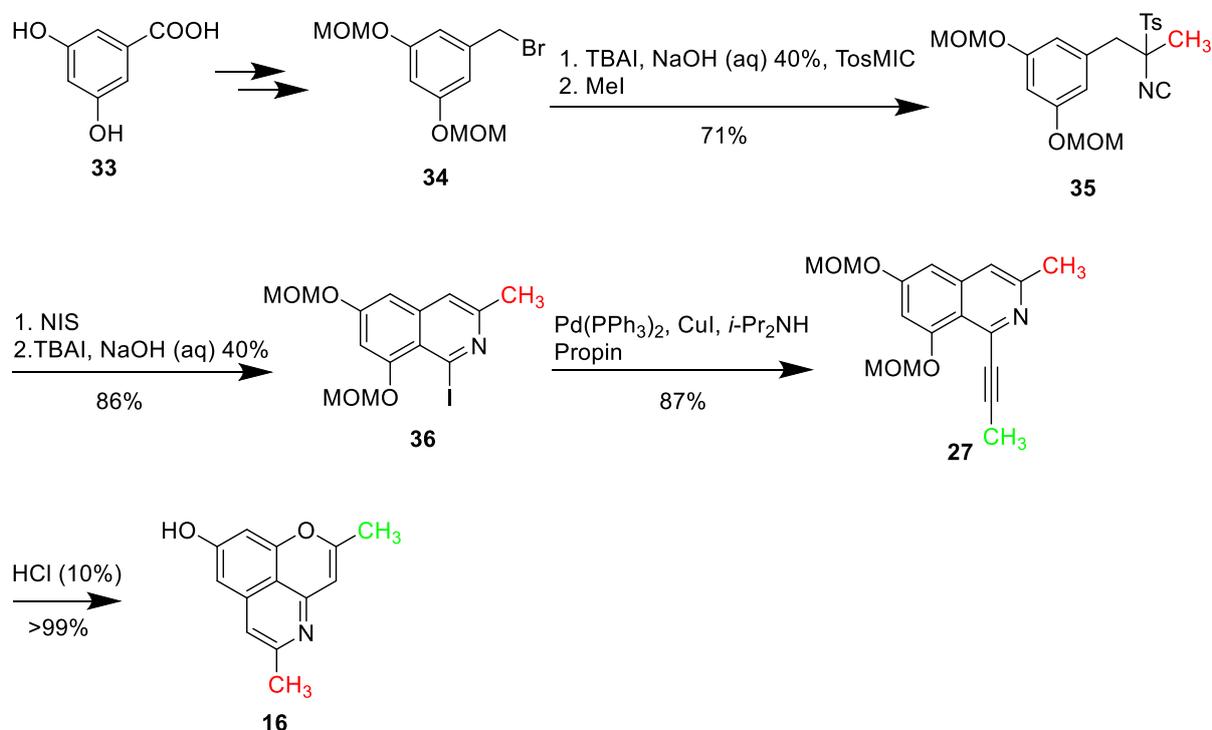


Abbildung 61: Syntheseroute zur Darstellung von Cassiarin A nach Gutiérrez et al.^[34]

Synthesen

Diese Route umfasst zunächst die Synthese von 1-(Brommethyl)-3,5-bis(methoxymethoxy)benzen (**34**) dem Protokoll von Gester et al.^[79] folgend. Ausgehend vom 3,5-Dihydroxybenzoesäuremethylester (**120**) können mittels Williamson-Ether-Synthese die beiden Hydroxygruppen mit Methoxymethylchlorid geschützt werden, um **121** in 93% Ausbeute zu erhalten. Anschließende Reduktion mit Lithiumaluminiumhydrid liefert den Benzylalkohol **119** in 92% Ausbeute (Abbildung 63). Die abschließende Appel-Reaktion mit Triphenylphosphin und NBS als Halogenquelle sollte das Benzylbromid **34** ergeben. Dieses stellte sich das jedoch als instabil heraus, da es sich bereits beim Entfernen des Lösungsmittels am Rotationsverdampfer selbst bei Raumtemperatur sehr schnell zersetzt. Gut zu erkennen war die Zersetzung durch eine schnell stärker werdende Rotfärbung des Rohproduktes nach der Extraktion, wobei nach dem Eindampfen eine gummiartige, rote Masse zurückbleibt. Nach DC-Kontrolle des Rohproduktes wurde durch eine Vielzahl von neu entstandenen Nebenprodukten der Beweis der Zersetzung erbracht. Gester et al.^[79] beschrieben, dass diese schnelle Zersetzung ein hydrolytischer Vorgang sei, weswegen diese auf eine wässrige Extraktion verzichtet und das Produkt direkt einer Säulenchromatographie unterzogen hatten, um es aufzureinigen. Dass die Hydrolyse so schnell verläuft, kann dadurch erklärt werden, dass die Hydrolyseprodukte einerseits der Benzylalkohol **119**, andererseits Bromwasserstoffsäure sind. Da diese ihrerseits mit den Acetalen der MOM-Schutzgruppen beider Moleküle **34** und **119** reagieren kann, können diverse Nebenprodukte in Folgereaktionen entstehen. Durch weitere Hydrolyse neu gebildete Bromwasserstoffsäure kann anschließend wiederum diese Reaktionen eingehen. Ein weiterer Hinweis für die Plausibilität dieser Theorie ist die Tatsache, dass die Hydrolyse bei 3,5-Dimethoxybenzylbromid (**122** Abbildung 64) deutlich langsamer verläuft, da die entstehende Bromwasserstoffsäure nicht weiter reagieren und somit dem Reaktionsgleichgewicht nicht entzogen werden kann. Aufgrund der deutlich erhöhten Stabilität kann **122** sogar käuflich erworben und bei Raumtemperatur gelagert werden.

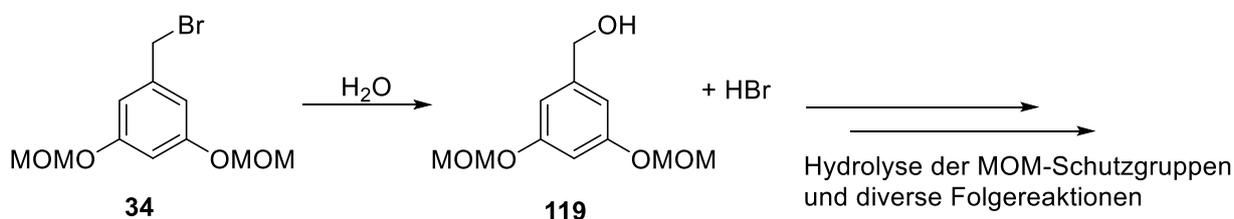


Abbildung 62: Hydrolyse von Benzylbromid **34**; entstehendes HBr reagiert mit **119** und **34** zu diversen Nebenprodukten

Dem Protokoll von Gesters et al.^[79] folgend wurde auf eine wässrige Extraktion verzichtet und das Rohprodukt nach Einengen am Rotationsverdampfer direkt einer Säulenchromatographie unterzogen. Trotz des Versuchs möglichst wasserfrei zu arbeiten, konnte die beginnende und fortschreitende Hydrolyse von **34** während der Säulenchromatographie an der immer stärker werdenden roten Färbung des Kieselgels verfolgt werden. Daher konnte **34** lediglich in etwa 12% Ausbeute isoliert werden, wobei die Substanz jedoch nie in analysenreiner Qualität erhalten werden konnte.

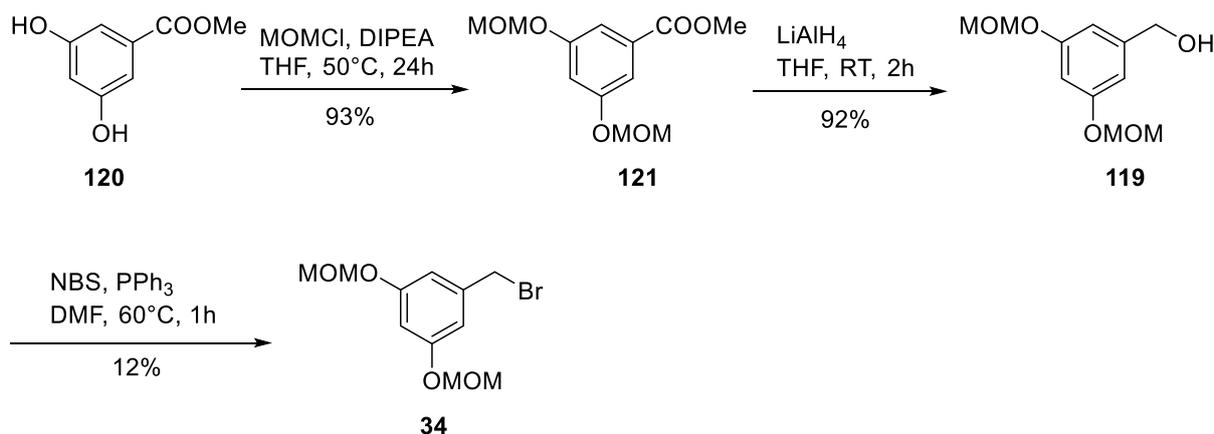


Abbildung 63: Darstellung des Benzylbromids **34**

3.3.2 Optimierung der Synthese des unsymmetrischen Isocyanids **123**

Durch eine Variation der Schutzgruppen sollte das oben beschriebene Problem beseitigt werden. So sollten statt der Methoxymethyl-Gruppen Methyl-Schutzgruppen verwendet werden, insbesondere da das 3,5-Dimethoxybenzylbromid (**122**) günstig kommerziell erwerbbar ist. Durch Verwendung von Bortribromid sollten im letzten Schritt die Methylgruppen gespalten werden und die Cyclisierung zum Cassiarin A in einem Schritt ablaufen. Hierbei sollte untersucht werden, ob die Cyclisierung nicht nur mit einer Brønstedt-Säure (wässrige Salzsäure, vgl. Abbildung 61) sondern auch mit einer Lewis-Säure (Bortribromid) gelingen kann.

Synthesen

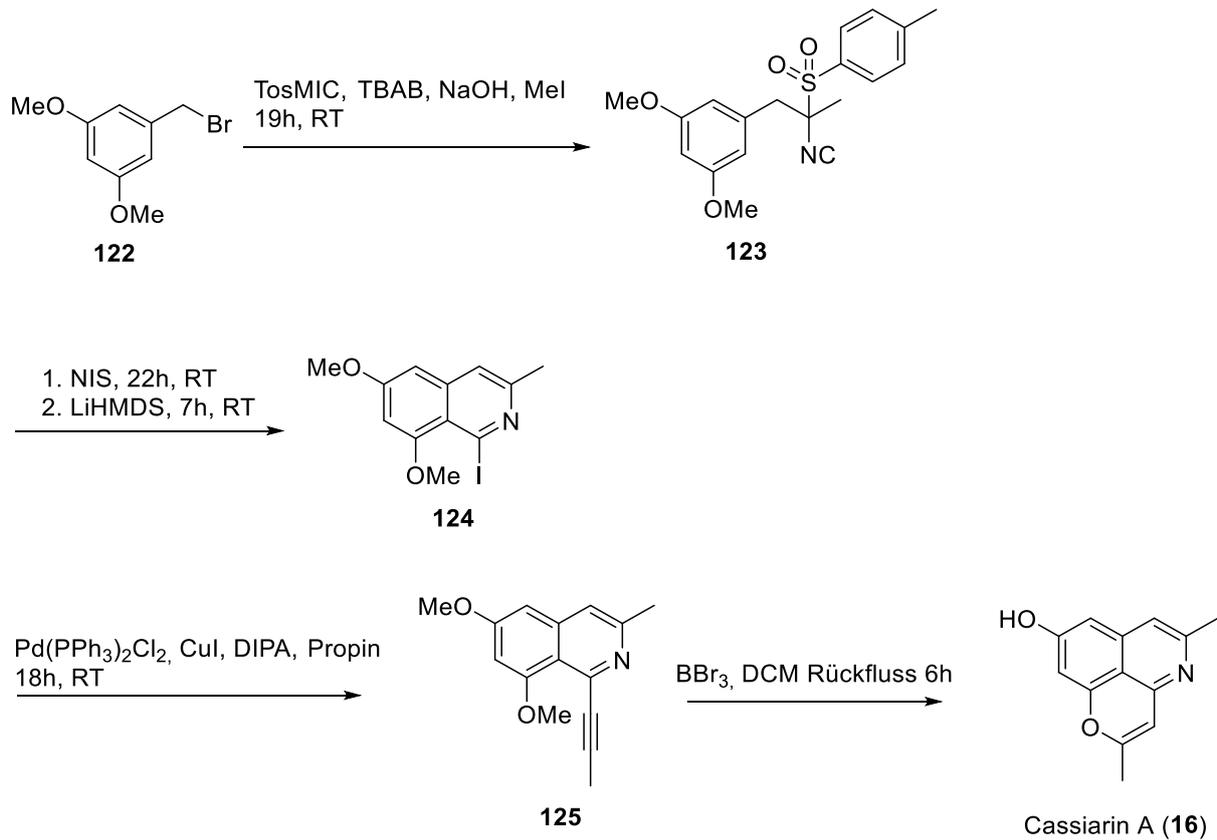


Abbildung 64: Geplante Darstellung von Cassiarin A (16) basierend auf dem Protokoll von Guti\u00e9rrez et al.^[34] mit Methyl- statt Methoxymethyl-Schutzgruppen

Der erste Schritt stellt einen asymmetrischen, doppelten Angriff am Kohlenstoff zwischen der Isonitrilgruppe und der Sulfonylgruppe des kommerziell erwerblichen Tosylmethylisocyanids dar. Durch Deprotonierung der beiden CH-aziden Wasserstoffatome an diesem Kohlenstoff kann Tosylmethylisocyanid sukzessive mit dem Benzylbromid **122** und Iodmethan alkyliert werden und somit das Produkt **123** entstehen (Abbildung 64).

Synthesen

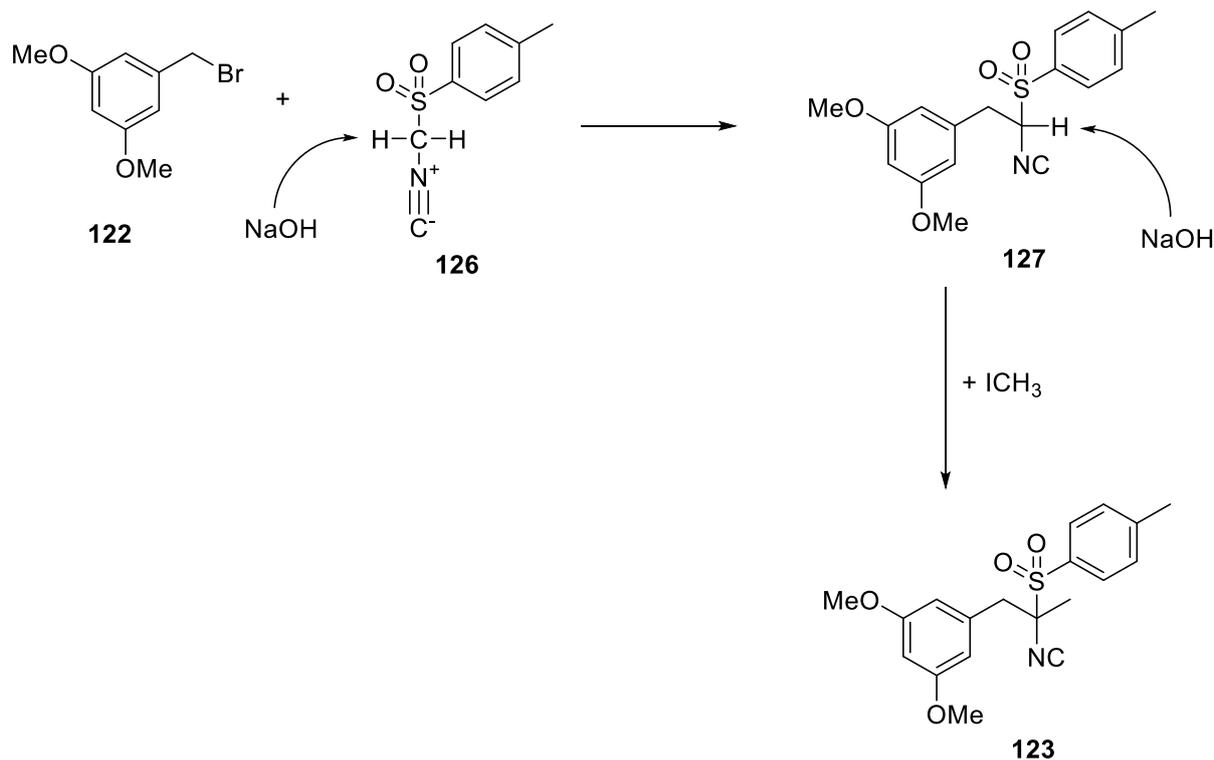


Abbildung 65: Geplante Bildung des Isocyanids bb; nach Deprotonierung an der CH-aziden Position des TosMIC (**126**) kann das Benzylbromid **122** elektrophil angreifen, anschließend kann über denselben Mechanismus Iodmethan an **127** nach Deprotonierung des zweiten Protons elektrophil angreifen

Die in der Literatur beschriebenen guten Ausbeuten für diesen Reaktionstyp konnten mit 3,5-Dimethoxybenzylbromid (**122**) als Edukt nicht bestätigt werden. Lediglich 36% konnten im besten Fall als Ausbeute registriert werden, wobei diese selbst bei verschiedenen Ansatzgrößen gleichbleibend war. Auch Versuche mit veränderter Temperatur, Reaktionsdauer und unterschiedlichen Zugabezeitpunkte von **122** und Iodmethan (Tabelle 6) unter Verwendung von Natronlauge (50% in Wasser) lieferten in einem Zweiphasensystem mit DCM als Lösungsmittel stets ähnliche Ausbeuten.

Temperatur	Reaktionsdauer	Zugabezeitpunkt 122	Zugabezeitpunkt ICH ₃	Ausbeute 123
RT	19 h	zu Beginn	nach 1h	36%
RT	19 h	nach 1h	zu Beginn	30%
RT	19 h	zu Beginn	nach 1h	34%
Rückfluss	8 h	zu Beginn	nach 1h	35%
Rückfluss	8 h	nach 1h	zu Beginn	32%
0°C	48 h	nach 3h	zu Beginn	33%
0°C	48 h	zu Beginn	nach 3h	30%

Tabelle 6: Versuche zur Optimierung der Ausbeute der in Abbildung 65 gezeigten Reaktion

Synthesen

Eine Erklärung hierfür ist, dass die CH-azide Position des TosMIC, die in einer Reaktion zweimal – je einmal vom Benzylbromid und einmal von Iodmethan – angegriffen wird, auch zweimal von demselben Reaktionspartner angegriffen werden kann, was zu den Verbindungen **128** und **129** führt. Die Anwesenheit der in Abbildung 66 gezeigten möglichen Reaktionsprodukte wurde über ASAP-Massenspektrometrie bestätigt. Diese Verbindungen wurden jedoch – abgesehen vom gewünschten Produkt **123** - nicht isoliert.

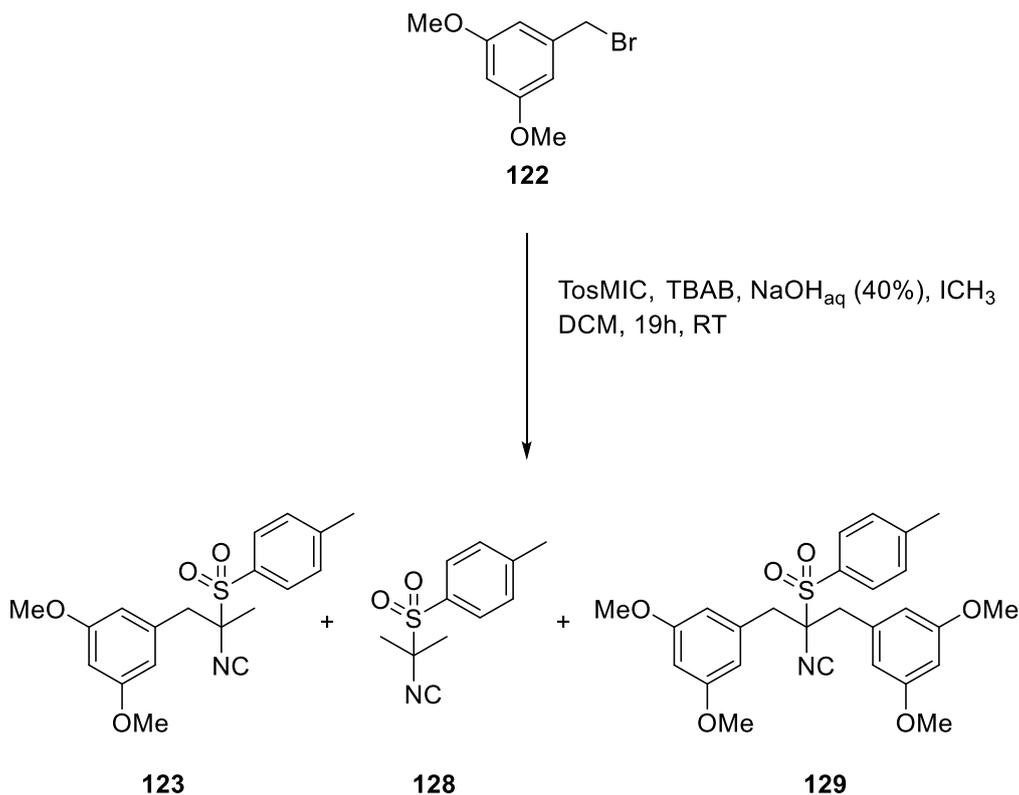


Abbildung 66: Mögliche Reaktionsprodukte der Reaktion von TosMIC (**126**) mit **122** und Iodmethan

Da die Edukte im Einkauf günstig waren und die Reaktion zu **123** auch im Multigramm Maßstab konstant ca. 35% Ausbeute lieferte, wurde von weiterer Optimierung abgesehen. Im folgenden Schritt wurde die Anellierung zum 1-Isochinolin untersucht.

3.3.3 Optimierung der Synthese des 1-Iodisochinolins **124**

Zusammengefasst sollte mechanistisch betrachtet hierbei eine Heterocyclisierung mit *N*-Iodsuccinimid als Elektrophil zum 3,4-Dihydroisochinolin stattfinden, gefolgt von einer Eliminierung der Tosylgruppe und damit Aromatisierung zum 1-Iodisochinolin (Abbildung 67).

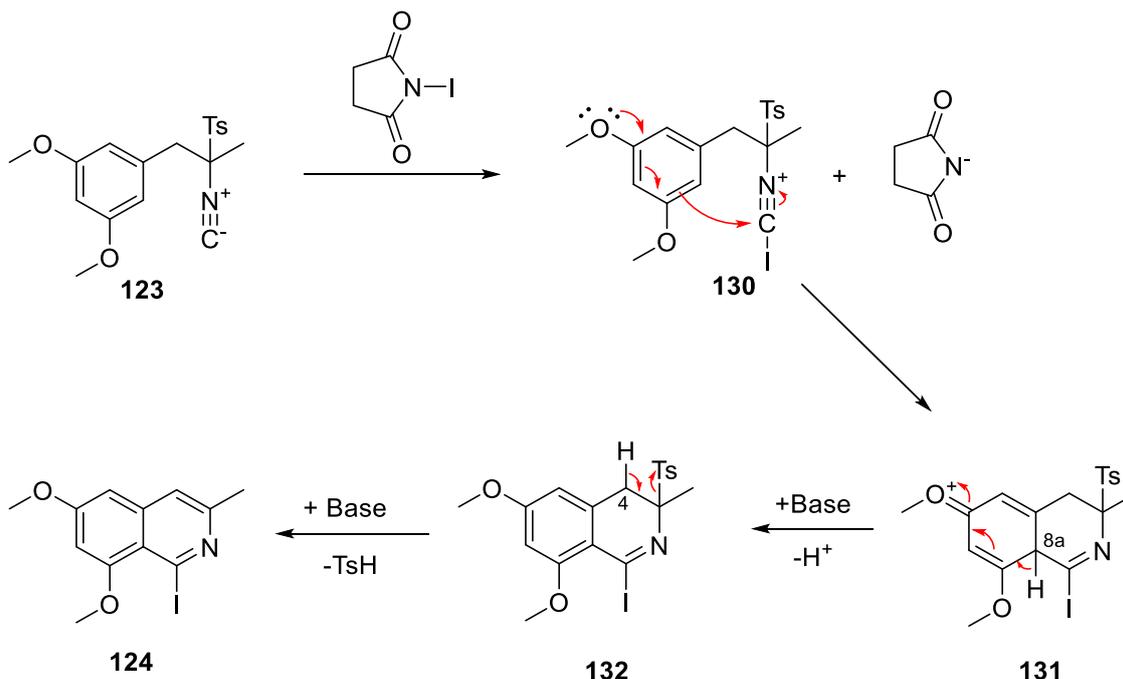


Abbildung 67: Postulierter Reaktionsmechanismus für die Heterocyclisierung zum 1-Iodisochinolin **124** mit NIS als Elektrophil in Anlehnung an Gutiérrez et al.^[34]

Nach dem elektrophilen Angriff von Iod aus *N*-Iodsuccinimid am Isocyanidkohlenstoff von Verbindung **123** erfolgt durch Elektronenverschiebung die Bildung des 3,4-Dihydroisochinolins **131**. Durch Zugabe einer geeigneten Base wird das 3,4-Dihydroisochinolin zuerst an 8a-Position deprotoniert, was eine Rearomatisierung zur Folge hat. Anschließend wird durch die Base auch an der 4-Position deprotoniert, woraufhin die Tosylgruppe als Sulfinat eliminiert wird. Durch Aromatisierung kann das 1-Iodisochinolin **124** erhalten werden. Diese Deprotonierungen sollten laut Gutiérrez et al.^[34] mit 40% wässriger Natronlauge gelingen. In einem ersten Versuch konnte mittels DC-Kontrolle durch ASAP-Massenspektrometrie beobachtet werden, dass der Ringschluss und die Rearomatisierung zum Aromaten **132** gelangen, dann die Reaktion jedoch stoppte. Beim Versuch das 3,4-Dihydroisochinolin **132** zu isolieren ging aufgrund der Instabilität der Verbindung viel Substanz verloren, dennoch konnte zumindest mittels NMR-Spektroskopie gezeigt werden, dass **132** entstanden ist. Da in diesem Versuch Natriumhydroxid offensichtlich zu schwach war,

um die Tosylgruppe zu eliminieren, wurde mit LiHMDS auf eine deutlich stärkere Base zurückgegriffen. Diese wurde gewählt, da in derselben Publikation^[34] sämtliche Beispiele zur Darstellung von 1-Iodisochinolin mit LiHMDS als Base durchgeführt wurden, lediglich im Beispiel zur Synthese von Cassiarin A wurde mit wässriger Natronlauge gearbeitet. Jedoch verwendeten die Autoren für die Synthese von Cassiarin A MOM-Schutzgruppen anstatt Methyl-Schutzgruppen, was die unterschiedlichen Reaktivitäten erklären könnte. Das LiHMDS bietet zudem durch ihre Löslichkeit in Dichlormethan den Vorteil, dass die Reaktion in einer homogenen Lösung stattfinden kann. Bei Verwendung von Natronlauge (40% in Wasser) mussten die Autoren in einem Zwei-Phasen-System aus Wasser und Dichlormethan arbeiten. Mit der Variante mit LiHMDS gelang die Eliminierung der Tosylgruppe und die anschließende Aromatisierung in 66% Ausbeute.

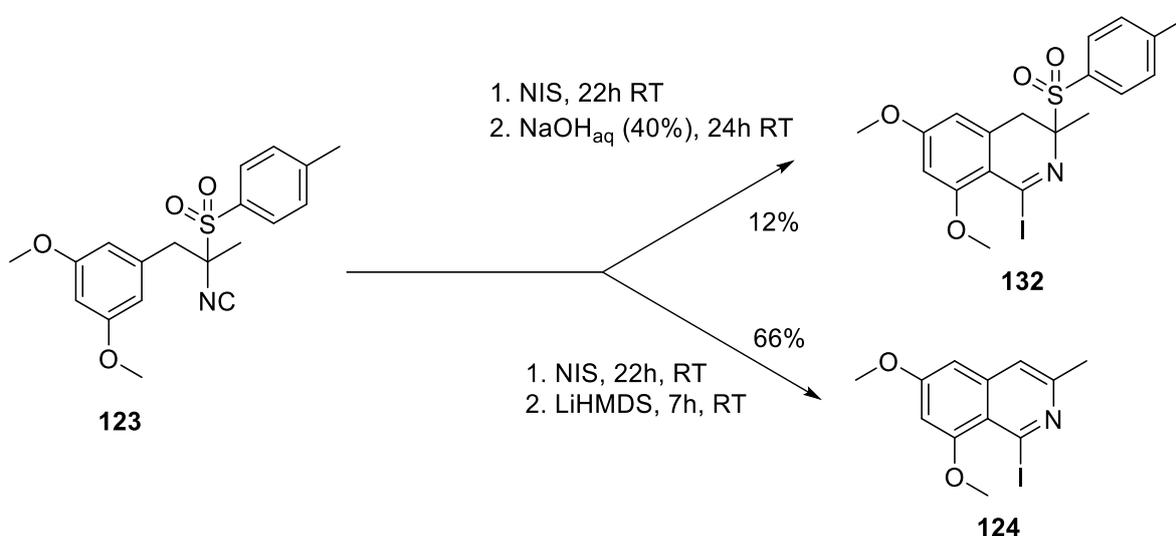


Abbildung 68: Darstellung des 1-Iodisochinolins **124** nach modifizierter Methode mit LiHMDS als Base, da die Reaktion unter Verwendung von Natronlauge nach Bildung des 3,4-Dihydroisochinolins **132** zum Erliegen kommt

3.3.4 Sonogashira-Kupplung und Cyclisierung zum Cassiarin A

Die anschließende Sonogashira-Reaktion mit kommerziell erwerblichen Propin (1M in DMF) und katalytischen Mengen Bis(triphenylphosphin)palladium(II)dichlorid und Kupfer(I)iodid und DIPEA als Base lieferte das 1-Alkylisochinolin **125** in 93% Ausbeute. Da Gutiérrez et al.^[34] in ihrem Protokoll mit MOM-Schutzgruppen arbeiteten, konnten diese schonend durch wässrige Salzsäure entfernt werden, die anschließende Anellierung fand im selben Schritt statt. Da hier mit den Methylgruppen andere Schutzgruppen verwendet wurden, musste auf ein anderes Entschützungsreagenz zurückgegriffen werden. Somit sollte zunächst die Entschützung der Methoxygruppen mit BBr₃ durchgeführt werden in der Erwartung, dass die Anellie-

rung zum Cassiarin A (**16**) auch in Anwesenheit einer Lewis-Säure abläuft. Nachdem das Gemisch aus **125** und BBr_3 16 Stunden in Dichlormethan bei Raumtemperatur gerührt wurde, konnte mittels DC-Kontrolle beobachtet werden, dass keine Reaktion abgelaufen war. Das Gemisch wurde folglich sechs Stunden zum Rückfluss erhitzt, woraufhin **125** komplett verbraucht war. Nach säulenchromatographischer Aufreinigung konnte das Cassiarin A in 43% Ausbeute gewonnen werden. Somit konnte bewiesen werden, dass die Anellierung zum Trizyklus auch mit Hilfe einer Lewissäure gelingt, wenngleich auch mit deutlich niedrigerer Ausbeute. Ob die Anellierung zum Cassiarin A spontan oder säurekatalysiert – durch eine Lewis-Säure oder eine Brønsted-Säure – abläuft, konnte weder in der Literatur gefunden noch durch diese Versuche bewiesen werden.

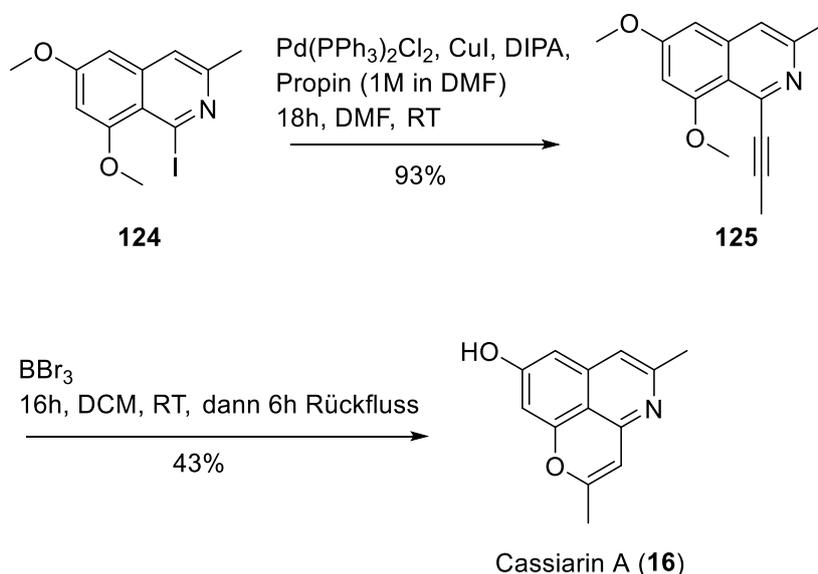


Abbildung 69: Darstellung des Cassiarin A (**16**) nach modifizierter Route basierend auf der Arbeit von Gutiérrez et al.^[34]

3.3.5 Synthese eines Cassiarin A-Analogons mit Variation der 2-Position

Anschließend sollten durch Variation der bei der Sonogashira-Reaktion verwendeten Alkine neue Substituenten an der 2-Position des Cassiarin A eingeführt werden. Um die Auswirkung längerer aliphatischer Ketten auf die cytotoxische Aktivität zu untersuchen, wurde dazu als Alkin bei der Sonogashira Reaktion mit dem 1-Iodisochinolin **124** Hex-1-in verwendet, wobei **133** in 92% Ausbeute gewonnen werden konnte. Die Cyclisierung mit Bortribromid zum Cassiarin A Analogon **134** gelang in diesem Fall mit einer guten Ausbeute von 63%. Dabei wurde das Reaktionsgemisch direkt sechs Stunden zum Rückfluss erhitzt und nicht - wie in Abbildung 69 gezeigt – erst 16 Stunden bei Raumtemperatur gerührt und danach zum Rück-

Synthesen

fluss erhitzt. Die biologische Testung auf zytotoxische Aktivität (vgl. Kapitel 4.2.1) zeigte jedoch, dass die Substanz **134** im Vergleich zu 2-Aryl-substituierten Cassiarin A–Analoga deutlich schwächer aktiv war.

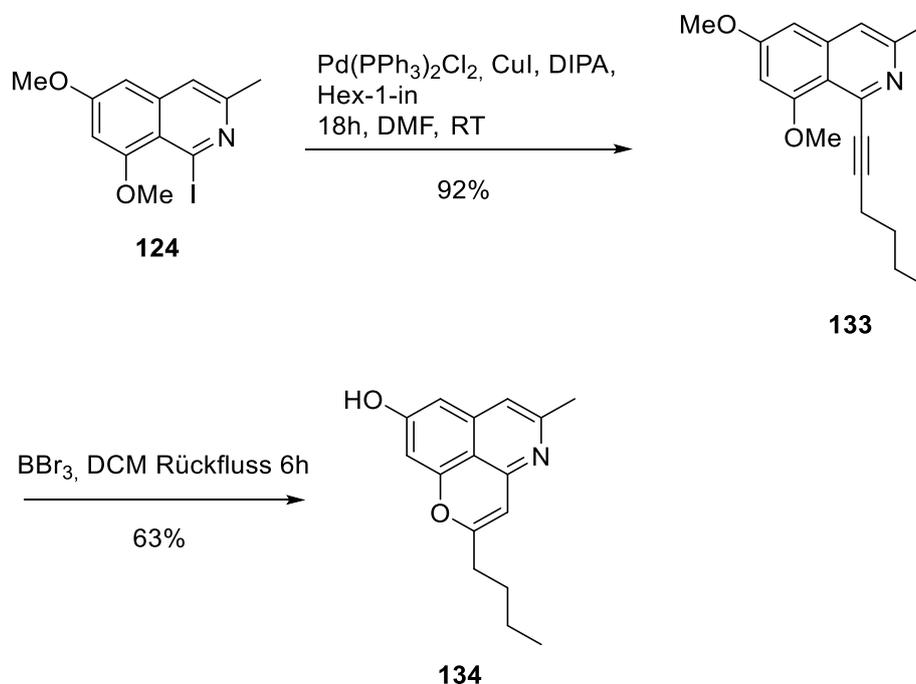


Abbildung 70: Darstellung des Cassiarin A–Analogons **134** mittels modifizierter Syntheseroute basierend auf der Arbeit von Gutiérrez et al.^[34]

3.4 Synthese eines derivatisierbaren Cassiarin A–Analogons für ein yeast-three-hybrid screening

Mithilfe eines yeast three-hybrid screenings – weiterentwickelt am Arbeitskreis von Prof. Vollmar (LMU München)^[80] – zur Identifizierung der Zielstrukturen von kleinen Molekülen, sollte das Targetprotein von Cassiarin A identifiziert werden. Dies bringt einerseits den Vorteil, dass der Wirkmechanismus besser aufgeklärt werden kann, andererseits können durch nachfolgende Untersuchungen an diesem Protein (z. B. durch Cokristallisation eines aktiven Cassiarin A–Analogons und dem Zielprotein und anschließende Röntgenstrukturanalyse) die Interaktionen der Verbindung mit dem aktiven Zentrum des Zielproteins präzisiert werden. Dadurch können systematisch weitere Verbindungen geplant und synthetisiert werden, die mit hoher Wahrscheinlichkeit höhere Affinität zum Zielprotein zeigen (vgl. Kapitel 3.6).

Ein wesentliches Merkmal dieses Assays ist, dass die Struktur noch Aktivität zeigen muss, wenn sie chemisch an das Trimethoprim-Linker-System gebunden ist. Da die Cassiarin A–

Synthesen

Analoge mit Aromaten an 2-Position (**108** und **109**, vgl. Tabelle 5) zu diesem Zeitpunkt die potentesten Vertreter waren, sollte Verbindung **108** (Tabelle 5) dazu als Vorlage dienen. Da das/die Zielprotein(e) unbekannt war(en) und somit auch unbekannt war wie das Cassiarin an die Zielverbindung „andockt“ sollten zwei Verbindungen synthetisiert werden, mit denen die Testung durchgeführt werden sollte – ein Cassiarin A-Derivat mit Funktionalisierung am Phenylrest an C-2 und eines mit Verknüpfung am tricyclischen Grundkörper.

Zum einen sollte an das Molekül **108** mittels Williamson-Ether-Synthese mit Propargylbromid das Cassiarin **137** mit terminalem Alkin generiert werden, welches anschließend mithilfe einer Click-Reaktion mit dem entsprechenden Trimethoprim-Derivat **229** (vgl. Abbildung 112) zu Verbindung **138** reagieren sollte, die anschließend im Assay verwendet werden kann.

Zum anderen sollte ein weiteres Cassiarin A-Analogon mit aromatischer Carbonsäure am entgegengesetzten Ende des Moleküls synthetisiert werden, welches mit dem terminalen Amin des Trimetoprim-Derivats **230** (vgl. Abbildung 112) zum Amid **136** reagieren kann, was anschließend ebenfalls im Assay verwendet werden soll. Durch die Synthese und Testung beider Verbindungen sollte ausgeschlossen werden, dass sich falsch negative Ergebnisse ergeben, falls die Stelle, die für die Bindung an das Zielprotein verantwortlich ist, bei einer der beiden Substanzen mit dem Trimethoprim-Linker-System substituiert ist.

Synthesen

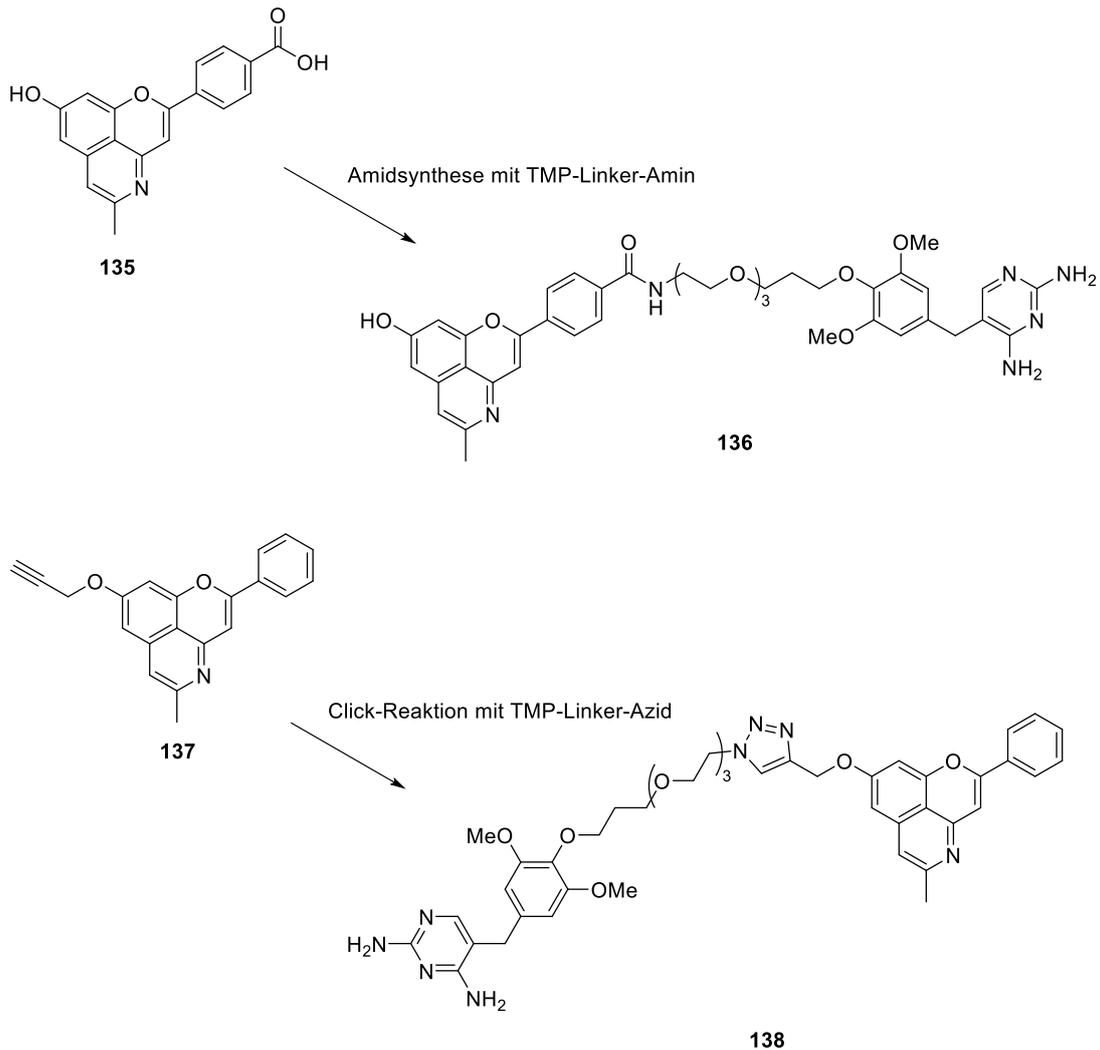


Abbildung 71: Cassiarin A-Analoga **135** und **137**, aus denen die Verbindungen **136** und **138** synthetisiert werden sollen, mit denen anschließend im yeast-three-hybrid screening mögliche Zielproteine identifiziert werden sollten

Da die Substanzen für die Testung noch biologische Aktivität zeigen müssen, um ein repräsentatives Ergebnis zu erzeugen, sollte zunächst eine repräsentative Verbindung synthetisiert werden, die neben dem Cassiarin auch einen nennenswerten Teil des Linkers enthält. Hierfür wurde ein endständig ethyliertes Diethylenglycol gewählt. Dazu sollte eine Verbindung synthetisiert werden, die an 2-Position des Cassiarin einen Aromaten mit Oligoethylenglycol-Gruppe in para-Position trägt, wobei nach synthesepraktischen Überlegungen Verbindung **141** (Abbildung 72) als geeignet befunden wurde. Gemäß der in Kapitel 3.3 optimierten Route über das 1-Iodisochinolin sollte **141** mittels Sonogashira-Kupplung von **124** und dem Alkin **139** nach anschließender Entschützung und Cyclisierung der aus der Kupplungsreaktion entstandenen Verbindung **140** dargestellt werden.

Synthesen

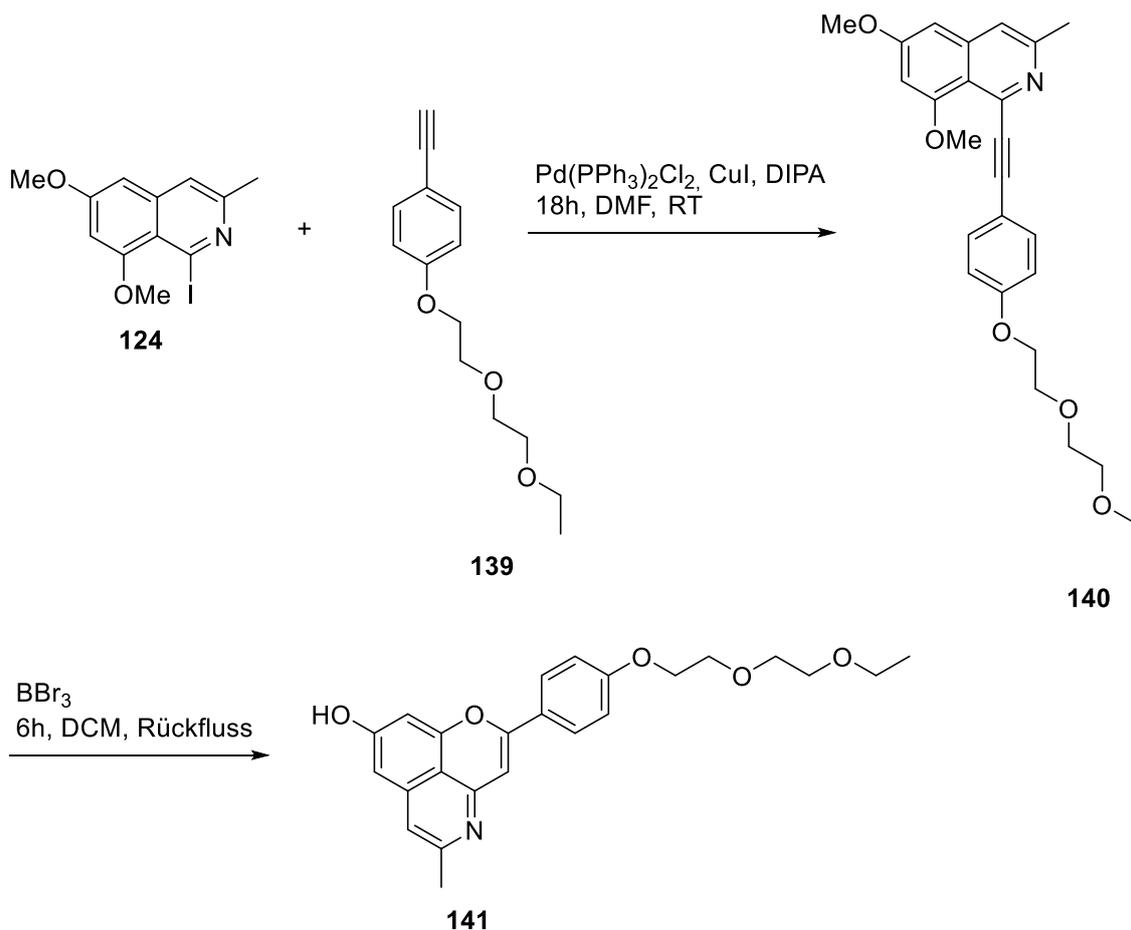


Abbildung 72: Geplante Darstellung des Oligoethylglykols **141** nach Sonogashira-Reaktion von **124** und **139** und anschließender Entschützung und Cyclisierung von **140**

Da das Alkin **139** nicht kommerziell erwerbbar war, musste es zunächst eigens synthetisiert werden. Dazu wurde analog dem Protokoll von Wei et al.^[81] das Toluolsulfonat **143** ausgehend vom 2-(2-Ethoxyethoxy)ethan-1-ol (**142**) synthetisiert, welches anschließend mit 4-Iodphenol in einer Williamson-Ether Synthese in Anwesenheit von Kaliumcarbonat zur Diethylenglykol-Verbindung **144** (Abbildung 73) umgesetzt wird. Im Gegensatz zur klassischen Williamson-Ether-Synthese wurde hier keine Halogenverbindung als Elektrophil sondern die Tosylverbindung **143** verwendet. Anschließend wurde **144** mit Trimethylsilylacetylen in einer Sonogashira-Kupplung gekuppelt. Dazu wurde ein Protokoll von Krauss et al. verwendet^[82], der in früheren Arbeiten an unserem Arbeitskreis eine mikrowellenunterstützte Variante der Sonogashira-Reaktion entwickelt hatte. Im finalen Schritt wurde die Trimethylsilylgruppe durch Kaliumcarbonat entfernt, um den Baustein **139** zu erhalten, mit dem die in Abbildung 72 gezeigte Synthese realisiert werden sollte.

Synthesen

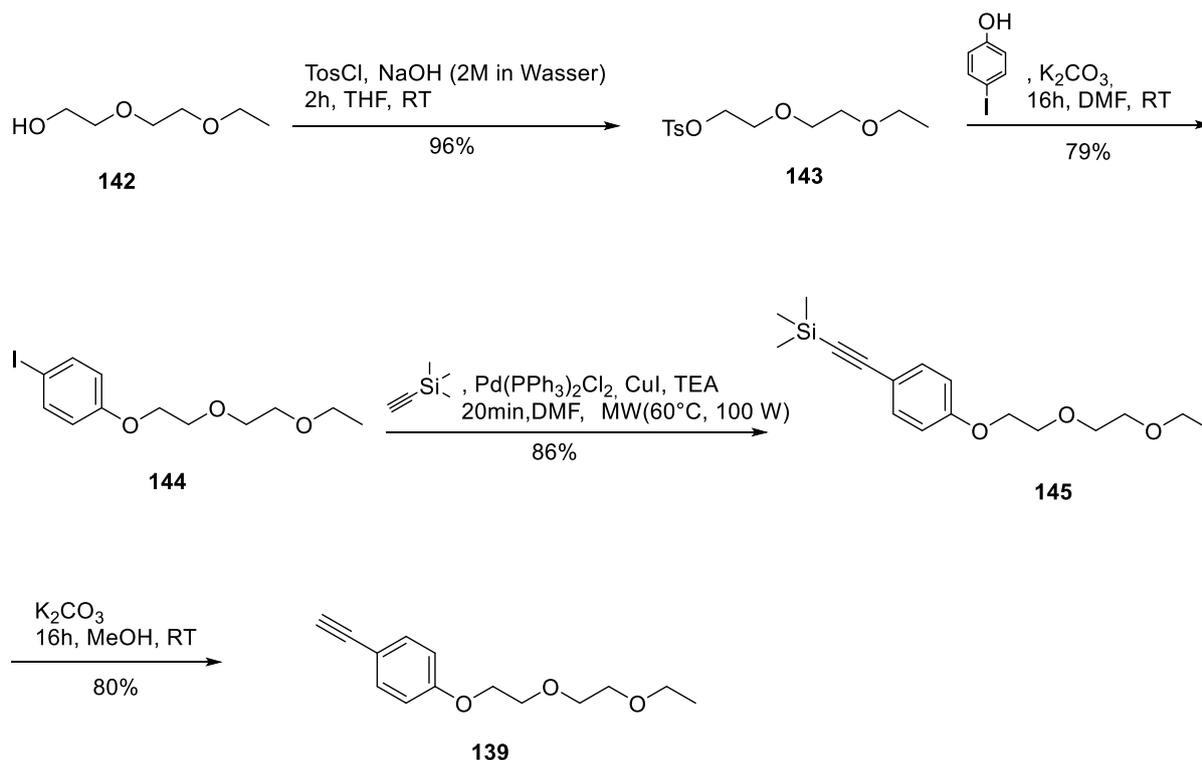


Abbildung 73: Darstellung des Alkins **139**, welches für die Synthese des Cassiarin A – Analogons **141** benötigt wird

Da im letzten Schritt der Cyclisierung (vgl. Abbildung 69) mit BBr_3 ein Reagenz eingesetzt wird, welches zwar bevorzugt Methylether spaltet, prinzipiell jedoch jeden aliphatischen Ether spalten kann, wurde in einem „Vorversuch“ die Stabilität des Diethylenglycol-Derivats **139** gegenüber BBr_3 untersucht. Dazu wurde 1 mmol **139** in Dichlormethan gelöst und 2 mmol BBr_3 zugegeben. Die Lösung wurde anschließend 16 Stunden zum Rückfluss erhitzt. Nach wässriger Extraktion und folgender Säulenchromatografie konnte **139** in 91% Ausbeute zurückgewonnen werden. Mittels DC-Kontrolle konnten zwar Nebenprodukte, vermutlich gespaltene Ether, entdeckt werden. Da die Reaktionszeit des „Vorversuchs“ bewusst deutlich länger gewählt wurde (16 Stunden im Vergleich zu 6 Stunden im geplanten Versuch), die Rückgewinnung von **139** jedoch bei 91% lag, wurde davon ausgegangen, dass die Oligoethylenglykolkette im Produkt **140** stabil genug gegenüber BBr_3 ist, um den finalen Cyclisierungsschritt unversehrt zu überstehen.

Synthesen

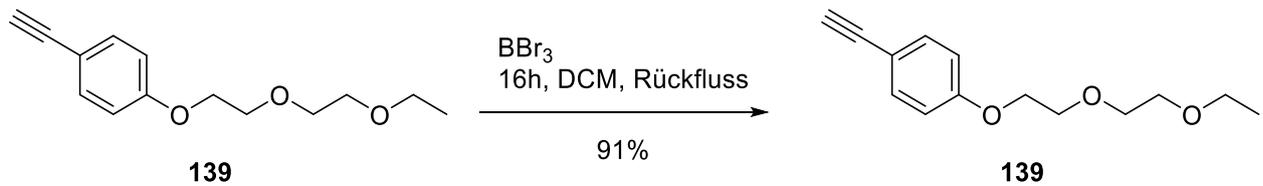


Abbildung 74: Untersuchung der Stabilität der Oligoethylglykolkette von **139** gegenüber BBr_3

Das somit erhaltene Alkin **139** wurde in einer Sonogashira-Reaktion unter den in Kapitel 3.3.4 etablierten Standardbedingungen mit dem 1-Iodisochinolin **124** zum 1-Alkynylisochinolin **140** gekuppelt, wobei **140** in 87% Ausbeute erhalten werden konnte. Anschließend sollten die Methoxygruppen von **140** – analog der vorherigen Syntheseroute – mithilfe von Bortribromid entschützt und die Verbindung im selben Schritt zum Tricyclus **141** cyclisiert werden. Bei Verwendung von zwei Äquivalenten BBr_3 stellte sich jedoch – entgegen der vermeintlichen Erkenntnis des Vorversuchs - die Diethylglykolkette als instabiler als die Methylgruppe an Position 8 des Cassiarin A heraus, wobei neben vielen weiteren unidentifizierbaren Nebenprodukten das Cassiarin A–Analogon **146** in 12% Ausbeute isoliert werden konnte.

Synthesen

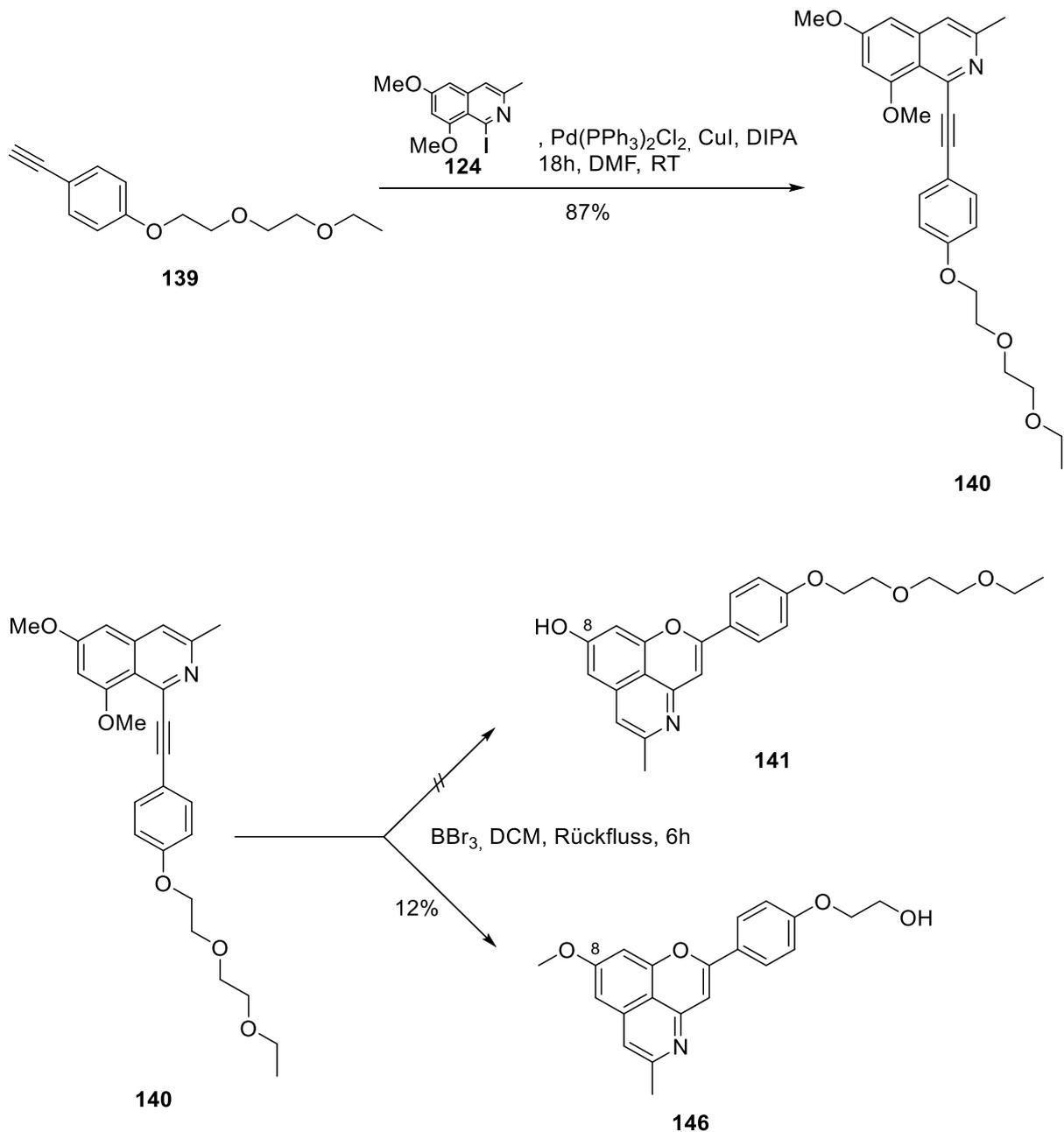


Abbildung 75: Versuchte Darstellung des Cassiarin A-Analogons **141**, der jedoch in Verbindung **146** resultierte

Nachdem die Ether der Oligoethylenglykolkette scheinbar labiler gegenüber BBr_3 sind als der Arylmethylether, sollte mit einem anderen Reagenz die Spaltung des Methylethers versucht werden. Majetich et al.^[83] publizierten im Jahr 1994 die Spaltung von Arylmethylethern mithilfe von L-Selectride[®] (Lithium-tri-sec-butyl(hydrido)borat) in siedendem THF. Dazu wurde **140** zusammen mit L-Selectride[®] in THF 24 Stunden zum Rückfluss erhitzt und nach wässriger Aufarbeitung säulenchromatografisch aufgereinigt. Auch bei diesem Versuch konnte beobachtet werden, dass sich viele diffuse Produkte bildeten, wobei erneut nur Verbindung **146** in 5% Ausbeute isoliert werden konnte. Daraus wurde geschlussfolgert, dass die Ether der

Synthesen

Ethylenglykolkette zu instabil sind, um **141** durch diese Syntheseroute darzustellen. Obwohl die Verbindung **146** nicht die gewünschte war, wurde sie auf ihre cytotoxische Aktivität getestet (vgl. Kapitel 4.2.1).

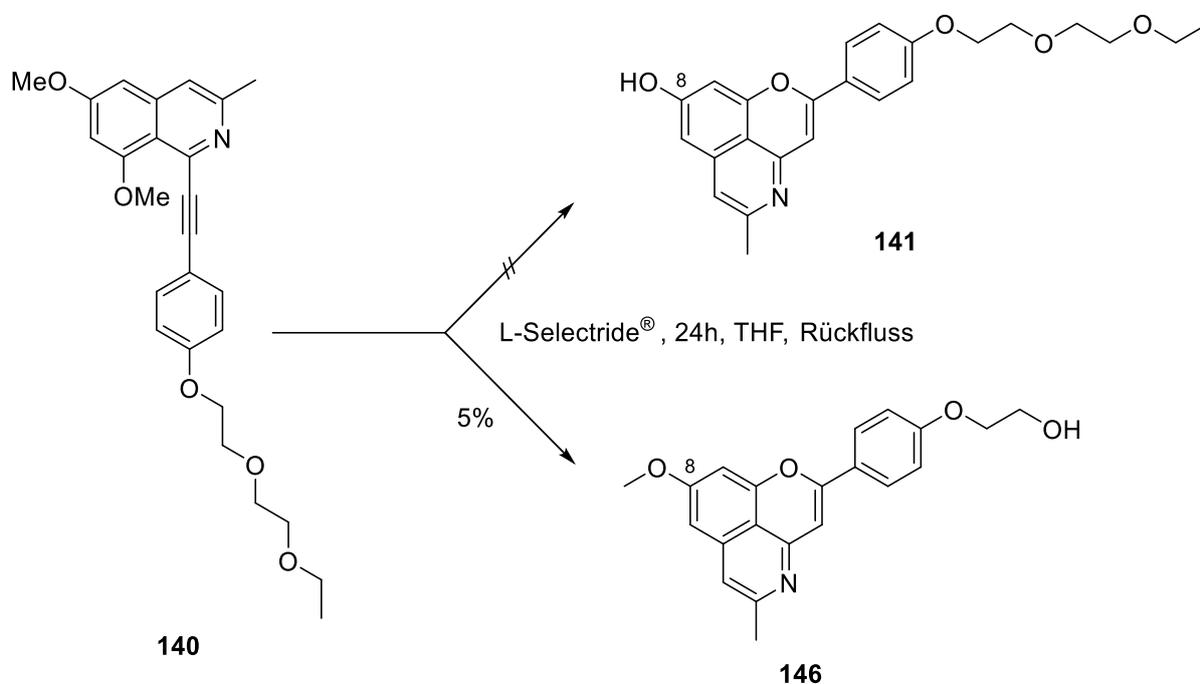


Abbildung 76: Versuch zur Darstellung von **141** mit L-Selectride[®] anstelle von BBr_3 als Entschützensreagenz der Methoxygruppen

Da das Anbringen der Oligoethylenglykolkette auf diese Weise nicht möglich war, musste eine andere Möglichkeit gefunden werden, um ein Cassiarin A-Analogon zu synthetisieren, mit dem die Identifizierung von Targetstrukturen mithilfe eines yeast-three-hybrid screenings möglich sein sollte. Da bereits ein Trimethoprim-Derivat (**230**) mit Triethylenglykolkette und terminalem Amin synthetisiert wurde (vgl. Kapitel 3.6.3), sollte die Carboxylverbindung **135** synthetisiert werden, die anschließend für die Derivatisierung sowohl mit einer Oligoethylenglykolkette (über ein terminales Amin zum Amid) als auch mit dem entsprechenden Trimethoprim-Linker **230** mit terminalem Amin zum entsprechenden Amid geeignet ist. Dabei sollte **147** aus im vorherigen Abschnitt erwähnten Gründen auf seine zytotoxische Aktivität getestet werden. Bei vorhandener Aktivität sollte anschließend **135** mit der Trimethoprim-Linker Verbindung **230** derivatisiert werden, um **148** zu erhalten. Mithilfe dieser Verbindung sollten in einem yeast-three-hybrid screening mögliche Zielstrukturen des Cassiarin A gefunden werden.

Synthesen

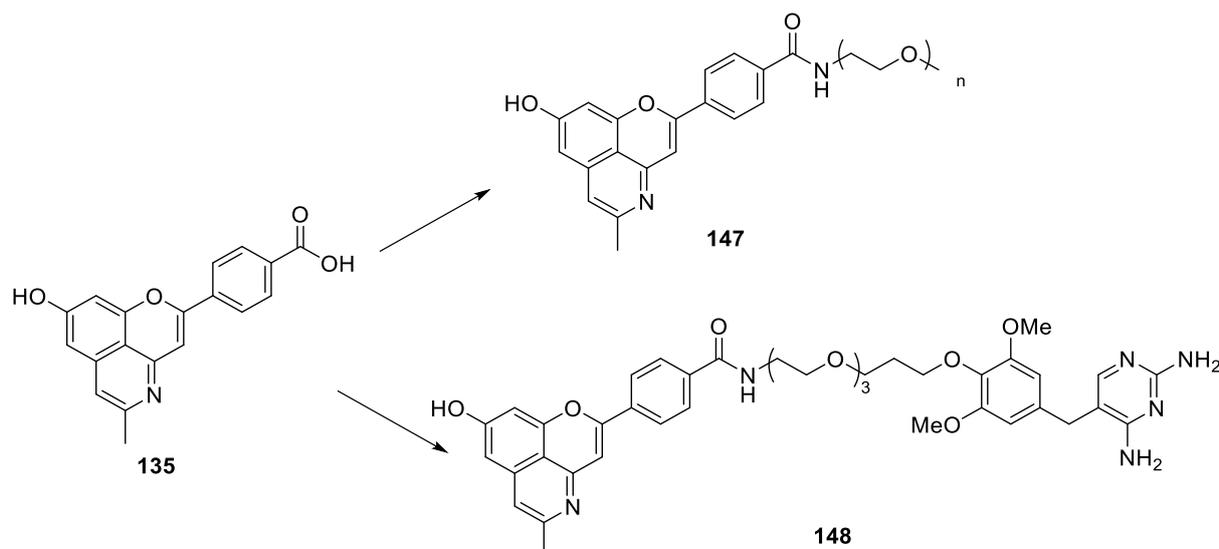


Abbildung 77: Optimierter Plan zur Darstellung eines Cassiarin A–Analogons (**135**), das sowohl mit einer Oligoethylenglykolkette zu **147** als auch mit Verbindung **230** zu **148** – geeignet für ein yeast-three-hybrid screening – derivatisiert werden kann

Hierzu sollte erneut vom 1-Iodisochinolin **124** ausgegangen werden. Zunächst sollte kommerziell erwerbliches Methyl-4-ethynylbenzoat in einer Sonogashira-Reaktion mit Bis(triphenylphosphin)palladium(II)dichlorid und Kupferiodid als Katalysatoren in DMF mit Diisopropylamin als Base an **124** gekuppelt werden, um Verbindung **149** zu erhalten. Gemäß der in Kapitel 3.3.4 etablierten Route sollten die beiden Methylether durch BBr_3 gespalten werden, wobei die Cyclisierung zu **150** in einem Schritt gelingen sollte. Dass Methylester inert gegenüber Bortribromid sind, konnten unter anderem Che et al.^[84], Paulini et al.^[85] und Wilde et al.^[86] zeigen, weshalb erwartet wurde, dass der Methylester unter diesen Bedingungen bestehen bleibt. Nach anschließender Hydrolyse des Esters von **150** sollte die Carbonsäure **135** erhalten werden, die dann als Edukt für die Darstellung von **147** und **148** (vgl. Abbildung 77) dienen sollte.

Synthesen

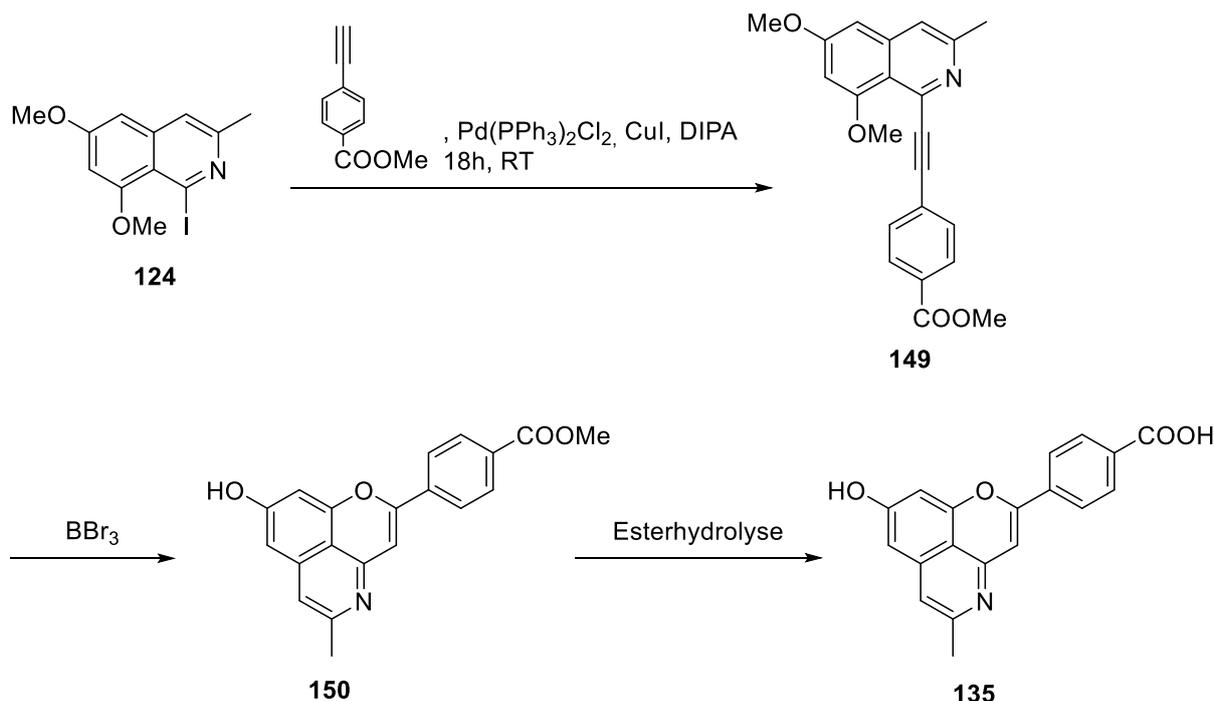


Abbildung 78: Geplante Darstellung des Cassiarin A–Analogons **135**, aus dem die in Abbildung 77 gezeigten Verbindungen **147** und **148** synthetisiert werden können

Mit der Sonogashira-Kupplung unter den oben genannten Bedingungen konnte nach Aufreinigung mittels FSC **149** (Abbildung 79) in 71% Ausbeute erhalten werden. Nach Zugabe von BBr₃ wurde das Gemisch analog der etablierten Route sechs Stunden zum Rückfluss erhitzt. Durch DC-Kontrolle konnte gezeigt werden, dass das gesamte Edukt **149** (Abbildung 79) umgesetzt wurde, aber eine Vielzahl neuer Produkte entstanden ist. Mittels ASAP-Massenspektrometrie konnte jedoch die Masse des Produktes **150** (Abbildung 79) nicht gefunden werden. Stattdessen wurden die Massen dreier Substanzen detektiert, die in Tabelle 7 mit möglichen Strukturen dazu aufgelistet sind. Die gefundenen Massen lassen den Schluss zu, dass die 8-Methoxygruppe bei allen möglichen Verbindungen gespalten wurde, die Methoxygruppe an 6-Position noch vorhanden war, jedoch keine Cyclisierung eingetreten ist (Verbindung **151** Tabelle 7). Des Weiteren konnten zwei Massen mit der für Bromverbindungen charakteristischen Isotopenverteilung identifiziert werden. Zum einen konnte ein Doppelpeak bei den Massen 427,1 und 429,1 mit einem Verhältnis von 1:1 detektiert werden, was auf eine einfache Bromierung der Substanz schließen lässt (Verbindung **152** Tabelle 7). Yuan et al.^[87] konnten in ihrer Arbeit zeigen, dass Diphenylacetylene mit BBr₃ bromiert werden können. Daher liegt die Vermutung nahe, dass bei **152** ein Kohlenstoffatom der Dreifachbindung bromiert wurde. Aufgrund des für zweifach bromierte Substanzen typischen Isotopenmusters^[88] – das Verhältnis der gemessenen Massen 505,1; 507,1 und 509,1 liegt bei

Synthesen

1:2:1 - konnte davon ausgegangen werden, dass die Dreifachbindung zweifach bromiert wurde (Verbindung **153** Tabelle 7).

Der Versuch diese Produkte mittels FSC zu isolieren scheiterte jedoch, vermutlich aufgrund ihrer Instabilität. Es wurden jedoch keine weiteren Versuche unternommen, diese Vermutung zu belegen.

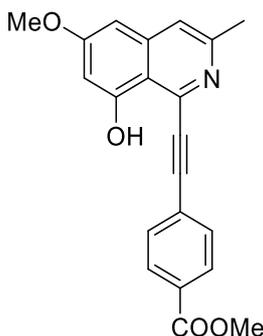
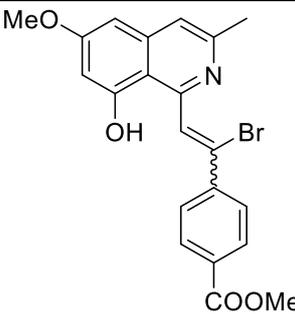
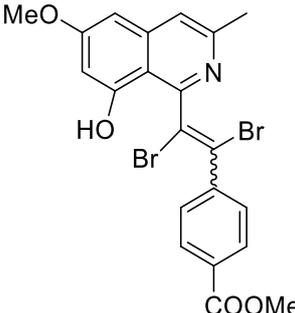
Gefundene Masse	Mögliche Verbindung	Berechnete Masse
347,1	 151	347,1
427,1 (100) und 429,1 (100)	 152	427,0 und 429,0
505,1 (50); 507,1 (100) und 509,1 (49)	 153	505,0; 507,0 und 509,0

Tabelle 7: Durch Reaktionskontrolle mittels ASAP-Massenspektrometrie gefundene Massen (links) und mögliche Verbindungen, die bei der in Abbildung 79 gezeigten Reaktion möglicherweise entstanden sein könnten, die relative Isotopenverteilung ist in Klammern angegeben

Synthesen

In einem weiteren Experiment sollte versucht werden durch mehr Äquivalente von Bortribromid die Spaltung des Methylethers an C-6 des Isochinolins **149** (Abbildung 79) zu forcieren. Dazu wurden zunächst 3 Äquivalente BBr_3 dem Reaktionsgemisch zugesetzt und anschließend im Abstand von 30 Minuten ein weiteres Äquivalent zugegeben bis nach dreieinhalb Stunden insgesamt zehn Äquivalente erreicht waren. Nach DC-Kontrollen im Abstand von ca. 20 Minuten und gleichzeitiger Untersuchung des Gemisches mittels ASAP-Massenspektrometrie konnte erneut beobachtet werden, dass die in Tabelle 7 beschriebenen Massen detektiert wurden. Dabei scheint die Reaktion auf dieser Stufe zum Erliegen zu kommen und keine Cyclisierung einzutreten. In einem letzten Versuch wurde statt Dichlormethan Toluol als Lösungsmittel verwendet und der Ansatz mit 3 Äquivalenten BBr_3 zum Rückfluss erhitzt in der Hoffnung, dass bei höheren Temperaturen der Methylether gespalten wird und die Cyclisierung einsetzen würde. Überraschenderweise konnten jedoch nach 24 stündigem Erhitzen unter Rückfluss erneut dieselben Verbindungen wie in Tabelle 7 beschrieben detektiert werden. Zusammengefasst lässt sich sagen, dass die Entschützung der Methoxygruppen und Cyclisierung für Verbindungen mit aliphatischem Rest an 2-Position des Cassiarin A (Verbindungen **16** und **134** Abbildungen 69 und 70) Ausbeuten mit mehr als 40% erreicht, für aromatische Reste an dieser Position schlechte Ausbeuten (12% für **146** Abbildung 75) liefert oder gar nicht funktioniert (Verbindung **150** Abbildung 79).

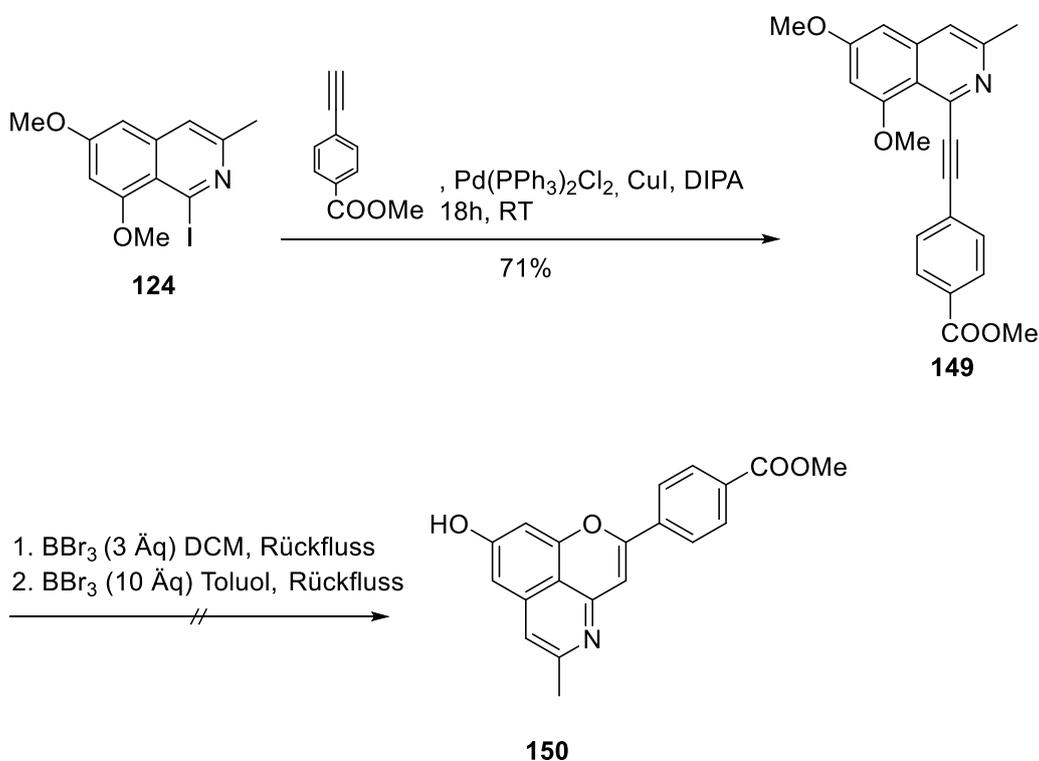


Abbildung 79: Versuchte Darstellung des Cassiarin A-Analogons **150** mit Methylbenzoat-Rest

Synthesen

Nachdem die Darstellung von **150** durch diesen Syntheseweg nicht möglich schien, sollten die Methylschutzgruppen durch Methoxymethylgruppen ersetzt werden, da diese durch Hydrolyse mit wässriger Mineralsäure unter weniger drastischen Bedingungen gespalten werden können. Dadurch kann auf den Einsatz von BBr_3 verzichtet werden. Grundlegend für diese Syntheseroute war die Synthese von Rudyanto et al.^[31], die bereits in Kapitel 1.4 (Abbildung 12) beschrieben wurde und hier graphisch noch einmal dargestellt wird.

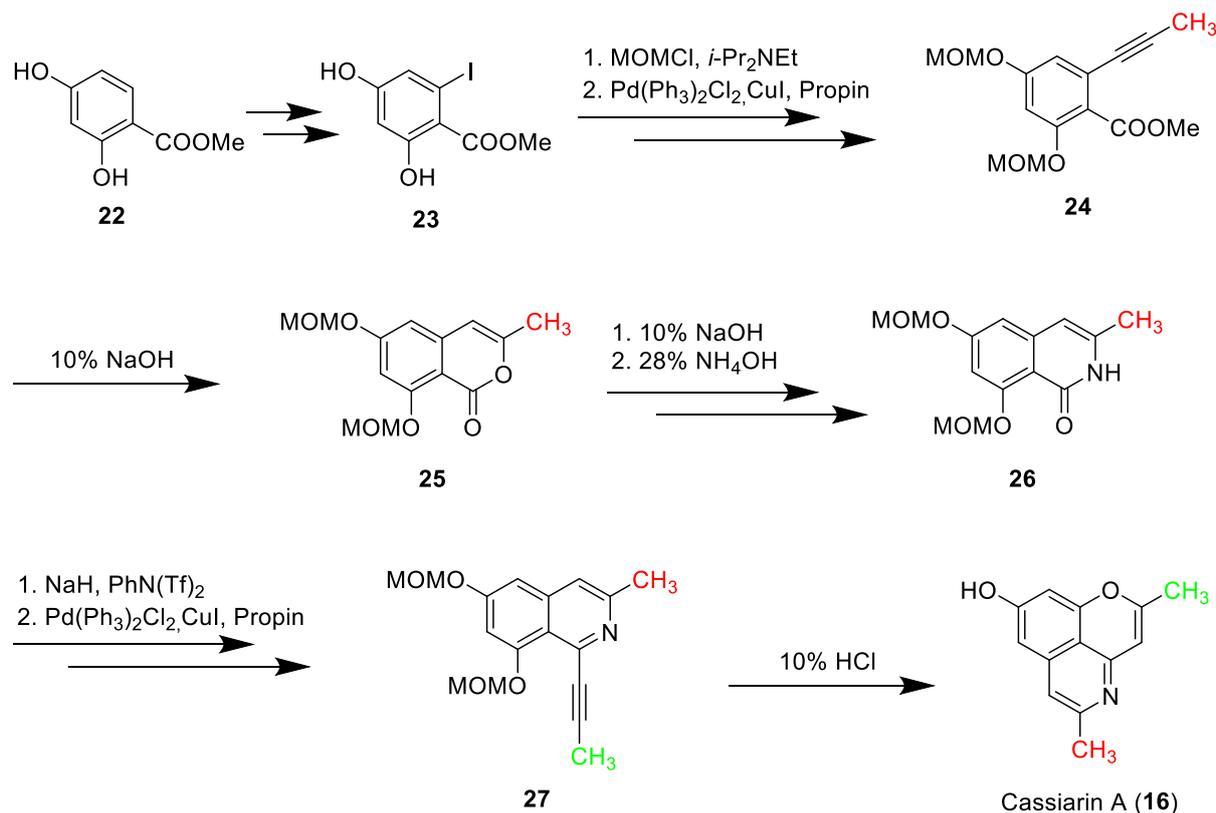


Abbildung 80: Erste Totalsynthese von Cassiarin A nach Rudyanto et al.^[31]

Dabei sollte zunächst das Isocoumarin **25** dargestellt werden und anschließend nach den beschriebenen Reaktionsbedingungen zum Cassiarin A–Analogon **150** umgesetzt werden. Dazu sollte zunächst nach dem Protokoll von Kalivretenos et al.^[89] die Verbindung **23** dargestellt werden. Diese beschrieben in ihrer Arbeit ausgehend von 2,4-Dihydroxymethylbenzoat (**22**) zunächst die Schützung der beiden Hydroxygruppen, gefolgt von einer Aminolyse mit Trimethylaluminium und Diethylamin zu **155** (Abbildung 81). Anschließende *ortho*-Lithierung von **155** mit *tert*-BuLi und Umsetzung mit Iodchlorid als Elektrophil lieferte den Iodaromaten **156**. Die folgende Reaktion von **156** mit Me₃OBF₄ und anschließende Hydrolyse mit Natriumcarbonat ergaben den Dihydroxybenzoesäuremethylester **23**. Dieser sollte anschließend nach erneuter Schützung der Hydroxygruppen mit Methoxymethylchlorid mittels Sonogashira-Kupplung und Cyclisierung nach Esterhydrolyse mit Natriumhydroxid zum Isocouma-

Synthesen

rin **25** reagieren (vgl. Abbildung 80), dem Edukt für die folgende Synthese des Cassiarin A–Analogons **150** (Abbildung 79).

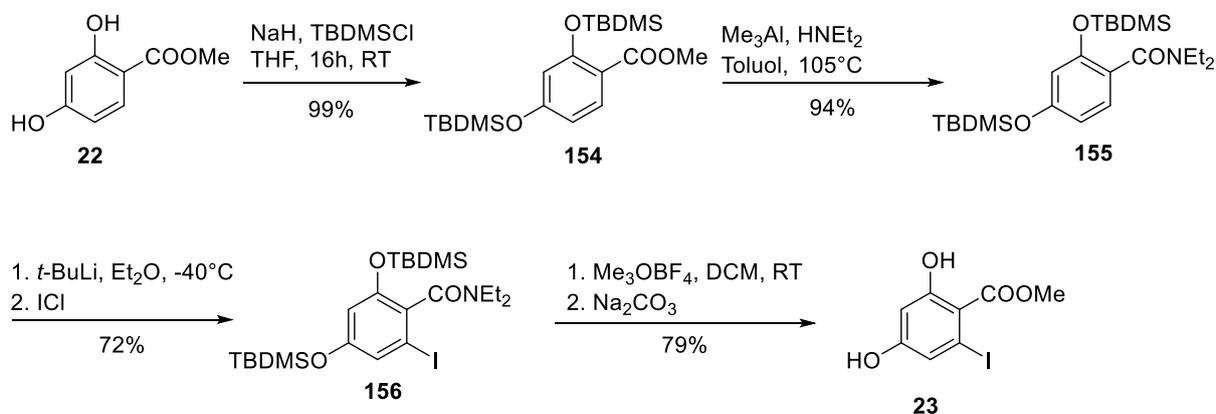


Abbildung 81: Darstellung von **23** nach dem Protokoll von Kalivretenos^[89] eigene Darstellung

Gemäß diesem Protokoll wurden zunächst die beiden Hydroxygruppen von kommerziell erwerblichem 2,4-Dihydroxymethylbenzoat (**22**) mithilfe von *tert*-Butyldimethylsilylchlorid und Triethylamin geschützt. Nach Aufarbeitung mittels FSC konnte **154** in 99% Ausbeute erhalten werden. Im nächsten Schritt sollte die Aminolyse des Methylesters mithilfe von Trimethylaluminium und Diethylamin folgen. Dazu wurde das Aluminiumreagenz mit Diethylamin in Toluol auf -6°C gekühlt, die Mischung auf Raumtemperatur erwärmt und eine Stunde gerührt. Anschließend wurde **154** zugegeben und das Reaktionsgemisch über Nacht zum Rückfluss erhitzt. Nach vorsichtiger, sauer-wässriger Aufarbeitung mit 10%iger Salzsäure und Extraktion mit Ethylacetat konnte nach Aufreinigung mittels FSC das Amid **155** mit lediglich 3% Ausbeute erhalten werden, während 89% des Edukts **154** zurückgewonnen werden konnten. Aufgrund der überschaubaren Ausbeute, des enormen Syntheseaufwandes und Sicherheitsbedenken bezüglich des pyrophoren Trimethylaluminiums wurde stattdessen ein Protokoll von Gbadebo et al.^[90] zur Darstellung von **155** verwendet. In dieser Arbeit aus dem Jahr 2022 wird eine Methode zur Synthese von Amiden aus Estern mithilfe von Grignard-Basen beschrieben. Diese Methode stellt eine Weiterentwicklung der Bodroux-Amidsynthese dar, die im Jahr 1904 von Fernand Bodroux publiziert wurde^[91]. Dieser beschrieb seinerzeit die Reaktion eines aliphatischen oder aromatischen Esters **A** mit einem Aminomagnesiumhalogenid **B** – welches zunächst separat aus einem Grignard-Reagenz und einem primären oder sekundären Amin dargestellt werden muss –, was im Amid **E** resultiert (Abbildung 82). Gbadebo et al. beschreiben in ihrer Arbeit die *in situ* Generierung des Aminomagnesiumhalogenids aus Methylmagnesiumchlorid und dem entsprechenden Amin **C**, welches anschließend mit dem entsprechenden Ester **A** zum Amid **E** reagiert (Abbildung 82).

Synthesen

Bodroux - Synthese

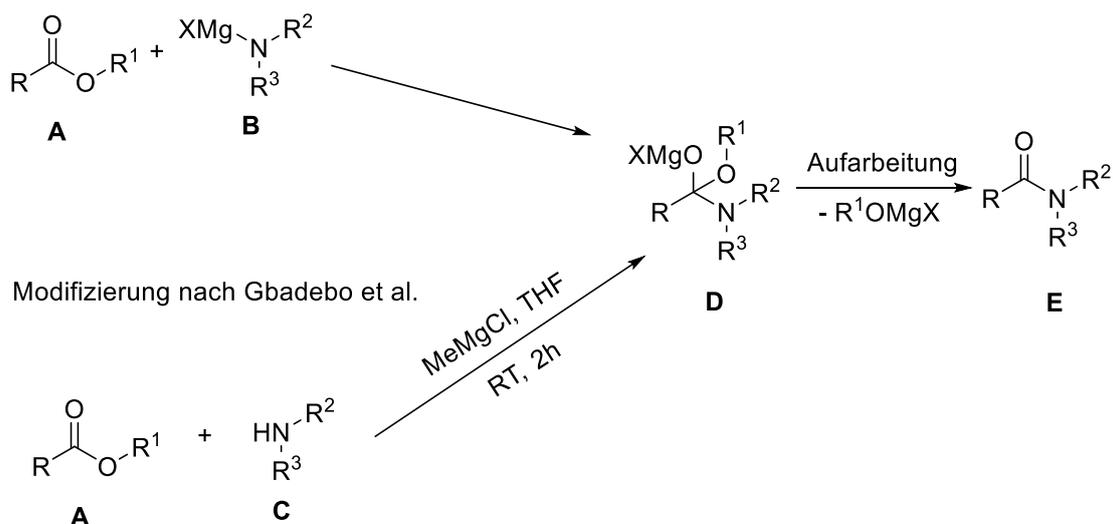


Abbildung 82: Bodroux-Synthese^[91] zur Darstellung von Amiden aus Estern und die Weiterentwicklung der Variante nach Gbadebo et al.^[90]

Nach diesem Protokoll wurde versucht mit Diethylamin und Methylmagnesiumchlorid (3M in THF) das Amid **155** darzustellen. Dazu wurde **154** zusammen mit Diethylamin in THF gelöst und Methylmagnesiumchlorid langsam unter einer Stickstoffatmosphäre zugetropft, wobei eine starke Wärmeentwicklung beobachtet werden konnte. Durch Kühlung des Reaktionsgefäßes im Eisbad konnte eine zu starke Erwärmung der Lösung verhindert werden. Nach zwei Stunden Reaktionszeit konnte mittels DC-Kontrolle die vollständige Umsetzung des Eduktes beobachtet werden, wobei lediglich ein Produkt entstanden ist. Nach Standard-Aufarbeitung konnte das Amid **155** in 94% Ausbeute erhalten werden.

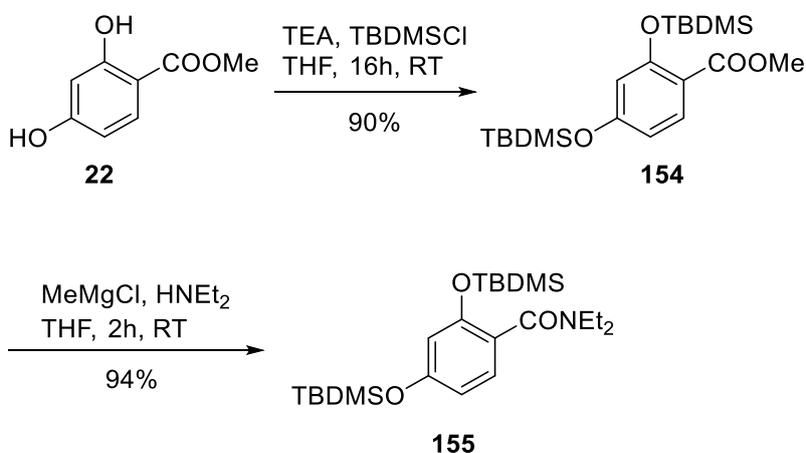


Abbildung 83: Darstellung des Benzoessäureamids **154** aus Dihydroxybenzoessäuremethylester (**22**) mithilfe der modifizierten Bodroux-Synthese von Gbadebo et al.^[90]

Anschließend sollte das Benzamid **155** nach Lithiierung in *ortho*-Position iodiert werden. Gemäß dem Protokoll von Kalivretenos et al.^[89] wurde das Benzamid **155** mit *t*-BuLi (1,7 M in Pentan) bei -78°C in Diethylether in *ortho*-Position lithiiert. Iodmonochlorid, welches zuvor in Diethylether gelöst wurde, wurde zugegeben und das Gemisch wurde langsam auf Raumtemperatur erwärmt und eine Stunde bei dieser Temperatur gerührt. Durch DC-Kontrolle konnte beobachtet werden, dass viele Produkte entstanden sind, wobei diese eine ähnliche Polarität aufweisen, wodurch die Isolierung von Reinsubstanzen mittels FSC nicht möglich war. Da die gesuchte Substanz literaturbekannt ist und auch publizierte NMR-Daten dazu vorliegen, konnte die Fraktion, in der **156** (Abbildung 73) enthalten war, identifiziert werden. Die dabei entstandenen Nebenprodukte konnten nicht identifiziert werden, doch durch die im NMR gemessenen Verhältnisse der Integrale der Signale kann davon ausgegangen werden, dass **156** im Gemisch zu weniger als 50% enthalten ist. Daraus ergäbe sich eine Ausbeute von <7%. Durch die fehlende Isolierung und Charakterisierung der Nebenprodukte kann über deren Beschaffenheit nur spekuliert werden. Möglicherweise wurde nicht selektiv die *ortho*-Position zum Amid von **155** substituiert, sondern eine der beiden *meta*-Positionen. Eine andere Möglichkeit wäre, dass **155** durch *tert*-BuLi zwar lithiiert wurde, jedoch durch das Iodmonochlorid nicht iodiert wurde und stattdessen bei der wässrigen Aufarbeitung lediglich reprotoniert wurde. Diese großen Probleme bei der Lithiierung waren nicht erwartet worden, zum einen, da durch die TBDMS-Schutzgruppen eine sterische Hinderung der beiden *meta*-Positionen zum Amid zu erwarten war, zum anderen, da die *ortho*-Position für *ortho*-Metallierung deutlich bevorzugt sein sollte, wie bereits im Jahr 1938 von Gilman und Bebb^[92] und 1940 von Wittig und Fuhrmann^[93] beschrieben wurde. Durch die schlechte Ausbeute und die Probleme bei der Synthese und Isolierung von **156** wurde die Darstellung des Isocoumarins **25** über diese Route verworfen.

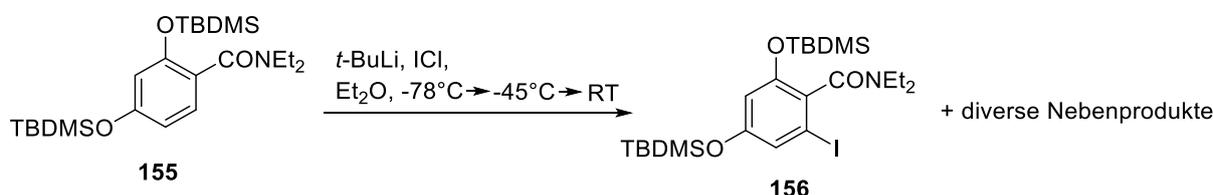


Abbildung 84: Versuch zur Iodierung des Benzamids **155** nach dem Protokoll von Kalivretenos et al.^[89], das bei der Reaktion in niedriger Ausbeute entstandene **156** konnte nicht isoliert werden

Kendall et al.^[94] publizierten bereits im Jahr 1989 eine alternative Möglichkeit das 6,8-Dimethoxy-3-methylisocoumarin (**163**) im großen Maßstab darzustellen. Hierbei wird 3,5-Dimethoxybenzaldehyd (**157**) mit Propionsäureanhydrid in Anwesenheit von Natriumpropionat zur Zimtsäureverbindung **158** umgesetzt. Anschließende katalytische Hydrierung und

Synthesen

eine intramolekulare Friedel-Crafts-artige Cyclisierung lieferten das Indanon **160**. Nach Umsetzung von **160** mit Trifluoressigsäureanhydrid zum Enolester **161** konnte nach Ozonolyse und Entschützung der Methoxygruppen das Isocoumarin **163** erhalten werden.

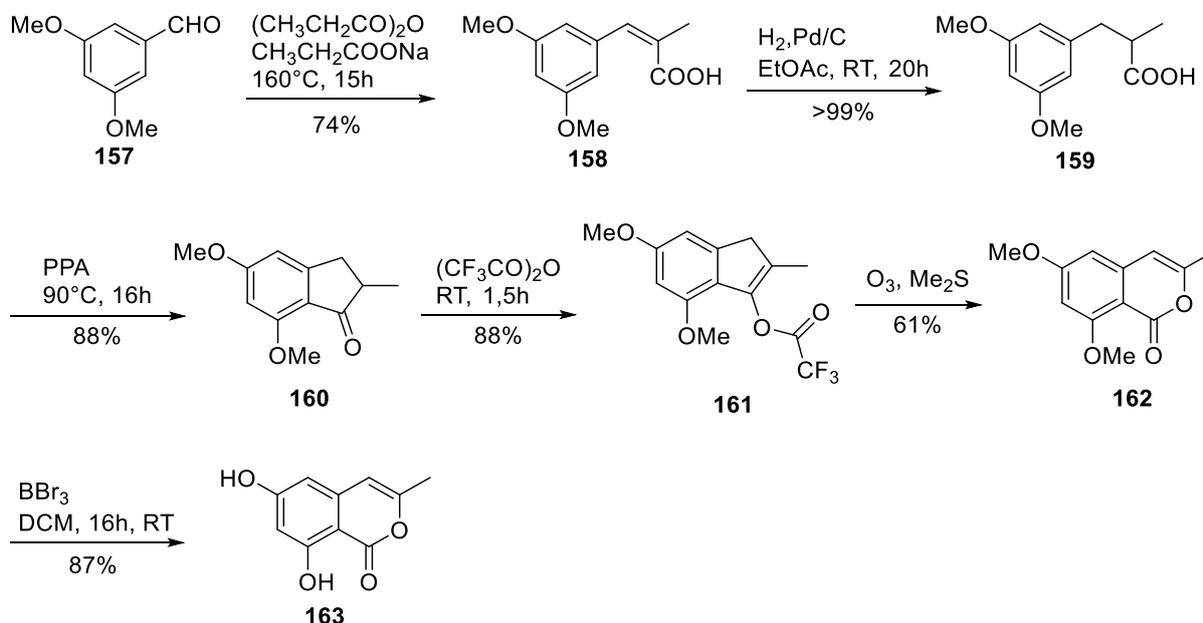


Abbildung 85: Geplante Darstellung von 6,8-Dimethoxy-3-methylisocoumarin (**163**) nach dem Protokoll von Kendall et al.^[94]; dargestellt sind die Ausbeuten aus der Publikation

Zu Beginn wurde in einer Perkin-Kondensation mit Propionsäureanhydrid und Natriumpropionat in 96% Ausbeute der Benzaldehyd **157** zur Zimtsäure **158** umgesetzt. Die Perkin Kondensation ist eine Namensreaktion benannt nach dem englischen Chemiker Sir William Henry Perkin, der diese Reaktion zur Darstellung von Zimtsäure-Analoga bereits im Jahre 1868^[95] beschrieb. Dabei reagieren Aldehyde in Anwesenheit von Anhydriden im basischen Milieu zu α,β -ungesättigten Carbonsäuren in einem Mechanismus ähnlich einer Aldol-Kondensation. Die anschließende katalytische Hydrierung mit Wasserstoff unter Palladium-Katalyse lieferte **159** in 93% Ausbeute. Bei der darauf folgenden intramolekularen Cyclisierung musste das Gemisch aufgrund der hohen Viskosität der Polyphosphorsäure zunächst kontinuierlich mit einem Glasstab von Hand gerührt werden, wobei das Gemisch langsam erwärmt wird (ca. 1°C pro Minute), um ein „Anbrennen“ des Reaktionsgemisches in das Reaktionsgefäß zu verhindern. Nachdem das zähe Gemisch auf diese Weise auf 90°C erwärmt wurde, wurde Wasser zugegeben bis eine klare, orange Lösung entstand, die dann über Nacht mechanisch weitergerührt werden konnte. So konnte das Indanon **160** in 83% Ausbeute erhalten werden. Durch Veresterung des Indanons **160** mit Trifluoressigsäureanhydrid kann das Enoltrifluoroacetat **161** in 64% Ausbeute gewonnen werden. Diese Veresterung

gelingt dank der Keto-Enol-Tautomerie des Indanons, wobei die Enol-Form mit Trifluoressigsäureanhydrid umgesetzt wird. Die Bildung von **161** ist notwendig, um eine Doppelbindung im Fünfring zu erzeugen, die im folgenden Schritt mittels Ozonolyse gespalten werden kann.

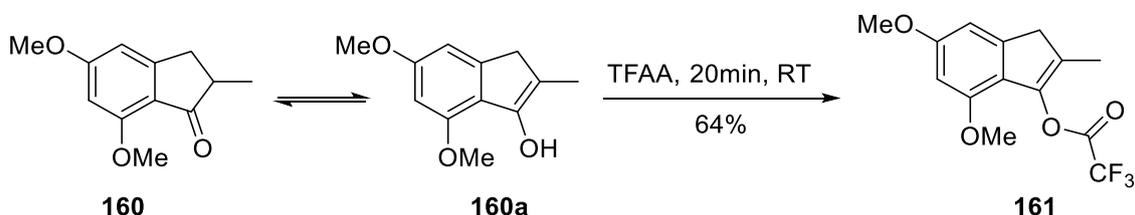


Abbildung 86: Keto-Enol-Tautomerie von **160**, wobei **160a** mit Trifluoressigsäureanhydrid (TFAA) zum Enoltrifluoroacetat **161** reagiert

Die folgende Ozonolyse wurde von Kendall et al. als „schwierig“^[94] bezeichnet, da diese sehr schnell Nebenprodukte generierte, sollte man die Reaktion zu spät stoppen. Auffällig war, dass die Autoren die Endpunktbestimmung der Reaktion mit der entstehenden blauen Farbe des Ozons festlegten und bereits über Zersetzungsprodukte des Isocoumarins **162** berichteten, wobei die Ausbeuten über mehrere Versuche gemittelt bei 61% lagen. Durch eigene Modifizierung des Protokolls durch die Zugabe von einer Spatelspitze Sudan III als Farbindikator – wie von Fisher und Dussault beschrieben^[96] - konnte der Endpunkt der Ozonolyse durch die Entfärbung der Indikatoren deutlich spezifischer festgestellt werden. Dazu wurde zunächst das Edukt **161** in Ethylacetat gelöst und auf -55°C gekühlt. Nachdem 15 Minuten lang Stickstoff durch die Reaktionsmischung geleitet wurde, wurde Ozon eingeleitet (60 L/h, 40 W, 4:40 Minuten) bis die rote Farbe des Farbindikatoren zu einer leicht gelblichen umgeschlagen war. Nach Zugabe von Dimethylsulfid wurde die gelbliche Lösung über Nacht gerührt. Nach Aufreinigung mittels FSC wurde das Isocoumarin **162** in 80% Ausbeute erhalten. Anschließend wurden die Methylschutzgruppen mit BBr₃ gespalten und 6,8-Dimethoxy-3-methylisocoumarin (**163**) in 96% Ausbeute gewonnen.

Synthesen

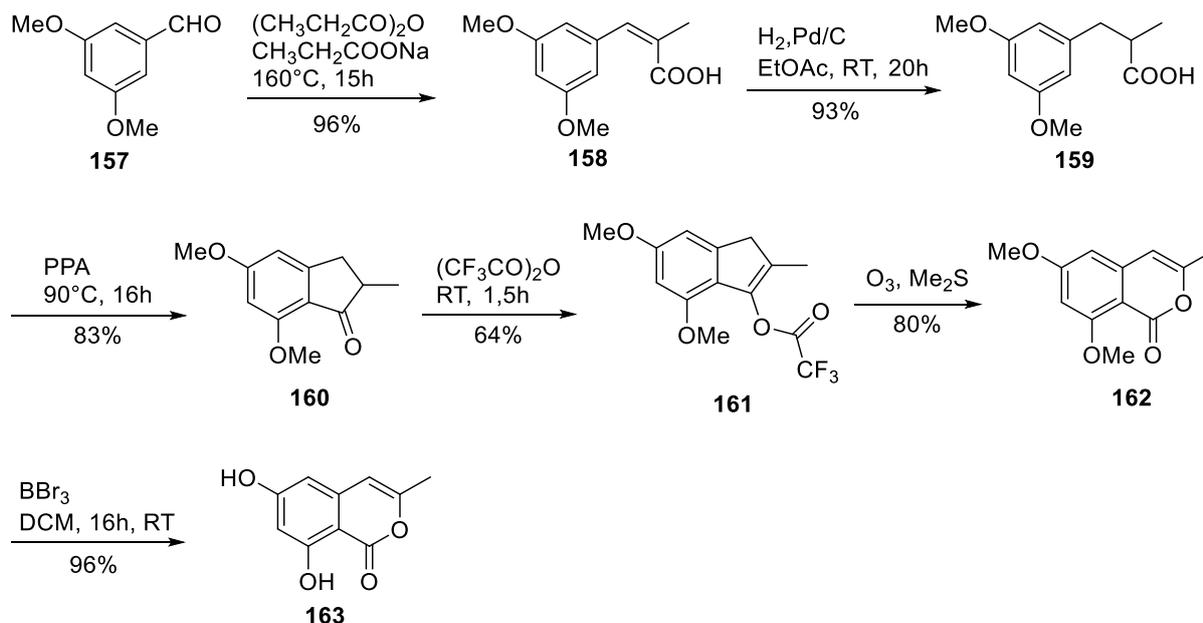


Abbildung 87: Synthese von 6,8-Dihydroxy-3-methylisocoumarin (**163**) in Anlehnung an das Protokoll von Kendall et al.^[94]

Durch anschließende Williamson-Ethersynthese mit Caesiumcarbonat als Base und Chlor-methylmethylether konnte das zweifach MOM-geschützte Isocoumarin **25** (Abbildung 88) in 96% Ausbeute erhalten werden. Durch Behandlung mit Ammoniak-Lösung (20% in Wasser) in DMF als Lösungsmittel bei 80°C für 16 Stunden konnte das Isochinolin-1(2*H*)-on **26** in 91% Ausbeute erhalten werden. Nach Deprotonierung von **26** mithilfe von Natriumhydrid lieferte Triflierung mit *N*-Phenyl-bis(trifluoromethansulfonimid) das triflierte Isochinolin **164** in 72% Ausbeute. Anschließende Sonogashira-Kupplung mit kommerziell erwerblichem Methyl-4-ethynylbenzoat mit Bis(triphenylphosphin)palladium(II)dichlorid und Kupferiodid als Katalysatoren und Diisopropylamin als Base lieferten das 1-Alkinylochinolin **165** in 84% Ausbeute. Anschließende Entschützung der MOM-Schutzgruppen und Cyclisierung nach dem Protokoll von Rudyanto et al.^[31] in einem 1:1 Gemisch aus Methanol und Salzsäure (10% in Wasser) lieferten das Cassiarin A-Analogon **150** in 84% Ausbeute. Dabei wurde das Reaktionsgemisch nach beendeter Reaktion neutralisiert, um eine Protonierung des Stickstoffs im Ringsystem zu verhindern. Anschließend wurde das Gemisch zur Trockene eingedunstet und mittels FSC aufgereinigt. Die schlechte Löslichkeit, die bei allen Cassiarin A-Analoga beobachtet werden konnte, war bei dieser Substanz am ausgeprägtesten.

Synthesen

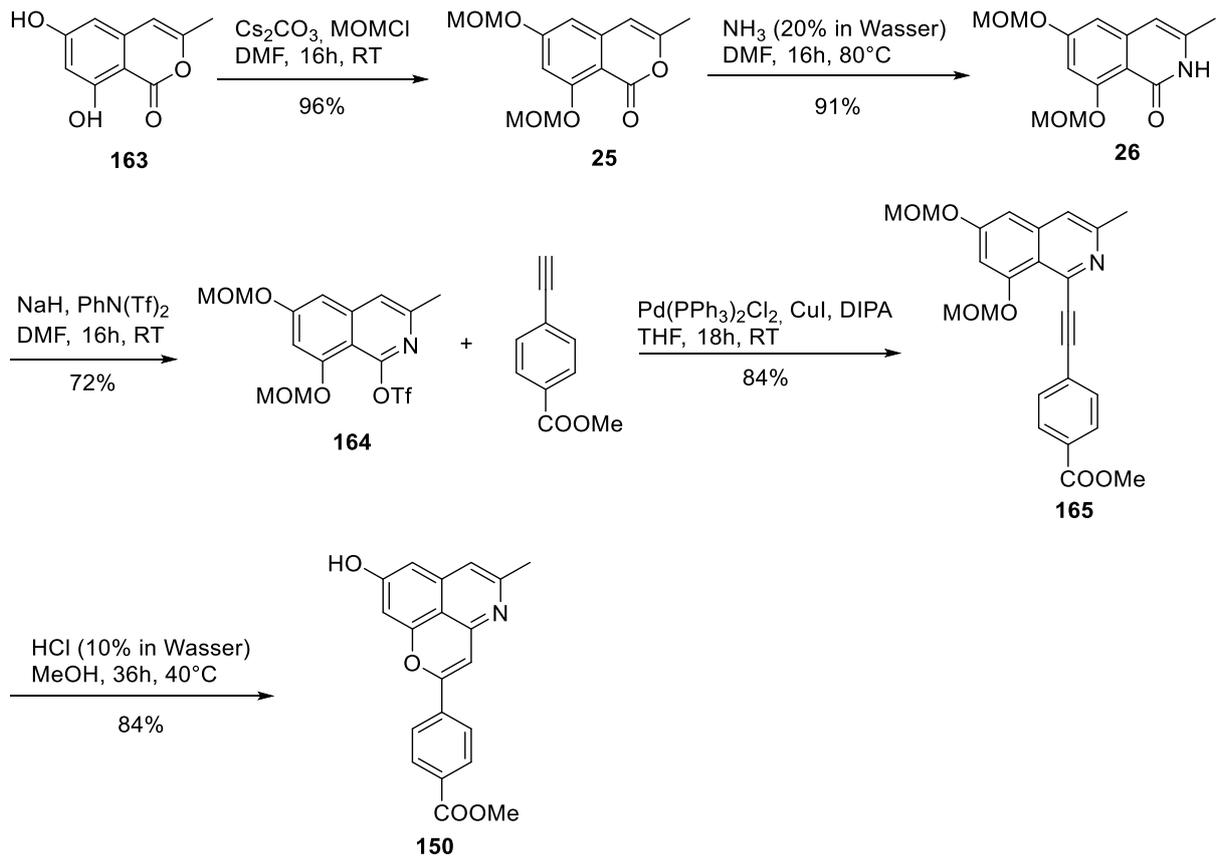


Abbildung 88: Darstellung des Cassiarin A–Analogons **150** mit Benzoessäuremthylester-Rest

Um ein Molekül zu generieren, welches mit dem terminalen Amin des Trimethoprim-Linkers reagieren kann (vgl. Abbildung 77), sollte anschließend lediglich der Methylester hydrolysiert werden. Verschiedene Versuche mit mehreren Basen – analog der klassischen Verseifung – scheiterten, wobei selbst bei hohen Temperaturen keine Reaktion stattfand und lediglich das Ausgangsmaterial zurückgewonnen werden konnte. Als Basen wurden Lithiumhydroxid, Natriumhydroxid, Kaliumhydroxid, Kaliumcarbonat und Cäsiumcarbonat in einem 1:1 Gemisch aus DMF und Wasser verwendet, wobei alle Ansätze zunächst 16 Stunden bei Raumtemperatur und anschließend 24 Stunden bei 80°C gerührt wurden.

Synthesen

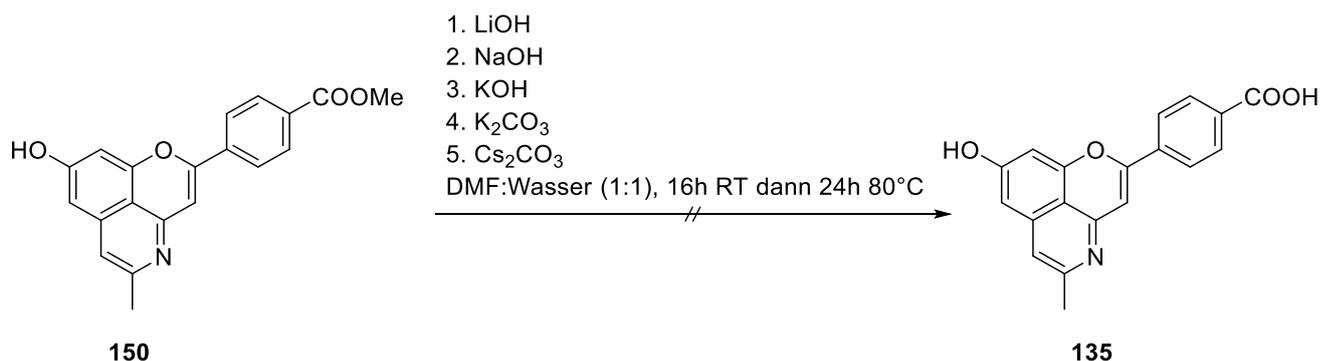


Abbildung 89: Versuche zur alkalischen Hydrolyse des Esters von **150**

Daher wurden andere Methoden zur Spaltung des Esters hinzugezogen. Jung und Lyster publizierten im Jahre 1977^[97] die Hydrolyse von Estern mithilfe von Trimethylsilyliodid in Tetrachlorkohlenstoff bei 50°C. Unter den publizierten Bedingungen fand jedoch selbst nach 72 Stunden Reaktionszeit keine Umsetzung statt, woraufhin das Gemisch 24 Stunden zum Rückfluss erhitzt wurde. Als selbst dann keine Umsetzung zu beobachten war, wurde der Versuch als gescheitert betrachtet und das Edukt zurückgewonnen. Eine weitere Möglichkeit der Esterhydrolyse veröffentlichten Chang und Wood im Jahr 1964^[98]. Hier wurden verschiedene Ester mit Kalium-*tert*-butanolat in DMSO bei Raumtemperatur hydrolysiert. Auch hier konnte bei den publizierten Bedingungen nach einer Reaktionszeit von 24 Stunden keine Umsetzung beobachtet werden. Nachdem das Gemisch auf 80°C erwärmt wurde, konnte nach einer Stunde bereits eine deutliche Farbänderung von gelb nach rotbraun festgestellt werden, wobei nach DC-Kontrolle ein komplexes Gemisch mehrerer Produkte erkennbar war. Nach zwei Stunden Reaktionszeit hatte sich das gesamte Edukt zersetzt, wobei kein Produkt entstanden ist. Zuletzt wurde eine Methode nach Müller und Siegfried versucht^[99]. Diese publizierten die selektive Hydrolyse von Methylestern mit Natriumcyanid in HMPT (Hexamethylphosphorsäuretriamid) bei 75°C und einer Reaktionszeit von 24 Stunden. Da HMPT – im Laborjargon besser bekannt als „*liquid cancer*“ – eine im Tierversuch nachgewiesene krebserzeugende Wirkung besitzt^[100], wurde es für den Versuch durch das weniger toxische NMP (*N*-Methyl-2-pyrrolidon) ersetzt. Nach 24 h Reaktionszeit bei 75°C konnte mittels DC-Kontrolle keine Umsetzung beobachtet werden. Nach Zugabe von zwei weiteren Äquivalenten Natriumcyanid wurde das Reaktionsgemisch auf 125°C erwärmt und 4 Stunden gerührt. Wie beim Versuch zuvor beobachtet, zersetzte sich das Edukt und es konnte aus dem komplexen Gemisch aus Nebenprodukten kein gewünschtes Produkt isoliert werden.

Synthesen

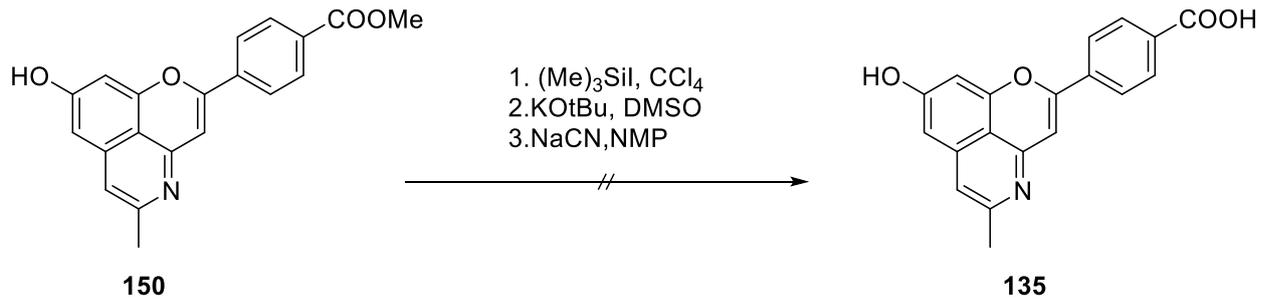


Abbildung 90: Weitere Versuche zur Spaltung des Methylesters von **150** nach Protokollen von Jung und Lyster^[97], Chang und Wood^[98] und Müller und Siegfried^[99]

Da der Ester **150** eine derart hohe Stabilität aufweist und mit diversen Methoden nicht gespalten werden konnte, sollte **150** zumindest auf seine zytotoxische Aktivität getestet werden. Für die Identifizierung von Zielverbindungen mittels yeast-three-hybrid screenings ist diese Substanz jedoch leider nicht geeignet.

Wie einleitend beschrieben sollte zudem eines der biologisch aktivsten Syntheseprodukte aus der Cassiarin-Reihe mittels Williamson-Ether-Synthese mit einem terminalen Alkin versehen werden. Dadurch kann mittels kupferkatalysierter Azid-Alkin-Cycloaddition (CuAAC oder „Click chemistry“) das Cassiarin-Analogon mit dem Azid-substituierten Trimethoprim-Linker-Molekül **229** verknüpft und anschließend getestet werden (vgl. Kapitel 3.6). Hierfür wurde das Cassiarin A-Analogon **108** in DMF gelöst und mit Propargylbromid in Anwesenheit von Caesiumcarbonat verethert, wobei das Alkin **166** mit 92% Ausbeute erhalten werden konnte.

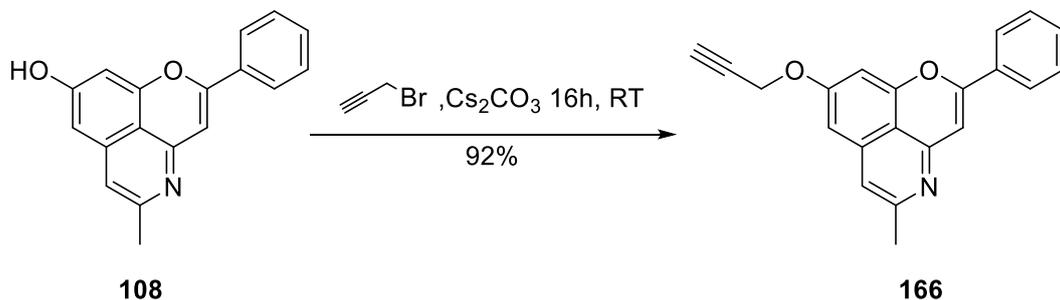


Abbildung 91: Darstellung des „clickbaren“ Cassiarin A-Analogons **166** ausgehend von **108** über Williamson-Ether-Synthese

Durch das Scheitern der Synthese der Carbonsäure **135** konnte auf diese Weise wenigstens ein Cassiarin A-Analogon dargestellt werden, mit dem die Identifizierung von Zielstrukturen mittels yeast-three-hybrid screenings durchgeführt werden kann.

3.5 Entwicklung einer neuen Syntheseroute zu Zephycandidin A

3.5.1 Synthese des 6-Aminophenanthridins

Ein zweites Projekt, welches im Rahmen dieser Arbeit bearbeitet wurde, war die Entwicklung und Etablierung einer Syntheseroute für das Alkaloid Zephycandidin A. Hierzu sollte eine neue Syntheseroute entwickelt werden und Variationen des Naturstoffs synthetisiert werden, um erste Erkenntnisse der Struktur-Aktivitätsbeziehungen zu erforschen. Dazu sollte die geplante Syntheseroute (vgl. Kapitel 2.2.3) auf Funktionalität untersucht werden.

Zunächst sollte der zentrale Schritt der Route – die Darstellung des 6-Aminophenanthridins – untersucht werden. Dazu wurde eine Vorschrift von Zhang et al.^[43] verwendet. Wie eingangs erwähnt wird in dieser Publikation beschrieben, dass durch Palladium-katalysierte Kreuzkupplung von *ortho*-bromierten Benzonitrilen mit *ortho*-Aminobenzolboronsäureestern und spontaner intramolekularer, nukleophiler Addition 6-Aminophenanthridine dargestellt werden können. Dazu wurde aus kommerziell erwerblichem 6-Brom-1,3-benzodioxol-5-carbonitril und 2-Aminophenylboronsäurepinakolester zusammen mit Bis(triphenylphosphin)palladium (II)chlorid und Natriumcarbonat in einem DMF-Wasser-Gemisch das auf diese Weise bisher noch nie dargestellte 6-Aminophenanthridin **68** in 76% Ausbeute erhalten.

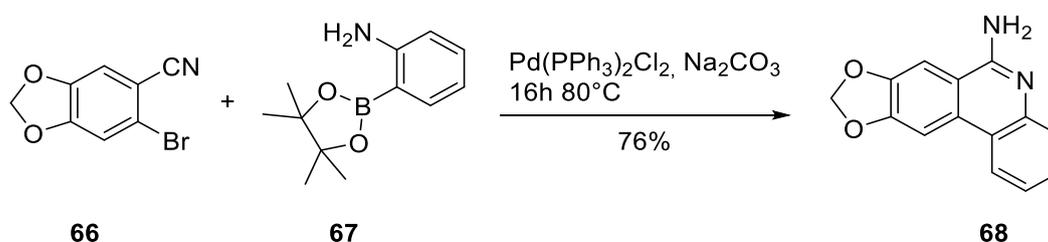


Abbildung 92: Darstellung des 6-Aminophenanthridins **68** über Suzuki-Kupplung und spontaner, intramolekularer nukleophiler Addition

Die Aufreinigung mittels FSC stellte hierbei eine besondere Herausforderung dar, da die Substanz auf dem leicht sauren Kieselgel offensichtlich schnell protoniert wird, folglich ausfällt und in den ersten Versuchen – trotz Beimischung von bis zu drei Prozent Triethylamin zum Fließmittel – die Chromatographiesäule regelrecht verstopfte. Durch vorheriges mehrmaliges „Inaktivieren“ des Kieselgels durch Spülen mit dem Eluenten (Ethylacetat/Triethylamin 99:1) konnte dieses Problem vermieden werden. Ein weiteres Problem war die Identifizierung des Produktes. Durch eine erfolgreiche Suzuki-Kupplung aber einen

Synthesen

gescheiterten nukleophilen Angriff des Amins am Benzotrifil würde man das Produkt **167** mit gleicher Molekülmasse erhalten.

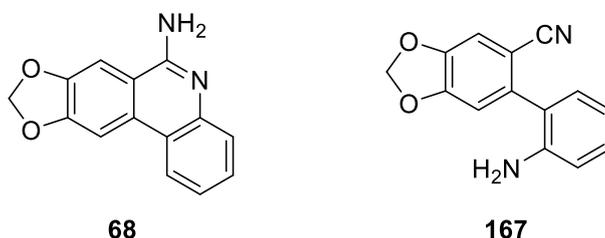


Abbildung 93: Mögliche Produkte der in Abbildung 92 gezeigten Reaktion, beide mit einer molaren Masse von 238 g/mol

Somit ist eine Unterscheidung beider Moleküle durch Massenspektrometrie nicht möglich. Auch die Identifizierung mittels NMR erbrachte in diesem Fall keinen eindeutigen Beweis: Durch die ähnlichen funktionellen Gruppen und die gleiche Anzahl an aliphatischen und aromatischen Protonen, die in beiden Molekülen ähnliche chemische Verschiebungen aufweisen dürften, konnte kein definitiver Strukturnachweis erfolgen. Auch das ¹³C-NMR- Spektrum konnte aus denselben Gründen keinen Beweis erbringen. Im HMBC-Spektrum konnte ebenfalls keine Kopplung zwischen den 6-Amino-Protonen und anderen Kohlenstoff-Atomen detektiert werden. Einen eindeutigen Beweis konnte lediglich die IR-Spektroskopie erbringen. Durch das Fehlen der für Nitrile charakteristischen, scharfen Bande bei einer Wellenzahl von 2210 – 2260 cm⁻¹ konnte die Umsetzung zum 6-Aminophenanthridin eindeutig bewiesen werden (Abbildung 94). Ein weiterer Beweis ist die darauffolgende erfolgreiche Cyclokondensation mit Chloracetaldehyd zum Zephycandidin A. Da diese Reaktion nur das Zephycandidin A liefern kann, wenn das entsprechende 6-Aminophenanthridin **68** mit Chloracetaldehyd umgesetzt wird (vgl. Kapitel 3.5.2), muss es sich zuvor um das 6-Aminophenanthridin **68** gehandelt haben.

Synthesen

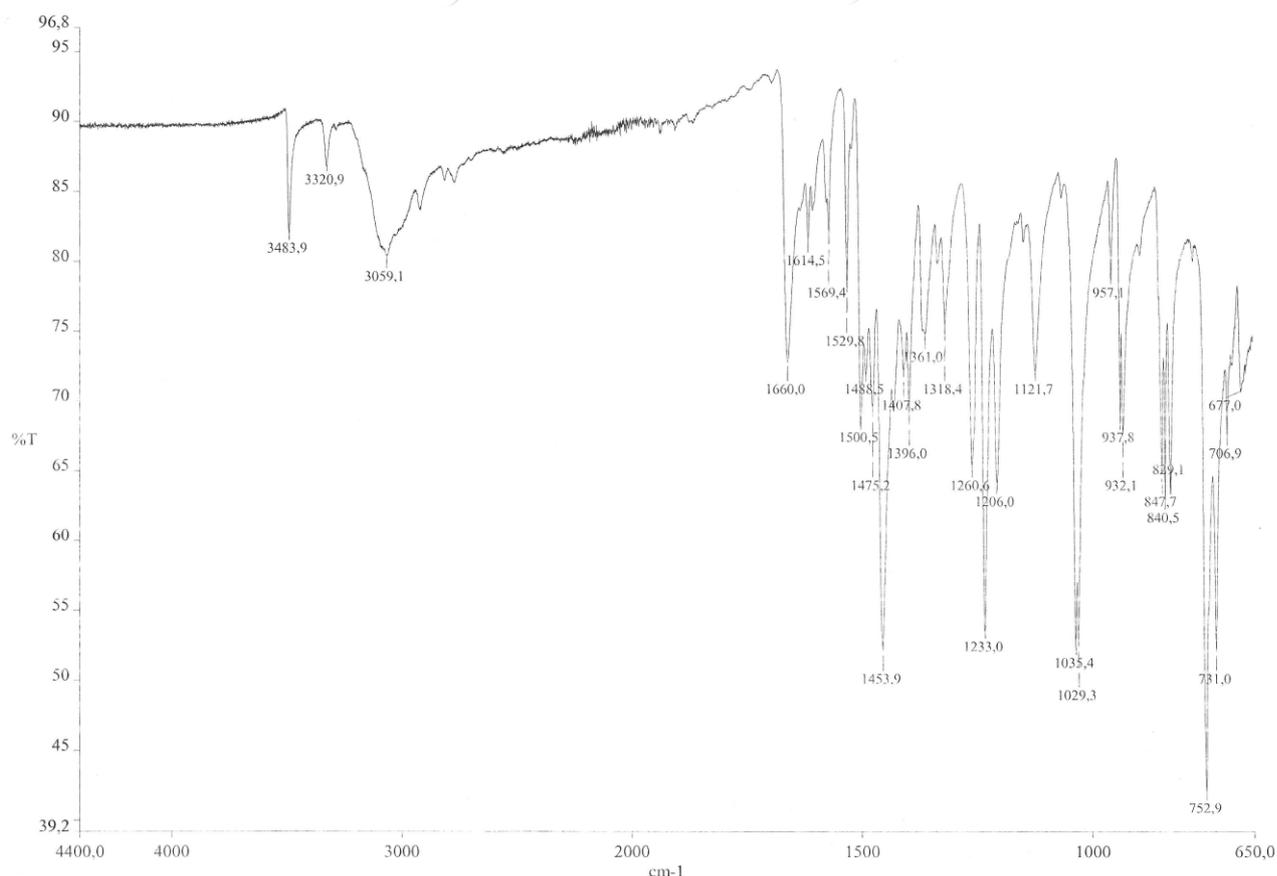


Abbildung 94: Infrarot-Spektrum der Verbindung **68**; das Fehlen der für Nitrile typischen Bande bei Wellenzahlen von $\tilde{\nu} = 2210\text{-}2260\text{ cm}^{-1}$ zeugt von der erfolgreichen Darstellung des 6-Aminophenanthridins **68**

3.5.2 Cyclokondensation zum Zephycandidin A

Anschließend wurde die Kondensationsreaktion mit Chloracetaldehyd zum Zephycandidin A (**21**) untersucht. Generell finden sich in der Literatur zahlreiche Beispiele für die Darstellung von Imidazo[1,2-a]pyridinen^{[101][102][103][104]} aber auch für Imidazo[1,2-f]phenanthridine^{[105][106]}, deren Bedingungen zwanglos für diese Synthese übernommen werden können. Diese Protokolle leiten sich von der Synthese von Imidazo[1,2-a]pyridinen ab, die bereits im Jahre 1929 von Tschitschibabin publiziert wurde^[107] und im Jahr 1955 von Shilling et al.^[108] optimiert wurde. Ausgehend vom α -Aminopyridin (**168**) lagert sich zunächst an dessen Pyridin-Stickstoff ein α -Halogenketon oder -aldehyd an. Anschließend folgt durch über eine Kondensationsreaktion die Aromatisierung zum Imidazo[1,2-a]pyridin (**169**). Dieser Mechanismus kann aufgrund der Ähnlichkeit zum 6-Aminophenanthridin auf diese Reaktion übertragen werden.

Synthesen

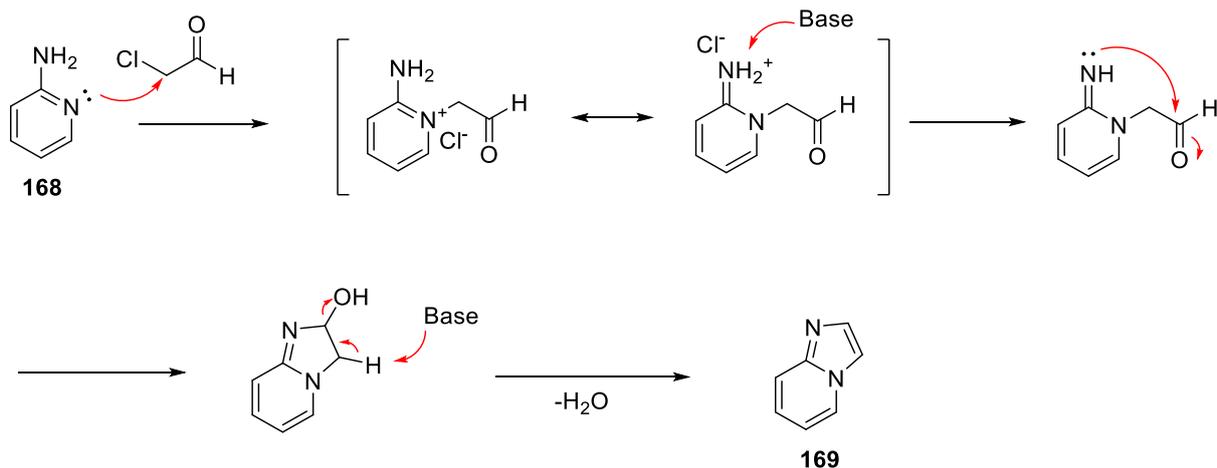


Abbildung 95: Postulierter Mechanismus der Tschitschibabin Synthese zur Bildung von Imidazo[1,2-a]pyridin (**169**) in Anlehnung an Shilling et al.^[108]

Zunächst wurde hier das Protokoll nach Zhang et al.^[43] versucht. Darin wird die Kondensation mit Chloroacetaldehyd (50% in Wasser) bei 80°C unter Stickstoffatmosphäre zusammen mit Natriumcarbonat in Wasser als Lösungsmittel bei einer Reaktionszeit von 16 Stunden beschrieben. In den ersten Versuchen konnte gezeigt werden, dass die Reaktion keine Stickstoffatmosphäre benötigt und das Edukt nach einer Stunde bereits vollständig umgesetzt war. Die einfache Handhabung der Reaktion und eine Ausbeute von 89% machten eine weitere Optimierung der Reaktion überflüssig.

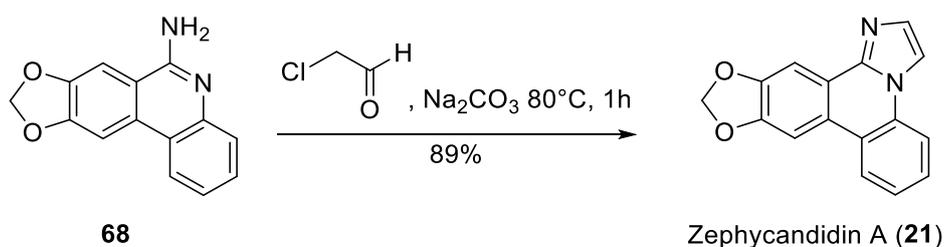


Abbildung 96: Finale Anellierungsreaktion zu Zephycandidin A (**21**)

Auf diese Weise konnte Zephycandidin A (**21**) in zwei einfachen Schritten mit einer Gesamtausbeute von 68% erhalten werden, was eine deutliche Verbesserung gegenüber den bisher bekannten Synthesen darstellt (vgl. Kapitel 1.5).

3.5.3 Synthese von *ortho*-Brombenzonnitrilen

Nachdem die Syntheseroute etabliert war, sollten Strukturvarianten des Zephyricandidin A dargestellt werden. Wie eingangs erwähnt sollte hierbei der Fokus auf dem Imidazolring und auf der Variation der Methylendioxy-Struktur an Ring A gelegt werden. Außerdem sollte eine einfache und universell anwendbare Methode zur Darstellung von *ortho*-Brombenzonnitrilen erarbeitet werden, um einen einfachen synthetischen Zugang zu Edukten der zweistufigen Synthese zu erhalten. Da das *o*-Brombenzonnitril **66** zwar prinzipiell kommerziell erwerblich ist, jedoch unsere gängigen Lieferanten zum damaligen Zeitpunkt während der COVID-19 Pandemie lange Lieferzeiten hatten, wurde die Verbindung **66** eigens synthetisiert. Zudem sollte damit auch eine Modellreaktion zur Darstellung von *o*-Brombenzonnitrilen entwickelt werden, die auf andere Benzaldehyde und *o*-Brombenzaldehyde als Edukte übertragen werden sollte. Ausgehend von Piperonal (**40**) konnte nach einer Methode von Ito et al.^[109] mittels elektrophiler aromatischer Substitution mit elementarem Brom und Eisenpulver in Essigsäure das 6-Brompiperonal (**44**) in 65% Ausbeute erhalten werden. Anschließend wurde dieses mit Hydroxylaminhydrochlorid in DMSO für eine Stunde bei 90°C gerührt, wobei das Nitril **66** in 96% Ausbeute erhalten werden konnte.

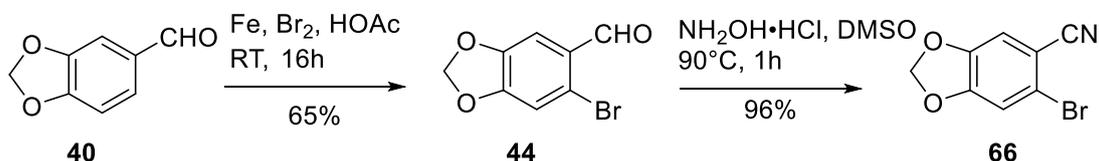


Abbildung 97: Etablierung einer allgemeinen Darstellungsweise für *o*-Brombenzonnitrile

Diese direkte Umwandlung von Aldehyden in Nitrile wurde von Augustine et al.^[110] entwickelt. Eine wesentliche Besonderheit dieser Reaktion ist, dass das DMSO hier als Lösungsmittel und Katalysator fungiert. Die Autoren postulieren, dass DMSO durch das Hydrochlorid protoniert wird und sich anschließend an das aus Aldehyd und Hydroxylamin entstandene Oxim kondensiert. Unter Abspaltung des Nitrils kann protoniertes DMSO zurückgewonnen werden und die Reaktion von neuem beginnen. Alle folgenden Nitrile wurden nach diesem Reaktionstyp dargestellt.

Synthesen

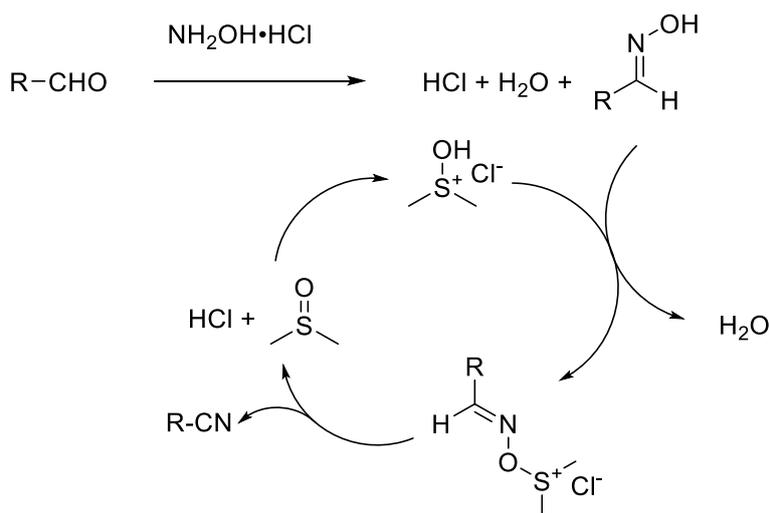


Abbildung 98: Postulierter Reaktionsmechanismus zur Nitrilsynthese mit „aktiviertem DMSO“ nach Augustine et al.^[110] (eigene Darstellung)

3.5.4 Variationen der Methylendioxy-Struktur und des Rings A

Wie eingangs erwähnt sollte untersucht werden, welche Strukturvariationen diese Syntheseroute zulässt und ob mit diesen Variationen ebenfalls gute bis sehr gute Ausbeuten erzielt werden können. Bei den zunächst untersuchten Resten sollte es sich um Methoxy-Substituenten statt der Methylendioxy-Struktur und Pyridin und Thiophen als Variationen des benzenoiden Rings A handeln. Die für die Suzuki-Kupplung benötigten Nitrile wurden entweder, wie oben beschrieben, mit der Methode nach Augustine et al.^[110] aus den entsprechenden Aldehyden dargestellt oder direkt käuflich erworben. Diese Nitrile wurden anschließend mittels Suzuki-Kupplung und intramolekularer nukleophiler Addition - wie in Kapitel 3.5.1 beschrieben - in die tricyclischen Phenanthridinsysteme überführt. Der finale Ringschluss zur Imidazol-Partialstruktur erfolgte letztendlich wie zuvor beschrieben mit Chloracetaldehyd im basischen Milieu. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Syntheseroute nicht nur für andere Reste an Ring A geeignet ist, sondern Ring A auch durch andere Heteroaromaten ersetzt werden kann, wobei durchgängig gute bis sehr gute Ausbeuten erhalten werden konnten. Tabelle 8 beinhaltet die Zephycandidin A-Analoga der „ersten Generation“ mit unsubstituiertem Imidazolring und deren Gesamtausbeute über drei Schritte. Anschließend wurden alle Substanzen auf ihre biologische Aktivität getestet. Die Testergebnisse werden in Kapitel 4.2.2 präsentiert und diskutiert.

Synthesen

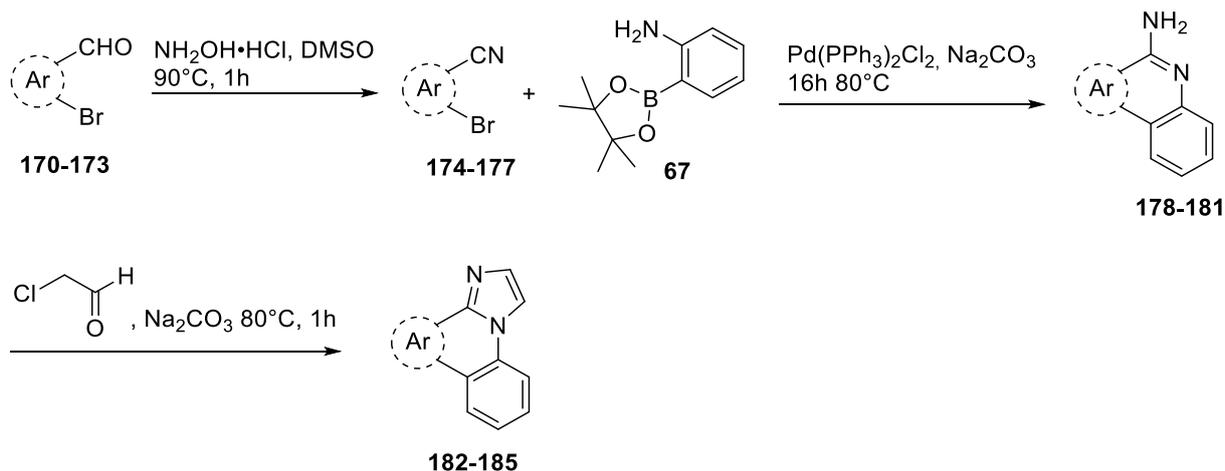


Abbildung 99: Allgemeine Syntheseroute für die Darstellung der Zephycandin A–Analoge **182-185** mit unsubstituiertem Imidazolring

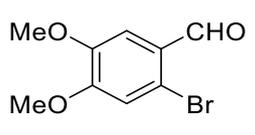
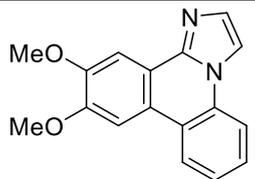
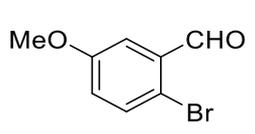
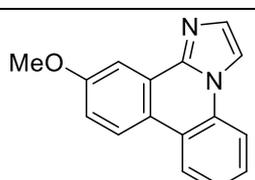
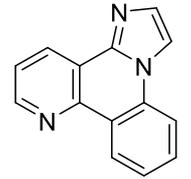
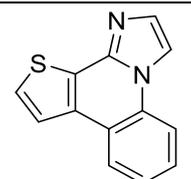
Edukt	Produkt	Gesamtausbeute
 170	 182	49%
 171	 183	66%
 172	 184	57%
 173	 185	55%

Tabelle 8: Die ersten Zephycandin A–Analoge mit Variationen des Rings A und der Methylenedioxy-Struktur

Synthesen

Um auf einfachem Wege weitere Variationen der Methylendioxy-Struktur zu synthetisieren und zu untersuchen, wurden anschließend über dieselbe Syntheseroute die komplementären *ortho*-Methoxyphenole **190** und **191** (Abbildung 100) synthetisiert. Diese wurden gewählt, da die Aldehyde **186** und **187** (Abbildung 100), die für die Synthese der Benzonitrile benötigt werden günstig kommerziell erwerblich sind. Zudem können die jeweiligen Aktivitäten der daraus resultierenden Konstitutionsisomere leichter miteinander verglichen werden und somit präzisere Aussagen zum Einfluss der verschiedenen Positionen auf die Aktivität gezogen werden. Um somit weitere Aussagen zu Struktur-Aktivitäts-Beziehungen der Zephycandidin A-Analoga treffen zu können, sollten zum einen Hydroxyethyl- und Buttersäureethylester-Reste eingeführt werden. Hierbei kann eine kurze Kette mit Wasserstoffbrückendonator (Hydroxyethyl) und eine längere Kette mit dem Ester als Wasserstoffbrückenakzeptor verglichen werden. Zudem sollte als weiterer Rest mit einer Benzylgruppe der Einfluss sterisch großer, lipophiler Reste untersucht werden.

Geplant war mit den *ortho*-Methoxyphenolen **188** und **189** die folgende Suzuki-Kupplung durchzuführen und die daraus entstandenen Phenanthridine **190** und **191** mittels Williamson-Ethersynthese weiter zu funktionalisieren. Es zeigte sich jedoch, dass bei der Suzuki-Kupplung in beiden Fällen eine Vielzahl an Nebenprodukten entstand. Die beiden gewünschten Produkte waren zwar jeweils in den Produktgemischen vorhanden, konnten jedoch nicht in reiner Form isoliert werden. Zudem wären die Ausbeuten nach der Aufreinigung – ohnehin nur geschätzt – nicht höher als maximal 20% gewesen, da nach einer versuchten Aufreinigung des Reaktionsgemisches mittels FSC das Produktgemisch, in dem die Produkte jeweils enthalten waren, einer Ausbeute von 20% entsprechen würde, wären diese Fraktionen rein gewesen.

Synthesen

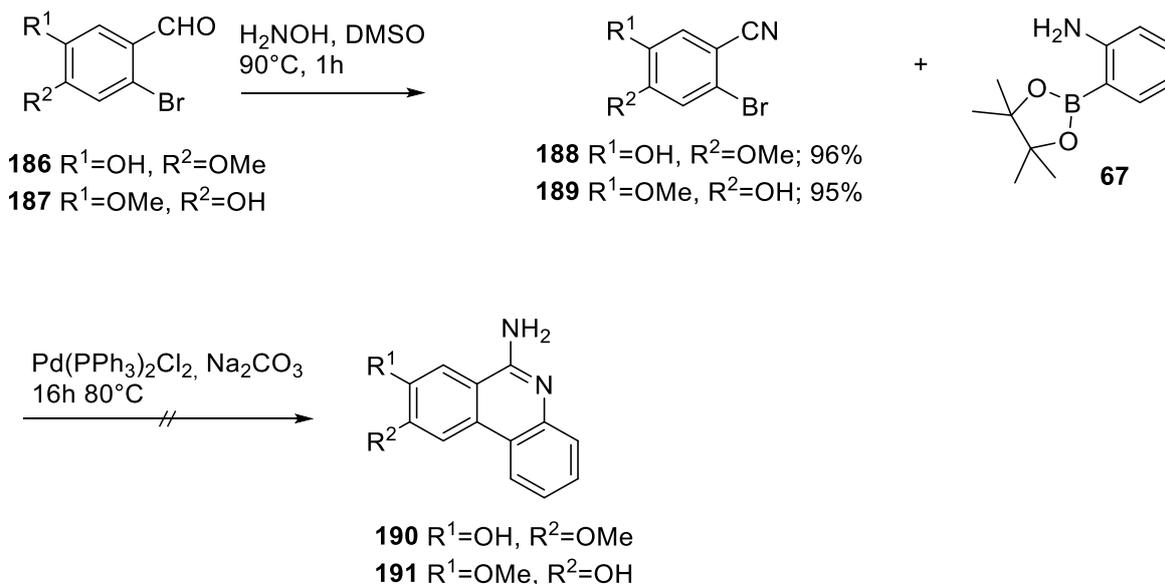


Abbildung 100: Versuchte Darstellung der 6-Aminophenanthridine mit Hydroxygruppen an Ring A, die anschließend mittels Williamson Ether-Synthese weiter hätten funktionalisiert werden sollen; die beiden 6-Aminophenanthridine **190** und **191** sind bei der Reaktion entstanden, konnten jedoch nicht in reiner Form isoliert werden

Da bei den in Abbildung 99 gezeigten Synthesen verschieden substituierte Benzonitrile **174** und **175** in der Suzuki-Kupplung unproblematisch verwendet werden konnten, sollten die Bausteine bereits auf der Stufe des Benzonitrils mit verschiedenen Substituenten verethert werden, um mit den neu gewonnenen Verbindungen die Suzuki-Kupplung zu versuchen. Auf diese Weise gelang die Darstellung der gewünschten Phenanthridine **196-199** (Abbildung 101) und **207-209** (Abbildung 102) in guten Ausbeuten. Diese wurden anschließend mit Chloracetaldehyd zu den entsprechenden Zephycandidin A-Analoga **200-203** (Abbildung 101) und **210-212** (Abbildung 102) kondensiert.

Synthesen

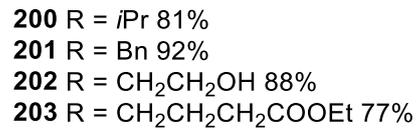
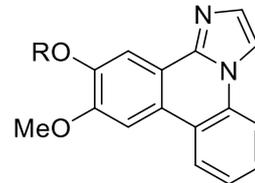
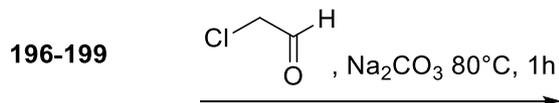
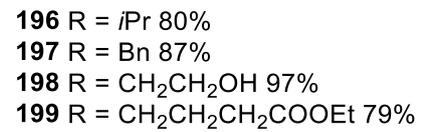
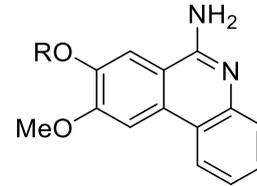
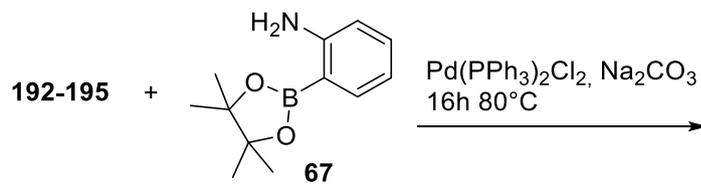
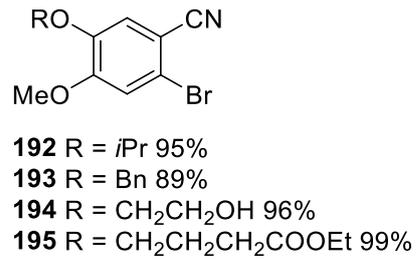
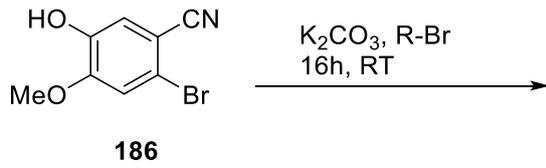


Abbildung 101: Darstellung neuer Zephycandidin A–Analoga **200-203** mit Variationen am Ring A ausgehend von 2-Brom-5-hydroxy-4-methoxybenzonitril (**186**)

Synthesen

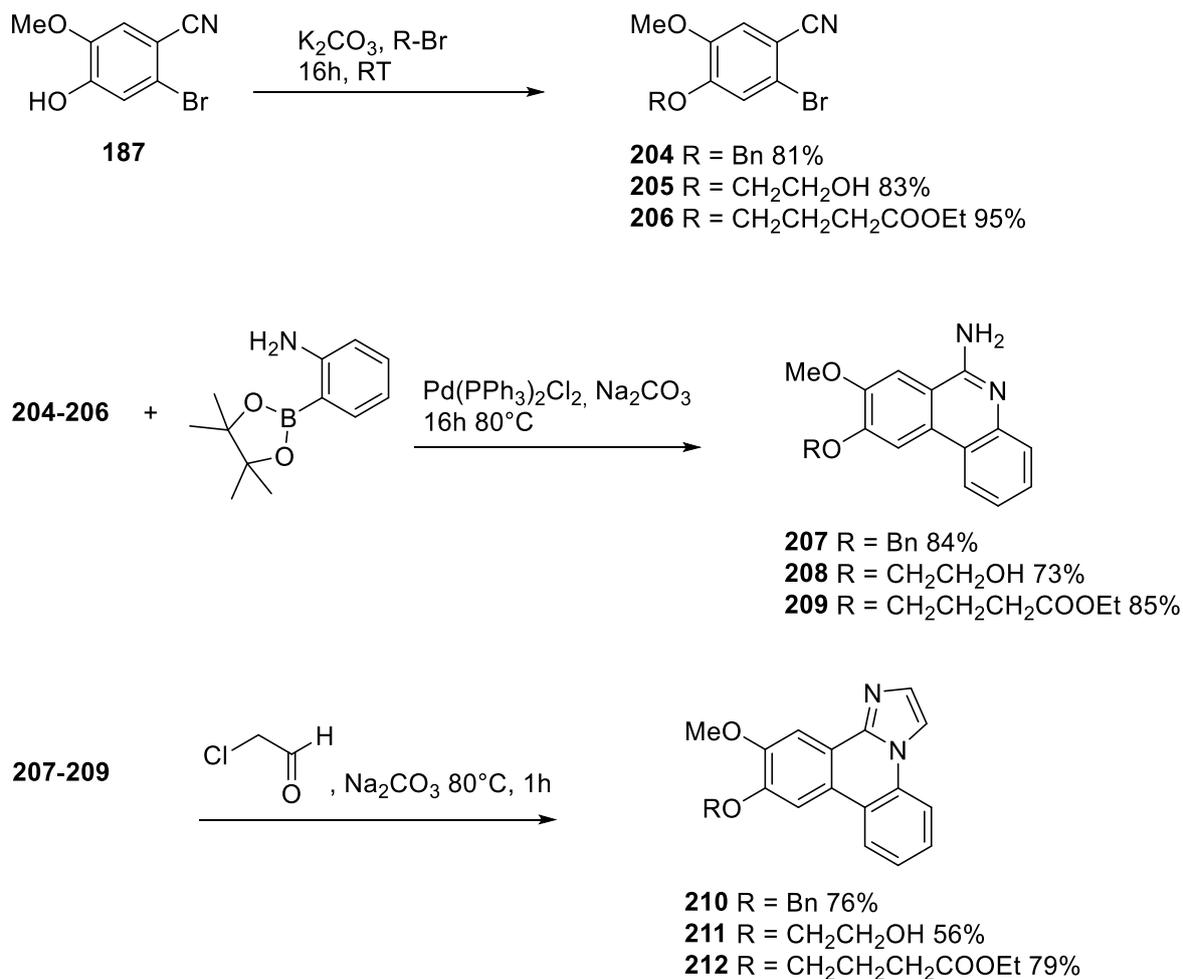


Abbildung 102: Darstellung neuer Zephyrcandidin A–Analoga **210-212** mit Variationen am Ring A ausgehend von 2-Brom-4-hydroxy-5-methoxybenzonitril (**187**)

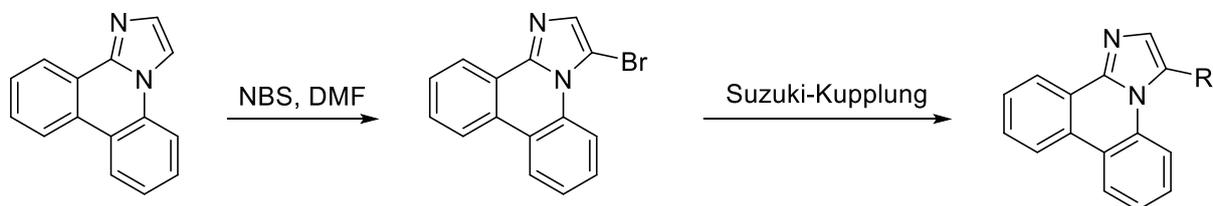
Anschließend wurden auch hier alle Substanzen auf ihre jeweilige biologische Aktivität getestet. Die Testergebnisse werden in Kapitel 4.2.2 präsentiert und diskutiert.

3.5.5 Synthese von Variationen am Imidazolring

Nachdem Ring A und die Methylendioxystruktur variiert worden waren, sollte als weitere Abwandlung von Zephyrcandidin A Funktionalisierungen des Imidazolrings untersucht werden. Hierbei sind mehrere Möglichkeiten der Funktionalisierung denkbar. Wie von Zhang et al. ^[43] beschrieben, kann der Imidazolring mit NBS in DMF in sehr guten Ausbeuten regioselektiv an C-3 bromiert werden, um anschließend mittels Palladium-katalysierten Kreuzkupplungen weiter funktionalisiert zu werden.

Kim et al.^[111] beschreiben als weitere Option die Reaktion von α -halogenierten aliphatischen Aldehyden mit 6-Aminophenanthridinen zu 3-substituierten Imidazo[1,2-*f*]phenanthridinen.

nach Zhang et al.



nach Kim et al.

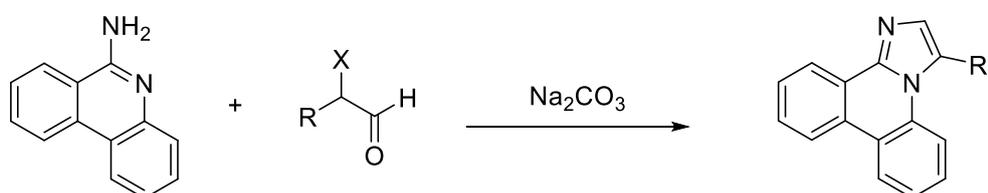


Abbildung 103: In der Literatur beschriebene Möglichkeiten zur Funktionalisierung der Imidazol-Partialstruktur an C-3 nach Zhang et al.^[43] (oben) und Kim et al.^[111] (unten)

Eine vergleichsweise neue, alternative Methode wurde im Jahr 2021 von Narva et al.^[54] publiziert. Nach diesem Protokoll sollte der Imidazolring des Zephycandidin A funktionalisiert werden. Darin wird die Synthese von 3-Aryl- oder 3-Alkylimidazo[1,2-*f*]phenanthridinen aus den entsprechenden 6-Aminophenanthridinen und Aldehyden unter Schwefelkatalyse beschrieben. Die Autoren postulieren hier eine oxidative Anellierung, wobei sie vermuten, dass DMSO nicht nur als Lösungsmittel sondern auch als Co-Oxidationsmittel fungiert, was aber mechanistisch nicht bewiesen werden konnte. Dieser postulierte Mechanismus beginnt mit der Kondensation des eingesetzten Aldehyds mit der Aminogruppe des 6-Aminophenanthridins (**213**) was im Enamin **214** resultiert. Ein elektrophiler Angriff von elementarem Schwefel an der Doppelbindung des Enamins **214** ergibt die Schwefelverbindung **215**. Durch nukleophilen Angriff des Phenanthridin-Stickstoffs kommt es zum Ringschluss unter Abspaltung der Polyschwefelverbindung und einem Hydrogensulfid-Anion. Deprotonierung von **216** und damit Aromatisierung liefert das 3-substituierte Imidazo[1,2-*f*]phenanthridin **217**.

Synthesen

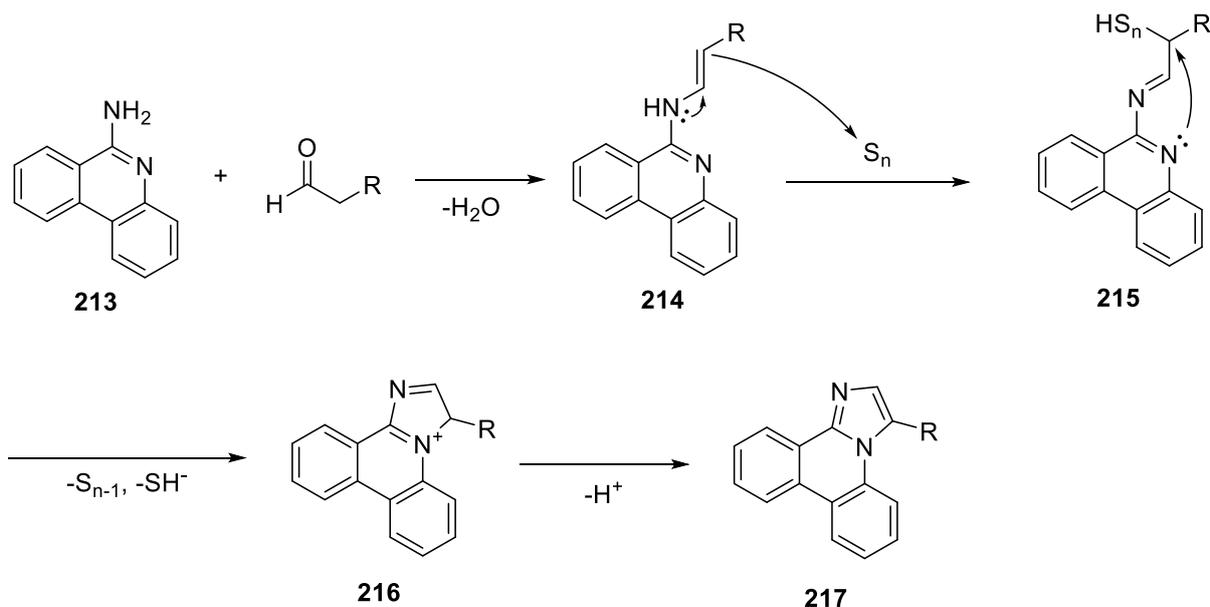


Abbildung 104: Postulierter Mechanismus der schwefelkatalysierten Synthese von 3-substituierten Imidazo[1,2-*f*]phenanthridinen nach Narva et al.^[54]

Diese Annahme wird durch die Arbeit von Tan et al.^[112] gestützt, die bei der schwefelkatalysierten Darstellung von Imidazo[1,2-*a*]pyridinen denselben Mechanismus postulieren.

Dem Protokoll von Narva et al.^[54] folgend konnte aus dem 6-Aminophenanthridin **68** und Propanal mit elementarem Schwefel in einem Gemisch aus Cyclohexan und DMSO, welches für 8 Stunden bei 120°C gerührt wurde, die Verbindung **218** in 53% Ausbeute hergestellt werden. Dieser Reaktion folgend konnten anschließend mit Phenylacetaldehyd und Isovaleraldehyd Phenyl- bzw. Isopropylreste am Imidazolring eingeführt werden. Für die Einführung unsubstituierter Alkylketten oder anderer thermisch stabiler Substituenten ist diese Reaktion aufgrund ihrer Einfachheit geeignet, auch wenn die Ausbeuten überschaubar sind. Zudem können als Edukte Aldehyde verwendet werden, die in der Regel günstig erwerbbar sind. Für sensiblere funktionelle Gruppen sollte jedoch auf eine der beiden eingangs erwähnten Methoden zurückgegriffen werden.

Synthesen

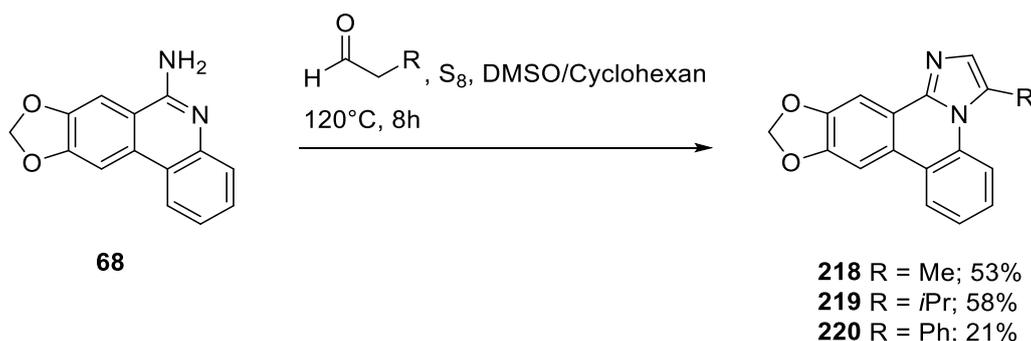


Abbildung 105: Darstellung von 3-Aryl- und 3-Alkylimidazo[1,2-*f*]phenanthridinen mittels schwefelkatalysiertem Ringschluss

Auch die Substanzen **218-220** wurden auf ihre jeweilige biologische Aktivität getestet. Die Ergebnisse werden im Kapitel 4.2.2 beschrieben und diskutiert.

Wie eingangs erwähnt, sollte auch das Zephycandidin A mittels yeast-three-hybrid Screening auf mögliche molekulare Targetstrukturen untersucht werden. Überraschenderweise ergaben die biologischen Testergebnisse unseres Kooperationspartners (Kapitel 4.2.2), dass Zephycandidin A keine cytotoxische Aktivität besitzt. Diese Ergebnisse stehen im deutlichen Widerspruch mit den von Zhan et al.^[30] publizierten Daten, was ebenfalls in Kapitel 4.2.2 diskutiert wird. Da Zephycandidin keine zytotoxische Aktivität besitzt, erübrigt sich die Suche nach molekularen Zielverbindungen mittels yeast-three-hybrid Screening.

3.6 Yeast three hybrid Screening

3.6.1 Allgemeine Methodik des yeast-three-hybrid Screenings

Im Rahmen einer Kooperation mit Prof. Dr. Simone Moser (Arbeitsgruppe Prof. Vollmar, LMU, jetzt Lehrstuhl für Pharmakognosie an der Leopold-Franzens-Universität Innsbruck) wurde an unseren Arbeitskreis eine Anfrage gestellt, für ein biologisches Testverfahren, ein yeast-three-hybrid Screening (Y3H), die benötigten „chemical tools“ zu synthetisieren.

Das Y3H-System, entwickelt von Licitra und Liu^[113], ist ein Verfahren zur Identifizierung von Interaktionen zwischen kleinen Molekülen und Proteinen und dient damit der Entdeckung von Zielproteinen (molekulare Targets) einer biologisch aktiven Substanz und damit auch zur Erklärung von möglichen Nebenwirkungen von etablierten Wirkstoffen^[114]. Gegenüber anderen etablierten Verfahren, die zur Targetidentifizierung genutzt werden – z.B. Photo-cross-linking^[115], *pull-down*-Assays^[116] oder Affinitätschromatographie und anschließende Massenspektrometrie^[117] – hat diese Methode den Vorteil, dass die Interaktionen in einem lebenden

Synthesen

Organismus, also *in vivo*, untersucht werden können. Dazu wird als Testorganismus meist die Bäcker- oder Bierhefe (*Saccharomyces cerevisiae*) verwendet. Die Technologie basiert hierbei auf der Rekonstruktion eines Transkriptionsfaktors, quasi ein Puzzle, das aus drei Teilen besteht. Das erste Teil des Transkriptionsfaktors setzt sich aus einer DNA-bindenden Domäne in Kombination mit einem Köder-Protein (im Englischen *bait* genannt) zusammen. Als zweites Puzzlestück findet sich eine DNA-aktivierende-Domäne wieder, welche mit je einem Vertreter aus einem Pool potentieller Bindungspartner oder cDNA-Bibliotheken, dem sogenannten Beuteprotein (im Englischen *prey* genannt) fusioniert ist. Das finale Puzzleteil ist eine chimäre Substanz, die zum einen Teil aus einem Molekül mit hoher Affinität zum Köder-Protein zum anderen aus der zu untersuchenden Verbindung besteht. Diese beiden Teile sind über einen Abstandshalter (*spacer*) miteinander verknüpft. Dieser besteht meist aus Oligoethylenglykol-Ketten, einer aliphatischen Kette oder einer Mischung aus beidem. Die Länge der Kette hat jedoch entscheidenden Einfluss auf das Ergebnis der Testung. Hat nun die zu untersuchende Verbindung eine hohe Affinität zu einem Beuteprotein, ist das Puzzle vollständig zusammengesetzt und das Reporter gen wird abgelesen^[14]. Daher wird dieses Puzzleteil auch *chemical inducer of dimerisation* (CID) genannt. Das Reporter gen codiert häufig für einen bestimmten Nährstoff, was den Hefezellen das Überleben auf Selektivplatten ermöglicht. Durch DNA-Sequenzierung der überlebenden Hefezellen auf den Selektivplatten kann anschließend bestimmt werden, mit welchen Beuteproteinen die zu untersuchende Verbindung interagiert hat. Durch Auswertung der Ergebnisse der Sequenzierung können anschließend Rückschlüsse gezogen werden, mit welchem Beuteprotein das untersuchte Molekül (**B** in Abbildung 106) interagiert hat. Als Köder-Protein wird häufig die Dihydrofolatreduktase (DHFR) verwendet, da die altbekannten Arzneistoffe Trimethoprim und Methotrexat eine hohe Affinität zu diesem Enzym aufweisen und sich somit auch aufgrund ihrer Verfügbarkeit als Edukte einer Synthese des CID eignen.

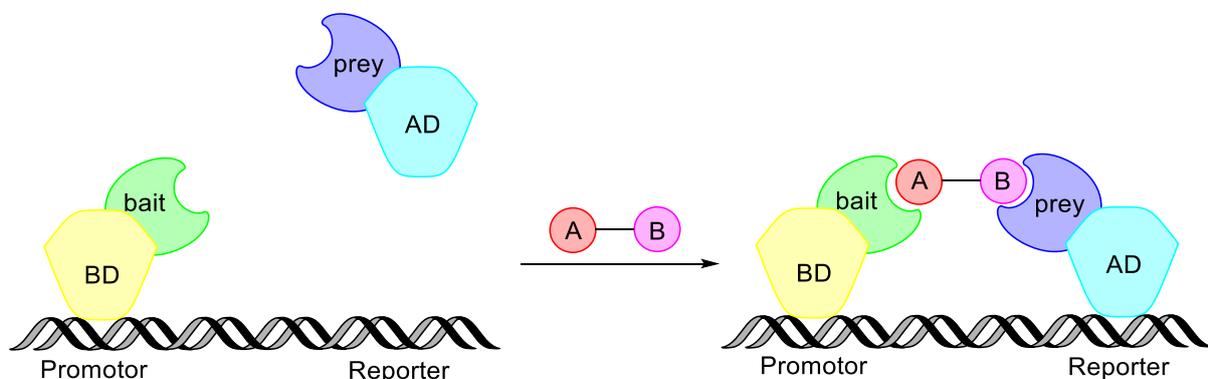


Abbildung 106: Graphische Darstellung des Yeast-three-hybrid Modells: Bindungsdomäne (BD) und bait-Protein (meist DHFR) binden an den Promotor, während die Aktivierungsdomäne (AD) mit dem prey-Protein fusioniert frei vorliegt. Durch Zugabe des chemical inducer of dimerisation (CID, bestehend aus A – mit hoher Affinität zum bait-Protein – einem Spacer bestehend aus Oligoethylenglykol-

Einheiten und B – der zu untersuchenden Verbindung) kommt bei prey-Proteinen mit hoher Affinität zu B die Aktivierungsdomäne (AD) in die Nähe des Reportergens, der Transkriptionsfaktor wird also rekonstruiert und das Reportergen wird abgelesen. Dies führt zur Produktion einer Aminosäure, die der Hefezelle das Überleben auf der jeweiligen Selektivplatte ermöglicht.

Einige wichtige Entdeckungen wurden seit der ersten Beschreibung des Y3H-Systems im Jahr 1996 mit dieser Methode gemacht. Becker et al.^[118] konnten beispielsweise neue Targets für Inhibitoren Cyclin-abhängiger Kinasen identifizieren. Moser und Johnsson konnten neue Targets für Wirkstoffe gegen Tuberkulose identifizieren^[119] und Chidley et al.^[120] entdeckten mit dieser Methode neue Targets für den Arzneistoff Sulfasalazin. Trotz der relativ einfachen Handhabung und des kostenarmen Setups bleibt die Methode seit der Entdeckung im Jahr 1996 eher eine Randerscheinung. Dies liegt vor allem an der „zeit- und kostenintensiven Synthese des CID“^[114]. Zudem müssen für ein Gelingen der Experimente Wissenschaftler intensiv interdisziplinär zusammenarbeiten, was verlässliche Kooperationspartner voraussetzt.

3.6.2 Syntheseplanung

Da für das Köder-Protein in diesem Modell die DHFR verwendet werden sollte, bot es sich an Trimethoprim (TMP) als Teil **A** des CID (vgl. Abbildung 106) zu verwenden, da TMP hohe Affinität zur DHFR aufweist. Daran anschließen sollte eine Linkerkette aus drei Ethylenglykol-Elementen, die in einem terminalen Azid enden sollte. Dies hat den Hintergrund, dass damit mittels click-Chemie die zu untersuchenden Verbindungen an das TMP-Linker-Konstrukt angehängt werden können, um das CID zu vervollständigen. Für diesen speziellen Reaktionstyp der 1,3-dipolaren Cycloaddition - heutzutage als click chemie, in älteren Publikationen noch als CuAAC (copper-katalysed azide-alkyne cycloaddition) bezeichnet – werden in der Regel ein Azid, ein Alkin und katalytische Mengen Kupfer benötigt. Aus diesen Edukten entsteht folglich ein 4,5-disubstituiertes 1,2,3-Triazol. Für hochreaktive Alkine, wie sie z.B. in cyclischen, hoch gespannten Systemen wie Cycloalkinen vorkommen, kann auf den Kupferkatalysator verzichtet werden. Da die click-Reaktion von den Kooperationspartnern eigenständig durchgeführt werden kann, sollte ich nur den Azid-funktionalisierten TMP-Linker als chemical tool synthetisieren, um die Testung zu ermöglichen.

Grundlegend für die Synthese war dazu das Protokoll von Liu et al.^[121]. Diese Autoren beschreiben die selektive Mono-Demethylierung von Trimethoprim (**221**) mittels Bromwasserstoffsäure zu **222** und anschließende Williamson-Ethersynthese mit Bromessigsäuremethyl-

ester, was in Verbindung **223** resultiert. Nach Verseifung des Esters entsteht die freie Carbonsäure **224**.

Mittels Steglich-Amidierung angelehnt an die Protokolle von Basak et al.^[122] und Long et al.^[123] kann die Carbonsäure **224** mit der kommerziell erwerblichen, Azid-substituierten Oligoethylenglykol-Verbindung **225** in einer Mischung aus EDC (1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid) und katalytischen Mengen 4-DMAP (4-(Dimethylamino)pyridin) in DMF zum TMP-Linker-Konstrukt **226** umgesetzt werden.

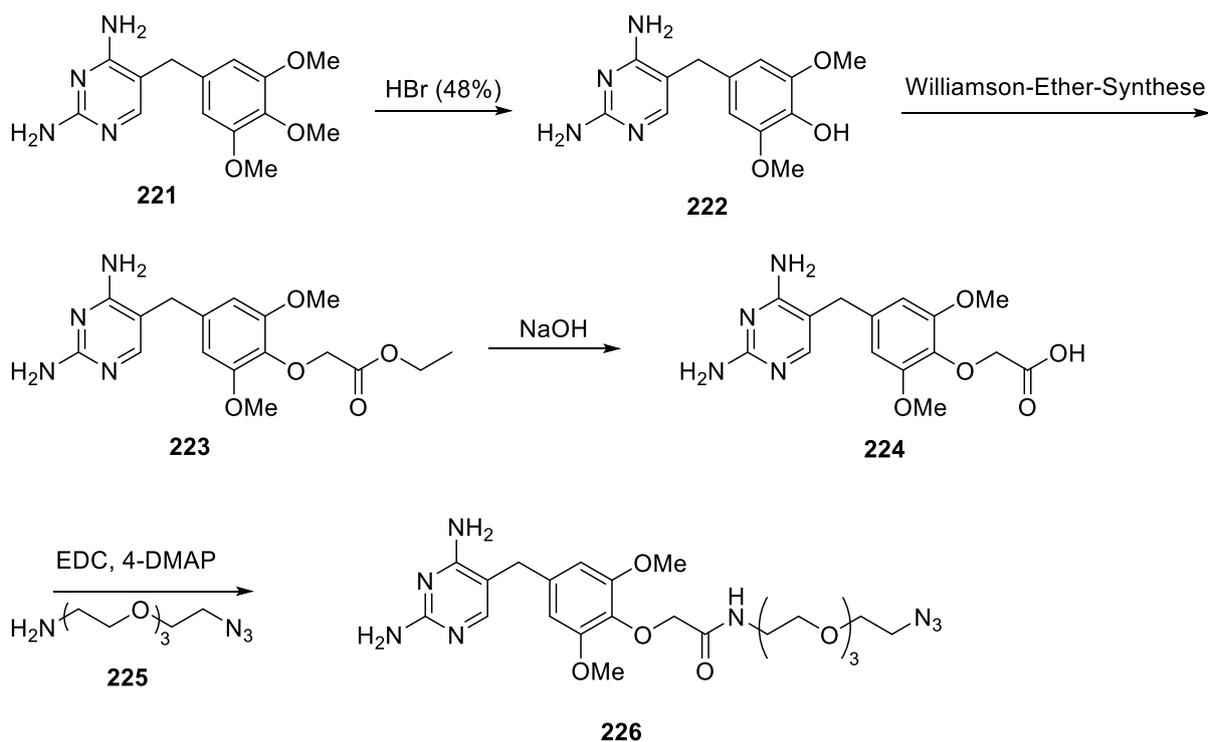


Abbildung 107: Geplante Synthese des TMP-Linker-Konstrukts (vgl. **A** Abbildung 106) des CID bestehend aus einfach demethyliertem Trimethoprim, das mit einem terminal Azid-substituierten Spacer verknüpft ist (**226**)

3.6.3 Synthese der Trimethoprimderivate

Zunächst wurde gemäß dem Protokoll von Liu et al.^[121] die Etherspaltung von Trimethoprim (TMP) zu **222** versucht. Der erste Versuch legte bereits nahe, dass die Reaktionsbedingungen, insbesondere die Reaktionszeit, eine äußerst sensible Variable darstellen. Hierbei wurde versucht mittels DC-Kontrollen den Demethylierungsgrad des TMP zu überwachen. Durch die Zeit, die die Chromatographie in Anspruch nahm (ca. 5 Minuten), konnte die Reaktion nur abschnittsweise beobachtet werden. Daraus wurde ersichtlich, dass nach 15 Minuten ledig-

lich ein Bruchteil des Eduktes einfach demethyliert vorlag, der Großteil des Edukts noch unverändert vorhanden war. Nach 25 Minuten hingegen war **222** nahezu nicht mehr im Reaktionsgemisch vorhanden, dafür konnten zwei- oder sogar dreifach demethylierte Spezies des TMP detektiert werden. Die Anwesenheit dieser Nebenprodukte lässt sich auch dadurch erkennen, dass sich das Reaktionsgemisch schnell dunkelbraun färbt, lässt man es zu lange reagieren. Ein weiteres Problem stellte die Aufreinigung der Substanz dar. Da das Produkt aufgrund seiner zahlreichen hydrophilen funktionellen Gruppen nicht mittels Säulenchromatographie isoliert werden konnte, beschreiben auch Liu et al. die Reinigung des Rohproduktes mittels Umkristallisation. Da eine Umkristallisation nur gelingen kann, wenn der Hauptinhaltsstoff des Rohproduktes das gewünschte Produkt ist, muss die Reaktion zuvor zum richtigen Zeitpunkt gestoppt werden, um die optimale Ausbeute zu erhalten. Nach 20 Minuten Reaktionszeit, die sich in den Vorversuchen als optimal gezeigt haben, wurde die noch heiße, leicht gelbliche Lösung mit 50%iger Natronlauge tropfenweise unter starkem Rühren versetzt, der daraus resultierende Niederschlag durch Filtration gewonnen und anschließend aus Wasser umkristallisiert, was zu einer reproduzierbaren Ausbeute von 61% führte.

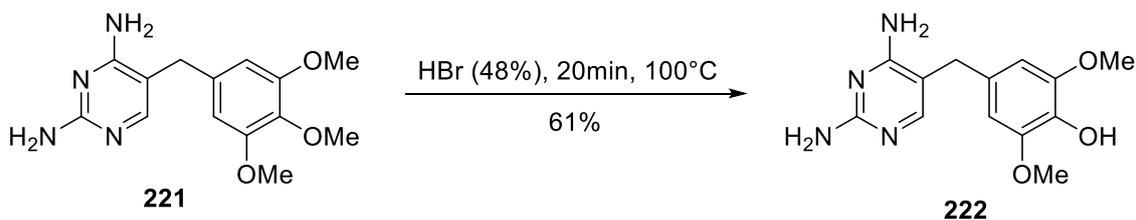


Abbildung 108: Selektive Mono-Demethylierung von Trimethoprim

Anschließend wurde die Williamson-Ether-Synthese nach dem Protokoll von Liu et al.^[121] versucht. Dazu wurde **222** in DMSO gelöst und Kalium-*tert*-butanolat zugegeben. Nachdem die Mischung 30 Minuten bei Raumtemperatur gerührt wurde, wurde Bromessigsäuremethylester zugegeben und bei Raumtemperatur weitergerührt. Nach 24 Stunden Reaktionszeit konnte jedoch keine Reaktion beobachtet werden. Auch nachdem das Gemisch 24 Stunden zum Rückfluss erhitzt wurde, konnte keine Reaktion beobachtet werden und **222** wurde quantitativ zurückgewonnen. Da die Vermutung nahelag, dass die beiden dem Phenol benachbarten Methoxygruppen eine Reaktion an dieser Position sterisch behindern würden, wurde die dem Ester vorgelagerte Alkylkette verlängert, um die voluminöse Estergruppe aus dem Einflussbereich der Methoxygruppen zu bewegen. Dieser Idee folgend wurde ein Protokoll von Li et al. verwendet^[124]. Dazu wurde **222** in DMF gelöst und mit Cäsiumcarbonat versetzt. Nachdem die Suspension 20 Minuten bei Raumtemperatur gerührt wurde, wurde 4-Brombuttersäureethylester zugegeben und die Mischung fünf Stunden bei 50°C gerührt. An-

Synthesen

schließende säulenchromatographische Aufreinigung des Rohproduktes lieferte den 4-Aryloxybuttersäureester **227** in 44% Ausbeute.

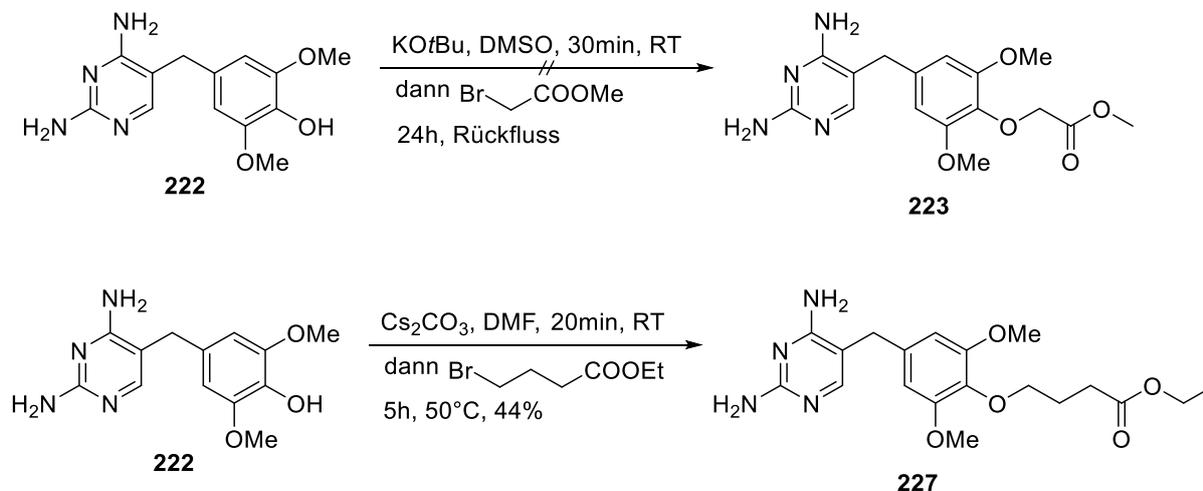


Abbildung 109: Gescheiterte Williamson-Ether Synthese mit Bromessigsäuremethylester (oben) und alternative Synthese mit längerer Alkylkette mit 4-Brombuttersäureethylester zu Verbindung **227**

Anschließende zweistündige Reaktion mit 2 M Natronlauge bei 45°C führten zur Verseifung des Ethylesters und somit zur Bildung der Carbonsäure **228**. Durch Neutralisieren der Reaktionslösung fällt **228** an dessen isoelektrischem Punkt (pH 6-7) als beiger Feststoff aus, der durch Filtration in 79% Ausbeute analysenrein gewonnen werden konnte.

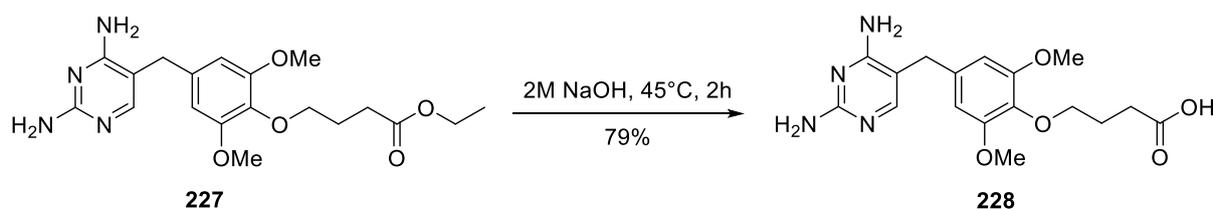


Abbildung 110: Alkalische Verseifung von **227** zur Carbonsäure **228**

Im Folgenden wurde wie geplant die Carbonsäure **228** mit dem kommerziell erwerblichen Triethylenglykol-Derivat **225** (mit einer primären Aminogruppe am einen und einer Azidgruppe am anderen Ende) in einer Steglich-Amidierung mit 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid (EDC) und 4-(Dimethylamino)pyridin (4-DMAP) zum gewünschten Produkt **229** umgesetzt. Basierend auf einem Protokoll von Long et al.^[123] wurde **228** in DMF gelöst und je 1,2 Äquivalente EDC und **225** zugegeben. Anschließend wurde eine katalytische Menge 4-DMAP zugegeben und die milchige Suspension 24 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Nachdem das Reaktionsgemisch zur Trockene eingengt wurde,

Synthesen

konnte **229** nach säulenchromatographischer Aufreinigung in 68% Ausbeute erhalten werden.

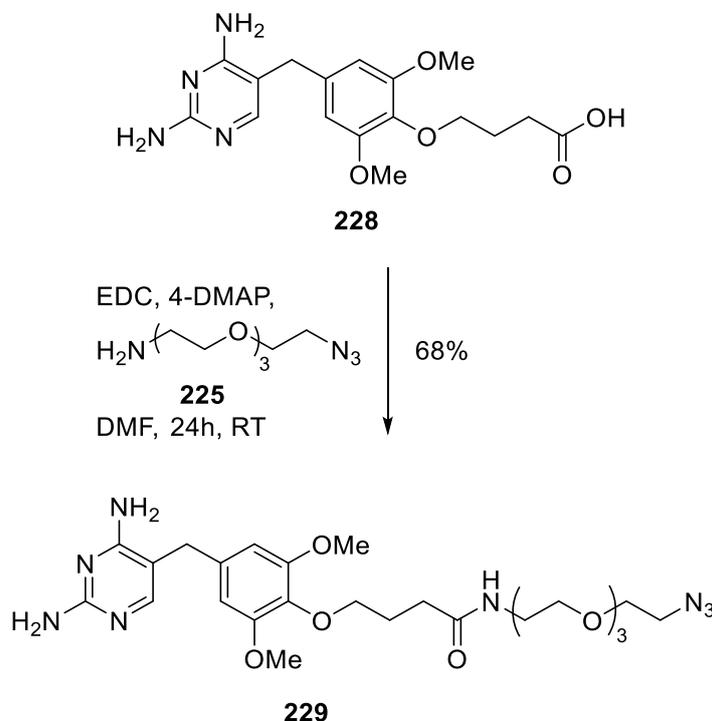


Abbildung 111: Synthese des für den Y3H-assay benötigten chemical tools **229** mit Trimethoprim als Teil des Moleküls mit hoher Affinität zum Bait-Protein (DHFR) und einer terminalen Azid-Funktion für eine click-Reaktion mit dem zu untersuchenden Molekül

Wie eingangs erwähnt, kann mithilfe dieses chemical tools das Molekül, das untersucht werden soll, mittels click-Chemie mit **229** verbunden und im Y3H-Screening getestet werden. Dazu benötigen die Verbindungen von Interesse jedoch eine Alkin-Gruppe, was nicht für jeden Wirkstoff von Interesse problemlos zu bewerkstelligen ist. Um eine weitere Möglichkeit der Derivatisierung zu ermöglichen, haben wir uns dazu entschieden, das Azid in **229** in einer Staudinger-Reduktion zum terminalen primären Amin zu reduzieren. So kann – beispielsweise durch Bildung einer Amidbindung – ein größerer Pool an Substanzen einfacher getestet werden. Dazu wurde nach einem Protokoll von Banala et al.^[119] **229** in einer Mischung aus Methanol und Wasser gelöst und Triphenylphosphin zugegeben. Nach 16 Stunden Reaktionszeit bei Raumtemperatur wurde das Methanol am Rotationsverdampfer entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch aufgereinigt, wobei das primäre Amin **230** in 63% Ausbeute gewonnen werden konnte.

Synthesen

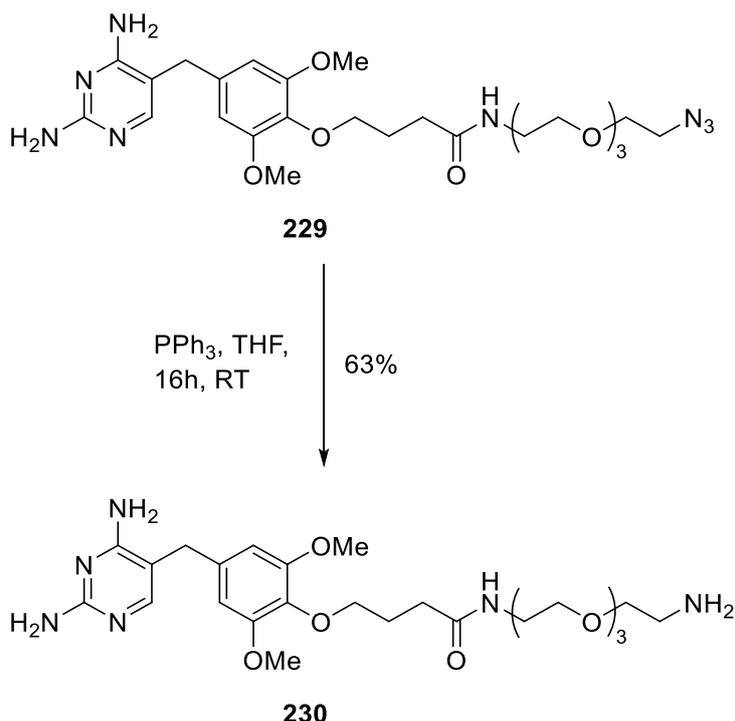


Abbildung 112: Reduktion des terminalen Azids **229** zum primären Amin **230** mittels Staudinger-Reaktion

Die beiden chemical tools **229** und **230** wurden an die Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Simone Moser übergeben und von ihren Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern weiter funktionalisiert. Die daraus synthetisierten CIDs wurden für die weitere Testung im Y3H-Screening verwendet. Erste Ergebnisse dieser Kooperation wurden im Journal Biological Chemistry veröffentlicht.

In diesem Artikel wird die Etablierung des Y3H-Testsystems im Hefe-Deletionsstamm ABC9 Δ durch Verwendung der von mir synthetisierten Verbindungen **229** und **230** beschrieben. Mit diesem etablierten System wurde Ethinylestradiol auf neue Proteinbindungspartner untersucht. Dabei wurde die Prokollagen-Lysin-2-Oxoglutarat-5-Dioxygenase 2 (PLOD2, Lysylhydroxylase oder LH2) als direktes Target von Ethinylestradiol entdeckt. Um die Gültigkeit des Treffers zu beweisen, erfolgte die Bestätigung mittels einer etablierten Methode zur Untersuchung von Wechselwirkungen zwischen Proteinen und kleineren Molekülen, der Affinitätschromatographie. Mein Beitrag zu dieser Publikation umfasste das Erarbeiten des Synthesekonzeptes sowie die Durchführung der oben beschriebenen Synthesen der Verbindung und die Auswertung der analytischen Daten. Auch das Verfassen des chemischen Teils der Publikation gehörte zu meinen Aufgaben.



Pengyu Wang, Thomas Klassmüller, Cornelia A. Karg, Maibritt Kretschmer, Stefan Zahler, Simone Braig, Franz Bracher, Angelika M. Vollmar and Simone Moser*

Using the yeast three-hybrid system for the identification of small molecule-protein interactions with the example of ethinylestradiol

<https://doi.org/10.1515/hzs-2021-0355>

Received August 27, 2021; accepted February 10, 2022;

published online February 28, 2022

Abstract: Since the first report on a yeast three-hybrid system, several approaches have successfully utilized different setups for discovering targets of small molecule drugs. Compared to broadly applied MS based target identification approaches, the yeast three-hybrid system represents a complementary method that allows for the straightforward identification of direct protein binders of selected small molecules. One major drawback of this system, however, is that the drug has to be taken up by the yeast cells in sufficient concentrations. Here, we report the establishment of a yeast three-hybrid screen in the deletion strain ABC9Δ, which is characterized by being highly permeable to small molecules. We used this system to screen for protein binding partners of ethinylestradiol, a widely used drug mainly for contraception and hormone replacement therapy. We identified procollagen-lysine 2-oxoglutarate 5-dioxygenase 2 (PLOD2 or lysyl hydroxylase, LH2) as a novel direct target and were able to confirm the interaction identified with the yeast three-hybrid system by a complementary method, affinity chromatography, to prove the validity of the hit. Furthermore, we provide evidence for an interaction between the drug and PLOD2 *in vitro* and *in cellulo*.

Keywords: ethinylestradiol; lysyl hydroxylase 2; target identification; yeast three-hybrid screen.

*Corresponding author: Simone Moser, Pharmaceutical Biology, Department of Pharmacy, Ludwig Maximilians University of Munich, Butenandtstr. 5-13, Building B, D-81377 Munich, Germany. E-mail: simone.moser@cup.uni-muenchen.de. <https://orcid.org/0000-0003-3415-3673>

Pengyu Wang, Cornelia A. Karg, Maibritt Kretschmer, Stefan Zahler, Simone Braig and Angelika M. Vollmar, Pharmaceutical Biology, Department of Pharmacy, Ludwig Maximilians University of Munich, Butenandtstr. 5-13, Building B, D-81377 Munich, Germany. <https://orcid.org/0000-0003-2230-2870> (P. Wang)

Thomas Klassmüller and Franz Bracher, Pharmaceutical Chemistry, Department of Pharmacy, Ludwig-Maximilians University of Munich, Butenandtstr. 7, Building C, D-81377 Munich, Germany

Introduction

Many fundamental processes in biology rely on small ligand-protein interactions which form the basis for pharmacological intervention of human diseases. Once the bioactivity of a compound has been critically evaluated, the challenge remains to identify its molecular target. In contrast to target-based identification of bioactive small molecules, in which large libraries of small molecules are typically screened against a selected (disease related) target, cell-based screenings of new biologically active small molecules are increasingly employed. Anti-tumoral compounds are very often discovered in phenotypic screens, looking at cytotoxicity or inhibition of proliferation. This ‘bottom-up’ strategy struggles with the bottleneck of target identification, which is often laborious and time-consuming (Schenone et al. 2013). Nevertheless, an increased understanding of tumor biology has enabled the development of molecularly targeted cancer drugs, many of which are based on a natural product scaffold. An example for a success story of a natural product in clinical use to treat cancer is paclitaxel (Taxol®), which is an inhibitor of microtubule disassembly (Band 1992). At the same time, albeit potent anti-tumor activities are observed, the molecular targets of numerous other small molecules often remain elusive, as do the molecular mechanisms that lead to the observed phenotype in cells. For developing small molecules as potential lead structures for novel therapeutics, knowledge of the identity of the target protein is crucial (Bunnage et al. 2015). Indeed, affected networks and downstream or upstream signaling pathways are often the missing link to completely understand the mechanisms leading to the activity of a small molecule and to explain the cellular effects observed upon small molecule treatment.

Although various approaches for target identification have proven successful, the combination of complementary approaches is required for success in many cases. Current approaches for target identification rely on genetic mutant screens (Han and Nijhawan 2019) or chemical proteomics based on mass spectrometry. Chemical

proteomic approaches have proven very powerful methods by employing small molecule probes to fish for protein targets. Among these approaches, affinity chromatography is probably the most widely used; other recently described chemical proteomics methods include drug affinity responsive target stability (DARTS) (Lomnick et al. 2011) or activity based protein profiling (ABPP) (Chen et al. 2017).

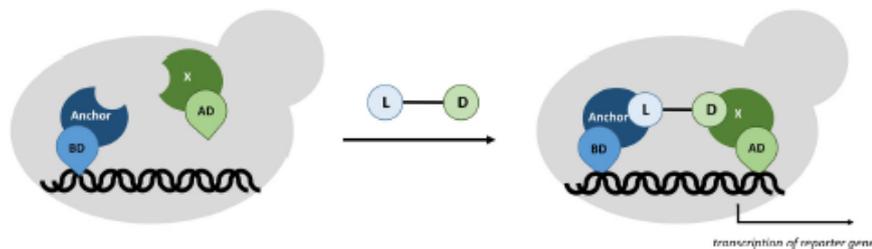
Affinity chromatography represents an un-biased method that allows for identification of a direct binding partner of small molecules (Rix and Superti-Furga 2008). To select for binding partners of a small molecule with this approach, the compound needs to be immobilized onto a solid support. Whole cell lysates are then applied to the surface exposing the small molecule. Non-binding proteins are removed by a washing step and proteins with an affinity to the small molecule are retained. After elution, the potential binding partners are resolved by SDS-PAGE and analysed using state-of-the-art mass spectrometry and statistical analysis. In contrast to high-throughput screening efforts, which often only focus on selected subproteomes such as kinases, the compound of interest is exposed to the entire variety of cellular proteins including all naturally occurring posttranslational modifications and activation states. The shortcomings of this approach are mainly that transient interactions are missed out, and that the method selects for high abundance proteins, whereas proteins that are only expressed at low levels are easily missed.

Conceptually, the yeast three-hybrid system (Y3H) is similar to affinity based target identification. Both approaches share the disadvantage that they require the derivatization of the active molecule. Compared to affinity based target identification, however, the Y3H system offers several advantages, such as its application in living cells; furthermore, the Y3H system is based on cDNA libraries, hence allows for the identification of proteins underrepresented in cell lysates used for affinity chromatography

due to low expression levels; furthermore, no high end mass spectrometer or other costly device is necessary; the identity of the protein of interest can be obtained by standard DNA sequencing, for which ample service providers are available at very low costs.

The Y3H system builds on the yeast-2-hybrid (Y2H) system, which is used to screen for protein-protein interactions of a selected organism in baker's yeast (Fields and Song 1989). In this system, a protein of interest, the 'bait' is expressed as fusion protein to the DNA binding domain of a split transcription factor, whereas a pool of potential binding partners or cDNA libraries ('preys') are expressed as fusion proteins of the activation domain. Only if an interaction takes place, is the transcription of a reporter gene activated, leading to survival of the yeast cells on selective plates (Brückner et al. 2009). In the Y3H system, a small molecule-ligand hybrid is added to the Y2H setup (Scheme 1) (Licitra and Liu 1996). The small molecule of interest is chemically coupled to an anchor molecule, which can be a small molecule substrate with high affinity to the enzyme it inhibits, such as the methotrexate-dihydrofolate reductase interaction pair (Becker et al. 2004; Henthorn et al. 2002), which has been used to screen for kinase inhibitors, or the substrate of a protein tag such as SNAP tag (Chidley et al. 2011). The SNAP tag Y3H system has successfully been applied to clinically approved drugs against human cDNA libraries, yielding not only the confirmation of 16 previously identified tyrosine kinases but also a previously unknown non-kinase hit in the case of the tyrosine kinase inhibitor dasatinib. Similarly, screening of atorvastatin against cDNA libraries has revealed a number of novel targets. Moreover, the Y3H system has proven useful in the screening of protein targets of anti-*Mycobacterium tuberculosis* drugs (Moser and Johansson 2013).

The advantage of the Y3H screening over conventional target fishing methods (like affinity chromatography or whole cell screenings) is that the identity of the target



Scheme 1: Setup of a yeast three-hybrid system.

A small molecule (D) is coupled to a linker (L) that allows for binding to an anchor protein coupled with the DNA binding domain of a split transcription factor (BD). In this setup, the small molecule is screened against a library of potential binding partners (X) fused to the activation domain of the same transcription factor (AD). Transcription of a reporter gene and thus survival of the yeast cell on selective plates only occurs upon interaction of the small molecule (D) with a protein (X).

protein is readily revealed by isolating the plasmid DNA from the hit yeast colony followed by sequencing. This fact also facilitates the confirmation of the hits, since the gene encoding for the potential protein binding partner can be directly cloned from the Y3H vector into a vector for protein expression. One disadvantage of using this system is a high false positive rate; one way to identify false positives is to verify that growth of the yeast depends on the presence of the small molecule probe. Depending on the nature of the identified interaction, complementary assays can be performed to confirm the interaction and analyze downstream effects.

In this study, we set up and tested a Y3H platform for its suitability to identify protein binders of small molecule drugs. For a proof-of-concept screening, we exemplarily chose ethinylestradiol (EE) as small molecule candidate, with the rationale that it features an ethynyl moiety that allows for a simple modification of the molecule.

Estrogens are widely used in combined oral contraceptives (COCs). As a member of the estrogens family, EE was first applied in COCs because it was confirmed to have better oral bioavailability (38–48%) than other estrogens (Kuhl 2005) while exerting the same functions: it regulates vaginal bleeding, replaces lost estradiol after suppression of ovarian function, and also reduces the amount of progesterin which is necessary to inhibit ovulation effectively (Kluft et al. 2017). Activities of estrogens are mainly mediated via estrogen receptor (ER) α , a nuclear hormone receptor that is responsible for endogenous estrogen associated regulation and signaling (Brzozowski et al. 1997). EE

binds with high affinity to ER α , and modifying the molecule via 'click' chemistry at its ethynyl functional group does not hinder binding to the receptor (Tang et al. 2018).

Results

In order to be able to perform un-biased target identification screens we established a Y3H system; as an anchor, we used the trimethoprim-DHFR interaction, which has already been validated before (Gallagher et al. 2007). The interaction of purvalanol B with the kinase CDK5 was selected as positive control, since this interaction pair has already been validated in a Y3H setup (Wegner et al. 2015). We therefore synthesized a purvalanol B derivative linked to trimethoprim via a PEG (polyethyleneglycol) linker using newly designed (see the Supplementary Material) trimethoprim-PEG-amine (Figure 1).

Dhfr (*E. coli*) and *cdk5* (human) genes were cloned into the Y2H bait and prey vectors, respectively, from the Matchmaker Gold Y2H system (Takara Bio) and transformed into the modified yeast reporter strain ABC9 Δ , which was obtained from the A*STAR institute in Singapore. This strain has nine efflux pump deletions, and has been proven to possess superior properties for yeast based screenings, since it has a higher permeability for small molecules, which is a major challenge of the yeast based system (Wong et al. 2017). The yeast was then spotted on unselective plates (-LW), and on selective plates (-LWH) with or without the purvalanol B probe. The spot

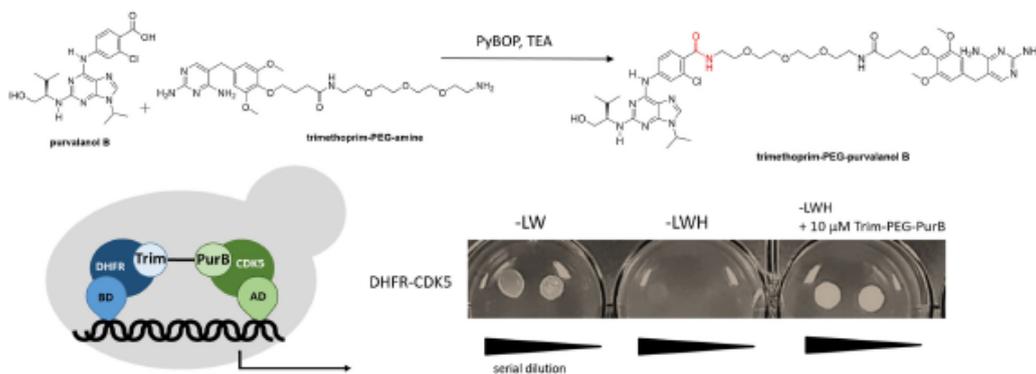


Figure 1: Establishing the Y3H system based on a dihydrofolate synthase (DHFR) anchor that binds tightly to the drug trimethoprim (Trim). For proof of principle, the known interaction of cyclin dependent kinase 5 (CDK5) with the CDK5 inhibitor purvalanol B (PurB) was tested in the system. For synthesis of the Y3H probe, PurB was coupled to amino-functionalized trimethoprim via a PEG linker (see Supplementary Material). The yeast reporter strain expressing CDK5 fused to the activation domain, and DHFR fused to the DNA binding domain was grown on medium selecting for the two plasmids (-LW) and plates selecting for the interaction (-LWH) in the presence and absence of the trimethoprim-PEG-purvalanol B probe.

test showed that the yeast grew well on selective plates only in the presence of the probe (Figure 1).

Having confirmed that our Y3H can indeed detect small molecule-protein interactions, we next wanted to employ this system for the identification of protein binding partners of small molecules out of a pool of proteins. Therefore, we used conventional cDNA libraries for Y2H screens, which are commercially available. We used an electroporation protocol (Benatuil et al. 2010) to transform the ABC9Δ strain containing the DHFR bait plasmid with a mammary gland and pancreas cDNA library, respectively. The viability of the transformed yeast strains was determined by cfu plating and was found to be larger than 10^9 cfu/ml for both libraries (see Supplementary Material).

A clickable trimethoprim probe with a PEG linker and an azide moiety was synthesized as described in the Supplementary Material. In brief, the 4''-hydroxy analogue (TMP-OH) of trimethoprim was connected with a butyrate spacer (Li et al. 2018), which in turn was amidated with 11-azido-3,6,9-trioxundecan-1-amine. The trimethoprim-PEG-azide was coupled to EE via a copper-catalyzed alkyne-azide 'click' reaction generating a triazole unit at C-17 of EE (see Figure 2) and the Y3H screen was then performed similar to previously described procedures (Chidley et al. 2011; Moser and Johnsson 2013). In brief, yeast library stocks were spread onto selective plates (-LWH containing 2.5 mM 3-aminotriazole [3-AT]) containing 10 μM trimethoprim-PEG-EE. 3-AT is an inhibitor of the *his3* reporter gene product, and addition of 3-AT was found to lead to a lower false positive rate. More than 5×10^7 yeast cells were used per plate to ensure a larger than 10 fold of library coverage (complexity of the library indicated as

3×10^6 by the manufacturer). One 15 cm diameter plate was used per screen and library. The plates were incubated for 10 days at 30 °C; after this time, colonies were picked and subjected to growth dependence tests by spotting them on selective plates, and plates with and without the EE probe, which allows for the elimination of further false positives. Only colonies that grew on plates containing the drug conjugate, but showed no growth on plates without the drug conjugate, were classified as hits and analyzed further (Figure 2). From the mammary gland library, 18 hits were obtained, while the pancreas library yielded 12 colonies classified as hits.

Colony PCR of all hits was performed (see Supplementary Material). Sequencing analyses of all cDNA inserts led to the exclusion of further false positives, due to the obtained sequence being either out of frame with the GAL4 AD, or due to the fragment not being part of a coding sequence. Eventually, the screening of the pancreas library yielded no real hit, while one confirmed hit was obtained from the mammary gland library screen. This hit was identified twice and encoded for the last 81 amino acids of procollagen-lysine 2-oxoglutarate 5-dioxygenase 2 (PLOD2, alternative name lysyl hydroxylase 2 [LH2]). A high false-positive rate is inherent to yeast based screenings, since many proteins can activate the reporter without an interacting partner (Shivhare et al. 2021). In contrast to the Y2H screen, in the Y3H system false positives can be eliminated in one simple spotting step as performed in this study, which only selects yeast colonies that grow depending on the presence of the probe, thereby eliminating auto-activators.

In order to validate PLOD2 as hit and interaction partner of EE, we performed affinity chromatography using a biotin-

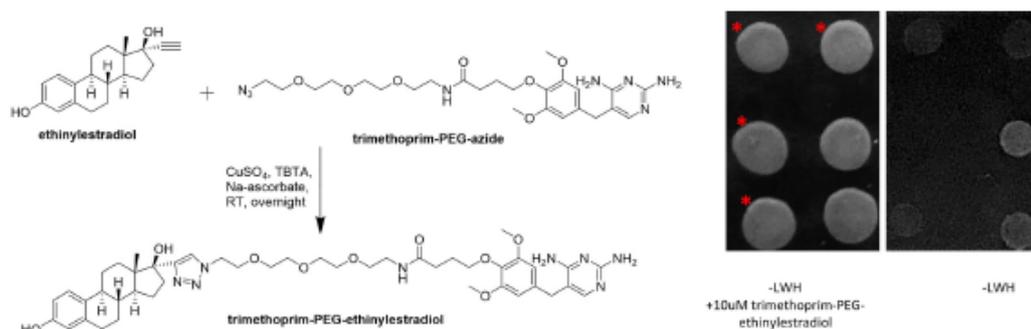


Figure 2: Using the Y3H system to screen for binding partners of EE.

First, a trimethoprim-PEG-EE probe was synthesized to allow for DHFR anchoring in the Y3H setup, and then screened against two different human cDNA libraries in the Y3H setup. Colonies were picked and subjected to a growth dependence test in the presence and absence of the probe to eliminate false positives (right panel). Only colonies that showed growth on the plates containing the probe but no growth on the plate without the probe, were classified as 'hits' (marked with a red asterisk*).

PEG-EE probe (see Supplementary Material). The probe allowed for the immobilization of EE on streptavidin beads. The beads were then incubated with human recombinant PLOD2, or whole cell lysates of yeast overexpressing the identified PLOD2 fragment as GAL4 AD fusion (see the Materials and methods section and Supplementary Material). As a negative control, a modified biotin carrying the same linker as the EE probe was immobilized on the streptavidin beads. After washing, bound proteins were eluted with SDS and heat, and analyzed by SDS-PAGE and Western Blotting using a PLOD2 antibody for staining, or a GAL4 antibody for the detection of the GAL4 AD fusion protein from the Y3H vector. Indeed, the Western Blot revealed that the PLOD2 fragment identified in our Y3H screen can be enriched on EE modified beads, although only a faint band was observed, while no band was detected in the eluate from the beads modified with pegylated biotin as negative control (see the Supplementary Material). Having confirmed the interaction between EE and the 81 aa fragment of PLOD2 identified in the Y3H screen, we performed the same experiment using human recombinant PLOD2, showing that also the whole protein can be enriched with the EE probe in a pull-down setup (Figure 3A), yielding a more intense band compared to the fragment.

PLOD2 is involved in collagen cross-linking by hydroxylating lysyl residues in telopeptides of fibrillary

collagens. In the course of this reaction, succinate is created that in turn can be detected in a luminescence based *in vitro* assay and allows for monitoring of PLOD2 activity. Using the assay developed by Devkota et al. (2019), the influence of EE on PLOD2 activity was determined. Indeed, using human recombinant PLOD2, a decrease in the formation of succinate was observed upon treatment with EE (Figure 3B).

PLOD2 catalyzes the hydroxylation of lysine residues in the telopeptides of fibrillar collagens, which leads to the formation of stable collagen cross-links. A recent study also showed that PLOD2 can be secreted by tumor cells and modify collagen in the extracellular space (Chen et al. 2016). To further investigate the effect of EE on PLOD2, we conducted a collagen I staining to see whether EE treatment can alter extracellular collagen fibers. As a known inhibitor of PLOD2 expression, minoxidil (Xu et al. 2017) was also included as a positive control. From the confocal microscopy images (Figure 4A), we can see that without treatment, cells actively remodel the collagen fibers creating a cage-like structure around themselves. The addition of EE and the control substance minoxidil, however, significantly impaired matrix remodeling. At a higher concentration of EE or minoxidil, the cells appear to interact less with the underlying collagen, so that a cage around the cells can no longer be observed.

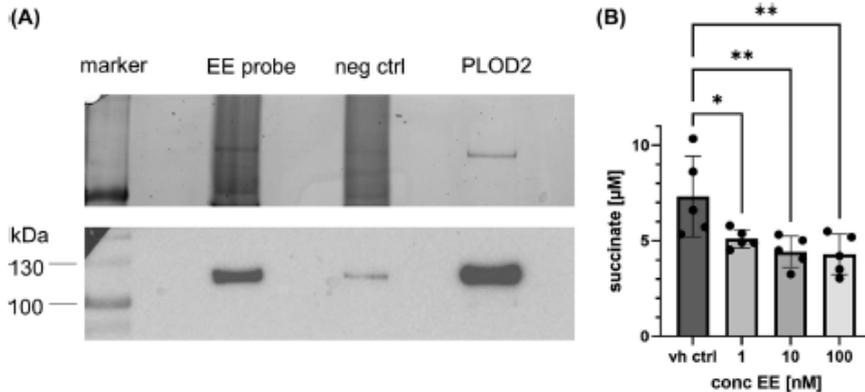


Figure 3: Validation of the EE-PLOD2 interaction pair using commercially available human recombinant PLOD2 (whole protein). (A) Affinity chromatography. A biotin-PEG-EE probe was immobilized on streptavidin beads. Next, 200 ng of human recombinant PLOD2 were added. After incubation and washing, bound proteins were eluted and analyzed by SDS-PAGE. A Western Blot using a PLOD2 antibody revealed an enrichment for the eluate from the EE modified solid phase compared to beads modified with pegylated biotin as negative control. Top panel: SDS-PAGE loading control. Lower panel: Exemplary photo of a Western Blot (Western Blots of all three replicates can be found in the Supplementary Material). (B) PLOD2 activity assay. An activity assay was performed that measures the succinate formed by PLOD2 in a bioluminescence based assay (Devkota et al. 2019). An impairment of PLOD2 activity is observed upon addition of EE in comparison to a vehicle control (vh ctrl). $n = 5$, error bars represent standard deviations. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

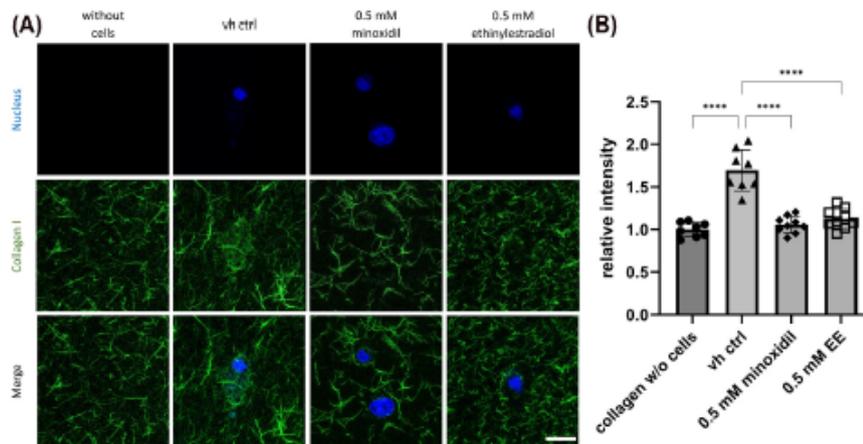


Figure 4: EE inhibits collagen remodeling.

HeLa cells were seeded onto FITC labeled collagen I (2 mg/ml) and treated with either EE, minoxidil (an inhibitor of PLOD2 expression; Xu et al. 2017) as positive control, or a DMSO vehicle control (vh ctrl). (A) Images taken 24 h after cell seeding are shown with the nuclei in blue (live cell Hoechst staining) and the collagen fibers in green (scale bar 25 μm). (B) Evaluation of collagen fluorescence intensity shows that treatment with EE or the positive control minoxidil leads to reduced density of collagen fibers in close proximity of the cells, indicating a potential effect of EE on PLOD2 in comparison to a vehicle control. Error bars represent standard deviations (vh ctrl, **** $p < 0.0001$).

Discussion

The identification of protein targets of a small molecule drug is crucial for its further development. Not only downstream mode of action studies, also medicinal chemistry approaches are facilitated in case an interaction partner is known. Among the many approaches to fish for targets of small molecules, the Y3H system has not found a broad application, despite its technical simplicity. Here, we report the setup of a Y3H platform for target identification using an already validated drug-protein interaction pair as anchor. The interaction between trimethoprim and DHFR is known to be strong; *E. coli* DHFR has a K_i of 0.17 nM for inhibition by trimethoprim (Cammarata et al. 2017), rendering this pair ideal for a Y3H setup. In order to facilitate drug uptake, we used the recently published *Saccharomyces cerevisiae* ABC9Δ strain featuring 9 efflux pump deletions (Wong et al. 2017) as a reporter strain. Indeed, using a trimethoprim-purvalanol B chemical inducer of dimerization and CDK5 as prey completing the setup of two known interaction pairs, the yeast grew only on selective plates containing the purvalanol B probe, validating our approach in living yeast cells.

We then introduced two commercially available cDNA libraries intended for Y2H studies, a mammary gland and pancreas cDNA library, respectively, into the reporter strain containing the DHFR bait plasmid. Performing a Y3H

screen with EE (linked to trimethoprim) as a candidate drug yielded several colonies that passed the growth dependence test; after sequencing, however, none of the inserts from the pancreas library screening turned out to be real positive hits. Nevertheless, from the mammary gland library screening, two colonies among those classified as hits both carried a library plasmid with an insert encoding for an 81 amino acid sequence in the coding sequence of PLOD2. PLOD2 is a 737 amino acid protein, whereby the first 25 amino acids are part of a signal peptide (<https://www.uniprot.org/uniprot/O00469>). The 81 amino acid sequence identified in our screen covers a region towards the C-terminus of the protein, and contains the metal binding domain as well as the active site of PLOD2. Whether the identified fragment is correctly folded is not clear. Since this fragment was identified in the screen looking for binding partners of EE, we assume that it is at least folded correctly to a degree which allows for the binding to take place. This is underlined by the pull-down experiments, in which a stronger band is obtained when using whole recombinant PLOD2 compared to the fragment identified in the screen (Figure 3A and Supplementary Material). PLOD2 has received increased attention recently, since it has been found to aid tumor metastasis by increasing the stiffness of the collagen matrix (Chen et al. 2015, 2016). For a first confirmation of PLOD2 as a binding partner of EE, a complementary affinity chromatography

approach was employed. Using immobilized EE, the PLOD2 fragment identified in the Y3H screen could be pulled down from yeast cell lysates overexpressing the fragment (see Supplementary Material, Figure 2). Since the cDNA insert from the Y3H screen did not cover the entire coding sequence, we wanted to validate the interaction between EE and PLOD2 using human recombinant PLOD2. Therefore, we repeated the pull-down experiment using the commercially available whole PLOD2 and a PLOD2 antibody for Western Blot analysis. Compared to the negative control (pegylated biotin), a clear enrichment was observed when PLOD2 was washed over beads with immobilized EE (Figure 3), which confirmed the validity of the interaction identified in the Y3H screen. Since the fragment identified in the Y3H screen contains the catalytic site of PLOD2, we assessed the effect of EE on PLOD2 activity. PLOD2 catalyzes the formation of hydroxyl-lysine residues in collagens, a reaction in which succinate is formed. By performing a bioluminescence based PLOD2 activity assay that is based on Promega's Succinate-Glo™ Assay (Devkota et al. 2019), the formation of succinate can be monitored. Using this assay and commercially available whole PLOD2, addition of EE led to a decreased formation of succinate, suggesting an impairment of PLOD2 activity by EE (Figure 3). To further underline our results, we have assessed PLOD2 expression levels using a PLOD2 antibody and have found that both, minoxidil and EE, led to a decrease of PLOD2 expression levels (see Supplementary Material).

PLOD2 is secreted by tumor cells and modifies collagen in the extracellular space (Chen et al. 2016). The decrease of collagen intensity around the cells indicates that the extracellular collagen crosslinking is impaired upon treatment with EE (Figure 4).

Albeit yielding a previously unknown binding partner of EE, interestingly, ER α , the classical target of EE, has not been identified in the Y3H screen. This fact could be due to the size of the receptor which probably has excluded it in the process of library construction, which is limited to cDNA of a smaller size range. Another possible explanation could be that – in case the receptor or parts of it are included in the library – increasing the number of plates used for screening might lead to the identification of ER α in the screen. Nevertheless, using the Y3H screen allowed for the identification of a hitherto unknown protein binding partner of the widely used contraceptive EE. The implications of the interaction between PLOD2 by EE as identified in a biological context, especially in cancer biology, is the subject of future studies.

Despite its simplicity, the Y3H has the drawback that a small molecule of interest has to be derivatized by chemical

synthesis, and that this probe has then to be taken up by the yeast cells in sufficient concentration. Here, we report the establishment of a yeast-3-hybrid screen in the efflux pump deletion strain ABC9 Δ , which has been proven previously to enable a more efficient drug uptake into the yeast cell (Wong et al. 2017). In this study, we confirmed the validity of our Y3H setup by testing the known interaction pair purvalanol B-CDK5, and by performing a proof-of-principle screen, we revealed a previously un-identified binding partner of EE, which we confirmed by conventional affinity chromatography. Hence, our Y3H is now ready to be applied for target ID screens and represents a complementary, simple, and straightforward approach for the identification of direct targets of small molecule drugs.

Materials and methods

Chemicals and materials

HPLC grade methanol (MeOH), HPLC grade acetonitrile (ACN), dichloromethane (DCM), dimethylsulfoxide (DMSO), hydrochloric acid (HCl), acetic acid (AcOH), sodium hydroxide (NaOH), and silica gel 60 were obtained from VWR (Ismaning, Germany) and ultra-pure water (18 M Ω -cm⁻¹) from a Millipore S.A.S. Milli-Q Academic system (Molsheim, France). Ammonium acetate (NH₄AcO), bovine serum albumin (BSA), calcium chloride (CaCl₂), sorbitol, d₆-DMSO, and ethylene glycol-bis(2-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid (EGTA) were purchased from Merck KGaA (Ismaning, Germany). SepPak Plus C18 cartridges were obtained from Waters Associates (Milford, USA). Magnesium chloride (MgCl₂) and glycerol were purchased from AppliChem (Darmstadt, Germany). TBTA, Agar-Agar, ampicillin, α -ketoglutaric acid, potassium chloride (KCl), Roti[®]-Quant (5 \times concentrate) Bradford solution and sodium dodecyl sulfate (SDS) were purchased from Carl Roth (Karlsruhe, Germany). Purvalanol B from Cayman chemicals was purchased from biomol (Hamburg, Germany). Streptavidin beads, [IKG], peptide, Collagen Type I, Page Ruler™ Plus Prestained Protein Ladder and Abnova™ PLOD2 (Human) Recombinant Protein were obtained from Thermo Fisher Scientific (Schwerte, Germany). Anti-GAL4 AD antibody and Anti-PLOD2/LH2 antibody were purchased from Abcam (Berlin, Germany). Lithium acetate was purchased from BioScience GmbH (Dümmer, Germany). 50% PEG was purchased from Takara Bio. Dithiothreitol (DTT) was purchased from SERVA Electrophoresis (Heidelberg, Germany). The Succinate-Glo™ JmJc Demethylase/Hydroxylase Assay Kit was purchased from Promega GmbH (Walldorf, Germany). Ethinylestradiol, minoxidil, Collagen Type I-FITC Conjugate, biotin-PEG₂-N₃, copper(II) sulfate pentahydrate (CuSO₄ \times 5H₂O), yeast nitrogen base, yeast synthetic drop-out medium supplements, adenine, tryptophan, benzotriazol-1-ylotripropylidiphosphonium hexafluorophosphate (PyBOP), triethylamine, glass beads, imidazole, β -mercaptoethanol, potassium phosphate dibasic (K₂HPO₄), potassium phosphate monobasic (KH₂PO₄), magnesium sulfate (MgSO₄), phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), Tris-HCl, pyridine, HEPES, EDTA-2Na, sodium chloride (NaCl), ferrous chloride (FeCl₂), Nonidet P-40, sodium

deoxycholate, sodium ascorbate, ascorbic acid and Triton-X 100 were purchased from Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Germany). Goat anti-Rabbit IgG secondary antibody was purchased from Dianova (Hamburg, Germany). Anti-Mouse IgGk light chain BP secondary antibody was purchased from Santa Cruz Biotechnology (Heidelberg, Germany).

Chromatography

- (i) Analytical HPLC: Agilent 1260 Infinity II LC system with a 1260 Infinity Degasser, a 1260 Series quaternary pump and 1260 Series diode array detector; Merck LiChrospher® 100 RP-18 (5 µm) LiChroCART® 125-4, protected by a Merck LiChrospher® 100 RP-18 (5 µm) LiChroCART® 4-4 i.d. pre-column; injection volume: 100 µl (unless stated otherwise). Solvent system: mobile phase A = NH₄AcO buffer 10 mM pH 7, B = ACN, flow 0.5 ml/min; Solvent composition: 0–2 min 5% B, 2–17 min 5–100% B, 17–20 min 100% B, 20–22 min 100–5% B. Data were processed with OpenLab CDS Data Analysis 2.3.
- (ii) Semi-preparative HPLC: Büchi Pure C-830 with prep HPLC pump 300 bar, fraction collector, and prep sample injection valve. Gynkotec LC-System with manual sampler, M480 pump, Phenomenex DG-301 online degasser, Gynkotec UVD 640 diode array detector and a Rheodyne injection valve with 5 ml loop. Column: Supelco Ascentis® C18, 5 µm, 15 cm × 10 mm, with a Phenomenex pre-column ODS 9 × 16 mm; mobile phase A = NH₄AcO buffer 10 mM pH 7, B = ACN, flow 2.5 ml/min; solvent composition: 0–2 min 12% B, 2–12 min 12–20% B, 12–30 min 20–80% B, 30–40 min 80–100% B. Data were processed with Gynkosoftware 5.50 or Büchi Pure software 1.5.

Spectroscopy

HR-MS were measured at the MS facility of the Department of Chemistry, University of Munich. Data were processed using Xcalibur. NMR spectra were recorded on an Avance III HD 500 MHz NMR spectrometer from Bruker BioSpin equipped with a CryoProbe™ Prodigy broadband probe holder. NMR data were analyzed with Mestre Nova.

Spot test with trimethoprim-PEG-purvalanol B

The *S. cerevisiae* reporter strain ABC9A was transformed with bait and prey plasmid in two steps. In the first step, the bait plasmid was introduced into the yeast using the quick and easy protocol from Gietz and Schiestl (2007b). The transformation mix was spread on 10 mm plates containing complete minimal medium minus tryptophan (-W). In a second step, the yeast containing the bait plasmid were transformed using the high efficiency transformation protocol from Gietz and Schiestl (2007a). Selection of transformants was carried out on plates containing complete minimal medium minus leucine tryptophan (-LW).

One colony of each transformation was restreaked on a -LW plate to ensure robust growth. The yeast was then picked from the plate, and suspended in 1× TE in three dilutions. A 2 µl portion of each dilution was spotted on -LW plates as growth control, and on plates containing complete minimal medium minus leucine tryptophan histidine (-LWH) and on -LWH plates containing 10 µM trimethoprim-PEG-purvalanol B

(in DMSO). The plates were incubated at 30 °C and pictures were taken after 4 days.

Preparation of the Y3H reporter strains containing cDNA libraries

The mammary gland and pancreas cDNA library in pACT2 were purchased from Takara Bio (traditional Y2H libraries). Plasmids were isolated after cultivation in Luria-Bertani (LB) medium containing ampicillin using a Qiagen MaxiPrep kit. The ABC9A strain containing the bait plasmid (eDHFR in pGBKT7) was transformed by electroporation based on the protocol of Benatuil et al. (2010) with modifications: An overnight culture of yeast in -W was diluted 5× to 1 l in two 500 ml baffled flasks. After incubation on a shaker for 5–6 h, the cultures were centrifuged at 4 °C (500 g) for 2 min. The pellets were washed twice with 200 ml of ice cold MilliQ water each and once with 200 ml of ice cold 1 M sorbitol. The pellet was suspended in 80 ml of 0.1 M lithium acetate/10 mM DTT and incubated at 30 °C for 30 min with shaking. After centrifugation, the pellet was washed with 80 ml of ice cold 1 M sorbitol and centrifuged again. The competent cells were cautiously suspended in 400 µl of ice cold 1 M sorbitol (total volume about 1 ml) and used within 1 h. 1.5 µg of library plasmid were used for electroporation. The electroporation was carried out using an Eppendorf Eporator with the settings for *S. cerevisiae*. 1 ml of pre-warmed YPAD medium was added directly after the pulse, and the transformation mixture was incubated at 30 °C on a thermoshaker (400 rpm). After 1 h, the mixtures were centrifuged (1 min, 10 000 rpm). The pellets were suspended in -LW medium (total 1 l) and incubated at 30 °C overnight on a shaker. The cultures were centrifuged and washed twice with one volume of 1× TE. About two pellet volumes of freezing solution (65% glycerol, 100 mM MgSO₄, 25 mM Tris-HCl pH 8) were added. The viability of the libraries was determined by plating dilutions on -LW plates to be 2 × 10⁹ cfu/ml for the mammary gland library and 4 × 10⁸ cfu/ml for the pancreas library.

Y3H screening

The Y3H screening was performed following a previously published protocol (Moser and Johnsson 2013). In brief, both mammary gland cDNA library and pancreas cDNA library with the amount of about 25–50 µl stock (5 × 10⁷–2 × 10⁸ cfu/ml) were diluted in 1× TE and then homogeneously spread on large plates (150-mm diameter) containing complete minimal medium minus leucine tryptophan histidine (-LWH) + 2.5 mM 3-amino-1,2,4-triazole (3-AT) + 10 µM trimethoprim-PEG-EE (diluted from a 10 mM stock in DMSO) + 1% (w/v) agarose. After 10 days at 30 °C, all colonies larger than 1 mm in diameter were picked and resuspended in 100 µl 1× TE each in 96-well plates. Using a metal 96-prong replicator, the resuspended colonies were transferred onto -LWH plates with 2.5 mM 3-AT firstly and then onto -LW plates. After 5 days at 30 °C, all colonies which did not grow in -LWH plates but grew in -LW plates were picked and resuspended in 100 µl 1× TE in 96-well plates. The resuspended colonies were transferred onto -LWH plates only with 1 mM 3-AT firstly and then onto -LWH plates with 1 mM 3-AT and 10 µM trimethoprim-PEG-EE using a metal 96-prong replicator. After 3 days at 30 °C, all colonies which grew better in plates with trimethoprim-PEG-EE than in plates without the compound were picked and resuspended in 100 µl 1× TE in 96-well plates. Two µl of the resuspended yeast cells were spotted on a -LW plate to ensure robust

growth. After 3 days at 30 °C, the colonies were picked with tips and resuspended in 1 ml -LW medium. Yeast cultures were then incubated at 30 °C overnight. Plasmid DNAs were isolated with a commercial kit according to the manufacturer's instructions (EZ-10 Spin Column Yeast Plasmid DNA Mini-Preps Kit, Bio Basic). The cDNA inserts were amplified by colony PCR and analyzed by sequencing (Eurofins Scientific). The cDNA identity was determined by BLAST analysis.

Amplification of hit plasmids in *E. coli*

Plasmid DNAs of five potential target proteins were transferred into *E. coli* cells using electroporation. After incubation at 37 °C for 1 h, the *E. coli* cells were homogeneously spread on plates (100 mm diameter) containing LB medium + 50 µg/ml ampicillin. After overnight incubation at 37 °C, single colonies were picked from each plate and suspended in 5 ml LB medium with 50 µg/ml ampicillin. After overnight culture at 37 °C and 100 rpm in the thermoshaker, *E. coli* cell pellets were recovered by centrifugation. Plasmid DNAs were then isolated with a commercial kit according to the manufacturer's instructions [QIAprep® Spin Miniprep Kit (250), Qiagen]. The cDNA inserts were analyzed by sequencing (Eurofins Scientific) and subsequent BLAST analysis. The standard GAL4 AD primer was used for DNA sequencing.

Yeast transformation with hit plasmids

Transformations were carried out following the protocol by Gietz and Schiestl (2007b). An overnight culture of the *S. cerevisiae* Y2H Gold strain (Takara Bio) in 10 ml of YPAD medium was used.

Yeast cell lysates for affinity chromatography

For each transformed yeast strain, a 5 ml of overnight culture in YPAD medium was prepared. After incubation, the YPAD medium was discarded by centrifugation. The pellet was resuspended in -L medium and vortexed for 30 s to disperse cell clumps. Then the cell culture was diluted with -L medium to an OD600 value of about 0.2. The cells were incubated at 30 °C and 120 rpm for the protein expression until the OD600 value reached 0.4–0.6. The culture was poured into pre-chilled 50 ml falcons halfway filled with ice. The tubes were immediately placed in a pre-chilled rotor and centrifuged at 1000g for 5 min at 4 °C. The cell pellet was washed with 50 ml of ice-cold H₂O.

Glass beads of the same volume as the cell pellet were added to the pellet. A 150 µl portion of RIPA buffer (150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl pH 8, 1% Nonidet P-40, 0.5% sodium deoxycholate and 0.1% SDS) with 1 mM PMSF was added to resuspend the pellet. The mixture was vortexed for 1 min and incubated on ice for 1 min afterwards. The vortex/chill cycle was repeated four more times. The supernatant was collected after centrifugation at 18,000 rpm for 10 min at 4 °C. The remaining pellet was extracted with another 150 µl of RIPA buffer with 1 mM PMSF and the lysates were pooled. The protein concentration of the lysate was determined by a Bradford assay.

Biotin-tag-based EE pull-down

100 µl of streptavidin beads suspension were washed with washing buffer (10 mM HEPES-NaOH, 50 mM KCl, 1 mM EDTA-2Na, 10% glycerol, pH 7.9) and resuspended in 50 µl of washing buffer. 50 µl of 2 mM

biotin-PEG-EE conjugate (see Supplementary Material) or biotin-PEG₃-N₃ (Sigma-Aldrich) as negative control were added to the beads. The mixture was incubated at room temperature for 30 min. After washing three times with 1 ml of washing buffer each, 100 µl of either yeast cell lysate (total 1 mg of protein as determined by a Bradford assay) or 200 ng of human recombinant PLOD2 (Abnova™, full-length ORF AAH37169, amino acids 27–758, with GST tag at N-terminal) were added. The mixture was incubated at 4 °C for 1 h. The beads were washed 2 times with 0.5 ml of washing buffer each. The supernatant was discarded by centrifugation at 3000 rpm for 3 min at 4 °C. 45 µl of 1× Western Blot sample buffer was added. The samples were boiled at 99 °C for 5 min. The eluates were separated by sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) on discontinuous polyacrylamide gels (12%). Proteins from the gels were transferred to 0.2 µm polyvinylidene difluoride (PVDF) membranes by Western Blotting. For detection, either a GAL4 AD primary antibody (Abcam) was used for the fragment (GAL4 AD-PLOD2 fusion protein), or a PLOD2 antibody (Abcam) for the detection of human recombinant PLOD2. Protein bands were detected by chemiluminescence using a ChemiDoc™ Touch Imaging System (Bio-Rad, Munich, Germany). Protein bands were analyzed by comparison with the Page Ruler™ Plus Prestained Protein Ladder and intensities of protein bands were analyzed using Image Lab™ software (Bio-Rad, Munich, Germany).

PLOD2 activity assay

The activity assay was performed as described by Devkota et al. (2019) with minor adaptations. In brief, 15 µl of 0.47 µM PLOD2 in assay buffer (50 mM HEPES pH 7.4, 150 mM NaCl, 0.5% DMSO, 0.01% Triton-X 100) were added to a white 96-well plate. Then, 5 µl of 5× compound stock or DMSO in assay buffer were added. After incubation for 50 min at r.t., 5 µl of 5× substrate mix (1 mM [IKG]₃ peptide, 0.1 mM α-ketoglutarate, 1 mM ascorbic acid, 0.1 mM FeCl₂ (freshly prepared) in assay buffer) were added to the well. The plate was incubated for 3 h at r.t. The succinate detection reagents from Promega's Succinate-Glo™ Assay kit were added according to the manufacturer's instruction. Luminescence was measured on an Orion II Microplate Luminometer.

Collagen I staining

A collagen gel with a concentration of 2 mg/ml was prepared. For that, 58.8 µl of collagen were mixed with 30 µl of 10× PBS, 1.4 µl of 1 N NaOH and 209.8 µl of H₂O. 2.5% of FITC labelled collagen were added to the collagen solution for visualization. 30 µl of collagen were added to each well of an 8-well ibidi slide and distributed with a pipette tip to coat the whole bottom of the well. The slide was placed in a 10 cm petri dish and a wet paper towel was added to the petri dish to avoid drying out of the collagen. The collagen was incubated at 37 °C/5% CO₂ for 30 min to allow polymerization. In the meantime, HeLa cells were prepared at a concentration of 27,000 cells/ml. 230 µl of the cell suspension were seeded to each well after the collagen had polymerized. Afterwards, 20 µl of the compound samples were added to each well. The slide was incubated at 37 °C/5% CO₂. After 24 h, cellular nuclei were stained using 2.5 mg/ml Hoechst 33,342 (37 °C/5% CO₂ for 20 min). Afterwards, the cells were washed with PBS once and 250 µl of medium was added to each well again. The cells were imaged on a Leica TCS SP8 confocal microscope. A HC PL APO CS2 63×/1.4 NA oil objective was applied. The pinhole size was set to 1.0 airy units and the pixel size was set to 2048 × 2048. Following lasers were employed: 405 nm (diode) for excitation of Hoechst 33342, 488 nm (argon) for

excitation of FITC labelled collagen. Mean intensities of collagen fibers around cells were evaluated using ImageJ (Version 1.53c) and normalized to a no cell control.

PLOD2 expression levels

Details are presented in the online Supplementary Material.

Synthesis

Details are presented in the online Supplementary Material.

Acknowledgements: The authors would like to thank Prakash Arumugam (Bioinformatics Institute, A*STAR Singapore) for providing the yeast strain ABC9Δ and for helpful discussions, Lars Allmendinger for NMR measurements, and Teresa Gruber, Eva Staschik, María-Teresa Lluésma, Rita Socher, Jana Peliskova, and Julia Blenninger for technical support.

Author contributions: All the authors have accepted responsibility for the entire content of this submitted manuscript and approved submission.

Research funding: Funding from the German Research Foundation (DFG, Project-ID 448289381 to S.M.) and the Mentoring program at the Faculty of Chemistry and Pharmacy at LMU is gratefully acknowledged. P. Wang is supported by a Fellowship from the Chinese Scholarship Council.

Conflict of interest statement: The authors declare no conflicts of interest regarding this article.

References

- Band, H.S. (1992). Mechanism of action of taxol. *Trends Pharmacol. Sci.* 13: 134–136.
- Becker, F., Murthi, K., Smith, C., Come, J., Costa-Roldán, N., Kaufmann, C., Hanke, U., Degenhart, C., Baumann, S., Wallner, W., et al. (2004). A three-hybrid approach to scanning the proteome for targets of small molecule kinase inhibitors. *Chem. Biol.* 11: 211–223.
- Benatui, L., Perez, J.M., Belk, J., and Hsieh, C.M. (2010). An improved yeast transformation method for the generation of very large human antibody libraries. *Protein Eng. Des. Sel.* 23: 155–159.
- Brückner, A., Polge, C., Lentze, N., Auerbach, D., and Schlattner, U. (2009). Yeast two-hybrid, a powerful tool for systems biology. *Int. J. Mol. Sci.* 10: 2763–2788.
- Brzozowski, A.M., Pike, A.C., Dauter, Z., Hubbard, R.E., Bonn, T., Engström, O., Ohman, L., Greene, G.L., Gustafsson, J.A., and Carlquist, M. (1997). Molecular basis of agonism and antagonism in the oestrogen receptor. *Nature* 389: 753–758.
- Bunnage, M.E., Gilbert, A.M., Jones, L.H., and Hett, E.C. (2015). Know your target, know your molecule. *Nat. Chem. Biol.* 11: 368.
- Cammarata, M., Thyer, R., Lombardo, M., Anderson, A., Wright, D., Ellington, A., and Brodbelt, J.S. (2017). Characterization of trimethoprim resistant *E. coli* dihydrofolate reductase mutants by mass spectrometry and inhibition by propargyl-linked antifolates. *Chem. Sci.* 8: 4062–4072.
- Chen, X., Wong, Y.K., Wang, J., Zhang, J., Lee, Y.-M., Shen, H.-M., Lin, Q., and Hua, Z.-C. (2017). Target identification with quantitative activity based protein profiling (ABPP). *Proteomics* 17: 1600212.
- Chen, Y., Guo, H., Terajima, M., Banerjee, P., Liu, X., Yu, J., Momin, A.A., Katayama, H., Hanash, S.M., Burns, A.R., et al. (2016). Lysyl hydroxylase 2 is secreted by tumor cells and can modify collagen in the extracellular space. *J. Biol. Chem.* 291: 25799–25808.
- Chen, Y., Terajima, M., Yang, Y., Sun, L., Ahn, Y.-H., Pankova, D., Puperi, D.S., Watanabe, T., Kim, M.P., Blackmon, S.H., et al. (2015). Lysyl hydroxylase 2 induces a collagen cross-link switch in tumor stroma. *J. Clin. Invest.* 125: 1147–1162.
- Chidley, C., Haruki, H., Pedersen, M.G., Muller, E., and Johnsson, K. (2011). A yeast-based screen reveals that sulfasalazine inhibits tetrahydrobiopterin biosynthesis. *Nat. Chem. Biol.* 7: 375.
- Devkota, A.K., Veloria, J.R., Guo, H.F., Kurie, J.M., Cho, E.J., and Dalby, K.N. (2019). Development of a high-throughput lysyl hydroxylase (LH) assay and identification of small-molecule inhibitors against LH2. *SLAS Discov.* 24: 484–491.
- Fields, S. and Song, O. (1989). A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature* 340: 245–246.
- Gallagher, S.S., Miller, L.W., and Cornish, V.W. (2007). An orthogonal dexamethasone-trimethoprim yeast three-hybrid system. *Anal. Biochem.* 363: 160–162.
- Gietz, R.D. and Schiestl, R.H. (2007a). High-efficiency yeast transformation using the LiAc/SS carrier DNA/PEG method. *Nat. Protoc.* 2: 31–34.
- Gietz, R.D. and Schiestl, R.H. (2007b). Quick and easy yeast transformation using the LiAc/SS carrier DNA/PEG method. *Nat. Protoc.* 2: 35–37.
- Han, T. and Nijhawan, D. (2019). Exome sequencing of drug-resistant clones for target identification. In: Ziegler, S. and Waldmann, H. (Eds.), *Systems chemical biology: methods and protocols*. New York: Springer New York.
- Henthorn, D.C., Jaxa-Chamiec, A.A., and Meldrum, E. (2002). A GAL4-based yeast three-hybrid system for the identification of small molecule-target protein interactions. *Biochem. Pharmacol.* 63: 1619–1628.
- Kluff, C., Zimmerman, Y., Mawet, M., Klipping, C., Duijkers, I.J., Neuteboom, J., Foidart, J.-M., and Bennink, H.C. (2017). Reduced hemostatic effects with drospirenone-based oral contraceptives containing estetrol vs. ethinyl estradiol. *Contraception* 95: 140–147.
- Kuhl, H. (2005). Pharmacology of estrogens and progestogens: influence of different routes of administration. *Climacteric* 8: 3–63.
- Li, H., Ma, S., Zhang, X., Li, C., Dong, B., Mujtaba, M.G., Wei, Y., Liang, X., Yu, X., Wen, K., et al. (2018). Generic hapten synthesis, broad-specificity monoclonal antibodies preparation, and ultrasensitive ELISA for five antibacterial synergists in chicken and milk. *J. Agric. Food Chem.* 66: 11170–11179.
- Licitra, E.J. and Liu, J.O. (1996). A three-hybrid system for detecting small ligand-protein receptor interactions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93: 12817–12821.
- Lomenick, B., Olsen, R.W., and Huang, J. (2011). Identification of direct protein targets of small molecules. *ACS Chem. Biol.* 6: 34–46.
- Moser, S. and Johnsson, K. (2013). Yeast three-hybrid screening for identifying anti-tuberculosis drug targets. *ChemBioChem* 14: 2239–2242.

- Rix, U. and Superti-Furga, G. (2008). Target profiling of small molecules by chemical proteomics. *Nat. Chem. Biol.* 5: 616.
- Schenone, M., Dančik, V., Wagner, B.K., and Clemons, P.A. (2013). Target identification and mechanism of action in chemical biology and drug discovery. *Nat. Chem. Biol.* 9: 232.
- Shivhare, D., Musialak-Lange, M., Julca, I., Gluza, P., and Mutwil, M. (2021). Removing auto-activators from yeast-two-hybrid assays by conditional negative selection. *Sci. Rep.* 11: 5477.
- Tang, C., Du, Y., Liang, Q., Cheng, Z., and Tian, J. (2018). A novel estrogen receptor α -targeted near-infrared fluorescent probe for in vivo detection of breast tumor. *Mol. Pharm.* 15: 4702–4709.
- Wegner, S.V., Sentürk, O.J., and Spatz, J.P. (2015). Photocleavable linker for the patterning of bioactive molecules. *Sci. Rep.* 5: 18309.
- Wong, J.H., Alfatah, M., Sin, M.F., Sim, H.M., Verma, C.S., Lane, D.P., and Arumugam, P. (2017). A yeast two-hybrid system for the screening and characterization of small-molecule inhibitors of protein-protein interactions identifies a novel putative Mdm2-binding site in p53. *BMC Biol.* 15: 108.
- Xu, F., Zhang, J., Hu, G., Liu, L., and Liang, W. (2017). Hypoxia and TGF- β 1 induced PLOD2 expression improve the migration and invasion of cervical cancer cells by promoting epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) and focal adhesion formation. *Cancer Cell Int.* 17: 54.

Supplementary Material: The online version of this article offers supplementary material (<https://doi.org/10.1515/hsz-2021-0355>).

3.7 Neue Syntheseroute zur Darstellung von Glycozolon A und B

Im Rahmen des Erasmus-Programms durfte ich für 6 Monate eine italienische Studentin (Claudia Tringali) betreuen. Im Rahmen dieses Studienaufenthalts sollte eine neuartige Synthesemöglichkeit für die beiden 2-Arylmethyl-2,3-dihydro-4(1*H*)-chinazoline Glycozolon A (**233**) und B (**236**) entwickelt werden. Möhrle und Seidel^[125] publizierten bereits im Jahr 1976 die Darstellung von 2-Arylmethyl-2,3-dihydro-4(1*H*)-chinazolinen ausgehend von *N*-Methylantranilamid (**231**) durch Kondensationsreaktion mit entsprechenden Aldehyden in einem Gemisch aus Ethanol/Eisessig (40:1). Unter anderem synthetisierten die Autoren dabei auch das zu dieser Zeit noch gar nicht als Naturstoff identifizierte Glycozolon A (**233**) (Abbildung 113).

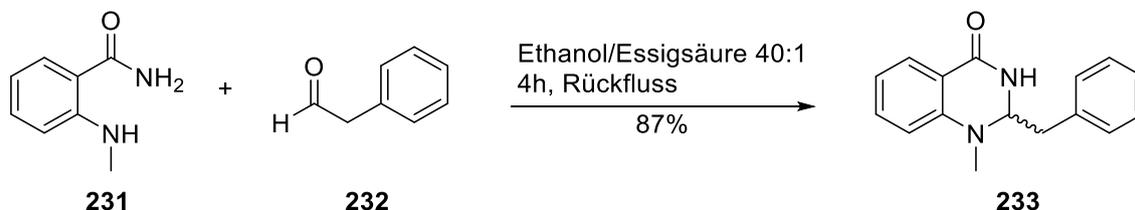


Abbildung 113: Darstellung von Glycozolon A (**233**) mithilfe einer Kondensationsreaktion nach Möhrle und Seidel^[125]

Da Arylacetaldehyd-Bausteine schwer zugänglich und über längeren Zeitraum nicht stabil sind, sollten diese durch ω -Methoxystyrol-Verbindungen ersetzt werden, da sich diese als vorteilhafte Arylacetaldehyd-Äquivalente in stark sauren, wasserfreien Medien erwiesen haben^[126]. Dies konnte in früheren Arbeiten an unserem Arbeitskreis bereits am Beispiel der Synthese von 1-Benzyltetrahydroisochinolinen durch Keller et al. gezeigt werden^[126]. Dabei wurde in einer Pictet-Spengler-Reaktion der für diese Reaktion benötigte Aldehyd durch ein ω -Methoxystyrol (**B**) in einem Gemisch aus Trifluoressigsäure und Dichlormethan ersetzt (Abbildung 114).

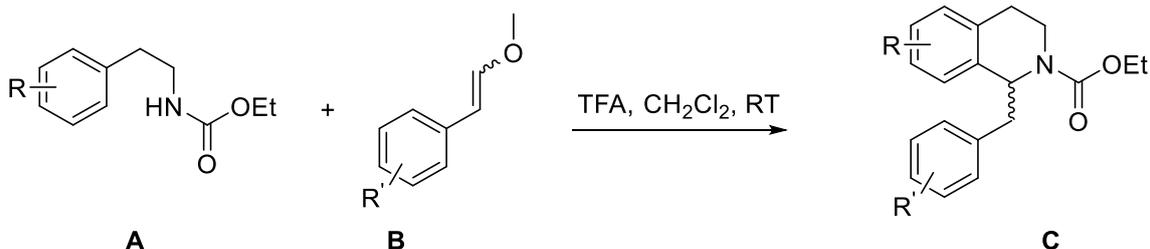


Abbildung 114: Pictet-Spengler-Reaktion nach Keller et al.^[126], bei der Arylacetaldehyde durch ω -Methoxystyrol-Verbindungen (**B**) in wasserfreien, sauren Medien ersetzt wurden

Synthesen

Diese Enoether haben den Vorteil, dass sie oft günstig kommerziell erwerbbar sind, oder mittels Wittig-Reaktion aus den entsprechenden aromatischen Aldehyden mit einem Phosphorylid dargestellt werden können. Zudem zeichnen sie sich durch eine höhere Stabilität im Vergleich zu den entsprechenden Arylacetaldehyden aus. Diese alternative Synthese wurde in dieser Publikation auf die allgemeine Darstellung von 2-Arylmethyl-2,3-dihydro-4(1*H*)-chinazoline adaptiert und die Reaktionsbedingungen optimiert, um damit die Naturstoffe Glycozolon A (**233**) in 47% und B (**236**) in 50% Ausbeute zu synthetisieren.

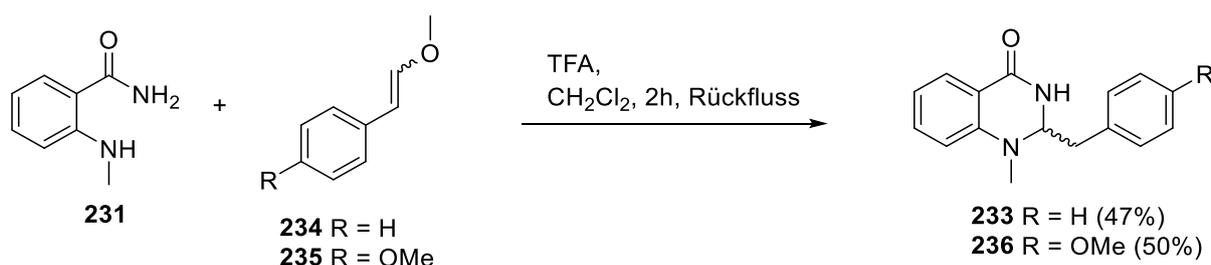


Abbildung 115: Darstellung von Glycozolon A (**233**) und B (**236**) durch Ersetzen des Arylacetaldehyds durch die kommerziell erwerblichen ω-Methoxystyrol-Verbindungen **234** und **235** im wasserfreien, sauren Medium

Des Weiteren wurde versucht die Syntheseroute auf *N*-1-unsubstituierte Analoga zu erweitern. Jedoch konnte in diesem Experiment lediglich das dehydrogenierte 2-Benzylchinazolin-4(1*H*)-on - der Naturstoff Glycosminin - ausgehend von Anthranilamid unter den etablierten Bedingungen in nur 11% Ausbeute dargestellt werden. Daher spielt diese Syntheseroute für diese Stoffklasse keine Rolle. Die Testung der Verbindungen auf biologische Aktivität (antibakteriell, antimykotisch und cytotoxisch) zeigte, dass keine der synthetisierten Verbindungen biologisch aktiv ist. Die Ergebnisse dieser Arbeit wurden im Journal Natural Product Research publiziert.

Mein Beitrag zu dieser Publikation umfasste das Erarbeiten des Synthesekonzeptes sowie die Anleitung und Beaufsichtigung der Synthesearbeit von Claudia Tringali und die Auswertung der analytischen Daten. Auch das Verfassen des chemischen Teils der Publikation gehörte zu meinen Aufgaben.

Reprinted by permission of Informia UK Limited, trading as Taylor & Taylor & Francis Group^[127]



A novel approach to 2-arylmethyl-2,3-dihydro-4(1*H*)-quinazolinones. Total synthesis of the alkaloids glycozalone-A and glycozalone-B

Thomas Kläßmüller, Claudia Tringali and Franz Bracher 

Department of Pharmacy - Center for Drug Research, Ludwig-Maximilians University, Munich, Germany

ABSTRACT

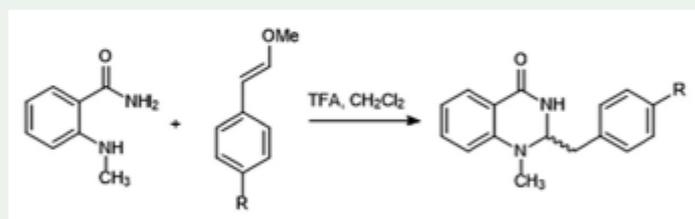
2-Arylmethyl-2,3-dihydro-4(1*H*)-quinazolinones are a small subgroup of the class of quinazolin-4-one alkaloids, and most published total syntheses require the use of unstable and poorly accessible arylacetaldehydes. Here we show that easily available, stable ω -methoxystyrenes are versatile substitutes for arylacetaldehydes. This new methodology was applied to the total synthesis of the alkaloids glycozalone-A and glycozalone-B. The limitations of this new approach were analyzed as well. In this course, new total syntheses of two 2-arylmethyl-4(1*H*)-quinazolinone alkaloids (glycosminine, 2-(4-hydroxybenzyl)-4(1*H*)-quinazolinone) were developed as well.

ARTICLE HISTORY

Received 29 May 2022
Accepted 28 July 2022

KEYWORDS

Alkaloid; quinazolinones; total synthesis; arylacetaldehydes; cyclization



1. Introduction

In heterocyclic chemistry, especially in alkaloid total syntheses, nitrogen-containing heterocyclic rings are frequently constructed *de novo* using cyclocondensation reactions of carbonyl and related groups (aldehydes, ketones, nitriles, ...) with nitrogen-containing functional groups (ammonia, amines, amides, amidines, guanidines). An important undesired side reaction in this course is self-condensation of the carbonyl compounds, and this problem occurs exceptionally with highly reactive arylacetaldehydes (Brown et al. 2016; Comins et al. 1997) Therefore, stable equivalents of arylacetaldehydes are versatile building blocks in organic synthesis. In previous work others and we have applied enamines (ω -aminostyrenes and heterocyclic analogues) as

CONTACT Franz Bracher  Franz.Bracher@cup.uni-muenchen.de

 Supplemental data for this article can be accessed online at <https://doi.org/10.1080/14786419.2022.2110095>.

© 2022 Informa UK Limited, trading as Taylor & Francis Group

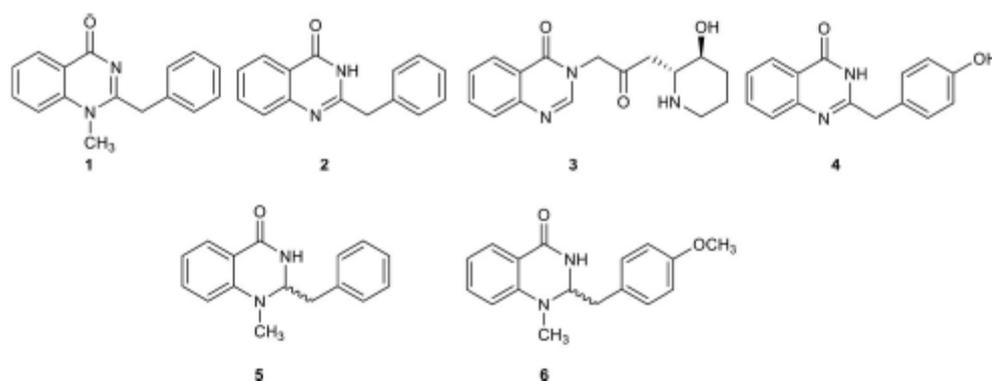


Figure 1. Top row: Representative bicyclic quinazolin-4-one alkaloids: arborine (1), glycosminine (2), febrifugine (3), and the (unnamed) antiviral alkaloid 4. Bottom row: The racemic alkaloids glycozalone-A (5) and glycozalone-B (6) isolated from *Glycosmis cochinchinensis*.

reactive intermediates in the construction of indole rings (Leimgruber-Batcho synthesis (Batcho and Leimgruber 1985)) and condensed pyridines (naphthyridines, pyridoacridone and related alkaloids (Bracher 1989; Bracher 1989b; Bracher and Mink 1995), and canthin-4-ones (Puzik and Bracher 2010)), as these enamines are easily obtained by condensation of CH-acidic methyl(ene) groups with formamide acetals under C₁-homologation (Bracher 2020). In a similar manner, nitrovinylarenes have been used as aryl acetaldehyde equivalents in indole syntheses (He et al. 1999). Alternative building blocks are enol ethers (ω -alkoxystyrenes), which are easily obtained by Wittig-type C₁-homologation of aromatic aldehydes with (methoxymethylene)triphenylphosphorane (Brown et al. 2016). Alternatively, enol ethers are prepared by Pd-catalyzed alkoxyvinylolation of haloarenes using alkoxyvinylboronates (Kamlah and Bracher 2019) or alkoxyvinylstannanes (Kamlah et al. 2016), or by catalyzed or uncatalyzed anti-Markovnikov addition of alkoxides to arylacetylenes (Cuthbertson and Wilden 2015). These building blocks were successfully applied to the synthesis of isoquinoline, β -carboline (Kamlah et al. 2016), 2,6-naphthyridine (Kamlah and Bracher 2019), and 1-benzyltetrahydroisoquinoline alkaloids (Comins et al. 1997; Keller et al. 2021; Schütz et al. 2020).

Here we describe a novel application of ω -alkoxystyrenes as arylacetaldehyde equivalents in the total synthesis of 2-arylmethyl-2,3-dihydro-4(1*H*)-quinazolinone alkaloids. The quinazolin-4-ones are a class of more than 150 anthranilic acid-derived alkaloids, found in at least six plant families, whereby the family Rutaceae is especially rich in these alkaloids (Aniszewski 2015; Kshirsagar 2015; Undheim and Benneche 1996). Further, quinazolin-4-ones, among them the antiviral compound 4, have been isolated from marine fungi (Li et al. 2011; Ma et al. 2011; Shen et al. 2013). Synthetic quinazolin-4-ones were approved as drugs, e.g. the anti-cancer drug raltitrexed (Van Cutsem et al. 2002) and the coccidostatic drug halofuginone (derived from alkaloid febrifugine (3, Figure 1) (Sundrud et al. 2009)). The general subtypes of bicyclic quinazolin-4-one alkaloids are presented in Figure 1. These natural products mainly differ in the state of unsaturation and the degree of substitution at C-2, N-1 and N-3.

Natural quinazolin-4-ones with complex structural features and remarkable biological activities have incited a lot of activities towards the development of new

synthetic strategies for total synthesis (Kshirsagar 2015). The less complex, bicyclic quinazolinone alkaloids are generally synthesized starting from anthranilic acid or derivatives thereof (esters, isatoic acids, cyclic sulfinamide anhydrides) under condensation with formamides, carboxamides, thioamides (Kametani et al. 1978; Möhrle and Seidel 1976), nitriles (Abe et al. 2017), amidoximes (Adib et al. 2010), iminoesters (Ganjan and Lalezari 1984) or orthoesters, or from *N*-acylated anthranilic acids under cyclization (Asif 2014). Further, aldehydes and primary alcohols have been cyclized with anthranilamide under oxidative conditions (Hu et al. 2021).

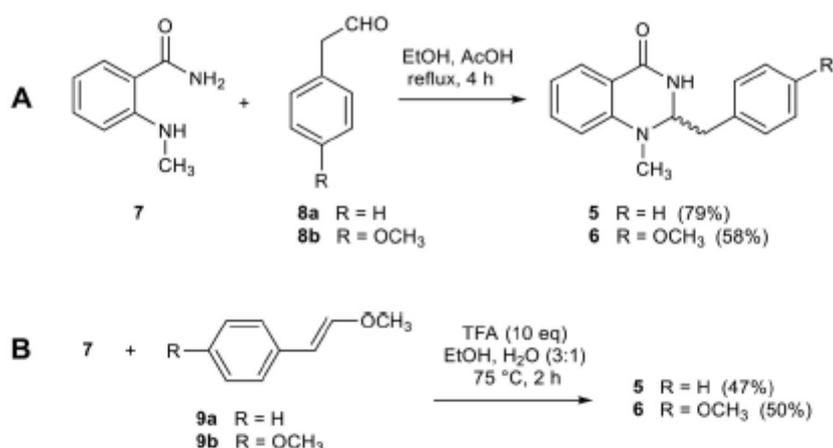
The corresponding 2,3-dihydro analogues are generally obtained *via* condensation of anthranilamides with aldehydes, catalyzed by Brønsted acids (e.g. hydrochloric acid (Böhme and Böing 1960), acetic acid (Möhrle and Seidel 1976), tartaric acid (Ghosh and Nagarajan 2016) or Lewis acids (Chen et al. 2007; Chen et al. 2008). The same conversion can be performed using ionic liquids ('green synthesis') (Chen et al. 2007b), and asymmetric variants have been published as well (Cheng et al. 2008; Hou et al. 2021; Kesavan et al. 2013). However, most of the published protocols using aldehyde building blocks are limited to aromatic aldehydes, and especially arylacetaldehydes are heavily underrepresented in these approaches (Cheng et al. 2008; Ghosh and Nagarajan 2016; Kesavan et al. 2013; Möhrle and Seidel 1976; Radfar et al. 2018). Alternatively, 2,3-dihydroquinazolin-4-ones can be obtained by reduction of the corresponding quinazolin-4-ones using complex hydrides, catalytic hydrogenation (Chatterjee and Majumdar 1954) or zinc/hydrochloric acid (Chakravarti et al. 1953).

The 2,3-dihydro-4(1*H*)-quinazolinone alkaloids glycozalone-A (**5**) and glycozalone-B (**6**) (Figure 1) were isolated from the leaves of *Glycosmis cochinchinensis* (Rutaceae) collected in Thailand (Ito et al. 1999). They contain a benzyl or 4-methoxybenzyl residue at C-2 and were, surprisingly, isolated in racemic form. No biological activities were reported for these alkaloids.

Even before its identification as a natural product, glycozalone-A (**5**) had been obtained by synthesis. One approach comprises reduction of alkaloid arborine (**1**; Figure 1) with LiAlH_4 , NaBH_4 , catalytic hydrogenation (Chakravarti et al. 1953; Chatterjee and Majumdar 1954), or with zinc/hydrochloric acid (Chakravarti et al. 1953). A direct synthesis involving acetic acid-mediated condensation of 2-(methylamino)benzamide (**7**) and phenylacetaldehyde (**8a**) was published by Möhrle (Möhrle and Seidel 1976). The structure of glycozalone-B (**6**) had not been mentioned in the literature before its isolation from *G. cochinchinensis*.

2. Results and discussion

In order to make authentic samples of the alkaloids **5** and **6** available for monitoring of our novel protocol, we first re-synthesized glycozalone-A (**5**) following Möhrle's protocol (Möhrle and Seidel 1976) using 2-(methylamino)benzamide (**7**) and phenylacetaldehyde (**8a**). Only part of the alkaloid precipitated from the reaction mixture, and reliable yields were obtained only after chromatographic purification of the mother liquor. This way, an overall yield of 79% was obtained (Scheme 1A). Analytical data of the product (see Supplementary material, Figure S1) were in full accordance with those published by Möhrle and those published for the isolated natural product (Ito

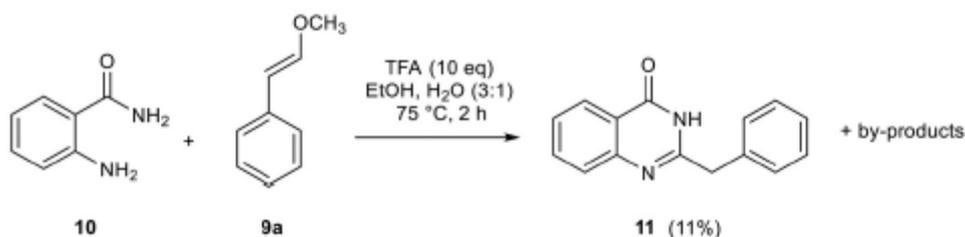


Scheme 1. A: Synthesis of alkaloids glycozalone-A (5) and glycozalone-B (6) utilizing arylacetaldehyde building blocks (8a/8b). B: Novel synthesis of the alkaloids 5 and 6 utilizing ω -alkoxystyrene building blocks 9a/9b.

et al. 1999). For the synthesis of glycozalone-B (6), the building block (4-methoxyphenyl)acetaldehyde (8b) was prepared from 2-(4-methoxyphenyl)ethanol by oxidation with Dess-Martin reagent (O'Brien et al. 2018). Cyclocondensation under Möhrle's conditions and work-up as described for glycozalone-A gave the alkaloid 6 in 58% yield (Scheme 1A). Spectroscopic data (Figure S2) were in full accordance with the data published for the isolated natural product (Ito et al. 1999).

Next, in order to avoid the use of unstable arylacetaldehydes in the total syntheses of glycozalone-A (5) and glycozalone-B (6), we investigated the corresponding ω -methoxystyrenes 9a/9b as building blocks. In our previous work using ω -alkoxystyrenes as arylacetaldehyde equivalents (Keller et al. 2021; Schütz et al. 2020) standard conditions were reacting the components in anhydrous dichloromethane in presence of excess trifluoroacetic acid (TFA), whereby a reactive carbenium-oxonium intermediate was formed under C-protonation of the enol ether. Alternatively, *in situ* generation of the arylacetaldehydes from 9a/9b by means of strong acid in a mixture of organic solvent and water was considered, which should be followed by immediate cyclization according to Möhrle's work (Möhrle and Seidel 1976). The reaction conditions were optimized using commercially available ω -methoxystyrene (9a), ending up with alkaloid glycozalone-A (5) (Scheme 1B, Table S1).

Attempts for obtaining the cyclization under anhydrous conditions (TFA in dichloromethane or anhydrous ethanol; Table S1, entries 1 and 2) gave the desired alkaloid only in disappointing yields (20% and 30%). So, we envisaged an *in situ*-hydrolysis/cyclization protocol, which required acid and water on the one side, and an organic co-solvent on the other side for providing a homogeneous solution of all reactants. Pretests showed that 3:1 ethanol-water mixtures are suitable for this purpose. Poor yields (<20%) of alkaloid 5 were obtained with the weak acid acetic acid (entry 3) (compare Möhrle's protocol (Möhrle and Seidel 1976)) and with low amounts of the strong acid TFA (entry 4). Fortunately, an acceptable yield (47%) was achieved with 10 equivalents of TFA (entry 5). A higher water content (50%; entry 6) in the reaction mixture did not improve the yield.



Scheme 2. Synthesis of the alkaloid glycosminine (**11**) including an unattended dehydrogenation step.

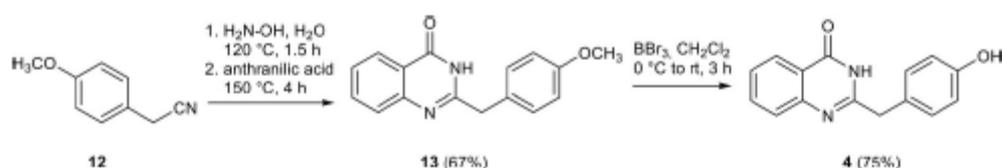
Using these optimized conditions, glycozalone-B (**6**) was obtained from 2-(methylamino)benzamide (**7**) and (*E*)-1-methoxy-4-(2-methoxyvinyl)benzene (**9b**) in 50% yield (Scheme 1B). Building block **9b** was prepared in 89% yield by Wittig olefination of *p*-anisaldehyde with methoxymethyltriphenylphosphonium chloride/LDA (Brown et al. 2016).

Having a practicable method for the synthesis of 2-benzylated 2,3-dihydro-4(1*H*)-quinazolinones in hands, we further investigated the applicability of this enol ether route to *N*-1-unsubstituted analogues. Single reports on acid-mediated syntheses of such products starting from 2-aminobenzamide (**10**) and arylacetaldehydes can be found in literature (Chen et al. 2008; Ghosh and Nagarajan 2016; Kesavan et al. 2013; Radfar et al. 2018). However, there is also clear evidence that, depending on reaction time, temperature, and solvent, the formed 2,3-dihydro-4(1*H*)-quinazolinones can undergo partial or complete dehydrogenation to the corresponding 4(1*H*)-quinazolinones (Chen et al. 2008; Ghosh and Nagarajan 2016). In fact, reaction of 2-aminobenzamide (**10**) with the enol ethers **9a/9b** under the reaction conditions of entry 5 (Table S1) gave complex mixtures of products. Careful chromatographic purification of the mixture obtained from **9a** gave only one pure compound, the dehydrogenated product 2-benzylquinazolin-4(1*H*)-one (**11**) in 11% yield (Scheme 2, Figure S3). This compound is identical to the alkaloid glycosminine, isolated from *Glycosmis arborea* (Pakrashi et al. 1963).

The unfortunate progress of the cyclization attempts with 2-aminobenzamide (**10**) prompted us to re-investigate the published protocol of Ghosh (Ghosh and Nagarajan 2016) for the synthesis of alkaloid **4** (Figure 1). These authors claimed that reaction of **10** with (4-methoxyphenyl)acetaldehyde (**8b**) in a (L)-tartaric acid/*N,N'*-dimethylurea mixture gave, depending on the reaction time (3 h or 10 h), either the 2,3-dihydro-4(1*H*)-quinazolinone or the aromatized quinazolin-4(1*H*)-one (**13**) in high yields. In our hands, under those conditions a complex mixture of products resulted almost immediately, which did not change significantly over the time. In order to provide an authentic reference substance for TLC control of this reaction, we synthesized 2-(4-methoxybenzyl)quinazolin-4(1*H*)-one (**13**) (Shen et al. 2012) by condensation of anthranilic acid with an amidoxime, generated *in situ* from (4-methoxyphenyl)acetonitrile (**12**) and hydroxylamine in analogy to Adib's protocol (Adib et al. 2010), in 67% yield. Subsequent *O*-demethylation with BBr_3 (Ghosh and Nagarajan 2016) gave the alkaloid **4** in 75% yield (Scheme 3, Figure S4).

The alkaloids glycozalone-A (**5**), glycozalone-B (**6**), glycosminine (**11**) and **4** were tested for antibacterial and antifungal activity in a standard agar diffusion assay, and

6 T. KLAßMÜLLER ET AL.



Scheme 3. Synthesis of the alkaloid 4.

for cytotoxic activity against HL-60 (human leukemia) cells in an MTT assay, but none of them showed noteworthy activity.

3. Conclusions

In this investigation we demonstrated that ω -methoxystyrenes are versatile arylacetaldehyde equivalents in the synthesis of N-1-alkylated 2-arylmethyl-2,3-dihydro-4(1H)-quinazolinones starting from appropriate aminobenzamides. Poor yields were obtained under anhydrous conditions (solvents: dichloromethane, ethanol; entries 1 and 2), in case the strong acid TFA was applied. TFA-mediated cyclization in ethanol-water mixtures, which presumably occur under *in-situ* hydrolysis to the corresponding arylacetaldehydes, provide the target compounds in acceptable yields. This resulted in a novel total synthesis of glycozalone-A (5) and the first total synthesis of glycozalone-B (6). Compared to the established route using arylacetaldehydes, the yields of the cyclization steps are lower, but concerning overall yields of the total syntheses, this new protocol is very well competitive. Only few arylacetaldehydes are commercially available, due to their limited stability, and their synthesis requires a couple of steps. In contrast, ω -alkoxystyrenes are prepared in high-yielding single step conversions of readily available precursors (aromatic aldehydes, aryl halides, arylacetylenes), and show satisfactory stability. The protocol could not be extended to the synthesis of N-1-unsubstituted analogues, since extensive decomposition, in part due to undesired dehydrogenation reactions, was observed in this case. A comparably complex reaction mixture was observed in a related approach using an arylacetaldehyde as well, demonstrating that the synthesis of N-1-unsubstituted 2-(arylmethyl)-dihydro-4(1H)-quinazolinones requires tailored reaction conditions.

Disclosure statement

The authors report there are no competing interests to declare.

Funding

This work was supported by the German Bundesagentur für Sprunginnovationen (SPRIN-D; Challenge 'Ein Quantensprung für neue antivirale Mittel'). The authors thank Dr. Lars Allmendinger for support in the interpretation of NMR spectra.

ORCID

Franz Bracher  <http://orcid.org/0000-0003-0009-8629>

Data availability statement

See Supplementary material for experimental details including analytical data and copies of ^1H - and ^{13}C -NMR spectra of the synthesized alkaloids.

References

- Abe T, Kida K, Yamada K. 2017. A copper-catalyzed Ritter-type cascade via iminoketene for the synthesis of quinazolin-4(3H)-ones and diazocines. *Chem Commun (Camb)*. 53(31):4362–4365.
- Adib M, Ansari S, Mohammadi A, Bijanzadeh HR. 2010. A novel, one-pot, solvent-, and catalyst-free synthesis of 2-aryl/alkyl-4(3H)-quinazolinones. *Tetrahedron Lett*. 51(1):30–32.
- Aniszewski T. 2015. Chapter 2 – Alkaloid chemistry. In: Aniszewski T, editor. *Alkaloids*. 2nd ed. Elsevier, Amsterdam; p. 99–193.
- Asif M. 2014. Chemical characteristics, synthetic methods, and biological potential of quinazoline and quinazolinone derivatives. *Int J Med Chem*. 2014:395637.
- Batcho AD, Leimgruber W. 1985. Indoles from 2-Methylnitrobenzenes by condensation with formamide acetals followed by reduction: 4-benzyloxyindole. *Org. Synth*. 63:214.
- Böhme H, Böing H. 1960. Zur Kenntnis der 4-Oxo-1,2,3,4-tetrahydro-chinazoline. *Arch Pharm Pharm Med Chem*. 293(11):1011–1020.
- Bracher F. 1989. Polycyclische aromatische alkaloide, I. Synthese von deistopholin und sampangin. *Liebigs Ann Chem*. 1989(1):87–88.
- Bracher F. 1989b. Total synthesis of the pentacyclic alkaloid ascididemin. *Heterocycles*. 29(11):2093–2095.
- Bracher F. 2020. Dimethylformamide acetals and bredereck's reagent as building blocks in natural products total synthesis. *MROC*. 17(1):47–66.
- Bracher F, Mink K. 1995. First total synthesis of the 2,7-naphthyridine alkaloid neozeylanicine and unexpected formation of isoquinolines from ethoxyvinyl pyridines. *Liebigs Ann*. 1995(4):645–647.
- Brown CE, McNulty J, Bordón C, Yolken R, Jones-Brando L. 2016. Enol ethers as carbonyl surrogates in a modification of the Povarov synthesis of 3-aryl quinolines and their anti-toxoplasma activity. *Org Biomol Chem*. 14(25):5951–5955.
- Chakravarti D, Chakravarti RN, Chakravarti SC. 1953. Alkaloids of *glycosmis arborea*. Part I. Isolation of arborine and arborinine: the structure of arborine. *J Chem Soc*. 3337–3340.
- Chatterjee A, Majumdar SG. 1954. Alkaloids of *glycosmis pentaphylla* (Retz.) DC. Part I. *J Am Chem Soc*. 76(9):2459–2463.
- Chen J, Su W, Wu H, Liu M, Jin C. 2007b. Eco-friendly synthesis of 2,3-dihydroquinazolin-4(1H)-ones in ionic liquids or ionic liquid–water without additional catalyst. *Green Chem*. 9(9):972–975.
- Chen J, Wu D, He F, Liu M, Wu H, Ding J, Su W. 2008. Gallium(III) triflate-catalyzed one-pot selective synthesis of 2,3-dihydroquinazolin-4(1H)-ones and quinazolin-4(3H)-ones. *Tetrahedron Lett*. 49(23):3814–3818.
- Chen J, Wu H, Su W. 2007. A facile synthesis of 2,3-dihydro-2-aryl-4(1H)-quinazolinones catalyzed by scandium(III) triflate. *Chin. Chem. Lett*. 18(5):536–538.
- Cheng X, Vellalath S, Goddard R, List B. 2008. Direct catalytic asymmetric synthesis of cyclic aminals from aldehydes. *J Am Chem Soc*. 130(47):15786–15787.
- Comins DL, Thakker PM, Baevsky MF, Badawi MM. 1997. Chiral auxiliary mediated pictet-spengler reactions: asymmetric syntheses of (–)-laudanone, (+)-glauconine and (–)-xylopinine. *Tetrahedron*. 53(48):16327–16340.
- Cuthbertson J, Wilden JD. 2015. Z-selective, anti-Markovnikov addition of alkoxides to terminal alkynes: an electron transfer pathway? *Tetrahedron*. 71(25):4385–4392.
- Ganjian I, Lalezari I. 1984. A convenient synthesis of glycosminine, 4-quinazolinone alkaloid, and related compounds. *Synth. Commun*. 14(1):33–37.

- Ghosh SK, Nagarajan R. 2016. Total synthesis of penipanoid C, 2-(4-hydroxybenzyl)quinazolin-4(3H)-one and NU1025. *Tetrahedron Lett.* 57(38):4277–4279.
- He F, Bo Y, Altom JD, Corey EJ. 1999. Enantioselective total synthesis of aspidophytine. *J Am Chem Soc.* 121(28):6771–6772.
- Hou B, Yang S, Yang K, Han X, Tang X, Liu Y, Jiang J, Cui Y. 2021. Confinement-driven enantioselectivity in 3D porous chiral covalent organic frameworks. *Angew Chem Int Ed Engl.* 60(11):6086–6093.
- Hu Y, Hou H, Yu L, Zhou S, Wu X, Sun W, Ke F. 2021. Electro-oxidative cyclization: access to quinazolinones via K₂S₂O₈ without transition metal catalyst and base. *RSC Adv.* 11(50):31650–31655.
- Ito C, Kondo Y, Ruangrunsi N, Furukawa H. 1999. New quinazoline alkaloids from *glycosmis cochinchinensis*. *Chem Pharm Bull.* 47(10):1491–1493.
- Kametani T, Van Lao C, Ihara M, Fukumoto K. 1978. Modified total synthesis of arborine, glycosminine, and glomerine by condensation of sulfinamide anhydride with thioamides. *Heterocycles.* 9(11):1585–1591.
- Kamlah A, Bracher F. 2019. A short synthesis of the plant alkaloid 4-methyl-2,6-naphthyridine. *LOC.* 16(12):931–934.
- Kamlah A, Lirk F, Bracher F. 2016. A new approach to 1-substituted β -carbolines and isoquinolines utilizing tributyl[(Z)-2-ethoxyvinyl]stannane as a C-3,C-4 building block. *Tetrahedron.* 72(6):837–845.
- Keller M, Sauvageot-Witzku K, Geisslinger F, Urban N, Schaefer M, Bartel K, Bracher F. 2021. The ethoxycarbonyl group as both activating and protective group in N-acyl-Pictet-Spengler reactions using methoxystyrenes. A short approach to racemic 1-benzyltetrahydroisoquinoline alkaloids. *Beilstein J Org Chem.* 17:2716–2725.
- Kesavan V, Prakash M, Jayakumar S. 2013. Investigation of the enantioselective synthesis of 2,3-dihydroquinazolinones using Sc(III)-inda-pybox. *Synthesis.* 45(16):2265–2272.
- Kshirsagar UA. 2015. Recent developments in the chemistry of quinazolinone alkaloids. *Org Biomol Chem.* 13(36):9336–9352.
- Li CS, An CY, Li XM, Gao SS, Cui CM, Sun HF, Wang BG. 2011. Triazole and dihydroimidazole alkaloids from the marine sediment-derived fungus *Penicillium paneum* SD-44. *J Nat Prod.* 74(5):1331–1334.
- Ma C, Li Y, Niu S, Zhang H, Liu X, Che Y. 2011. N-hydroxypyridones, phenylhydrazones, and a quinazolinone from *Isaria farinosa*. *J Nat Prod.* 74(1):32–37.
- Möhrle H, Seidel C-M. 1976. Eine neue synthese für Arborin und strukturanaloge 4(1H)-chinazolinone. 1. *Mitt. Arch Pharm (Weinheim).* 309(6):503–511.
- O'Brien CJ, Droegge DG, Jiu AY, Gandhi SS, Paras NA, Olson SH, Conrad J. 2018. Photoredox cyanomethylation of indoles: catalyst modification and mechanism. *J Org Chem.* 83(16):8926–8935.
- Pakrashi SC, Bhattacharyya J, Johnson LF, Budzikiewicz H. 1963. Studies on indian medicinal plants—VI: structures of glycosmicine, glycorine and glycosminine, the minor alkaloids from *Glycosmis arborea* (roxb.) DC. *Tetrahedron.* 19(6):1011–1026.
- Puzik A, Bracher F. 2010. New polycyclic ring systems derived from canthin-4-one. *J. Het. Chem.* 47:449–453.
- Radfar I, Miraki MK, Ghandi L, Esfandiary N, Abbasi S, Karimi M, Heydari A. 2018. BF₃-grafted Fe₃O₄@sucrose nanoparticles as a highly-efficient acid catalyst for syntheses of dihydroquinazolinones (DHQZs) and bis 3-indolyl methanes (BIMs). *Appl Organometal Chem.* 32(8):e4431.
- Schütz R, Meixner M, Antes I, Bracher F. 2020. A modular approach to the bisbenzylisoquinoline alkaloids tetrandrine and isotetrandrine. *Org Biomol Chem.* 18(16):3047–3068.
- Shen S, Li W, Wang J. 2013. A novel and other bioactive secondary metabolites from a marine fungus *Penicillium oxalicum* 0312F1. *Nat Prod Res.* 27(24):2286–2291.
- Shen Y, Han C, Cai S, Lu P, Wang Y. 2012. One-pot synthesis of 4(3H)-quinazolinones from azides, alkynes, anilines, and carbon monoxide. *Tetrahedron Lett.* 53(42):5671–5673.

- Sundrud MS, Korolov SB, Feuerer M, Calado DP, Kozhaya AE, Rhule-Smith A, Lefebvre RE, Unutmaz D, Mazitschek R, Waldner H, et al. 2009. Halofuginone inhibits TH17 cell differentiation by activating the amino acid starvation response. *Science*. 324(5932):1334–1338.
- Undheim K, Benneche T. 1996. 6 02 - Pyrimidines and their benzo derivatives. In: Katritzky AR, Rees CW, Scriven EFV, editors. *Compr. Het. Chem. II*. Pergamon Press, Oxford; p. 93–231.
- Van Cutsem E, Cunningham D, Maroun J, Cervantes A, Glimelius B. 2002. Raltitrexed: current clinical status and future directions. *Ann Oncol*. 13(4):513–522.

4 Biologische Testung

4.1 Bestimmung der antimikrobiellen Aktivität mittels Agar-Diffusionstest

Die Testungen wurden in den Laboren unseres Arbeitskreises von einer technischen Mitarbeiterin (Martina Stadler) durchgeführt. Alle Analoga von Cassiarin A und Zephycandidin A wurden mithilfe des sogenannten Agar-Diffusionstest, auch Hemmhofstest genannt, auf ihre antimikrobiellen Eigenschaften geprüft. Dabei wird eine Agarplatte mit einer Suspension des zu untersuchenden Bakteriums oder Pilzes bestrichen und in regelmäßigen Abständen zueinander Filterpapiere, die mit der zu untersuchenden Substanz getränkt wurden, eingesetzt. Nach Inkubation im Brutschrank kann bei Substanzen mit Aktivität gegen den getesteten Keim ein kreisrunder Bereich um das Filterpapier gesehen werden, in dem kein Wachstum stattgefunden hat. Dieser sogenannte Hemmhof ist namensgebend für die synonyme Bezeichnung des Agar-Diffusionstestes. Dabei ist zu beachten, dass das Ausmessen des Durchmessers des Hemmhofes lediglich zur qualitativen Analyse aussagekräftig ist, da der Hemmhofdurchmesser nicht nur von der antimikrobiellen Aktivität der Substanz, sondern auch von der Diffusionsfähigkeit selbiger durch das Agarmedium und der Menge der aufgetragenen Substanz abhängt. Um genauere quantitative Aussagen treffen zu können, kann die minimale Hemmkonzentration (MHK) durch Anfertigen einer Verdünnungsreihe und Auftragen in das Agarmedium ermittelt werden. Diese MHK definiert sich als die geringste Konzentration einer Substanz, die ein sichtbares Wachstum von Bakterien oder Pilzen in einem geeigneten Nährmedium verhindert. Die Mikroorganismen, an denen die Substanzen untersucht wurden, sind in Tabelle 9 aufgeführt. Als Positivkontrolle wurden Tetracyclin als antibiotisch und Clotrimazol als antimykotisch wirksame Referenzsubstanz aufgetragen (Abbildung 1). Die exakte Durchführung des Hemmhofstests ist im Kapitel 6.4.1 beschrieben.

Modellkeim	DSM-Nummer	Art
<i>Escherichia coli</i>	426	gramnegatives Bakterium
<i>Pseudomonas marginalis</i>	7527	gramnegatives Bakterium
<i>Staphylococcus equorum</i>	20675	grampositives Bakterium
<i>Streptococcus entericus</i>	14446	grampositives Bakterium
<i>Yarrowia lipolytica</i>	1345	Hefe
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	1333	Hefe

Tabelle 9: Verwendete Mikroorganismen im Agar-Diffusionstest

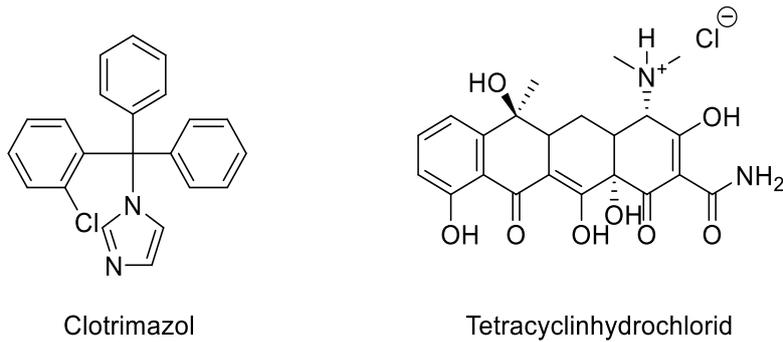
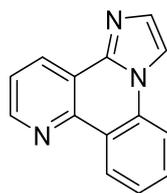


Abbildung 116: Clotrimazol und Tetracyclinhydrochlorid als Referenzsubstanzen für den Agar-Diffusionstest

Alle untersuchten Substanzen zeigen keinerlei antibiotische Aktivität gegenüber den verwendeten Bakterien. Lediglich Verbindung **184** zeigt mäßige antimykotische Eigenschaften gegenüber *Saccharomyces cerevisiae*, der Hemmhof beträgt hier 10 mm. Da die tricyclische Grundstruktur des Cassiarin A – das Pyrano[2,3,4-*ij*]isochinolin – in bisher publizierten Substanzen nur im Cassiarin A vorkommt, konnten zur antimikrobiellen Aktivität keine Literaturstellen hinzugezogen werden. Doch konnte durch die Versuche gezeigt werden, dass Cassiarin A und seine Analoga keine antibiotische oder antimykotische Aktivität gegenüber den getesteten Keimen zeigen. Auch ist das Zephycandidin A mit seiner Imidazo[1,2-*f*]phenanthridin-Grundstruktur in der Natur bisher einzigartig – Zhan et al.^[30] betiteln ihre Veröffentlichung mit „the first naturally occurring imidazo[1,2-*f*]phenanthridine alkaloid“ – weswegen hierzu ebenfalls keine vergleichbaren Literaturdaten vorliegen. Auch bei den Analoga des Zephycandidin A konnte keine antibiotische oder antimykotische Aktivität festgestellt werden, nur Verbindung **184** zeigt, wie bereits erwähnt, mäßige antimykotische Eigenschaften gegenüber der Bäckerhefe.



184

Abbildung 117: Die in den Testungen einzig antimykotisch aktive Substanz **184** gegenüber *Saccharomyces cerevisiae*

4.2 Bestimmung der cytotoxischen Aktivität mittels MTT-Test

Die Cytotoxizität der synthetisierten Verbindungen war in dieser Arbeit von zentraler Bedeutung. Diese wurde in ersten orientierenden Untersuchungen mit dem sogenannten MTT-Test bestimmt, welche ebenfalls in den Laboren unseres Arbeitskreises durch Martina Stadler durchgeführt wurden. Dieser Assay, der im Jahre 1983 von Mosmann entwickelt wurde^[128], ist nach der für die Testung verwendeten Verbindung (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT) benannt. Dieser gelbe, wasserlösliche Tetrazolfarbstoff wird durch alle lebenden, metabolisch aktiven Zellen reduktiv zu einem blau-violetten, wasserunlöslichen Formazan geöffnet. Die Menge an entstandenem Formazan ist dabei direkt proportional zur metabolischen Aktivität der (über-)lebenden Zellen und kann folglich zur ungefähren quantitativen Bestimmung der überlebenden Zellen herangezogen werden. Dachte man früher, dass das MTT durch mitochondriale Succinat-Dehydrogenasen reduziert wird, konnten Berridge und Tan zeigen, dass die Spaltung wahrscheinlich auf das Zusammenspiel von NADH und NADPH zurückzuführen ist^[129]. Dies bedeutet im Umkehrschluss, dass das Formazan nicht von metabolisch inaktiven – also in erster Linie toten – Zellen gebildet werden kann. Das gebildete Formazan kann anschließend – nach Zugabe von DMSO als Co-Solvens – photometrisch bei 570 nm vermessen und quantifiziert werden. Als Negativprobe wurden die Zellen lediglich mit DMSO behandelt. Durch diesen Test kann lediglich eine Aussage zur Zellviabilität nach Behandlung einer Zellsuspension mit einer Substanz getroffen werden, nicht jedoch dazu auf welche Weise der Zelltod eintritt.

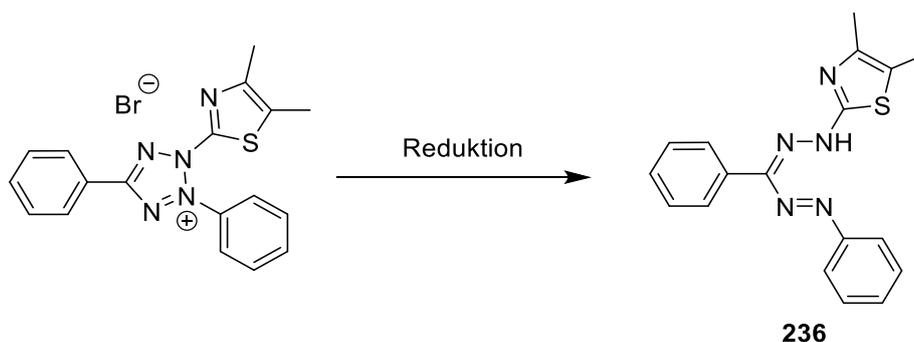


Abbildung 118: Reduktive Ringöffnung des MTT zum farbigen Formazan **236** im MTT-Assay

Zhan et al.^[30] beschrieben in ihrer Arbeit aus dem Jahr 2016, dass Zephycandidin A cytotoxische Aktivität mit IC_{50} -Werten im einstelligen mikromolaren Bereich für bestimmte Zelllinien zeigt (Abbildung 119 und Tabelle 10). Daher sollten alle synthetisierten Analoga des Zephycandidin A auf ihre cytotoxische Aktivität untersucht werden, um Struktur-Aktivitäts-Beziehungen dieser Substanzklasse zu beleuchten.

Biologische Testung

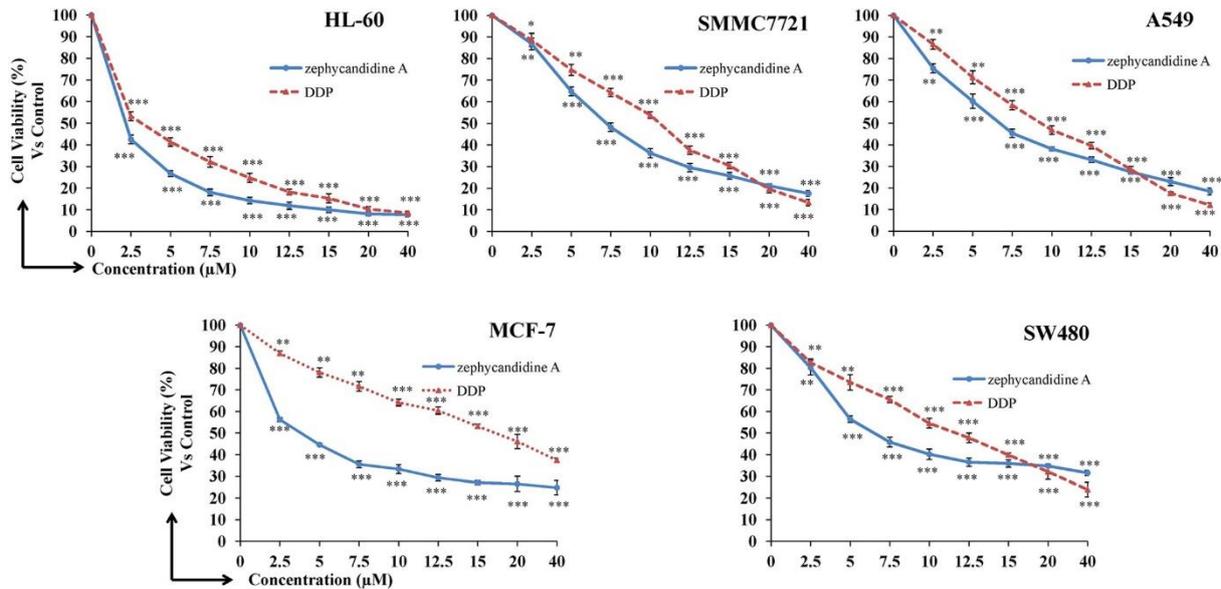


Abbildung 119: Graphische Darstellung der Testergebnisse von Zhan et al.^[30] gegenüber HL-60 (humane, myeloische Leukämie), SMMC7721 (Leberkarzinom), A549 (Lungenkarzinom), MCF-7 (Mammakarzinom) und SW480 (Kolonkarzinom). Die Werte für Zephycandidin A sind in blau dargestellt, als Referenzsubstanz wurde das Zytostatikum Cisplatin (DDP) (rote Kurven) verwendet.

Substanz	HL-60 [µM]	SMMC-7721 [µM]	A549 [µM]	MCF-7 [µM]	SW480 [µM]
Zephycandidin A	1,98	7,03	6,49	3,44	6,27
Cisplatin	3,12	9,82	8,95	18,48	11,37

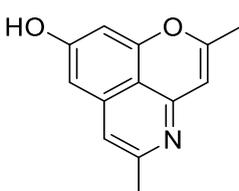
Tabelle 10: IC₅₀-Werte aus der Publikation von Zhang et al.^[30] zu Abbildung 119

Des Weiteren wurden auch alle Cassiarin A–Analoge auf ihre cytotoxische Aktivität getestet. Da in mehreren Publikationen Malariawirkstoffen cytotoxische Eigenschaften bescheinigt wurden, war diese Testung von besonderem Interesse. In mehreren, unabhängigen Studien konnte gezeigt werden, dass Chloroquin – ein Standardmedikament zur Behandlung von Malaria – cytotoxische Aktivität gegenüber verschiedenen Krebszelllinien zeigt. In diesen Studien wurde die Aktivität an Mammakarzinomen^[130], Kolonkarzinomen^[131], Bronchialkarzinomen^[132], Glioblastomen^[133] und Melanomen^[134] untersucht und bewiesen. Auch der für die Malariatherapie zugelassene Wirkstoff Artemisinin zeigte in mehreren Studien sein cytotoxisches Potential. So konnte dessen Aktivität gegenüber Mamma-^[135], Prostata-^[136], Kolon-^[137], Glioblastom-^[138], Melanom-^[139] und Bronchialkarzinomzellen^[140] in mehreren Studien gezeigt werden. Eine Dissertation über dieses Thema erarbeitete Giovanna Giampieri im Jahr 2018^[141]. Dass diese Substanzen dennoch gegen Malaria zugelassen wurden, liegt daran, dass die antiplasmodiale Aktivität die cytotoxische um ein Vielfaches übersteigt, also eine relative Selektivität vorliegt. Dadurch können die Wirkstoffe gegen Malaria in so niedrigen

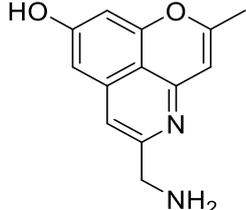
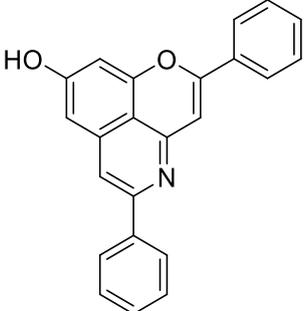
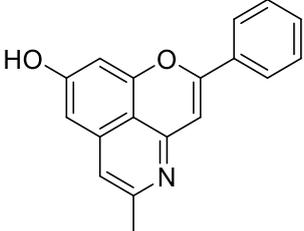
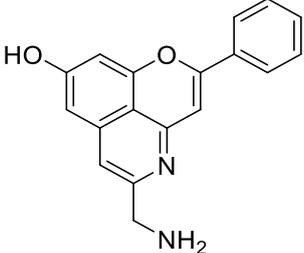
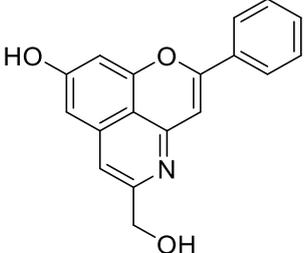
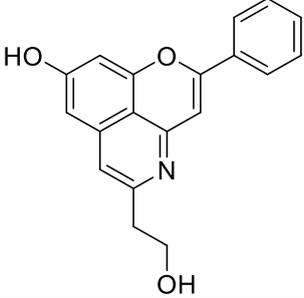
Dosierungen verwendet werden, dass sie keine nennenswerte cytotoxische Wirkung entfalten können. Zudem wurden und werden Anti-Malaria-Wirkstoffe in Kombination mit anderen Krebsmedikamenten in klinischen Studien untersucht, um eventuelle synergistische Effekte in der Krebstherapie zu erforschen^[142].

4.2.1 Testergebnisse Cassiarin A und Analoga

Alle synthetisierten Cassiarin A–Analoga sollten wie erwähnt auf ihre cytotoxische Aktivität untersucht werden. Da im Arbeitskreis lediglich die humane Leukämie Zelllinie HL-60 vorhanden war, jedoch auch Interesse an Aktivitäten bezüglich anderer Krebszelllinien bestand, wurden im Rahmen einer Kooperation ausgewählte Substanzen an Dr. Florian Lengauer (Arbeitskreis Prof. Dr. Angelika Vollmar, LMU München) zur Testung gesendet. Dabei wurden alle Substanzen auf ihre jeweilige Aktivität gegenüber einer Jurkat-Zelllinie (T-Zell-Leukämie) und einer MCF-7-Zelllinie (Mammakarzinom) getestet und der jeweilige IC₅₀-Wert bestimmt (Tabelle 11). Da die Verbindung **108** in der Testung auf Anti-Malaria-Aktivität hohe Aktivität insbesondere gegenüber der Chloroquin-resistenten Variante von *Plasmodium falciparum* gezeigt hatte, wurde diese Substanz zusätzlich auch an CCRF-CEM-Zellen (akute lymphoblastische Leukämie), HL-60-Zellen (akute myeloische Leukämie), MDA-MB-231-Zellen (Adenokarzinom) und MCF-10A-Zellen (immortalisierte, nicht-tumorigene Brustepithelzellen) getestet (Tabelle 12). Da die Testung aller Substanzen gegenüber allen hier aufgezeigten Zelllinien zu zeit- und kostenintensiv gewesen wäre, wurde lediglich **108** näher untersucht. Diese Verbindung wurde bereits vor Beginn der Testung ausgewählt, da sie in den Untersuchungen zur antiplasmodialen Aktivität (vgl. Tabelle 5, Kapitel 3.2.5) gegen die resistente Variante von *Plasmodium falciparum* die höchste Aktivität zeigt. Die Testergebnisse werden im Folgenden präsentiert:

Substanz	Strukturformel	IC ₅₀ -Wert [µM] Jurkat	IC ₅₀ -Wert [µM] MCF-7
Cassiarin A (16)		63,9	100,2

Biologische Testung

101		24,0	79,9
107		12,5	15,7
108		7,9	28,0
109		0,7	9,7
110		11,8	19,7
111		9,7	11,8

Biologische Testung

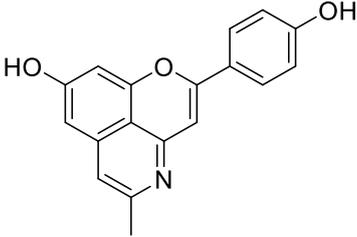
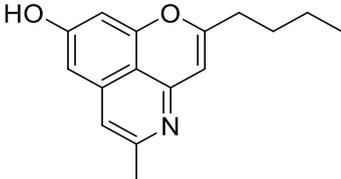
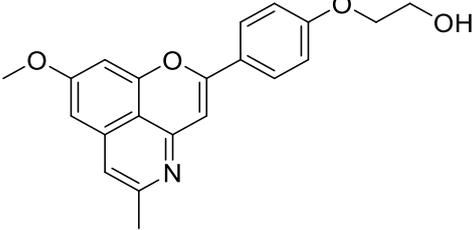
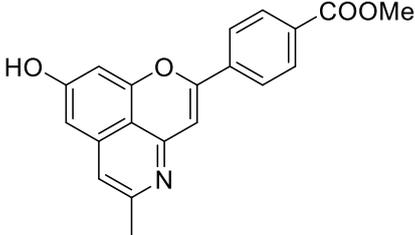
113		2,2	n.g.
134		28,4	n.g.
146		1,1	n.g.
150		unlöslich	unlöslich

Tabelle 11: Testergebnisse der synthetisierten Cassiarin A–Analoge gegenüber Jurkat- und MCF-7-Zelllinien; n.g. = nicht getestet; für Substanz **150** konnte aufgrund von Löslichkeitsproblemen kein Wert bestimmt werden.

Substanz	CCRF-CEM	HL-60	MDA-MB-231	MCF-10A
108	8,3 μ M	15,4 μ M	22,3 μ M	7,3 μ M

Tabelle 12: Ergebnisse der Testung von **108** gegenüber den genannten Zelllinien

Zusätzlich zu den ermittelten Werten wurde von Dr. Lengauer für Cassiarin A (**16**) sowie für THK 78C (**108**), THK 86C (**107**) und THK 94C (**109**) bei verschiedenen Konzentrationen die Expression von aktivierter Caspase 3 mittels Durchflusszytometrie, einer Standardmethode zur Bestimmung der aktivierten Caspase 3, ermittelt. Diese Protease spielt eine wesentliche Rolle in der Apoptose und gilt als Marker für apoptotische Zellen. Die Untersuchung der aktivierten Caspase 3 erlaubt somit eine Quantifizierung der apoptotischen Zellen. Je höher die Expression, desto mehr Zellen sind apoptotisch zu Grunde gegangen oder befinden sich im Apoptosevorgang. Aus Abbildung 120 wird deutlich, dass die aktivierte Caspase 3 vermehrt

bei Substanz **109** detektiert wird, was den Schluss zulässt, dass bei dieser Verbindung der Zelltod verstärkt durch Apoptose eintritt.

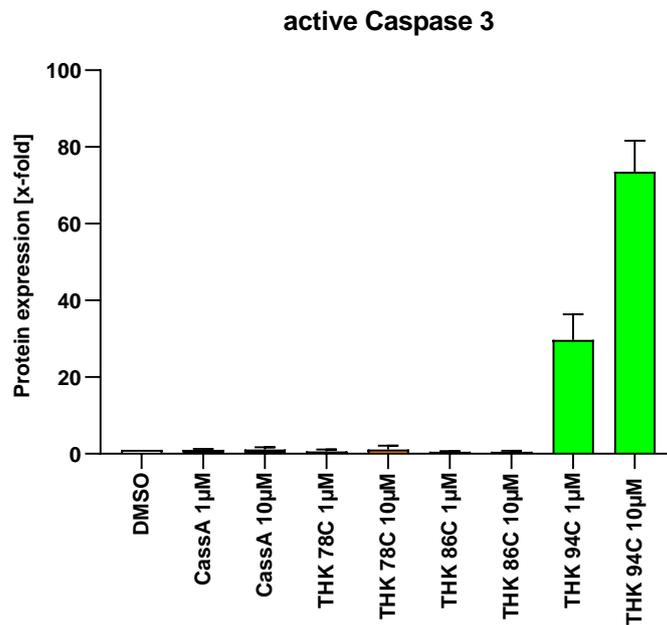
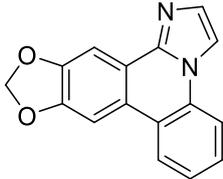


Abbildung 120: Bestimmung der aktivierten Caspase 3, einem Apoptosemarker, mittels Durchflussscytometrie.

4.2.2 Testergebnisse Zephycandidin A und Analoga

Auch die synthetisierten Analoga von Zephycandidin A wurden in Kooperation mit Dr. Florian Lengauer auf deren jeweilige zytotoxische Aktivität mittels MTT-Assay untersucht. Hier wurde ebenfalls die „erste Generation“ der Substanzen an Jurkat- und MCF-7-Zellen getestet, wobei drei Substanzen (**21**, **184** und **200**) analog zu **108** an vier weiteren Zelllinien getestet wurden (vgl. Tabelle 12).

Substanz	Strukturformel	IC ₅₀ -Wert [µM] Jurkat	IC ₅₀ -Wert [µM] MCF-7
Zephycandidin A (21)		11,7	146,6

Biologische Testung

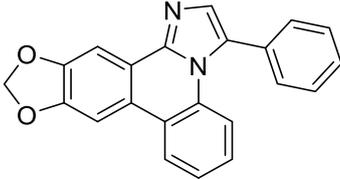
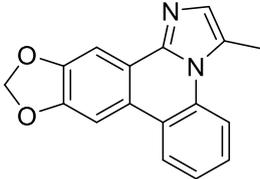
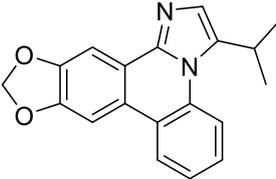
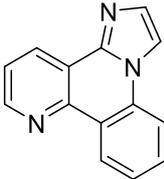
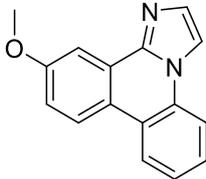
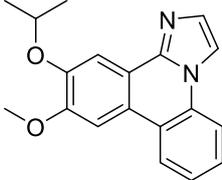
220		26,8	79,4
218		9,6	32,7
219		19,3	64,9
182		13,4	47,5
184		41,0	69,4
183		28,2	120,6
200		11,8	33,7

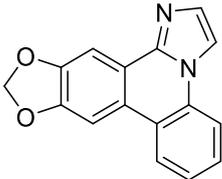
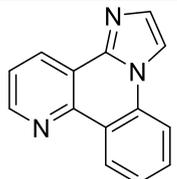
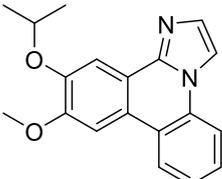
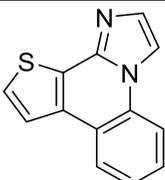
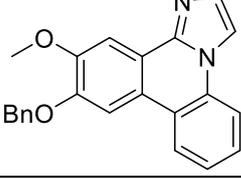
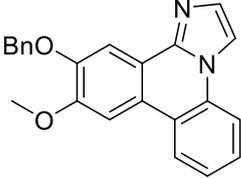
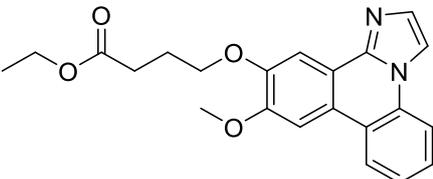
Tabelle 13: Testergebnisse der „ersten Generation“ von synthetisierten Zephycandidin A – Analoga gegenüber Jurkat- und MCF-7-Zelllinien

Substanz	CCRF-CEM	HL-60	MDA-MB-231	MCF-10A
21	19,5 µM	103,0 µM	58,7 µM	16,3 µM
184	51,3 µM	55,8 µM	63,2 µM	35,0 µM
200	10,3 µM	15,6 µM	62,3 µM	18,6 µM

Tabelle 14: Ergebnisse der Testung von **21**, **184** und **200** gegenüber den vier weiteren Zelllinien (vgl. Tabelle 12)

Biologische Testung

Nachdem nach Beendigung der Kooperation eine „zweite Generation“ von Zephycandidin A – Analoga synthetisiert wurde, wurden diese in den Laboren unseres Arbeitskreises von Martina Stadler gegenüber HL-60-Zellen getestet (vgl. Tabelle 15). Um die Vergleichbarkeit den bisherigen Testungen gegenüber zu gewährleisten, wurden die Substanzen **21**, **184** und **200** erneut getestet, da diese bereits gegen HL-60-Zellen getestet wurden.

Substanz	Strukturformel	IC ₅₀ -Wert [μM] HL-60
Zephycandidin A (21)		>50
184		>50
200		19,0
185		>50
210		>50
201		>50
203		>50

Biologische Testung

212		20,6
202		>50
211		>50

Tabelle 15: Testergebnisse der MTT-Testung von Zephycandidin A-Analoga gegenüber HL-60-Zellen

4.2.3 Diskussion der Testergebnisse und Ableitung von Struktur-Aktivitäts-Beziehungen

4.2.3.1 Cassiarin A und Analoga

Grundsätzlich können mit dem MTT-Test cytotoxische Substanzen identifiziert und die jeweilige Cytotoxizität quantifiziert werden. Als Referenzwert für das Testsystem mit HL-60-Zellen wird häufig ein IC_{50} -Wert von $5 \mu\text{M}$ verwendet, unter dem die Substanzen als signifikant zytotoxisch angesehen werden. Dieser Wert entspricht der Aktivität von Cisplatin in diesem Testsystem. Da Cisplatin gegenüber der Jurkat-Zelllinie Aktivität in derselben Größenordnung besitzt (IC_{50} ca. $5 \mu\text{M}$)^{[143][144]}, kann dieser Referenzwert auch für das Testsystem unserer Kooperationspartner angesehen werden.

Betrachtet man die Ergebnisse aus der Testung auf antiplasmodiale Aktivität und vergleicht diese mit den MTT-Testergebnissen, wird eine Korrelation der Ergebnisse deutlich. Substanzen, die hohe Aktivität gegenüber *Plasmodium falciparum* gezeigt hatten, zeigten auch signifikant cytotoxische Aktivität. Besonders deutlich zeigt sich dies bei den Verbindungen **108** und **109**, die in der Testung auf antiplasmodiale Aktivität mit IC_{50} -Werten im submikromolaren Bereich ($0,7 \mu\text{M}$ und $0,6 \mu\text{M}$) die höchsten Aktivitäten aller getesteten Substanzen zeigten, bei den MTT-Tests gegenüber den Jurkat-Zellen mit IC_{50} -Werten von $7,9 \mu\text{M}$ für **108** und $0,7 \mu\text{M}$ für **109** jedoch ebenfalls cytotoxisches Potential besitzen. Um diese Werte einordnen zu können sei erwähnt, dass die Aktivität gegenüber dem chloroquin-sensitiven Stamm von

Plasmodium falciparum (DD2) bei beiden Substanzen um das ca. 30-fache schlechter als die der Referenzverbindung Chloroquin ist, die zytotoxische Aktivität jedoch in der Größenordnung des Cisplatin liegt, was auf keine gute Selektivität hindeutet. Trotzdem können auf Basis dieser Daten einige Aussagen zur Struktur-Aktivitäts-Beziehung in Bezug auf die cytotoxische Aktivität der Cassiarin A-Analoga gemacht werden: Den größten Effekt auf die Cytotoxizität bringt die Einführung eines Aromaten an C-2. Während Substanzen mit Methylresten an C-2 nur mäßige Aktivität aufweisen (IC_{50} -Werte von 63,9 μM für **16** und 24,0 μM für **101**) sind die Verbindungen mit Phenylresten an C-2 um ein Vielfaches aktiver (IC_{50} -Werte von 7,9 μM für **108** und 0,7 μM für **109**). Diese Aktivität kann noch gesteigert werden, indem der Aromat an C-2 zusätzlich substituiert ist. Dies lässt sich aus den Aktivitäten des Substanzpaares aus **108** (IC_{50} -Wert = 7,9 μM) und **113** (IC_{50} -Wert = 2,2 μM) ableiten. Noch höhere Aktivität ist bei **146** zu beobachten (IC_{50} -Wert = 1,1 μM). Bei dieser Verbindung ist jedoch im Vergleich zu **113** sowohl das Phenol an C-8 mit einer Methylgruppe als auch das Phenol des Aromaten an C-2 mit einer Hydroxyethylgruppe verethert. Durch die Variierung von **113** an zwei Positionen ist es jedoch nicht möglich eine gesicherte Aussage darüber zu treffen, welche Substitution eine Erhöhung bzw. eine Erniedrigung der Aktivität bringt. Aussagekräftiger ist die Datenlage für den „Süden“ des Moleküls: Durch die Substitution der Methylgruppe an C-5 durch einen Aromaten nimmt die cytotoxische Aktivität ab. Ersichtlich wird dies durch den Vergleich von **108** (Methylrest, IC_{50} -Wert = 7,9 μM) und **107** (Phenylrest, IC_{50} -Wert = 12,5 μM). Eine deutliche Erhöhung der Aktivität bringt jedoch der Austausch der C-5 Methylgruppe durch eine Aminomethylgruppe. Bei Betrachtung der Substanzpaare **16** (IC_{50} -Wert = 63,9 μM) und **101** (IC_{50} -Wert = 24,0 μM) sowie **108** (IC_{50} -Wert = 7,9 μM) und **109** (IC_{50} -Wert = 0,7 μM) wird dies deutlich. Wird die C-5-Aminomethyl-Gruppe durch eine Hydroxymethyl- (**110**, IC_{50} -Wert = 11,8 μM) oder eine Hydroxyethyl-Gruppe (**111**, IC_{50} -Wert = 9,7 μM) ersetzt, sinkt die Aktivität jedoch. Vermutlich spielt die Basizität der Aminogruppe eine entscheidende Rolle für die cytotoxische Aktivität.

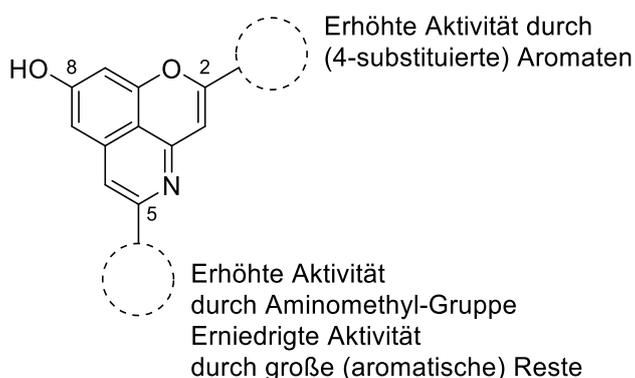


Abbildung 121: Übersicht der Struktur-Aktivitäts-Beziehungen für Cassiarin A und Analoga für cytotoxische und antiplasmodiale Aktivität

Zudem konnte durch die deutlich höhere Expression von Caspase 3 gezeigt werden, dass der Zelltod bei Behandlung mit **109** apoptotisch abläuft (Abbildung 120). Diese Besonderheit könnte durch die sogenannte lysosomale Ionenfalle ausgelöst werden. Hierbei gelangt die Substanz in die Lysosomen, wird dort an der Aminogruppe protoniert und kann das Lysosom nicht mehr verlassen. Beschrieben wurde ein derartiges Phänomen unter anderem an den Beispielen Hydroxychloroquin und Azithromycin^[145]. Die im Lysosom gefangene Substanz kann nun mit intralysosomalen Enzymen interagieren (z.B. Phospholipasen) und so der Zelle Stress zufügen und die Apoptose triggern. Dieser Prozess wurde unter anderem von Quiros et al. für die (Nephro-)Toxizität von Aminoglykosiden beschrieben, insbesondere am Beispiel von Gentamicin^[146].

Wie bereits in Kapitel 3.4 erwähnt wurde, wurde zur Identifizierung von Targetproteinen von Cassiarin A-Analoga das clickbare Cassiarin A-Analogon **166** zur Testung mittels Y3H-Screening an unsere Kooperationspartnerin Prof. Dr. Simone Moser geschickt. Die Testungen ergaben Interaktionen mit 26 Targetstrukturen, von denen 9 bereits sequenziert wurden. Die vollständigen Daten aller Zielverbindungen lagen jedoch noch nicht vor.

4.2.3.2 Zephycandidin A

Wie den Tabellen 14 und 15 entnommen werden kann, konnten die Literaturwerte von Zhan et al.^[30] (vgl. Tabelle 10) nicht bestätigt werden. Ferner zeigen sich beim Vergleich der IC₅₀-Werte gegen HL-60- und MCF-7-Zellen massiv unterschiedliche Werte. Der postulierten, signifikanten cytotoxischen Aktivität von Zephycandin A gegenüber den HL-60-Zellen von 1,98 µM – aktiver als Cisplatin – steht ein ermittelter IC₅₀-Wert von 103,0 µM entgegen. Die Schwelle, bei der Substanzen als nicht signifikant cytotoxisch eingestuft werden, beträgt 50 µM. Auch für die Brustkrebszelllinie MCF-7 finden sich mit 3,4 µM bei Zhan et al. ein signifikant niedrigerer IC₅₀-Wert als in unseren Testungen mit 146,6 µM. Zur Einordnung dieser Werte fallen zwei Dinge ins Auge: Zum einen sind die Verdünnungen, mit denen die IC₅₀-Werte bei Zhan et al. bestimmt werden nicht sinnvoll (vgl. Abbildung 119). Beispielhaft steht hier die Ermittlung des IC₅₀-wertes gegenüber den HL-60-Zellen. Hier befindet sich der Wert (1,98 µM) bereits vor der kleinsten Verdünnung von 2,5 M, was den Fehler der Methode deutlich erhöht. Sinnvoller wäre es gewesen diesen Versuch mit niedrigeren Konzentrationen zu wiederholen, um einen präziseren und richtigeren IC₅₀-Wert zu erhalten. Dies allein kann jedoch die deutlichen Unterschiede zwischen den von uns gemessenen Werten und den Literaturwerten nicht erklären.

Eine Erklärung dafür findet sich jedoch bei näherer Betrachtung in der Substanzbeschreibung von Zephycandidin A bei Zhan et al.^[30]. Diese beschreiben Zephycandidin A nach Extraktion und Aufreinigung als farbloses Öl, wohingegen die synthetisierte Substanz als ein weißer Feststoff gewonnen werden konnte, was andere Veröffentlichungen, die bereits Zephycandidin A synthetisch darstellten, bestätigen (Lee et al.^[41], Sheng et al.^[39] und Murphy et al.^[37]). Auch eine Bestimmung der Reinheit der Substanz mittels HPLC-System wurde nicht durchgeführt, was für Substanzen, die anschließend auf biologische Eigenschaften getestet werden, eigentlich obligatorisch ist. Besonders auffällig ist, dass die NMR-Daten der Publikation nicht vollständig sind. Das ¹H-NMR wurde nur im Bereich 5-10 ppm, das ¹³C-NMR im Ausschnitt von 45-175 ppm abgebildet (vgl. Abbildung 122). Durch die fehlende Abbildung des aliphatischen Bereichs der Spektren geht ein wesentlicher Teil der Information über die Substanz verloren. Da Substanzen mit hohem Anteil aliphatischer Verunreinigen zur Ölbildung neigen, kann damit auch der falsch beschriebene Aggregatzustand erklärt werden. Offensichtlich haben diese Verunreinigungen auch einen beträchtlichen Einfluss auf die cytotoxische Aktivität des Substanzgemisches, worauf die großen Unterschiede der Ergebnisse der biologischen Testungen hindeuten.

Biologische Testung

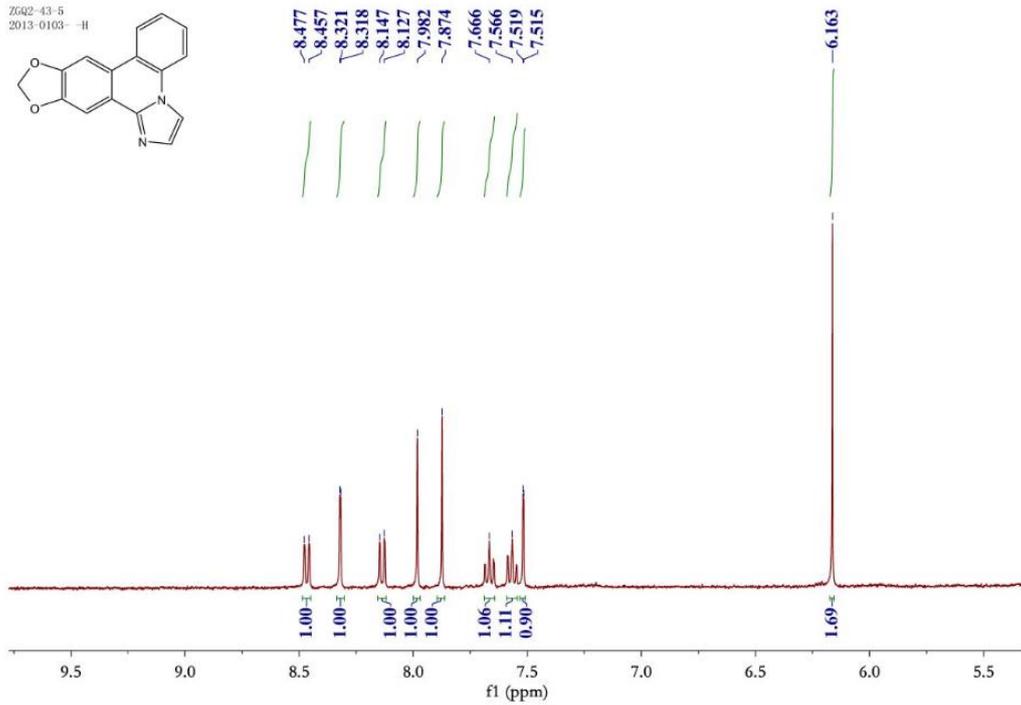


Figure S10. ^1H NMR spectrum of **1** (CD_3OD , 400 MHz)

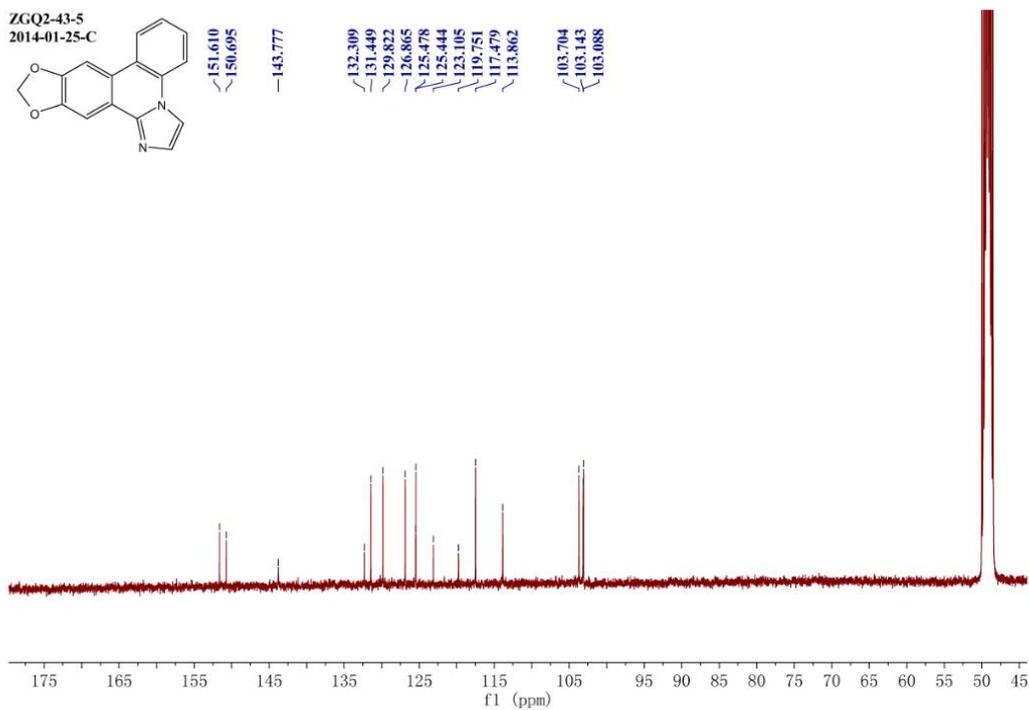


Figure S11. ^{13}C NMR spectrum of **1** (CD_3OD , 100 MHz)

Abbildung 122: ^1H - und ^{13}C -NMR Spektren von Zephycandin A aus der Publikation von Zhan et al. [30]. Deutlich zu sehen ist, dass beide Spektren jeweils in dem Bereich abgeschnitten sind, in dem aliphatische Signale zu erwarten sind

Somit ist davon auszugehen, dass die Testergebnisse von Zhan et al. mit verunreinigtem Zephyrcandidin A generiert wurden, was die Aussagekraft der Ergebnisse auf ein Minimum reduziert.

Bei Betrachtung der eigenen Testergebnisse kann man mit Ernüchterung feststellen, dass keine Substanz die erhofften, durchschlagenden cytotoxischen Effekte zeigt, die aus der Publikation von Zhan et al.^[30] zu erwarten waren. Gegenüber den Jurkat-Zellen konnte die Aktivität der Leitstruktur **21** (IC_{50} -Wert = 11,7 μ M) durch die Einführung einer Methylgruppe zu **218** am Imidazolring leicht gesteigert werden (IC_{50} -Wert = 9,6 μ M), was jedoch zu keiner erheblichen Verstärkung des cytotoxischen Effekts führt. Isobutyl- oder Phenylreste an dieser Position (Verbindungen **219** und **220**) zeigten jedoch wieder deutlich geringere Aktivität, was bedeutet, dass größere Reste hier offensichtlich nicht toleriert werden. Der gängigen Referenzsubstanz Cisplatin (IC_{50} -Wert ca. 5 μ M)^{[143][144]} sind somit alle Verbindungen unterlegen. Auch Variationen der Methylendioxy-Struktur der „ersten Generation“ (Tabelle 5 und 6) führten zu keiner erhöhten Aktivität. Ferner kann man aus den Werten ablesen, dass das Fehlen einer Methoxygruppe (**183**) eine deutliche Abnahme der Aktivität zur Folge hat. Gänzlich eliminiert wird jegliche Aktivität, wenn Ring A keine Reste trägt und durch einen Heteroaromaten ersetzt wird (**184** und **185**). Bei den Testungen der „zweiten Generation“ (Tabelle 7) konnten gegenüber HL-60 Zellen lediglich zwei Substanzen eine moderate aber vernachlässigbare Aktivität aufweisen (**200** und **212**). Aufgrund der Tatsache, dass nur diese beiden Verbindungen cytotoxische Aktivität aufweisen, lassen sich keine eindeutigen Rückschlüsse auf Struktur-Aktivitäts-Beziehungen ableiten.

Wie eingangs beschrieben (Kapitel 2.1.2), sollten auch mittels Y3H-Screening für Zephyrcandidin A-Analoga Targetstrukturen identifiziert werden. Da die Substanz jedoch wider Erwarten keine bzw. vernachlässigbare cytotoxische Aktivität aufweist, macht eine Untersuchung auf mögliche Zielproteine keinen Sinn. Daher wurden diesbezüglich keine Bemühungen unternommen.

5 Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung von Syntheserouten für den antiplasmodial wirksamen Naturstoff Cassiarin A (erstmalig 2007 von Morita et al. beschrieben^[14]) und den cytotoxisch aktiven Naturstoff Zephycandidin A (erstmalig 2016 von Zhan et al. beschrieben^[30]), sowie die Synthese von Strukturanaloga dieser beiden Verbindungen und deren Testung auf biologische Aktivität, um Struktur-Aktivitäts-Beziehungen zu analysieren.

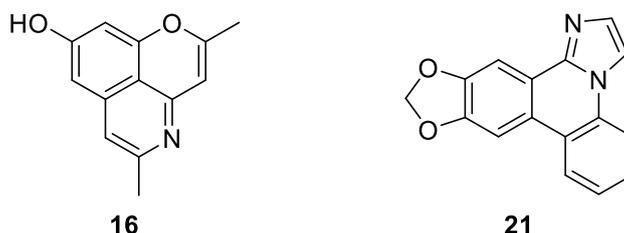


Abbildung 123: Die beiden Naturstoffe Cassiarin A (**16**) und Zephycandidin A (**21**)

5.1 Darstellung von Cassiarin A und dessen Analoga

Da für Cassiarin A in der Literatur bereits Totalsynthesen zu finden sind, diese Syntheserouten jedoch für die Darstellung von Analoga nur begrenzt einsetzbar sind, sollte eine neue Route entwickelt werden, mit der sich Analoga des Naturstoffs eleganter darstellen lassen. Zentraler Schritt sollte dabei eine reduktive Ringöffnung eines Isoxazols und anschließende doppelte Cyclokondensation dienen.

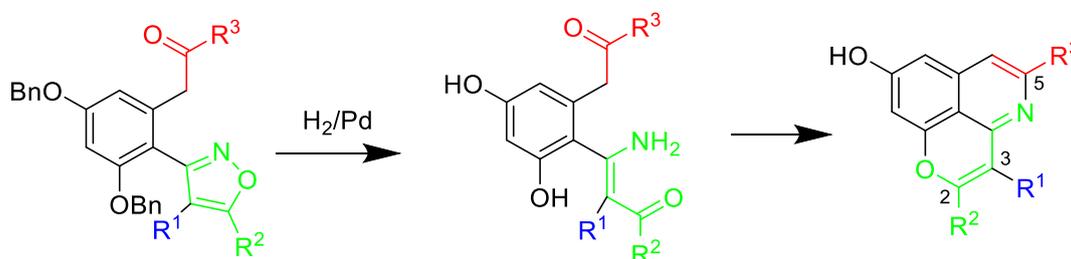


Abbildung 124: Geplante reduktive Ringöffnung des Isoxazols und doppelte Cyclokondensation zum Cassiarin A und Analoga

In Musterreaktionen sollte die Darstellung des 3,5-disubstituierten Isoxazols (**51**) ausgehend von 2,4,6-Trimethoxybenzaldehyd (**48**) untersucht werden, wobei die Synthese selbst über mehrere Routen nicht gelang (Abbildung 125). Dabei wurde die Darstellung der Isoxazole

Zusammenfassung

über Huisgen-Cycloaddition, durch Reaktion von *N*-Hydroxy-4-toluolsulfonamid mit dem α,β -ungesättigten Keton **52**^[48] und mittels elektrophiler Cyclisierung nach einem Protokoll von Waldo und Larock^[49] versucht. Die elektrophile Cyclisierung führte zwar zur Bildung eines Isoxazols **56**, jedoch wurde diese Route aufgrund ihrer schlechten Ausbeute und ihrer vergleichsweise vielen Schritte nicht weiter verfolgt.

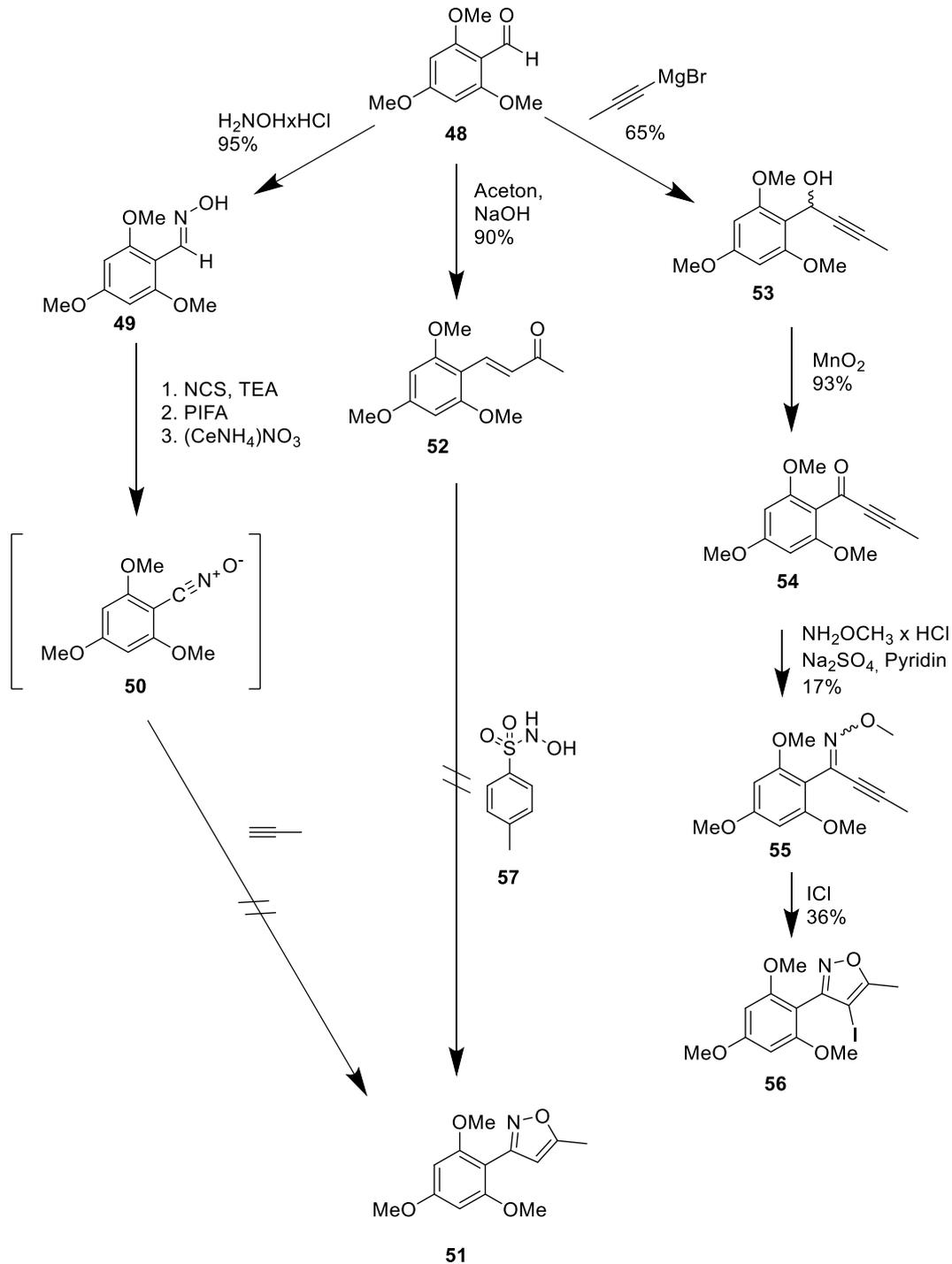


Abbildung 125: Übersicht der Versuche zur Synthese des 3,5-disubstituierten Isoxazols **51**. Der linke Ast stellt die Darstellung über eine 1,3-dipolare Cycloaddition, der mittlere Ast die Darstellung nach dem Protokoll von Tang et al.^[48] und der rechte Ast die elektrophile Cyclisierung nach Waldo und Larock^[49] dar.

Zusammenfassung

Auch Musterreaktionen zur Synthese 3,5-disubstituierter Isoxazole mittels Palladium-katalysierter Kreuzkupplung scheiterten. Zuletzt wurde in einer Musterreaktion die Rhodium-katalysierte Oxomethylierung von 3,5-Diphenylisoxazol (**89**) mit dem Sulfoxoniumylid **88** versucht, um einen Baustein zur Synthese von Analoga von Cassiarin A zu synthetisieren. Aber auch dieser Versuch lieferte nicht das erhoffte Ergebnis. Daher wurden die Bemühungen zur Etablierung einer neuen Route zur Synthese von Cassiarin A über ein Isoxazol Intermediat verworfen.

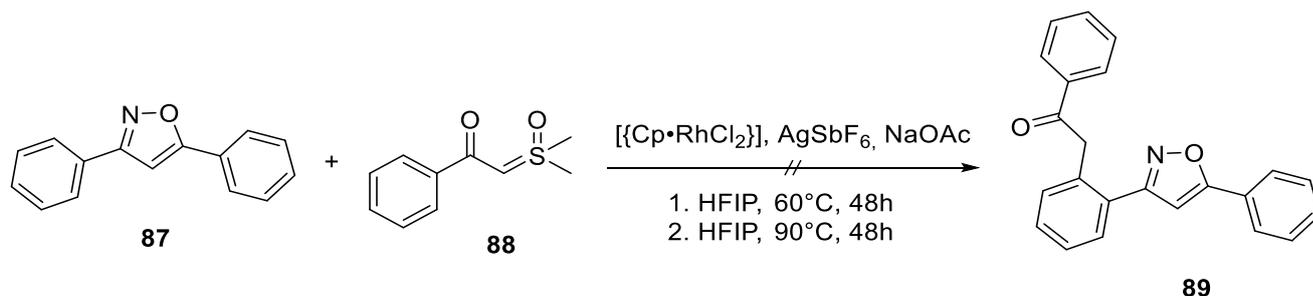


Abbildung 126: Gescheiterte Versuche der Rhodium-katalysierten Oxomethylierung mittels Sulfoxoniumylid **88** unter Verwendung eines Isoxazols (**89**) als dirigierende Gruppe

Da die Darstellung von Cassiarin A auf diesem Weg nicht gelang, wurde im weiteren Verlauf dieser Dissertation auf literaturbekannte Syntheserouten zu Cassiarin A zurückgegriffen und diese erweitert, um Strukturanaloga des Cassiarin A zugänglich machen zu können. Zunächst wurde die von Morita et al.^[17] publizierte Synthese als Grundlage verwendet. Dabei wurde zunächst die Darstellung des Chromenons Noreugenin (**28**) als Reaktion in einem Mikrowellenreaktor optimiert, welches als Edukt der Syntheseroute dient. Anschließend selektive Schützung der C-7 Hydroxygruppe und Triflierung der C-5 Hydroxygruppe nach dem Protokoll von Morita et al.^[17] lieferten das Triflat **29**. Dieses wurde in einer Sonogashira-Kupplung zum 5-Alkinchromenon **30** umgesetzt. Die dabei in der Literatur angegebenen Ausbeuten konnten jedoch auch nach Optimierung der Reaktion nicht erreicht werden. Um den aufwändigen Anellierungsschritt der etablierten Synthese zu vereinfachen, wurde die silberkatalysierte Darstellung von Isochinolinen, die von Reddy et al.^[77] entwickelt wurde, auf die Cyclisierung des 5-Alkinylchromenons **30** adaptiert. Anschließend saure Entschützung der MOM-Gruppe lieferte die Leitstruktur **16**. Dadurch konnte Cassiarin A in 9% Gesamtausbeute gewonnen werden. Über diese Route wurden sodann Analoga des Cassiarin A synthetisiert. Durch die Verwendung von kommerziell erwerbbarer Chrysin (**102**) bzw. Apigenin (**112**) als Edukt anstelle des selbst synthetisierten Noreugenins (**28**) konnte die Methylgruppe an C-2 durch einen Phenylrest (Edukt: Chrysin) oder 4-Hydroxyphenylrest (Edukt: Apigenin)

Zusammenfassung

ausgetauscht werden. Durch Verwendung verschiedener Alkine kann über diese Route zudem die C-5 Position des Cassiarin A flexibel variiert werden.

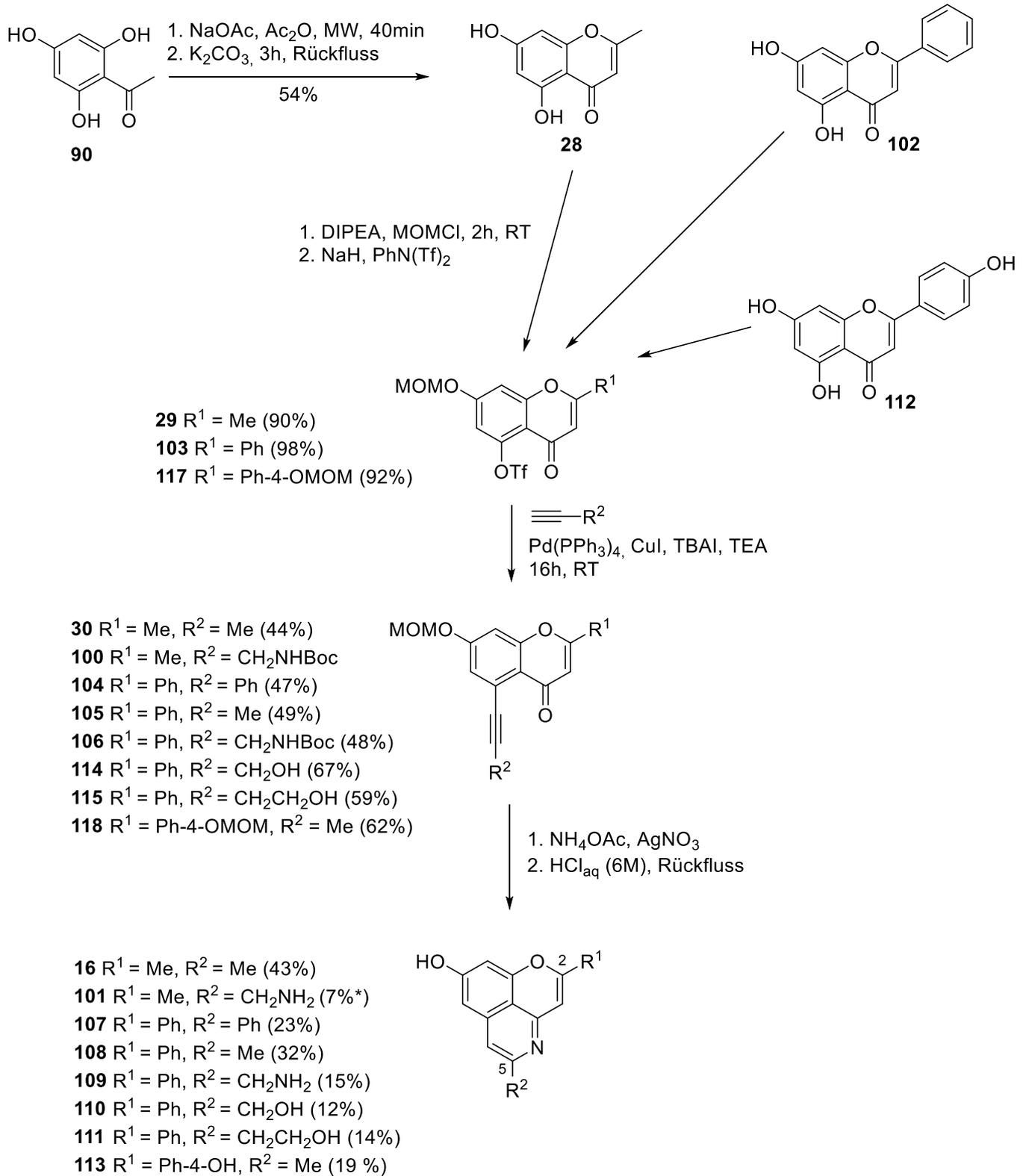


Abbildung 127: Darstellung von Cassiarin A (**16**) und Analoga **101**, **107-111** und **113** ausgehend von Noreugenin (**28**) bzw. Chrysin (**102**) und Apigenin (**112**). *Die Verbindung **100** konnte nicht analysenrein gewonnen werden, daher wurde für **101** die Ausbeute über die letzten beiden Schritte bestimmt

Zusammenfassung

Da auf dieser Route Variationen der C-2 Position stets zu Beginn der Synthesefolge eingeführt werden müssen, sollte die Syntheseroute von Gutiérrez et al.^[34] optimiert werden, um variable Reste an dieser Position später einführen zu können. Aufgrund von Stabilitätsproblemen mit dem hydrolyseempfindlichen Edukt 1-(Brommethyl)-3,5-bis(methoxymethoxy)benzen wurde auf das kommerziell erwerbliche 3,5-Dimethoxybenzylbromid (**122**) zurückgegriffen. Dieses wurde zusammen mit Iodmethan verwendet, um Tosylmethylisocyanid (TosMIC) sukzessive zweifach zu alkylieren. Dabei auftretende Nebenreaktionen verhinderten gute Ausbeuten der Reaktion. Das Produkt **123** konnte jedoch auch nach Optimierungsversuchen lediglich in 36% Ausbeute dargestellt werden. Anschließende Heterocyclisierung mit *N*-Iodsuccinimid als Elektrophil lieferte das 1-Iodisochinolin in 66% Ausbeute. Nach Sonogashira-Reaktion mit verschiedenen Alkinen, gefolgt von der Entschützung der Methoxygruppen mit Bortribromid und Cyclisierung in einem Schritt, konnten Cassiarin A und ein weiteres Analogon mit Butylrest an C-5 dargestellt werden (vgl. Abbildung 128).

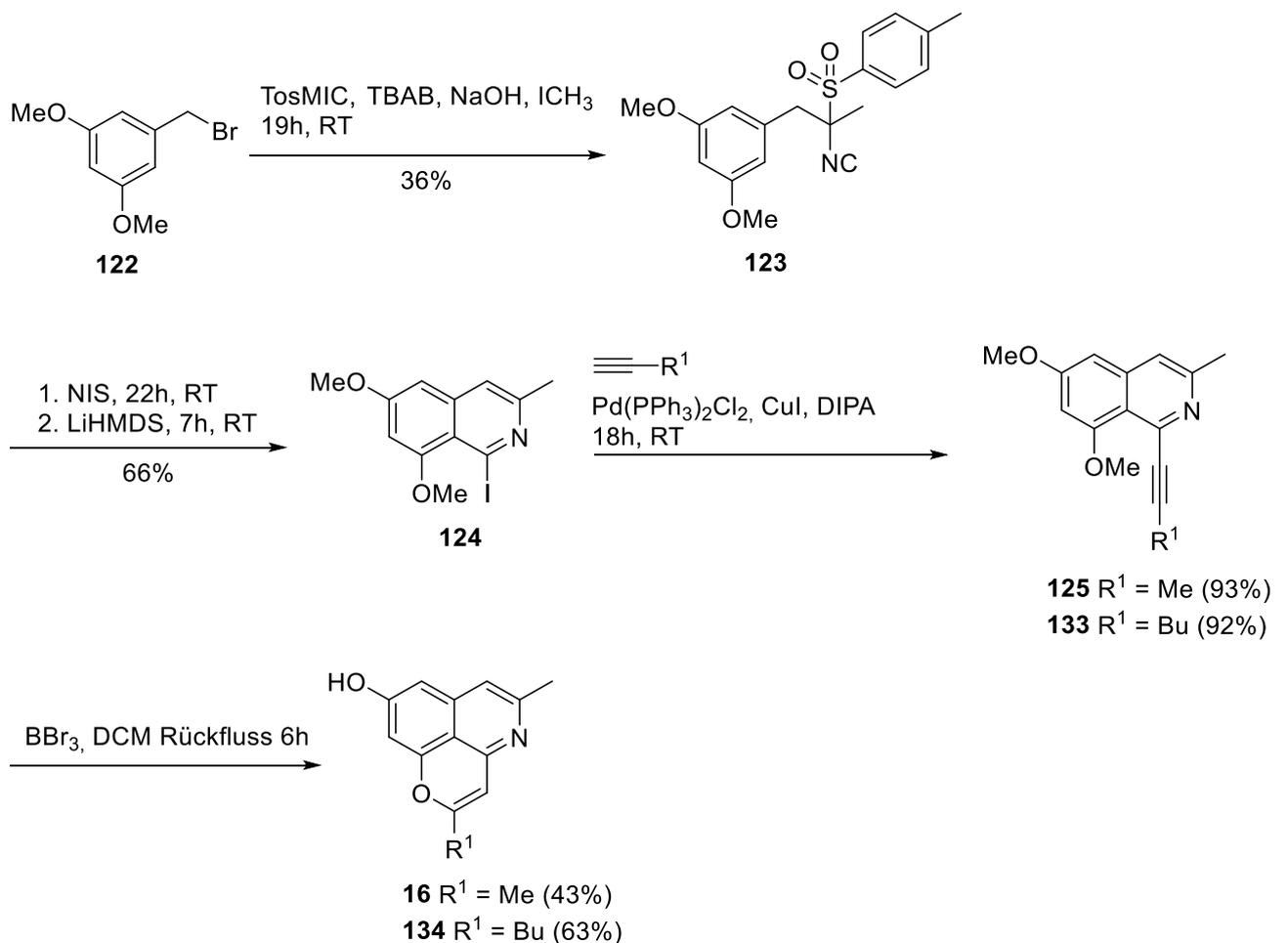


Abbildung 128: Darstellung von Cassiarin A (**16**) und dem Analogon **134** über die modifizierte Syntheseroute nach Gutiérrez et al.^[34]

Zusammenfassung

Um die Cassiarin A-Analoga in einem yeast-three-hybrid (Y3H) Screening auf mögliche molekulare Targetstrukturen zu untersuchen sollte ein Derivat synthetisiert werden, das ein terminales Alkin trägt, welches mithilfe von Click-Chemie mit einem Trimethoprim-Linker Molekül, welches ein terminales Azid trägt, verbunden werden kann. Die Synthese des Trimethoprim-Linker-Moleküls wird in Kapitel 5.3 zusammengefasst beschrieben. Mithilfe dieser neu entstandenen Verbindung können anschließend Targetstrukturen von Cassiarin A identifiziert werden. Da diese Verbindungen noch Aktivität besitzen müssen, um aussagekräftige Ergebnisse zu erzielen, sollte eine Verbindung synthetisiert werden, die das TMP-Linker-Cassiarin A-Konstrukt simuliert. Dazu wurde das Alkin **139** synthetisiert und nach der zuvor etablierten Route mittels Sonogashira-Reaktion an das Isochinolin **124** gekuppelt. Anschließende Entschützung der Methoxygruppen und Cyclisierung mit Bortribromid lieferte jedoch nicht das gewünschte Molekül. Da die Oligoethylengruppe labiler als die C-6 Methoxygruppe des Isochinolins war, wurde der Ether in der Kette gespalten, die Methoxygruppe blieb jedoch unberührt, was in Verbindung **141** resultierte (Abbildung 129).

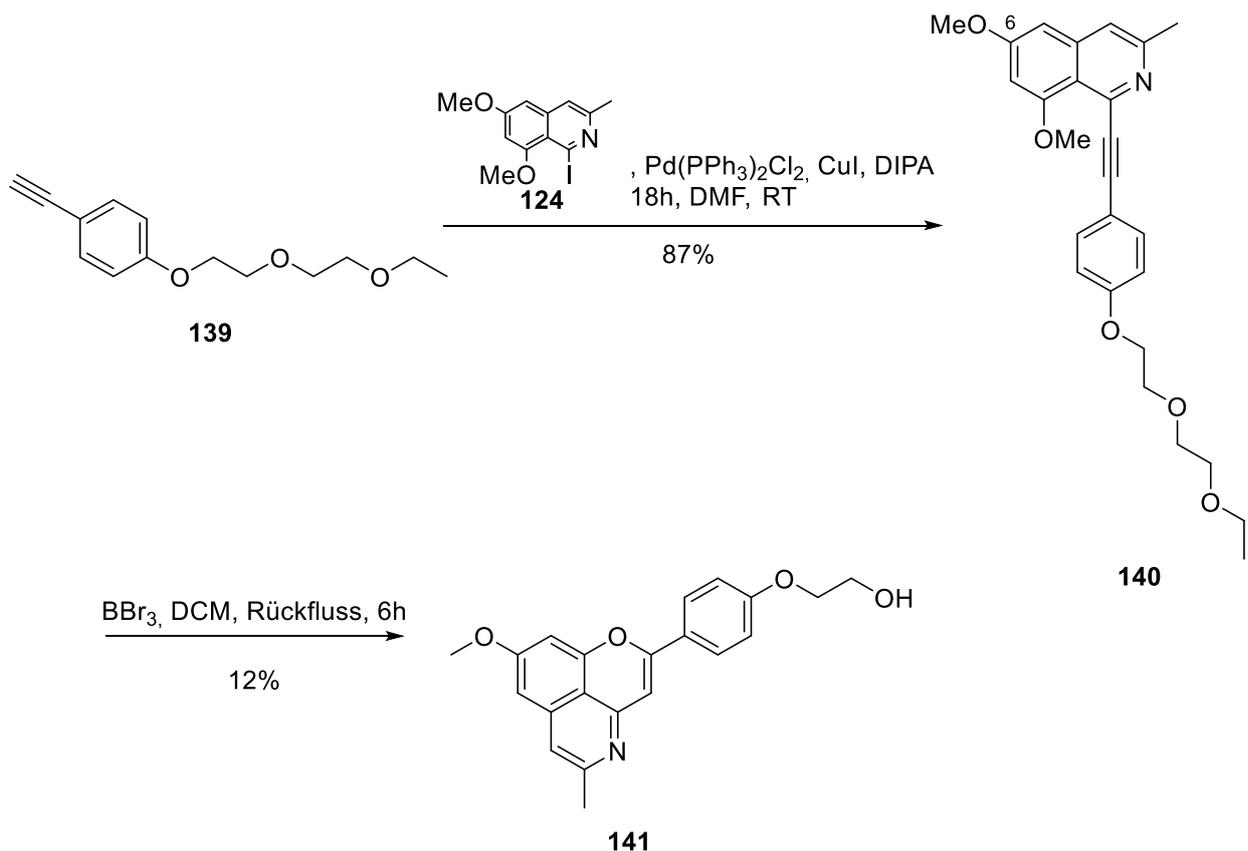


Abbildung 129: Darstellung von **141** durch höhere Labilität der Seitenkette als die C-6 Methoxygruppe von **140**

Zusammenfassung

Da eine Darstellung eines mit einem Trimethoprim über einen Linker verknüpften Moleküls auf diesem Weg nicht möglich war, wurden andere Möglichkeiten untersucht, um ein Y3H-Screening möglich zu machen. Weil für die Testung mittels Y3H-Screening von mir auch ein Trimethoprim-Derivat mit Aminogruppe synthetisiert wurde, sollte ein Cassiarin A-Analogon mit terminaler Carbonsäure synthetisiert werden, um damit das TMP-Linker-Cassiarin A Molekül mittels einer Amidsynthese darzustellen. Da sich für diese Synthese nach mehreren Versuchen die Methoxy-Schutzgruppen als nicht praktikabel zeigten, wurde in Anlehnung an Protokolle von Kendall et al.^[94] und Rudyanto et al.^[31] das MOM-geschützte Isochinolin **164** synthetisiert, welches mit kommerziell erwerblichem Methyl-4-ethinylbenzoat mittels Sonogashira-Kupplung zum 1-Alkinylisochinolin **165** umgesetzt werden konnte. Entschützung mittels Salzsäure und Cyclisierung zum Cassiarin A-Analogon **150** folgten anschließend. Unglücklicherweise blieb die Spaltung des Methylethers zur Verbindung **135** auch unter Anwendung mehrerer Protokolle erfolglos (Abbildung 130).

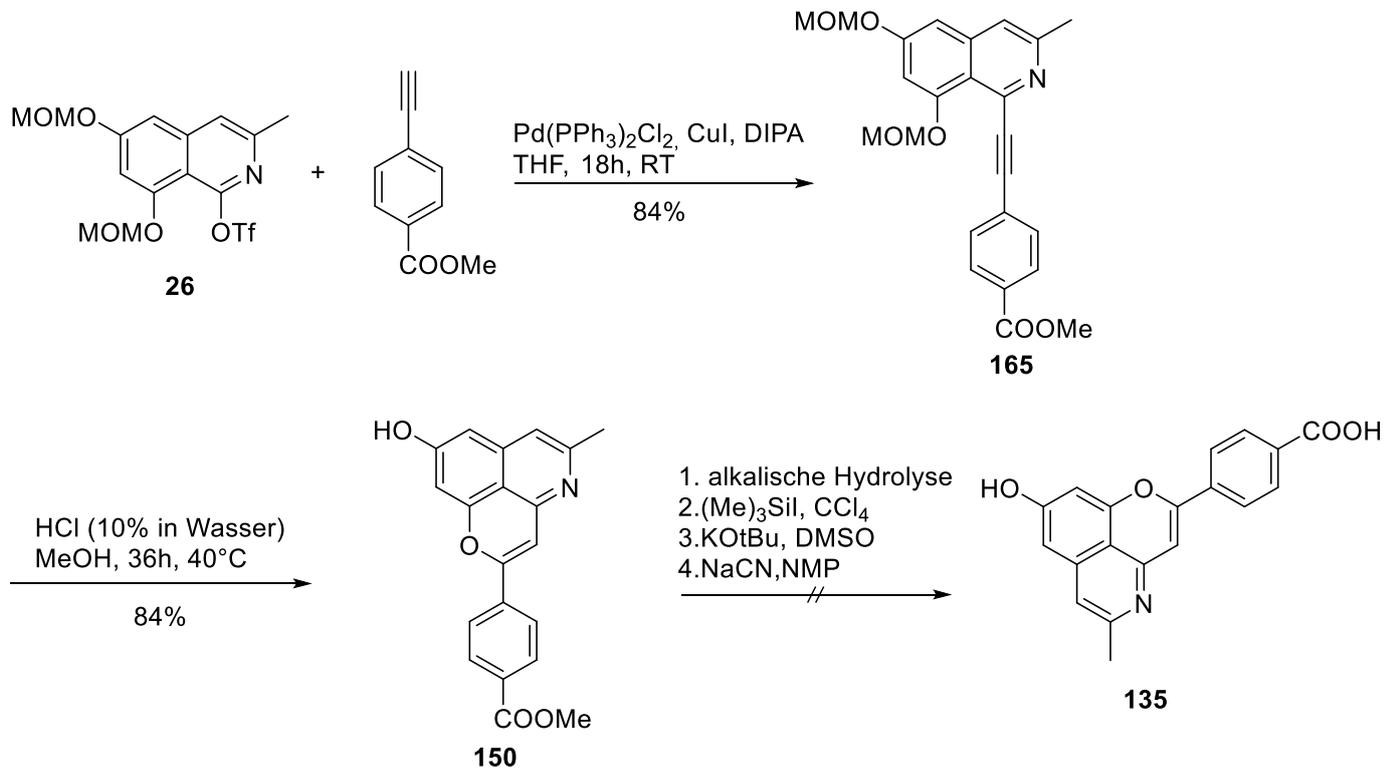


Abbildung 130: Versuchte Darstellung der Carbonsäure **135**

So wurde beschlossen, die phenolische Hydroxygruppe am Cassiarin A-Grundkörper mit Propargylbromid zu verethern, um eine clickbare Verbindung zu generieren. Die Verbindung **166** wurde unseren Kooperationspartnern übergeben. Die Testungen ergaben Interaktionen mit 26 Targetstrukturen, von denen 9 bereits sequenziert wurden. Die vollständigen Daten aller Zielverbindungen lagen jedoch noch nicht vor.

Zusammenfassung

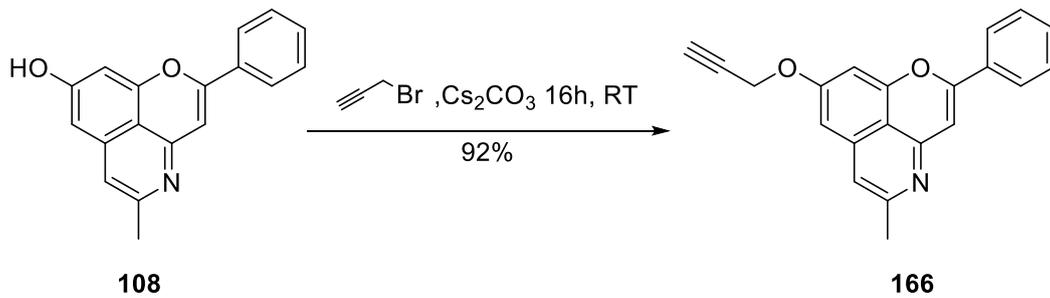


Abbildung 131: Darstellung des „clickbaren“ Cassiarin A-Analogons **166**

Bei den Testungen auf antiplasmodiale Eigenschaften, durchgeführt im Arbeitskreis von Prof. Dr. Gabriele Pradel (RWTH Aachen), stellten sich gegen einen Chloroquin-sensitiven Stamm von *Plasmodium falciparum* (3D7) vor allem die Verbindungen **108** (IC₅₀-Wert = 0,7 µM) und **109** (IC₅₀-Wert = 0,6 µM) als potenteste Vertreter der getesteten Substanzen dar. Insbesondere gegen den Chloroquin-resistenten Stamm DD2 von *Plasmodium falciparum* konnten mit IC₅₀-Werten von 0,9 µM (**108**) und 1,6 µM (**109**) ermutigende Ergebnisse erzielt werden. Somit konnte die Aktivität von Cassiarin A (IC₅₀-Wert = 18 µM) durch gezielte Strukturvariationen deutlich gesteigert werden. Jedoch lagen lediglich die Testergebnisse der Verbindungen **16**, **101** und **107-109** vor. Die übrigen Cassiarin A-Analoga wurden ebenfalls vor Monaten zur Testung an den Kooperationspartner geschickt, jedoch stehen die Ergebnisse noch aus.

Zudem konnte von unserem weiteren Kooperationspartner Dr. Florian Lengauer (damals Arbeitskreis Prof. Angelika Vollmar, LMU München) in einem MTT-Assay eine Korrelation zwischen antiplasmodialer und cytotoxischer Aktivität gezeigt werden. So zeigte Verbindung **109** mit einem IC₅₀-Wert von 0,7 µM gegenüber der Jurkat-Zelllinie Aktivität im submikromolaren Bereich. Auch die versehentlich synthetisierte Verbindung **141** war mit einem IC₅₀-Wert von 1,1 µM cytotoxisch potent. Alle anderen synthetisierten Verbindungen, mit Ausnahme der Leitstruktur Cassiarin A, besitzen ebenfalls IC₅₀-Werte im Bereich von 2,5 µM bis 28,4 µM. Prinzipiell lässt sich sagen, dass die cytotoxischen und die antiplasmodialen Aktivitäten miteinander korrelieren. Daher kann keine Substanz als selektiv cytotoxisch oder antiplasmodial gesehen werden. Auffällig dabei war, dass aromatische Reste an Position C-2 mit einer deutlichen Verbesserung der cytotoxischen und antiplasmodialen Aktivität einhergehen. Große Reste an Position C-5 verringern jedoch die Aktivität, wobei die kleine, protonierbare Methylamin-Struktur von **109** die Aktivität deutlich erhöht. Auch scheint eine freie Hydroxygruppe an Position C-8 nicht essentiell für die Wirkung zu sein, da **141** mit veretherter C-8 Hydroxygruppe ebenfalls hohe Aktivitäten besitzt. Weitere Variationen dieser funktionellen Gruppe wurden jedoch noch nicht realisiert, könnten jedoch für zukünftige Forschungsprojekte eine interessante und leicht zu funktionalisierende Gruppe darstellen. Be-

Zusammenfassung

sonders ermutigend für weitere Forschungsansätze war, dass durch Bestimmung der Expression von Caspase 3 – einem Apoptosemarker – gezeigt werden konnte, dass Zellen durch Behandlung mit der Substanz **109** vermehrt apoptotisch zu Grunde gehen.

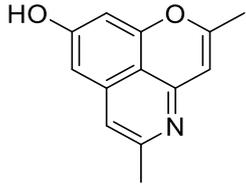
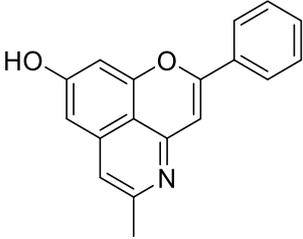
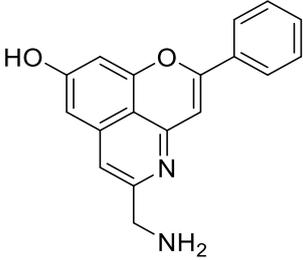
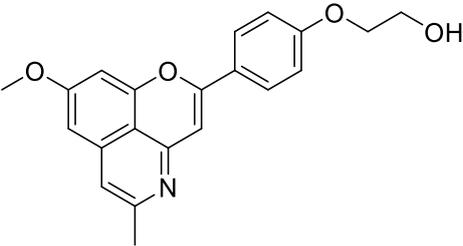
Substanz	Strukturformel	IC ₅₀ -Wert gegen <i>Plasmodium falciparum</i> (3D7) [μM]	IC ₅₀ -Wert gegen <i>Plasmodium falciparum</i> (DD2) [μM]	IC ₅₀ -Wert gegen Jurkat-Zellen [μM]
Cassiarin A (16)		18,0	-	63,9
108		0,7	0,9	7,9
109		0,6	1,6	0,7
141		n.g.	n.g.	1,1

Tabelle 16: Übersicht über die biologisch aktivsten Cassiarin A-Analoga; n.g. = nicht getestet (hier stehen die Testergebnisse noch aus); Cassiarin A wurde aufgrund zu geringer Aktivität gegenüber *Plasmodium falciparum* (3D7) nicht gegenüber dem Chloroquin-resistenten Stamm DD2 getestet

Die in dieser Arbeit etablierten Routen zur Synthese von Cassiarin A und Analoga davon stellen eine Verbesserung der bisher veröffentlichten Synthesemöglichkeiten dar. Der Vorteil

liegt vor allem in der Verkürzung der Routen und der einfachen Durchführung der Synthesen. Zudem konnte erstmalig die cytotoxische Aktivität von Analoga des Cassiarin A nachgewiesen und nach Synthese weiterer Verbindungen Struktur-Aktivitäts-Beziehungen untersucht werden. Basierend auf diesen Ergebnissen könnte die Synthese und Testung von Cassiarin A-Analoga für zukünftige Forschungsprojekte an dieser Stoffklasse eine vielversprechende Richtung darstellen, um Struktur-Aktivitäts-Beziehungen weiter zu erforschen und potentiell neue Verbindungen mit verbesserten pharmakologischen Eigenschaften zu identifizieren.

5.2 Darstellung von Zephycandidin A und dessen Analoga

Als weiteres Projekt wurde die Totalsynthese von Zephycandidin verfolgt. Angelehnt an ein Protokoll von Zhang et al.^[43] konnte zunächst aus dem *ortho*-Brombenzonitril **66** und dem Boronsäurepinacolester **67** - kommerziell verfügbaren und günstigen Edukten - in einer Suzuki-Kupplung mit nachfolgender spontaner intramolekularer nukleophiler Addition zum 6-Aminophenantridin **68** umgesetzt werden. Anschließende Anellierungsreaktion mit Chloracetaldehyd und Natriumcarbonat lieferte Zephycandidin A (**21**) in einer Gesamtausbeute von 68%.

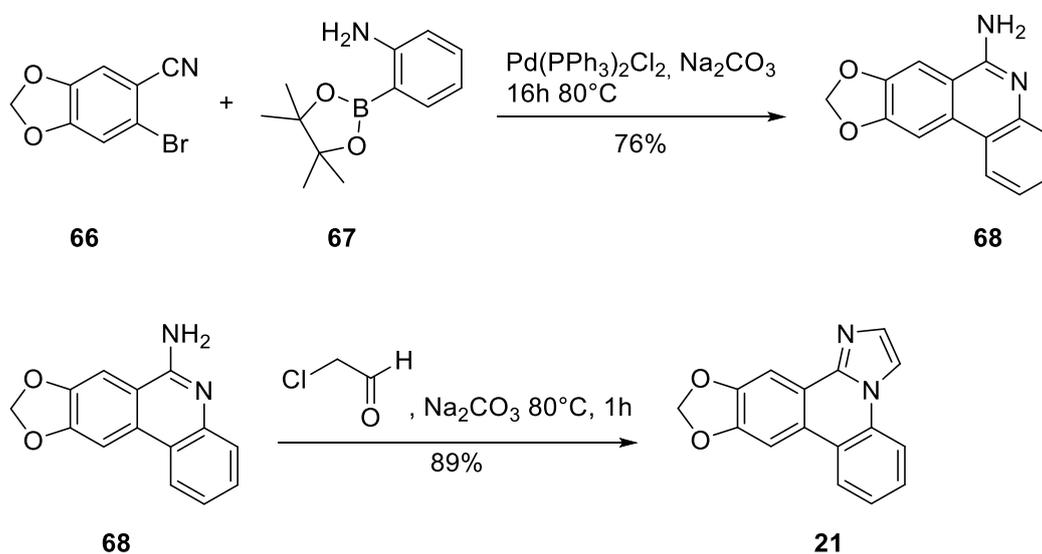
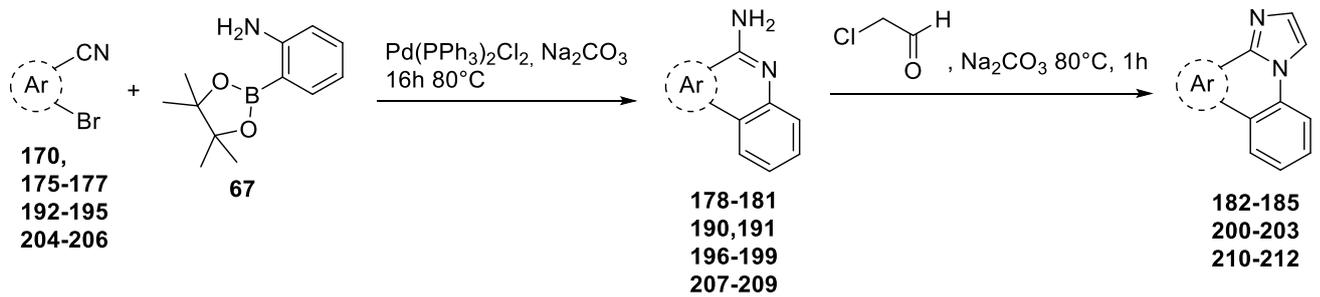


Abbildung 132: Darstellung von Zephycandidin A (**21**) mittels Suzuki-Kupplung mit nachfolgender intramolekularer nukleophiler Addition und anschließender Anellierungsreaktion

Dieser Syntheseroute folgend wurden weitere *ortho*-Brombenzonitrile (**170,175-177, 192-195, 204-206**) synthetisiert oder kommerziell erworben und zu den Verbindungen **182-185**,

Zusammenfassung

200-203 und **210-212** umgesetzt (Tabelle 17). Somit konnten Strukturanaloga von Zephyrandin A mit Variationen der Methylendioxybenzen-Struktur und auch des Benzen-Rings – ersetzt durch Heteroaromaten - dargestellt werden. Die Verbindungen **203** und **212** eignen sich prinzipiell ebenfalls zur Targetidentifizierung mittels Y3H-Screening. Nach alkalischer Hydrolyse steht hierbei für die Amidbildung mit dem Trimethoprim-Linker-Amin Molekül **230** in beiden Molekülen eine Carbonsäure zur Verfügung. Da für eine solche Targetidentifizierung die generierten Moleküle Aktivität besitzen müssen, die beiden Verbindungen jedoch keine cytotoxische Aktivität zeigen – wie auch die anderen Vertreter dieser Stoffklasse – wurde der Plan eine mögliche Zielverbindung zu identifizieren verworfen.



Edukt	Produkt	Edukt	Produkt
 176	 184 (57%)	 204	 210 (64%)
 192	 200 (65%)	 193	 201 (80%)
 177	 185 (55%)	 205	 211 (41%)

Zusammenfassung

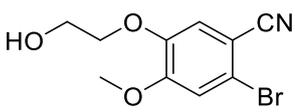
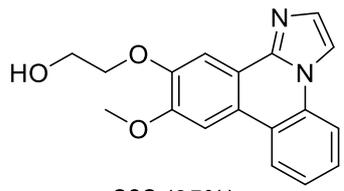
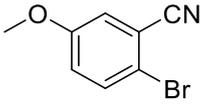
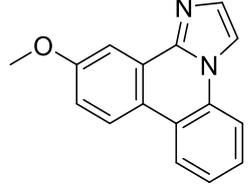
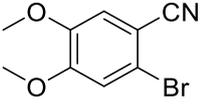
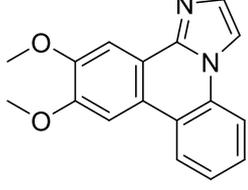
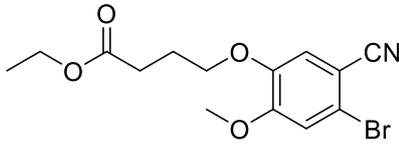
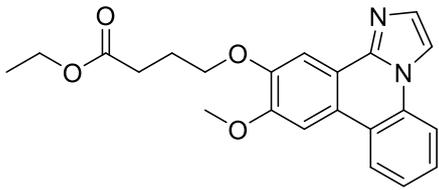
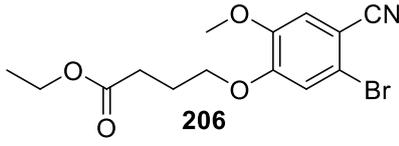
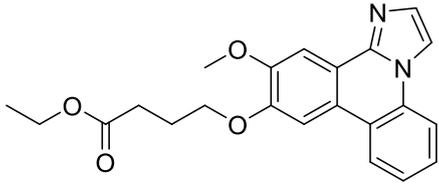
 194	 202 (85%)	 175	 183 (66%)
 170	 182 (49%)		
 195	 203 (61%)		
 206	 212 (67%)		

Tabelle 17: Analog der in Abbildung 132 beschriebenen Syntheseroute dargestellte Analoga von Zephycandidin A mit den jeweiligen Gesamtausbeuten über 2 Schritte

Des Weiteren wurden, basierend auf einem Protokoll von Narva et al.^[54], Funktionalisierungen des Imidazolrings an C-3 durchgeführt. Durch eine regioselektive, schwefelkatalysierte Anellierung konnten ausgehend vom 6-Aminophenanthridin **68** mit den entsprechenden Aldehyden in einem Gemisch aus DMSO und Cyclohexan drei weitere Analoga (**218-220**) von Zephycandidin A gewonnen werden (Abbildung 133).

Zusammenfassung

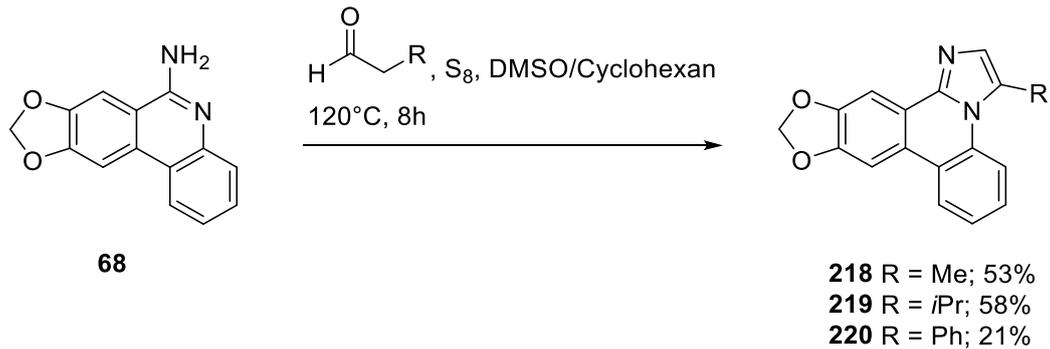


Abbildung 133: Darstellung der 3-substituierten Imidazo[1,2-*f*]phenanthridine **218-220** mittels schwefelkatalysiertem Ringschluss

Da für Zephycandidin A zusammen mit der Isolierung und Strukturaufklärung eine hohe cytotoxische Aktivität publiziert wurde (IC_{50} -Wert = 1,98 μ M gegenüber HL-60 Zellen), wurden die in Tabelle 17 und Abbildung 133 aufgelisteten Zephycandidin A-Analoga von Martina Stadler (Arbeitskreis Bracher) und Dr. Florian Lengauer (damals Arbeitskreis Vollmar, Arbeitsgruppe Karin Bartel) auf ihre jeweiligen cytotoxischen Aktivitäten untersucht. Dabei konnte überraschend gezeigt werden, dass Zephycandidin A keine nennenswerte cytotoxische Aktivität gegenüber HL-60-Zellen besitzt. Mäßige Aktivität konnte durch Dr. Florian Lengauer gegenüber der Jurkat-Zelllinie nachgewiesen werden, wobei aus der hergestellten Substanzbibliothek die Leitstruktur Zephycandidin A (**21**) mit einem IC_{50} -Wert von 11,7 μ M und das Analogon **218** (IC_{50} -Wert = 9,6 μ M) die besten Werte erzielten. Der große Unterschied zwischen den von Zhang et al. publizierten und den von uns ermittelten Werten lassen sich möglicherweise auf Verunreinigungen im Probenmaterial des chinesischen Forscherteams zurückführen. So wurde von diesen Zephycandidin A als farbloses Öl beschrieben, unser synthetisch dargestelltes Alkaloid ist allerdings ein weißer Feststoff mit einem Schmelzpunkt von 242-244°C. Auffällig ist zudem, dass in der Publikation nur ein Ausschnitt des ¹H-NMRs angegeben ist. Der Bereich zwischen 0 und 5 ppm wurde herausgeschnitten, wodurch möglicherweise wesentliche Informationen über aliphatische Verunreinigungen der Probe vorenthalten wurden.

Mit der von mir entwickelten Syntheseroute lassen sich in zwei Schritten – ausgehend von *ortho*-bromierten (hetero)aromatischen Nitrilen – in guten Ausbeuten Analoga des Zephycandidin A darstellen. Leider konnte die publizierte biologische Aktivität des Alkaloids nicht bestätigt werden. Da das Zephycandidin A der erste und bisher einzige entdeckte natürliche Vertreter der Imidazo[1,2-*f*]phenanthridine ist, ist über die biologischen Eigenschaften dieser Stoffklasse wenig bekannt. Daher wären weitere *in vitro* Testungen hilfreich, um mehr über diese Stoffklasse bzw. das Zephycandidin A im speziellen zu erfahren.

5.3 Synthese von „chemical tools“ zur Targetidentifizierung mittels yeast-three-hybrid Screening (Y3H)

Ein weiteres Thema meiner Dissertation war die Synthese von Derivaten von Trimethoprim (TMP), um diese anschließend in einem biologischen Testsystem – einem yeast-three-hybrid (Y3H) Screening – zur Identifizierung von Interaktionen zwischen kleinen Molekülen und Proteinen einzusetzen. Dieses Testsystem eignet sich insbesondere zur Aufklärung von Targetstrukturen niedermolekularer Verbindungen. Die Anfrage zur Synthese kam von Prof. Dr. Simone Moser (ehemals Arbeitsgruppe Vollmar LMU, jetzt Lehrstuhl für Pharmakognosie an der Leopold-Franzens-Universität Innsbruck). Zielverbindung war ein Tripethoprim-Derivat mit einer relativ polaren Oligoethylenglykolkette, an deren Ende ein Azid angebracht ist. Damit kann dieses chemical tool mittels Click-Chemie mit einem Alkin, welches am zu untersuchenden Molekül angebracht ist, verbunden werden. Dieses Konjugat kann anschließend im biologischen Test auf Interaktionen mit Zielproteinen untersucht werden. Einem Protokoll von Li et al.^[124] folgend konnte nach regioselektiver Mono-O-Demethylierung von Trimethoprim (**221**), anschließender Williamson-Ether-Synthese mit 4-Brombuttersäureethylester und alkalischer Verseifung des resultierenden Esters **227** die Carbonsäure **228** gewonnen werden. Durch anschließende Steglich-Amidierung mit der Azid-substituierten Oligoethylenglykol-Verbindung **225** konnte das TMP-Derivat **229** erhalten werden. Um eine weitere Möglichkeit zur Derivatisierung des chemical tools zu erhalten, wurde anschließend das terminale Azid in **229** mittels einer Staudinger Reaktion zum terminalen primären Amin **230** reduziert (Abbildung 134). Somit kann – z.B. durch Bildung einer Amidbindung - ein größerer Pool an Molekülen getestet werden. Die beiden chemical tools wurden der Kooperationspartnerin übergeben. Diese konnte anschließend den letzten Schritt (mittels Click Chemie oder Amidsynthese) in ihren Labors nach Standardprotokollen selbst durchführen. Diese konnten mithilfe der von mir synthetisierten Verbindungen das Y3H-Testsystem im Hefe-Deletionsstamm ABC9 Δ etablieren und anschließend – als proof of concept - ein neues Targetprotein für den Wirkstoff Ethinylestradiol – die Prokollagen-Lysin-2-Oxoglutarat-5-dioxygenase 2 (PLOD2) – identifizieren. Dieser Treffer wurde anschließend mit Affinitätschromatographie überprüft, um die Gültigkeit des Treffers zu beweisen. Die Ergebnisse wurden im Journal Biological Chemistry publiziert^[80].

Zusammenfassung

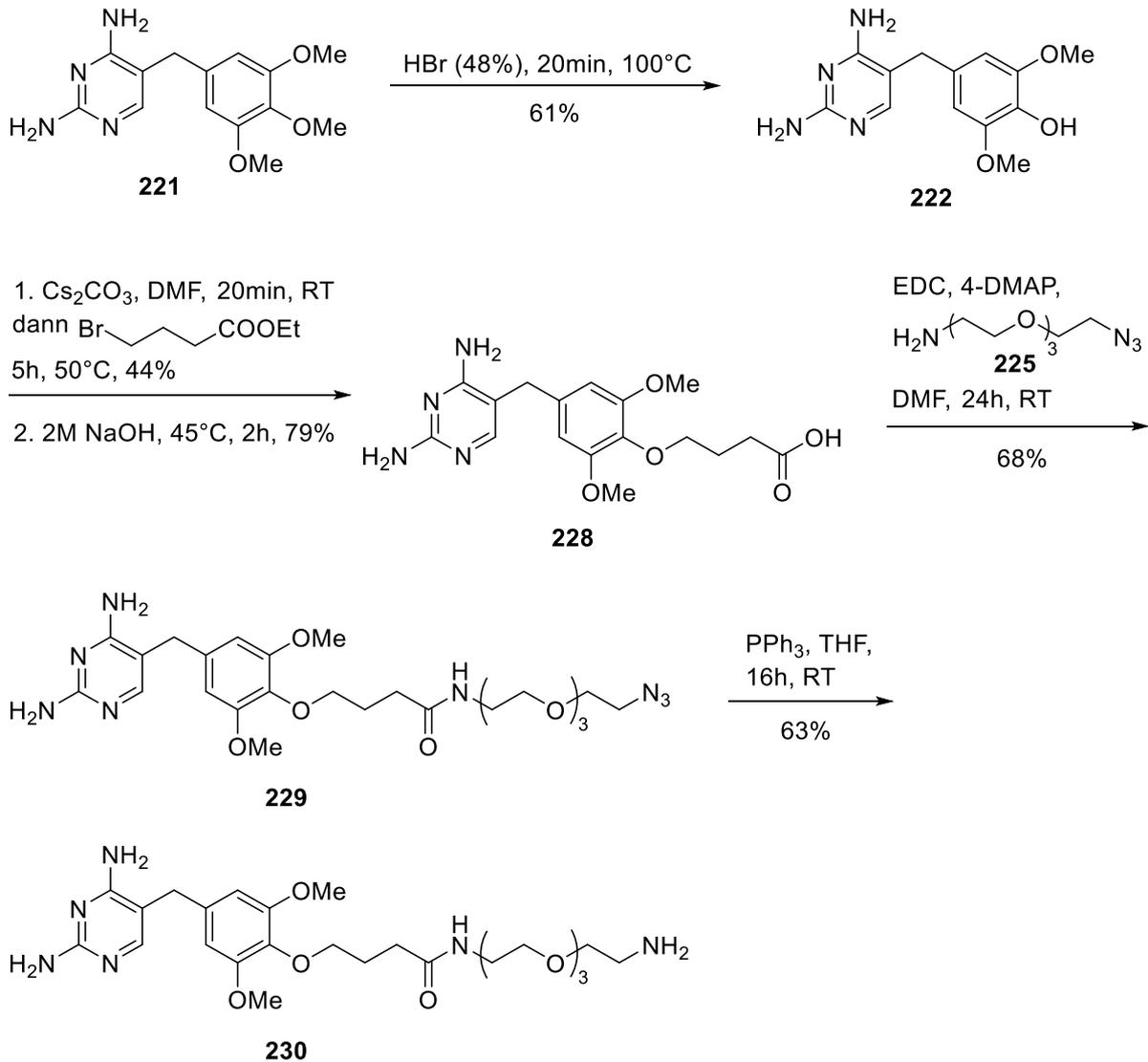


Abbildung 134: Darstellung der chemical tools **229** und **230** zur Durchführung eines yeast-three-hybrid screenings

Zusammenfassend habe ich für zwei interessante polycyclische Alkaloide neue Synthesen und Optionen zur systematischen Strukturvariation entwickelt. Aus den biologischen Testungen ließen sich somit erste interessante Aussagen zu Struktur-Aktivitäts-Beziehungen ableiten. Ferner habe ich mit der Synthese eines Trimethoprim-basierten chemical tools zum Aufbau eines Testsystems (Y3H) bei einer Kooperationspartnerin beigetragen, das u.a. auch dazu eingesetzt wird, neue Targetproteine der von mir bearbeiteten Naturstoffklassen zu identifizieren. Diese Testungen wurden leider bis zur Fertigstellung dieser Dissertation noch nicht abgeschlossen.

6 Experimenteller Teil

6.1 Allgemeine Angaben zur Analytik und präparative Parameter

IR-Spektren

Die IR-Spektren der Verbindungen wurden mit einem JASCO FT/IR-4100 Spektrometer oder einem Perkin-Elmer FT-IR Paragon 1000 aufgenommen. Alle Verbindungen konnten mithilfe eines ATR-Elements direkt vermessen werden. Die Lage der Absorptionsbanden ist durch die Wellenzahl ($\tilde{\nu}$ in cm^{-1}) angegeben.

Massenspektren

Die hochauflösenden Massenspektren (HRMS) wurden durch Elektronenstoß-Ionisation (EI) an einem Jeol JMS-GCmate II oder einem Thermo Finnigan MAT 95 bei einer kinetischen Energie der Elektronen von 70 eV bestimmt. Hochauflösende Massenspektren durch Elektronenspray-Ionisation (ESI) wurde an einem Thermo Finnigan LTQ FT bei 250°C gemessen. Die berechneten Werte beziehen sich auf die Masse des Radikalkations des beschriebenen Moleküls, welches aus den häufigsten natürlich vorkommenden Isotopen zusammengesetzt ist.

NMR-Spektren

Die NMR-Spektren wurden mit den beiden Geräten Avance III HD 400 MHz Bruker BioSpin (^1H NMR: 400 MHz, ^{13}C NMR 101 MHz) und Avance III HD 500 MHz Bruker BioSpin (^1H NMR: 500 MHz, ^{13}C NMR 126 MHz) der Firma Bruker aufgenommen. Als Lösungsmittel wurden deuterierte Lösungsmittel der Firma Eurisotop verwendet. Die Lagen der Resonanzsignale sind in Form der chemischen Verschiebung δ in parts per million (ppm) angegeben. Als Referenz für die Festlegung der chemischen Verschiebung diente das Resonanzsignal des Lösungsmittels. Kopplungskonstanten werden mit J bezeichnet und sind in Hertz (Hz) angegeben. Signale erster Ordnung, bei denen sich die Multiplizität nicht eindeutig bestimmen lässt, werden mit m (allgemein für Multipllett) gekennzeichnet. Bei unsicherer Zuordnung sind alle möglichen Zuordnungen angegeben.

Schmelzpunkte

Die Bestimmung der Schmelzpunkte kristalliner Substanzen wurde mit einem BÜCHI Melting Point B-540 der Firma Büchi durchgeführt. Die Angabe des Schmelzpunkts erfolgt in Grad Celsius (°C).

Ausbeuten

Die angegebenen Ausbeuten beziehen sich auf die nach den jeweiligen Versuchsvorschriften dargestellten und – falls erforderlich – gereinigten Substanzen. Für Substanzen, bei denen eine Aufreinigung nicht möglich war, wurde eine Durchführung aber keine Ausbeute oder Analytik erhoben.

Chemikalien

Dichlormethan, Essigsäureethylester, Aceton und Petrolether (Siedebereich 40–60°C) wurden durch Destillation gereinigt. Alle weiteren Lösungsmittel wurden in der kommerziell erhältlichen *p.a.*-Qualität verwendet. Edukte, Reagenzien und alle weiteren Chemikalien wurden von Fisher Scientific, Sigma-Aldrich, Abcr, BLD-Pharma und TCI in der handelsüblichen Qualität bezogen und ohne weitere Reinigung verwendet.

Dünnschichtchromatographie

Zur Reaktionskontrolle und Identifizierung von Substanzen wurden DC-Platten (Schichtdicke 0,20 mm, Format 4 × 8 cm) vom Typ Polygram SIL G/UV₂₅₄ der Firma Macherey-Nagel verwendet. Die Detektion fand bei UV-Licht der Wellenlänge 254 nm oder 366 nm durch Fluoreszenzlöschung bzw. Fluoreszenz statt. Zum Anfärben der Substanzflecken wurden die im Organikum beschriebenen Sprühreagenzien^[147] verwendet.

ASAP-Massenspektrometrie

Zur weiteren Reaktionskontrolle wurden die Reaktionsgemische mittels *atmospheric solids analysis probe* (ASAP) vermessen. Dazu wurde ein Glasstift in die Reaktionslösung getaucht und direkt im *compact mass spectrometer* (CMS, Advion) vermessen. Als Ionisierungsmethode wurde die chemische Ionisierung bei Atmosphärendruck (APCI) verwendet.

Mikrowellenreaktor

Reaktionen im Mikrowellenreaktor wurden an einem Discover (S-Class Plus) SP microwave reactor (CEM GmbH) durchgeführt.

Flash-Säulenchromatographie

Als stationäre Phase fand Geduran Si 60 Kieselgel (Merck) Verwendung. Die Befüllung der Glassäule erfolgte durch Trockenfüllung und sukzessive Konditionierung des Kieselgels mit dem angegebenen Elutionsmittel. Die Zusammensetzung des Elutionsmittels ist in Volumenteilen angegeben. Alle Substanzen wurden zuvor auf ISOLUTE HM-N (Biotage) aufgezogen.

Software

Zur Textverarbeitung wurde Word 2013 (Microsoft) verwendet. Zur Analyse und Auswertung der NMR-Spektren diente MestReNova 12.0 (Mestrelab). Als Zeichenprogramm für Strukturformeln und zur Berechnung von molaren Massen, Molekülmassen und Radikalkationen von Verbindungen wurde ChemDraw Professional 20.0 (PerkinElmer) verwendet.

HPLC-Reinheit

Die jeweiligen HPLC-Reinheit wurde mit einer HP Agilent 1100 HPLC mit Dioden Array Detektor bei den Wellenlängen $\lambda = 210 \text{ nm}$ und $\lambda = 254 \text{ nm}$ bestimmt. Es wurden jeweils $10 \mu\text{L}$ einer Lösung von ca. $100 \mu\text{g/mL}$ injiziert. Alle organischen Lösungsmittel entsprachen der Qualität „HPLC grade“, Wasser wurde als bidestilliertes Wasser verwendet. Als wässriger Puffer pH 4 wurde ein Natrium- oder Kaliumphosphatpuffer der Firma Merck in HPLC geeigneter Qualität verwendet.

Methode 1:

Säule: Zobrax Eclipse Plus C18 4,6x150mm, $5 \mu\text{m}$

Flussrate: 1 mL/min

Eluent: MeCN – Wasser (70:30)

Methode 2:

Säule: Zobrax Eclipse Plus C18 4,6x150mm, $5 \mu\text{m}$

Flussrate: 1 mL/min

Eluent: MeCN – wässriger Puffer pH 4 (50:50)

6.2 Allgemeine Synthesevorschriften

Synthesevorschrift A (Synthese der Benzonitrile aus aromatischen Aldehyden)

10 mmol des entsprechenden Aldehyds wurden in 15 mL DMSO gelöst und 1,04 g (15 mmol) Hydroxylaminhydrochlorid zugegeben. Die Mischung wurde auf 90°C erwärmt und 1 h bei dieser Temperatur gerührt. Nachdem das Gemisch auf Raumtemperatur abgekühlt wurde, wurden 20 mL Wasser und 15 mL Ethylacetat zugegeben und die organische Phase abgetrennt. Die wässrige Phase wurde mit 3 x 15 mL Ethylacetat extrahiert, die vereinigten organischen Phasen mit 3 x 15 mL gesättigter Kochsalzlösung gewaschen, über wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Das erhaltene Rohprodukt wurde mittels FSC aufgereinigt. Als Eluent wurde das angegebene Gemisch verwendet.

Synthesevorschrift B (Suzuki-Miyaura Kreuzkupplung zur Synthese des 6-Aminophenanthridin Grundkörpers)

Das entsprechend substituierte 2-Brombenzonitril (2,5 mmol) wurde in einem Schlenkcolben unter einer Stickstoffatmosphäre zusammen mit 2-Aminophenyl-boronsäurepinacolester (548 mg, 2,50 mmol) und Bis(triphenylphosphin)palladium(II)chlorid (88 mg, 0,013 mmol) in 15 mL trockenem DMF gelöst. Anschließend wurden 4 mL einer 2 M Natriumcarbonat-Lösung zugegeben und die resultierende Suspension 16 h bei 80°C gerührt. Das auf Raumtemperatur abgekühlte Gemisch wurde durch Kieselgur filtriert, wobei sukzessive mit 50 mL Dichlormethan und 50 mL Dichlormethan/Methanol 9:1 nachgewaschen wurde. Dem Filtrat wurden 100 mL Wasser zugegeben und die resultierenden Phasen getrennt. Die wässrige Phase wurde mit 2 x 25 mL Dichlormethan extrahiert. Die organischen Phasen wurden vereinigt, über wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet, filtriert und am Rotationsverdampfer eingeeengt. Das erhaltene Rohprodukt wurde mittels FSC aufgereinigt. Als Eluent wurde das angegebene Gemisch verwendet.

Synthesevorschrift C (Synthese des Imidazo[1,2-f]phenanthridin Ringsystems)

Das entsprechend substituierte 6-Aminophenanthridin (0,42 mmol) wurde mit 2-Chloracetaldehyd (50% in Wasser, 0,11 mL, 1,8 mmol) und Natriumcarbonat (71 mg, 0,84 mmol) in 6 mL eines Gemisches aus Isopropanol und Wasser (1:1) suspendiert. Das Gemisch wurde 1 h zum Rückfluss erhitzt. Nachdem das Gemisch auf Raumtemperatur abgekühlt war, wurden 10 mL Wasser zugegeben und mit 3 x 10 mL Ethylacetat extrahiert. Die

organischen Phasen wurden vereinigt, mit 10 mL gesättigter Kochsalzlösung gewaschen, über wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet, filtriert und am Rotationsverdampfer eingeeengt. Das erhaltene Rohprodukt wurde mittels FSC aufgereinigt. Als Eluent wurde das angegebene Gemisch verwendet. Das erhaltene Produkt wurde zur Entfernung von restlichen Lösungsmitteln über Nacht im Hochvakuum (bei ca. 10^{-2} mbar) getrocknet.

Synthesevorschrift D (Williamson Ether-Synthese zu Phenol-substituierten 2-Brombenzonnitrilen)

Das entsprechende 2-Brombenzonitril (5 mmol) wurde in 15 mL DMF gelöst und Kaliumcarbonat (1,04 g, 7,50 mmol) zugegeben. Die entstandene Suspension wurde 15 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde das entsprechende Halogenalkan (15 mmol) zugegeben und das Gemisch bei Raumtemperatur über Nacht gerührt. Nach Zugabe von 100 mL Wasser wurde 3 x mit je 50 mL Ethylacetat extrahiert, die vereinigten organischen Phasen mit 2 x 50 mL gesättigter Kochsalzlösung gewaschen, über wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet, filtriert und am Rotationsverdampfer eingeeengt. Das erhaltene Rohprodukt wurde mittels FSC aufgereinigt. Als Eluent wurde das angegebene Gemisch verwendet.

Synthesevorschrift E (Sonogashira-Kupplung zu 5-Alkynyl-4H-chromen-4-onen)

Das entsprechende Triflat (2,00 mmol) wurde mit Tetrabutylammoniumiodid (2,22 g, 6,00 mmol), Kupfer(I)iodid (114 mg, 0,600 mmol) und Tetrakis(triphenylphosphin)palladium(0) (231 mg, 0,200 mmol) in einem Schlenkkolben unter eine Stickstoffatmosphäre gebracht und mit einem Septum verschlossen. Anschließend wurde ein Gemisch aus DMF/TEA (2:1) (15 mL) und das entsprechende Alkin (2,4 mmol) zugegeben und 16 h bei Raumtemperatur gerührt. Der Kolben wurde geöffnet, 80 mL gesättigte Ammoniumchloridlösung zugegeben und das Gemisch mit 5 x 30 mL Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit 2 x 25 mL gesättigter Kochsalzlösung gewaschen, über wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet, filtriert und am Rotationsverdampfer eingeeengt. Das erhaltene Rohprodukt wurde mittels FSC aufgereinigt. Als Eluent wurde das angegebene Gemisch verwendet.

Synthesevorschrift F (Synthese des Cassiarin-Grundkörpers)

Das entsprechende Alkin (0,5 mmol), Silbernitrat (8,5 mg, 0,050 mmol) und Ammoniumacetat (58 mg, 0,75 mmol) wurden in 3 mL *tert*-Butanol suspendiert und 16 h bei 40°C gerührt. Anschließend wurden 15 mL Wasser zugegeben und das Gemisch mit 2 x 10 mL einer Mischung aus Dichlormethan/Isopropanol (4:1) extrahiert. Die vereinigten organischen Pha-

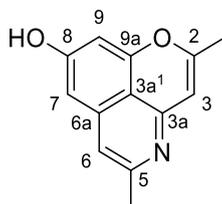
sen wurden über wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet, filtriert und am Rotationsverdampfer zur Trockene eingengt. Der Rückstand wurde in 4 mL einer Mischung aus Methanol und 6 M Salzsäure (1:1) aufgenommen und 5 h zum Rückfluss erhitzt. Die resultierende Lösung wurde mit 2M Natronlauge neutralisiert (pH 7-8) und mit 6 x 3 mL einer Mischung aus Dichlormethan/Isopropanol (4:1) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Natriumsulfat getrocknet, filtriert und am Rotationsverdampfer zur Trockene eingengt. Das erhaltene Rohprodukt wurde mittels FSC aufgereinigt. Als Eluent wurde das angegebene Gemisch verwendet.

Synthesevorschrift G (Sonogashira-Kupplung zu 1-Alkynylisochinolin)

1-Iod-6,8-dimethoxy-3-methylisochinolin (**124**; 200 mg, 0,608 mmol) wurde in einem 50 mL Schlenkkolben zusammen mit Bis(triphenylphosphin)palladium(II)dichlorid (21,3 mg, 0,0304 mmol) und Kupferiodid (11,6 mg, 0,0608 mmol) suspendiert, der Kolben mit einem Septum verschlossen und unter Stickstoffatmosphäre gebracht. Anschließend wurden nacheinander das entsprechende Alkin (1,22 mmol) und Diisopropylamin (3 mL) zugegeben. Nachdem das Gemisch 18 h bei Raumtemperatur gerührt wurde, wurden 25 mL gesättigte Ammoniumchlorid-Lösung zugegeben und mit 3 x 10 mL Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit 2 x 10 mL gesättigter Kochsalzlösung gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet, filtriert und am Rotationsverdampfer zur Trockene eingengt. Das erhaltene Rohprodukt wurde mittels FSC aufgereinigt. Als Eluent wurde das angegebene Gemisch verwendet.

6.3 Beschreibung der Substanzen

Cassiarin A (16)*



$C_{13}H_{11}NO_2$

$M = 213,24 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$

Methode 1: Die Darstellung von **16** erfolgte nach Synthesevorschrift F unter Verwendung von 129 mg (0,500 mmol) 7-(Methoxymethoxy)-2-methyl-5-(prop-1-in-1-yl)-4*H*-chromen-4-on (**30**). Die Aufreinigung erfolgte mittels FSC (Kieselgel, Dichlormethan/Methanol 10:1).

Ausbeute: 0,45 g (0,21 mmol) gelber Feststoff (42%)

Methode 2: 6,8-Dimethoxy-3-methyl-1-(prop-1-in-1-yl)isochinolin (**125**) (121 mg, 0,500 mmol) wurde in einem 10 mL Schlenkkolben in 7 mL Dichlormethan gelöst und unter Stickstoffatmosphäre gebracht. Bortribromid (1,15 mL, 1,00 g, 0,400 mmol) wurde über eine Spritze tropfenweise zugegeben und die orange Lösung 6 h zum Rückfluss erhitzt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurden 6 mL Methanol und 5 mL 10% Ammoniaklösung zugegeben und die Mischung 15 Minuten stark gerührt. Die gesamte Reaktionsmischung wurde am Rotationsverdampfer eingengt und mittels FSC (Kieselgel, Dichlormethan/Methanol 10:1) aufgereinigt.

$^1\text{H-NMR}$ [400 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$]: δ (ppm) = 11,01 (br s, 1 H, OH), 6,96 (s, 1H, 6-H), 6,68 (d, $J = 2,0$ Hz, 1H, 7-H oder 9-H), 6,67 (d, $J = 2,0$ Hz, 1H, 7-H oder 9-H), 6,35 (s, 1H, 3-H), 2,36 (s, 3H, 5- CH_3), 2,29 (s, 3H, 2- CH_3).

$^{13}\text{C-NMR}$ [101 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$]: δ (ppm) = 162,9 (C-2), 155,2 (C-8), 148,9 (C-5), 147,2 (C-9a), 137,8 (C-6a), 113,2 (C-6), 110,2 (C-3a¹), 102,3 (C-7, C-3), 99,8 (C-9), 21,5 (5- CH_3), 19,8 (2- CH_3)

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ (cm^{-1}) = 2759, 1652, 1606, 1431, 1392, 1367, 1291, 1188, 1168, 1134, 1083, 919, 831, 816

Experimenteller Teil

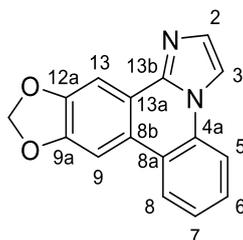
HRMS (EI): $m/z = 213,0775$ (berechnet für $[C_{13}H_{11}NO_2]^{+}$: $m/z = 213,0790$)

Schmelzpunkt: 254°C unter Zersetzung (Literaturwert: 240°C unter Zersetzung^[31])

HPLC-Reinheit: >99% (210 nm; Methode 1), >99% (254 nm; Methode 1)

* Literaturbekannte Verbindung^[31]. Die Darstellung erfolgte durch zwei neue Methoden.

Zephycandidin A (21)*



$C_{16}H_{10}N_2O_2$

$M = 262,27 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$

Die Darstellung von **21** erfolgte nach Synthesevorschrift C unter Verwendung von 100 mg (0,420 mmol) [1,3]Dioxolo[4,5-*j*]phenanthridin-6-amin (**68**). Die Aufreinigung erfolgte mittels FSC (Kieselgel, Isohexan/Ethylacetat 1:1).

Ausbeute: 98 mg (0,37 mmol) farbloser Feststoff (89%)

¹H-NMR [400 MHz, $CDCl_3$]: δ (ppm) = 8,24 (dd, $J = 8,1, 1,4 \text{ Hz}$, 1H, 8-H), 8,02 (s, 1H, 9-H), 7,95 (d, $J = 1,5 \text{ Hz}$, 1H, 2-H), 7,84 (dd, $J = 8,2, 1,3 \text{ Hz}$, 1H, 5-H), 7,71 (s, 1H, 13-H), 7,60 – 7,54 (m, 2H, 3-H, 6-H), 7,48 (ddd, $J = 8,4, 7,2, 1,3 \text{ Hz}$, 1H, 7-H), 6,13 (s, 2H, OCH_2O)

¹³C-NMR [101 MHz, $CDCl_3$]: δ (ppm) = 149,4 (C-9a), 148,8 (C-12), 142,6 (C-13b), 131,3 (C-2), 131,1 (C-4a), 128,0 (C-6), 125,0 (C-7), 123,8 (C-8), 123,3 (C-8b), 121,8 (C-13a), 119,5 (C-8a), 115,8 (C-5), 111,5 (C-3), 102,9 (C-9), 101,8 (OCH_2O), 101,4 (C-13).

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ (cm^{-1}) = 2920, 1506, 1462, 1331, 1260, 1035, 848, 736

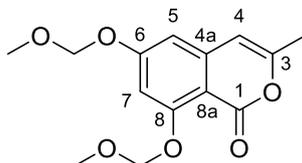
HRMS (EI): $m/z = 262,0737$ (berechnet für $[C_{16}H_{10}N_2O_2]^{+}$: $m/z = 262,0737$)

Schmelzpunkt: 242 – 244°C (Literaturwert: 242-243°C^[39])

HPLC-Reinheit: >99% (210 nm; Methode 2), >99% (254 nm; Methode 2)

* Literaturbekannte Verbindung^[39]. Die Darstellung erfolgte durch eine neue Methode.

6,8-Bis(methoxymethoxy)-3-methyl-1*H*-isochromen-1-on (25)*



$C_{14}H_{16}O_6$

$M = 280,28 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$

6,8-Dihydroxy-3-methyl-1*H*-isochromen-1-on (**163**; 500 mg, 2,60 mmol) wurde in einem 100 mL Kolben zusammen mit Cäsiumcarbonat (2,54 g, 7,80 mmol) in 20 mL DMF dispergiert und 30 Minuten gerührt. Chlormethylmethylether (494 μL , 523 mg, 6,50 mmol) wurden zugegeben, der Kolben verschlossen und 16 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurden je 50 mL Wasser und Ethylacetat zugegeben und die beiden Phasen getrennt. Die wässrige Phase wurde mit 2 x 30 mL Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit 2 x 25 mL gesättigter Lithiumchlorid-Lösung gewaschen, über wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet, filtriert und am Rotationsverdampfer zur Trockene eingengt. Der Rückstand wurde mittels FSC (Kieselgel, Isohexan/Ethylacetat 2:1) aufgereinigt.

Ausbeute: 725 mg (2,59 mmol) farbloser Feststoff (>99%).

¹H-NMR [400 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$]: δ (ppm) = 6,74 (d, $J = 2.2 \text{ Hz}$, 1H, 5-H oder 7-H), 6,70 (d, $J = 2.3 \text{ Hz}$, 1H, 5-H oder 7-H), 6,37 (d, $J = 1.2 \text{ Hz}$, 1H, 4-H), 5,30 (d, $J = 2.6 \text{ Hz}$, 4H, OCH_2O), 3,42 (s, 3H, OCH_3), 3,40 (s, 3H, OCH_3), 2,16 (d, $J = 1.0 \text{ Hz}$, 3H, CH_3).

¹³C-NMR [101 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$]: δ (ppm) = 162,3 (C-6), 160,1 (C-8), 157,7 (C-1), 155,1 (C-3), 141,7 (C-4a), 103,4 (C-7), 103,3 (C-8a), 103,2 (C-4), 103,0 (C-5), 94,7 (OCH_2O), 93,8 (OCH_2O), 56,1 (OCH_3), 56,1 (OCH_3), 19,0 (CH_3).

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ (cm^{-1}) = 2921, 1721, 1672, 1599, 1570, 1462, 1357, 1145, 1032, 1015, 922, 910, 848, 831

HRMS (EI): m/z = Der Molekülpeak konnte nicht beobachtet werden. Ein Signal mit $m/z = 265,0702$ (berechnet für $[\text{C}_{13}\text{H}_{14}\text{O}_6]^+$): $m/z = 265,0707$) und ein Signal bei $m/z = 249,0751$

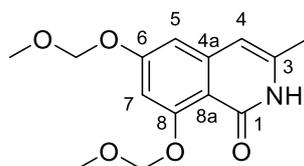
Experimenteller Teil

(berechnet für $[C_{13}H_{13}O_6]^+$: $m/z = 249,0757$) deuten auf die Fragmentierung des Radikalkations unter Demethylierung der Methoxymethyl-Gruppen hin.

Schmelzpunkt: 78 ° (Literaturwert: 79-80°C^[31])

* Literaturbekannte Verbindung^[31]. Die Darstellung erfolgte durch eine neue Methode.

6,8-Bis(methoxymethoxy)-3-methylisochinolin-1(2H)-on (26)*



$C_{14}H_{17}NO_5$

$M = 279,29 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$

6,8-Bis(methoxymethoxy)-3-methyl-1*H*-isochromen-1-on (**25**; 561 mg, 2,00 mmol) wurde in einem 100 mL Kolben in 10 mL DMF gelöst und 10 mL Ammoniak-Lösung (25% in Wasser) zugegeben. Die Lösung wurde auf 80°C erwärmt und 16 Stunden stark gerührt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurden 30 mL Wasser zugegeben und die leicht gelbliche Lösung mit 3 x 25 mL Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit 2 x 30 mL gesättigter Lithiumchlorid-Lösung gewaschen, über wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet, filtriert und am Rotationsverdampfer zur Trockene eingeeengt. Der Rückstand wurde mittels FSC (Kieselgel, Dichlormethan/Methanol 30:1) aufgereinigt.

Ausbeute: 510 mg (1,83 mmol) farbloser Feststoff (91%).

¹H-NMR [400 MHz, $(CD_3)_2SO$]: δ (ppm) = 10,78 (s, 1H, NH), 6,69 (d, $J = 2,3$ Hz, 1H, 5-H oder 7-H), 6,60 (d, $J = 2,3$ Hz, 1H, 5-H oder 7-H), 6,11 (d, $J = 1,3$ Hz, 1H, 4-H), 5,25 (s, 2H, OCH_2O), 5,21 (s, 2H, OCH_2O), 3,43 (s, 3H, OCH_3), 3,39 (s, 3H, OCH_3), 2,11 (s, 3H, CH_3)

¹³C-NMR [101 MHz, $(CD_3)_2SO$]: δ (ppm) = 160,4 (C-1), 159,7 (C-8), 159,1 (C-6), 142,7 (C-4a), 139,5 (C-3), 109,9 (C-8a), 103,3 (C-7), 103,1 (C-5), 102,5 (C-4), 95,4 (OCH_2O), 93,7 (OCH_2O), 55,9 (OCH_3), 55,9 (OCH_3), 18,4 (CH_3).

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ (cm^{-1}) = 2904, 1639, 1603, 1556, 1352, 1144, 1109, 1057, 1033, 964, 898, 866, 756

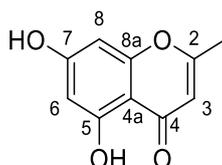
Experimenteller Teil

HRMS (EI): $m/z = 279,1100$ (berechnet für $[C_{14}H_{17}NO_5]^{+}$: $m/z = 279,1101$)

Schmelzpunkt: 156°C (Literaturwert: 167-168°C^[31])

* Literaturbekannte Verbindung^[31]. Die Darstellung erfolgte durch eine neue Methode.

5,7-Dihydroxy-2-methyl-4*H*-chromen-4-on (Noreugenin) (28)*



$C_{10}H_8O_4$

$M = 192,17 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$

2,4,6-Trihydroxyacetophenon (**90**; 2,02 g, 12,0 mmol) wurde in einem Mikrowellenreaktorgefäß mit Natriumacetat (12,8 g, 144 mmol) in 6 mL Acetanhydrid suspendiert, das Gefäß mit einem Septum verschlossen und 40 Minuten im Reaktor gerührt ($p_{\text{max}} = 8 \text{ bar}$, $P = 200 \text{ W}$, $T = 180^\circ\text{C}$). Die entstandene schwarze Suspension wurde mit 100 mL Wasser versetzt und mit 4 x 25 mL Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit 25 mL gesättigter Kochsalzlösung gewaschen, über wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet, filtriert und am Rotationsverdampfer zur Trockene eingengt. Der Rückstand wurde in 90 mL Wasser suspendiert und mit Kaliumcarbonat (4,98 g, 30,1 mmol) 3 h zum Rückfluss erhitzt. Nach Abkühlen wurde die Mischung mit konzentrierter Salzsäure neutralisiert und mit 3 x 25 mL Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit 25 mL gesättigter Kochsalzlösung gewaschen, über wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet, filtriert und am Rotationsverdampfer zur Trockene eingengt. Der Rückstand wurde mittels FSC (Kieselgel, Isohexan/Ethylacetat 7:3) aufgereinigt.

Ausbeute: 1,25 g (6,51 mmol) leicht gelblicher Feststoff (54%)

¹H-NMR [400 MHz, $(CD_3)_2SO$]: δ (ppm) = 12,81 (s, 1H, 7-OH), 10,78 (s, 1H, 5-OH), 6,29 (d, $J = 2,1 \text{ Hz}$, 1H, 8-H), 6,15 (d, $J = 2,1 \text{ Hz}$, 1H, 6-H), 6,13 (d, $J = 0,9 \text{ Hz}$, 1H, 3-H), 2,32 (d, $J = 0,8 \text{ Hz}$, 3H, CH_3)

¹³C-NMR [101 MHz, $(CD_3)_2SO$]: δ (ppm) = 181,8 (C-4), 167,6 (C-2), 164,1 (C-7), 161,5 (C-5), 157,8 (C-8a), 108,0 (C-3), 103,4 (C-4a), 98,8 (C-6), 93,7 (C-8), 19,9 (CH_3)

Experimenteller Teil

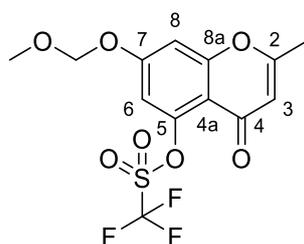
IR (ATR): $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) = 3086, 1765, 1613, 1366, 1189, 1101, 1068, 1022, 828, 723

HRMS (EI): m/z = 192,0415 (berechnet für [C₁₀H₈O₄]⁺: m/z = 192,0417)

Schmelzpunkt: 280°C (Literaturwert: 279-280°C^[33])

* Literaturbekannte Verbindung^[33]. Die Darstellung erfolgte durch eine neue Methode.

7-(Methoxymethoxy)-2-methyl-4-oxo-4*H*-chromen-5-yl-trifluormethansulfonat (**29**)*



C₁₃H₁₁F₃O₇S

$M = 368,28 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$

5-Hydroxy-7-(methoxymethoxy)-2-methyl-4*H*-chromen-4-on (**98**) (1,57 g, 6,65 mmol) wurde in einem 100 mL Kolben in 35 mL THF gelöst und auf 0°C gekühlt. Anschließend wurden 399 mg (9,98 mmol) Natriumhydrid (60%ige Dispersion in Paraffinöl) zugegeben und die Mischung 15 Minuten bei 0°C gerührt. In einem zweiten Gefäß wurden 3,56 g (9,98 mmol) *N*-Phenyl-bis-(trifluormethansulfonimid) in 10 mL THF gelöst und mit einer Spritze der ursprünglichen Reaktionsmischung zugetropft. Die gelbe Suspension wurde auf Raumtemperatur erwärmt und 2 h bei dieser Temperatur gerührt, wobei sich eine orange Lösung bildete. Anschließend wurden - langsam und unter starkem Rühren - 50 mL gesättigte Ammoniumchlorid-Lösung zugegeben und das Gemisch mit 3 x 30 mL Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit 25 mL gesättigter Kochsalzlösung gewaschen, über wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet, filtriert und am Rotationsverdampfer zur Trockene eingengt. Der Rückstand wurde mittels FSC (Kieselgel, Isohexan/Ethylacetat 5:1) aufgereinigt.

Ausbeute: 2,29 g (6,22 mmol) leicht gelblicher Feststoff (94%)

¹H-NMR [400 MHz, CDCl₃]: δ (ppm) = 7,11 (d, $J = 2.1$ Hz, 1H), 6,85 (d, $J = 1.8$ Hz, 1H), 6,10 (s, 1H), 5,27 (s, 2H), 3,51 (s, 3H), 2,35 (s, 3H)

Experimenteller Teil

¹³C-NMR [101 MHz, CDCl₃]: δ (ppm) = 178,5 (C-4), 167,6 (C-2), 163,2 (C-7), 158,0 (C-8a), 146,7 (C-5), 117,9 (CF₃), 112,3 (C-4a), 108,5 (C-3), 104,9 (C-6), 99,9 (C8), 94,2 (OCH₂O), 56,1 (OCH₃), 19,5 (CH₃).

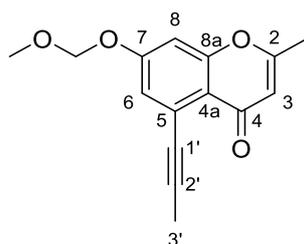
IR (ATR): $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) = 2560, 1632, 1556, 1424, 1398, 1336, 1211, 1182, 1138, 1019, 1003, 864, 820

HRMS (EI): m/z = 368,0171 (berechnet für [C₁₃H₁₁F₃O₇S]⁺: m/z = 368,0172)

Schmelzpunkt: 112°C (Literaturwert: 109-110°C^[32])

* Literaturbekannte Verbindung^[32] Die Darstellung erfolgte durch eine neue Methode.

7-(Methoxymethoxy)-2-methyl-5-(prop-1-in-1-yl)-4*H*-chromen-4-on (30)*



C₁₅H₁₄O₄

$M = 258,27 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$

Die Darstellung von **30** erfolgte nach Synthesvorschrift E unter Verwendung von 737 mg (2,00 mmol) 7-(Methoxymethoxy)-2-methyl-4-oxo-4*H*-chromen-5-yl-trifluormethansulfonat (**29**) und Propin (1 M in DMF, 2,4 mL, 2,4 mmol). Die Aufreinigung erfolgte mittels FSC (Kieselgel, Isohexan/Ethylacetat 2:1).

Ausbeute: 225 mg (0,871 mmol) orangeroter Feststoff (44%)

¹H-NMR [400 MHz, CDCl₃]: δ (ppm) = 7,10 (d, $J = 2,5$ Hz, 1H, 6-H), 6,94 (d, $J = 2,5$ Hz, 1H, 8-H), 6,04 (d, $J = 0,9$ Hz, 1H, 3-H), 5,23 (s, 2H, CH₂), 3,49 (s, 3H, OCH₃), 2,29 (d, $J = 0,7$ Hz, 3H, CH₃), 2,17 (s, 3H, 3'-H)

¹³C-NMR [101 MHz, CDCl₃]: δ (ppm) = 177,2 (C-4), 164,3 (C-2), 159,9 (C-7), 158,7 (C-8a), 124,5 (C-5), 120,9 (C-6), 118,7 (C-4a), 111,4 (C-3), 103,5 (C-8), 94,4 (CH₂), 92,8 (C-2'), 78,8 (C-1'), 56,5 (OCH₃), 20,2 (CH₃), 5,3 (C-3')

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) = 1654, 1601, 1391, 1338, 1156, 1078

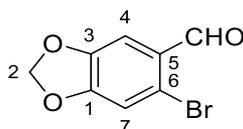
Experimenteller Teil

HRMS (EI): $m/z = 258,0888$ (berechnet für $[\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{O}_4]^+$: $m/z = 258,0887$)

Schmelzpunkt: 152°C unter Zersetzung (Literaturwert: 109-110^[32])

* Literaturbekannte Verbindung^[32] Die Darstellung erfolgte durch eine neue Methode.

6-Brombenzo[d][1,3]dioxol-5-carbaldehyd (**44**)*



$\text{C}_8\text{H}_5\text{BrO}_3$

$M = 229,03 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$

Zu einer Suspension von Eisenpulver (5,86 g, 105 mmol) in 70 mL Eisessig wurden 14,0 mL (273 mmol) elementares Brom bei 0°C über einen Tropftrichter zugetropft. Die dunkelbraune Suspension wurde 20 Minuten lang bei dieser Temperatur gerührt. Anschließend wurden 15,0 g (100 mmol) Piperonal (**40**) in 50 mL Eisessig gelöst der Reaktionsmischung über einen Tropftrichter zugegeben. Nach Zugabe von weiteren 6,00 mL (117 mmol) Brom wurde die Mischung auf Raumtemperatur erwärmt und über Nacht gerührt. Nach Zugabe von 500 mL Dichlormethan und 250 mL gesättigter $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ Lösung wurde das Gemisch filtriert und die entstandenen Phasen getrennt. Die wässrige Phase wurde mit 3 x 100 mL Dichlormethan extrahiert. Die organischen Phasen wurden vereinigt, mit 2 x 50 mL gesättigter $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ Lösung und 2 x 50 mL gesättigter Kochsalzlösung gewaschen, über wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet, filtriert und am Rotationsverdampfer eingeeengt. Das erhaltene Rohprodukt wurde aus 95 mL absolutem Ethanol umkristallisiert.

Ausbeute: 14,8 g (64,6 mmol) farblose, lange Nadeln (65%)

$^1\text{H NMR}$ [400 MHz, CDCl_3] δ (ppm) = 10,18 (s, 1H, CHO), 7,36 (s, 1H, 4-H), 7,06 (s, 1H, 7-H), 6,08 (s, 2H, 2-H)

$^{13}\text{C NMR}$ [101 MHz, CDCl_3] δ (ppm) = 190,5 (CHO), 153,5 (C-1), 148,3 (C-3), 128,2 (C-5), 121,8 (C-6), 113,5 (C-7), 108,3 (C-4), 102,9 (C-2)

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ (cm^{-1}) = 2865, 1668, 1612, 1594, 1485, 1390, 1255, 1110, 1028, 922, 888, 836, 783

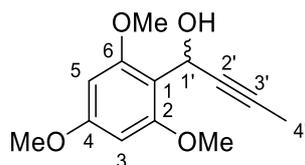
Experimenteller Teil

HRMS (EI): $m/z = 227,9412$ (berechnet für $[\text{C}_8\text{H}_5\text{BrO}_3]^+$: $m/z = 227,9417$)

Schmelzpunkt: 128°C (Literaturwert: 128-130°C^[148])

* Literaturbekannte Verbindung^[148].

1-(2,4,6-Trimethoxyphenyl)but-2-in-1-ol (53)



$\text{C}_{13}\text{H}_{16}\text{O}_4$

$M = 236,27 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$

2,4,6-Trimethoxybenzaldehyd (**48**; 2,38 g, 12,2 mmol) wurde unter einer Stickstoffatmosphäre in einem 250 mL Kolben in 60 mL THF gelöst und auf 0°C gekühlt. 1-Propynylmagnesiumbromid (0,5 M in THF, 26,70 mL, 13,35 mmol) wurde langsam zugetropft und die gelbliche Suspension 1 h bei 0°C weitergerührt. Anschließend wurden 100 mL gesättigte Kochsalzlösung zugegeben und die Phasen getrennt. Die wässrige Phase wurde mit 3 x 50 mL Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Das Rohprodukt wurde mittels FSC (Kieselgel, Isohexan/Ethylacetat 3:1) aufgereinigt.

Ausbeute: 1,86 g (7,87 mmol) blassgelber Feststoff (65%)

¹H NMR [400 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$] δ (ppm) = 6,21 (s, 2H, 3-H, 5-H), 5,59 (dq, $J = 8,5, 2,3$ Hz, 1H, 1'-H), 4,72 (d, $J = 8,5$ Hz, 1H, OH), 3,76 (s, 9H, OCH_3), 1,74 (d, $J = 2,4$ Hz, 3H, 4'-H).

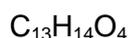
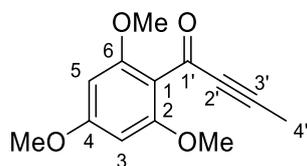
¹³C NMR [101 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$] δ (ppm) = 160,4 (C-4), 158,0 (C-2, C-6), 110,8 (C-1), 91,2 (C-3, C-5), 81,6 (C-2'), 77,4 (C-3'), 55,8 (OCH_3), 55,3 (OCH_3), 54,0 (C-1'), 3,3 (C-4').

IR (ATR): $\tilde{\nu}_{\text{max}}/\text{cm}^{-1} = 3501, 2910, 2168, 1597, 1415, 1222, 1206, 1148, 1101, 1058, 993, 950, 831, 810, 786, 728$

HRMS (EI): $m/z = 236,1046$ (berechnet für $[\text{C}_{13}\text{H}_{16}\text{O}_4]^+$: $m/z = 236,1043$)

Schmelzpunkt: 132°C

1-(2,4,6-Trimethoxyphenyl)but-2-in-1-on (54)



$M = 234,09 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$

1-(2,4,6-Trimethoxyphenyl)but-2-in-1-ol (**53**; 1,65 g, 6,98 mmol) wurde in einem 250 mL Kolben in 80 mL Dichlormethan gelöst und 9,13 g Mangan(II)oxid (105 mmol) zugegeben. Die schwarze Suspension wurde 14 Stunden bei Raumtemperatur gerührt und anschließend über Kieselgur filtriert. Der Filterkuchen wurde mit 50 mL Ethylacetat nachgewaschen und das Filtrat am Rotationsverdampfer eingeeengt. Das Rohprodukt wurde mittels FSC (Kieselgel, Isohexan/Ethylacetat 3:1) aufgereinigt.

Ausbeute: 1,52 g (6,49 mmol) blassgelber Feststoff (93%)

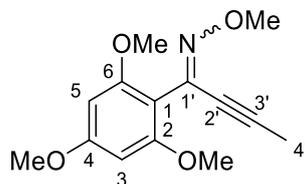
$^1\text{H NMR}$ [400 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$] δ (ppm) = 6,26 (s, 2H, 3-H, 5-H), 3,81 (s, 3H, 4-OCH₃), 3,75 (s, 6H, 2-OCH₃, 6-OCH₃), 2,03 (s, 3H, 4'-H).

$^{13}\text{C-NMR}$ [101 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$]: δ (ppm) = 177,7 (C-1'), 163,2 (C-4), 158,9 (C-2, C-6), 112,5 (C-1), 91,6 (C-3, C-5), 90,5 (C-3'), 82,7 (C-2'), 56,4 (2-OCH₃, 6-OCH₃), 56,0 (4-OCH₃), 4,1 (C-4').

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ (cm^{-1}) = 3502, 2947, 2845, 2235, 2201, 1651, 1606, 1584, 1467, 1456, 1420, 1345, 1260, 1229, 1204, 1160, 1121, 1114, 1052, 1031, 948, 891, 810, 761

HRMS (EI): $m/z = 234,0887$ (berechnet für $[\text{C}_{13}\text{H}_{14}\text{O}_4]^+$: $m/z = 234,0887$)

Schmelzpunkt: 124°C

1-(2,4,6-Trimethoxyphenyl)but-2-in-1-on-O-methyloxim (55)

$C_{14}H_{17}NO_4$

$M = 263,29 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$

1-(2,4,6-Trimethoxyphenyl)but-2-in-1-on (**54**; 820 mg, 3,50 mmol) wurde in einem 100 mL Kolben in 15 mL Methanol gelöst und *O*-Methylhydroxylamin (585 mg, 7,00 mmol), wasserfreies Natriumsulfat (994 mg, 7,00 mmol) und 1 mL Pyridin zugegeben. Die Suspension wurde 18 h bei 45°C gerührt, anschließend wurden 25 mL Wasser zugegeben und mit 3 x 15 mL Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit 15 mL gesättigter Kochsalzlösung gewaschen und mittels FSC (Kieselgel, Dichlormethan) aufgereinigt. Das Produkt wurde als Gemisch aus *E*- und *Z*- Isomer erhalten. Das Verhältnis wurde mittels NMR-Spektroskopie bestimmt und betrug 1 zu 7,5 (*Z* zu *E*)

Ausbeute: 160 mg (0,608 mmol) blassgelber Feststoff (17%)

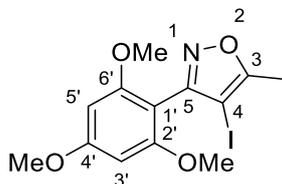
$^1\text{H NMR}$ [400 MHz, CDCl_3] δ (ppm) = 6,33 (s, 0,4H, 3-H, 5-H, *Z*), 6,13 (s, 2H, 3-H, 5-H, *E*), 4,06 (s, 0,6H, NOCH_3 , *Z*), 4,05 (s, 3H, NOCH_3 , *E*), 3,92 (s, 0,6H, 4- OCH_3 , *Z*), 3,87 (s, 1,2H, 2- OCH_3 , 6- OCH_3 , *Z*), 3,81 (s, 3H, 4- OCH_3 , *E*), 3,80 (s, 6H, 2- OCH_3 , 6- OCH_3 , *E*), 2,07 (s, 0,6H, 4'-H, *Z*), 2,06 (s, 3H, 4'-H, *E*).

$^{13}\text{C-NMR}$ [101 MHz, CDCl_3]: δ (ppm) = 162,1 (C-4), 159,3 (C-2, C-6), 134,8 (C-1'), 105,0 (C-1), 96,7 (C-3'), 91,3 (C-3, C-5), 73,9 (C-2'), 62,1 (NOCH_3), 56,3 (2- OCH_3 , 6- OCH_3), 55,9 (4- OCH_3), 4,7 (C-4').

IR (ATR): $\tilde{\nu}_{\text{max}}/\text{cm}^{-1} = 2962, 2213, 1605, 1591, 1503, 1470, 1413, 1347, 1313, 1228, 1209, 1162, 1100, 1041, 1032, 949, 8861, 812, 791$

HRMS (EI): $m/z = 263,1152$ (berechnet für $[\text{C}_9\text{H}_{11}\text{NS}]^+$: $m/z = 263,1152$)

Schmelzpunkt: 146°C

4-Iod-5-methyl-3-(2,4,6-trimethoxyphenyl)isoxazol (56)

$C_{13}H_{14}INO_4$

$M = 375,16 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$

1-(2,4,6-Trimethoxyphenyl)but-2-in-1-on-O-methyloxim (**55**; 65,8 mg, 0,252 mmol) wurde in einem 10 mL Kolben in 2,5 mL Dichlormethan gelöst und Iodmonochlorid (318 mg, 0,300 mmol) zugegeben. Die violette Lösung wurde 1 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurden 5 mL wässrige, gesättigte Natriumthiosulfat Lösung zugegeben und die resultierenden Phasen getrennt. Die wässrige Phase wurde mit 3 x 5 mL Dichlormethan extrahiert, die vereinigten organischen Phasen mit 5 mL wässriger, gesättigter Natriumthiosulfat Lösung gewaschen, über wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet, filtriert und am Rotationsverdampfer zur Trockene eingengt. Das Rohprodukt wurde mittels FSC (Kieselgel, Dichlormethan pur) aufgereinigt.

Ausbeute: 34 mg (0,091 mmol) farbloser Feststoff (36%)

$^1\text{H NMR}$ [400 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$] δ (ppm) = 6,33 (s, 2H, 3'-H, 5'-H), 3,85 (s, 3H, OCH_3), 3,69 (s, 6H, OCH_3), 2,46 (s, 3H, CH_3)

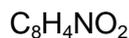
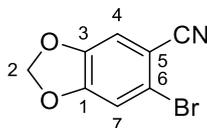
$^{13}\text{C NMR}$ [101 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$] δ (ppm) = 170,0 (C-3), 163,1 (C-4'), 160,8 (C-5), 159,5 (C2', C6'), 99,1 (C-1'), 91,4 (C-3', C-5'), 65,5 (C-4), 56,2 (4'- OCH_3), 55,9 (2'- OCH_3 , 6'- OCH_3), 12,8 (CH_3)

IR (ATR): $\tilde{\nu}_{\text{max}}/\text{cm}^{-1} = 3138, 2951, 2948, 2937, 1591, 1571, 1454, 1437, 1373, 1178, 966,$

HRMS (EI): $m/z = 375,9994$ (berechnet für $[\text{C}_{13}\text{H}_{14}\text{INO}_4]^+$: $m/z = 375,9996$)

Schmelzpunkt: 171°C

6-Brombenzo[*d*][1,3]dioxol-5-carbonitril (66)*



$M = 226,03 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$

Die Darstellung von **66** erfolgte nach Synthesevorschrift A unter Verwendung von 2,3 g (10 mmol) 6-Bromobenzo[*d*][1,3]dioxol-5-carbaldehyd (**44**). Die Aufreinigung erfolgte mittels FSC (Kieselgel, Isohexan/Ethylacetat 2:1).

Ausbeute: 2,16 g (9,56 mmol) farbloser Feststoff (96%)

$^1\text{H NMR}$ [400 MHz, CDCl_3] δ (ppm) = 7,09 (s, 1H, 4-H), 7,03 (s, 1H, 7-H), 6,10 (s, 2H, 2-H).

$^{13}\text{C NMR}$ [101 MHz, CDCl_3] δ (ppm) = 152,4 (C-1), 147,6 (C-3), 119,1 (C-6), 117,5 (CN), 113,6 (C-4), 112,7 (C-7), 108,1(C-5), 103,2 (C-2)

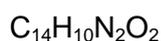
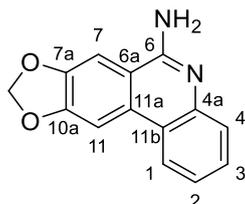
IR (ATR): $\tilde{\nu}$ (cm^{-1}) = 2913, 2231, 1610, 1496, 1480, 1349, 1259, 1215, 1111, 1031, 922, 880, 838, 737

HRMS (EI): $m/z = 224,9423$ (berechnet für $[C_8H_4NO_2]^+$: $m/z = 224,9420$)

Schmelzpunkt: 103 - 104°C (Literaturwert: 135°C^[149])

* Literaturbekannte Verbindung^[149]. Die Darstellung erfolgte durch eine neue Methode.

[1,3]Dioxol[4,5-*j*]phenanthridin-6-amin (68)



Experimenteller Teil

$$M = 238,25 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$$

Die Darstellung von **68** erfolgte nach Synthesevorschrift B unter Verwendung von 565 mg (2,50 mmol) 6-Brombenzo[*d*][1,3]dioxol-5-carbonitril (**66**). Die Aufreinigung erfolgte mittels FSC (Kieselgel, Ethylacetat/Triethylamin 99:1).

Ausbeute: 455 mg (1,91 mmol) beiger Feststoff (76%)

¹H-NMR [400 MHz, (CD₃)₂SO]: δ (ppm) = 8,35 (dd, $J = 8,2, 1,4$ Hz, 1H, 4-H), 8,13 (s, 1H, 11-H), 7,81 (s, 1H, 7-H), 7,52 – 7,39 (m, 2H, 1-H, 3-H), 7,21 (ddd, $J = 8,3, 6,8, 1,5$ Hz, 1H, 2-H), 6,78 (s, 2H, NH₂), 6,22 (s, 2H, OCH₂O)

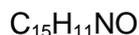
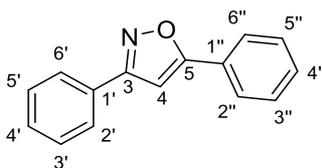
¹³C-NMR [101 MHz, (CD₃)₂SO]: δ (ppm) = 155,1 (C-6), 150,4 (C-7a oder C-10a), 147,6 (C-7a oder C-10a), 144,6 (C-4a), 130,7 (C-11a), 127,8 (C-3), 125,5 (C-1), 122,4 (C-4), 121,4 (C-2), 120,6 (C-11b), 114,1 (C-6a), 102,3 (C-7), 101,9 (OCH₂O), 100,8 (C-11)

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) = 3484, 3059, 1660, 1530, 1501, 1454, 1396, 1233, 1035, 1029, 938, 848, 829, 753, 731

HRMS (EI): $m/z = 254,1051$ (berechnet für [C₁₄H₁₀N₂O₂]⁺: $m/z = 254,1050$)

Schmelzpunkt: 250 – 252°C

3,5-Diphenylisoxazol (**87**)^{*}



$$M = 221,26 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$$

In einem 250 mL Kolben wurde Dibenzoylmethan (8,97 g, 40,0 mmol) in 40 mL Ethanol und 60 mL Wasser suspendiert und Hydroxylaminhydrochlorid (3,47 g, 50,0 mmol) zugegeben. Die Mischung wurde 4 h zum Rückfluss erhitzt und anschließend auf Raumtemperatur abgekühlt. Nach Zugabe von 80 mL Wasser wurde das Gemisch in einen Scheidetrichter überführt und 100 mL Dichlormethan zugegeben. Die beiden Phasen wurden getrennt und die wässrige Phase mit 2 x 100 mL Dichlormethan extrahiert. Die organischen Phasen wurden

Experimenteller Teil

vereinigt, mit 100 mL gesättigter Kochsalzlösung gewaschen, über wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet, filtriert und am Rotationsverdampfer zur Trockene eingengt. Der Rückstand wurde mittels FSC (Kieselgel, Isohexan/Diethylether 10:1) aufgereinigt.

Ausbeute: 8,26 g (37,3 mmol) farbloser Feststoff (93%)

¹H-NMR [500 MHz, (CD₃)₂SO]: δ (ppm) = 8,04 – 7,88 (m, 4H, 2'-H, 6'-H, 2''-H, 6''-H), 7,71 – 7,49 (m, 7H, 4-H, 3'-H, 4'-H, 5'-H, 3''-H, 4''-H, 5''-H).

¹³C-NMR [126 MHz, (CD₃)₂SO]: δ (ppm) = 162,8 (C-5), 154,0 (C-3), 130,3 (CH), 129,8 (CH), 129,7 (CH), 128,7 (CH), 128,7 (CH), 128,7 (CH), 128,7 (CH), 128,0 (CH), 126,2 (CH), 126,0 (CH), 124,9 (CH), 124,2 (CH), 98,3 (C-4)

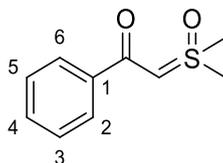
IR (ATR): $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) = 3114, 1649, 1619, 1594

HRMS (EI): m/z = 221,0835 (berechnet für [C₁₅H₁₁NO]⁺: m/z = 221,0835)

Schmelzpunkt: 140°C (Literaturwert: 139,5-141,2^[72])

* Literaturbekannte Verbindung^[72]

2-(Dimethyl(oxo)-λ⁶-sulfanylidene)-1-phenylethan-1-on (88)*



C₁₀H₁₂O₂S

$M = 196,26 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$

Trimethylsulfoxoniumiodid (6,01 g, 27,3 mmol) wurde in einem 250 mL Schlenkkolben in 55 mL trockenem THF unter Stickstoffatmosphäre suspendiert und mithilfe von Aluminiumfolie vor Licht geschützt. Im Stickstoffgegenstrom wurde Kalium-*tert*-butanolat (3,06 g, 27,3 mmol) zugegeben und die Mischung 2 Stunden zum Rückfluss erhitzt. Anschließend wurde das Gemisch im Eisbad auf 0°C abgekühlt und Benzoylchlorid (1,06 mL, 1,28 g, 9,10 mmol) über einen Zeitraum von 10 Minuten tropfenweise zugegeben. Das Gemisch wurde 2 h bei Raumtemperatur gerührt und anschließend am Rotationsverdampfer eingengt. Nach Zugabe von jeweils 50 mL Wasser und Ethylacetat, wurden die beiden Phasen getrennt und die wässrige

Experimenteller Teil

Phase mit 3 x 40 mL extrahiert. Die organischen Phasen wurden vereinigt, mit 2 x 50 mL gesättigter Kochsalzlösung gewaschen, über wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet, filtriert und am Rotationsverdampfer zur Trockene eingengt. Der Rückstand wurde mittels FSC (Kieselgel, Ethylacetat/Methanol 15:1) aufgereinigt.

Ausbeute: 1,62 g (8,26 mmol) farbloser Feststoff (91%)

¹H-NMR [500 MHz, CDCl₃]: δ (ppm) = 7,79 (d, *J* = 7,1 Hz, 2H, 2-H, 6-H)), 7,45-7,35 (m, 3H, 3-H, 4-H, 5-H), 4,98 (s, 1H, CHS), 3,50 (s, 6H, CH₃)

¹³C-NMR [126 MHz, CDCl₃]: δ (ppm) = 182,6 (CO), 139,2 (C-1), 131,1 (C-4), 128,5 (C-3, C-5), 126,9 (C-2, C-6), 68,7 (CHS), 42,8 (CH₃)

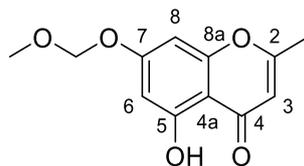
IR (ATR): $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) = 3010, 1587, 1523, 1385, 1173, 1025, 1134, 863, 793, 757

HRMS (EI): *m/z* = 196,0551 (berechnet für [C₁₀H₁₂O₂S]⁺: *m/z* = 196,0553)

Schmelzpunkt: 113 – 114°C (Literaturwert: 114-115°C^[150])

* Literaturbekannte Verbindung^[70]

5-Hydroxy-7-(methoxymethoxy)-2-methyl-4*H*-chromen-4-on (98)*



C₁₂H₁₂O₅

M = 236,22 g · mol⁻¹

5,7-Dihydroxy-2-methyl-4*H*-chromen-4-on (**28**) (2,31 g, 12,0 mmol) wurde in einem 250 mL Kolben in 40 mL DMF gelöst und mit DIPEA (1,55 g, 2,09 mL, 12,0 mmol) versetzt. Die Lösung wurde unter Rühren auf 0°C gekühlt und 15 Minuten weitergerührt. Anschließend wurde (Chlormethyl)methylether (0,97 g, 0,91 mL, 12 mmol) mit einer Spritze langsam zugegeben, der Kolben verschlossen, auf Raumtemperatur erwärmt und 2 h bei dieser Temperatur gerührt. Danach wurden 100 mL Wasser zugegeben und mit 3 x 35 mL Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit 2 x 25 mL gesättigter Kochsalzlösung gewaschen, über wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet, filtriert und am Rotationsverdamp-

Experimenteller Teil

fer zur Trockene eingengt. Der Rückstand wurde mittels FSC (Kieselgel, Isohexan/Ethylacetat 3:1) aufgereinigt.

Ausbeute: 2,68 g (11,3 mmol) blassgelber Feststoff (94%)

¹H-NMR [400 MHz, (CD₃)₂SO]: δ (ppm) = 12,81 (s, 1H, OH), 6,65 (d, *J* = 2,2 Hz, 1H, 8-H), 6,42 (d, *J* = 2,2 Hz, 1H, 6-H), 6,25 (d, 1H, 3-H), 5,29 (s, 2H, CH₂), 3,39 (s, 3H, OCH₃), 2,37 (s, 2H, CH₃)

¹³C-NMR [101 MHz, (CD₃)₂SO]: δ (ppm) = 182,0 (C-4), 168,3 (C-2), 162,4 (C-7), 161,2 (C-5), 157,4 (C-8a), 108,3 (C-3), 104,9 (C-4a), 99,3 (C-6), 94,3 (C-8), 93,9 (CH₂), 56,0 (OCH₃), 20,0 (CH₃)

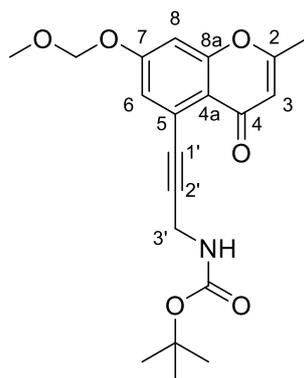
IR (ATR): $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) = 2921, 1624, 1652, 1606, 1592, 1502, 1435, 1405, 1326, 1263, 1132, 1071, 921, 836, 778

HRMS (EI): *m/z* = 236,0678 (berechnet für [C₁₂H₁₂O₅]⁺: *m/z* = 236,0679)

Schmelzpunkt: 78 – 79°C (Literaturwert 109-111°C^[32])

* Literaturbekannte Verbindung^[32]

tert-Butyl (3-(7-(methoxymethoxy)-2-methyl-4-oxo-4*H*-chromen-5-yl)prop-2-in-1-yl)carbamat (100)



C₂₀H₂₃NO₆

M = 373,41 g · mol⁻¹

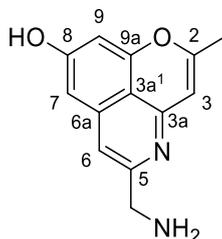
Die Darstellung von **100** erfolgte nach Synthesvorschrift E unter Verwendung von 737 mg (2,00 mmol) 7-(Methoxymethoxy)-2-methyl-4-oxo-4*H*-chromen-5-yl-trifluormethansulfonat

Experimenteller Teil

(**29**) und 372 mg (2,40 mmol) *N*-(*tert*-Butoxycarbonyl)propargylamin (**99**). Die Aufreinigung erfolgte mittels FSC (Kieselgel, Isohexan/Ethylacetat 1:1). Trotz sorgfältiger Säulenchromatographie konnte **100** nicht analysenrein gewonnen werden und wurde als Gemisch zu **101** umgesetzt.

Ausbeute: 512 mg (1,37 mmol) schwarzes Harz (ca. 69% Rohprodukt)

5-(Aminomethyl)-2-methylpyrano[2,3,4-*ij*]isochinolin-8-ol (**101**)



$C_{13}H_{12}N_2O_2$

$M = 228,25 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$

Die Darstellung von **101** erfolgte nach Synthesevorschrift F unter Verwendung von 512 mg (1,37 mmol) *tert*-Butyl (3-(7-(methoxymethoxy)-2-methyl-4-oxo-4*H*-chromen-5-yl)prop-2-yn-1-yl)carbamat - Gemisch (**100**). Die Aufreinigung erfolgte mittels FSC (Kieselgel, Dichlormethan/Methanol 8:1 unter Zusatz von 0,1% Triethylamin).

Ausbeute: 32 mg (0,14 mmol) gelber Feststoff (7% über 2 Schritte)

¹H-NMR [500 MHz, $(CD_3)_2SO$]: δ (ppm) = 10,68 (s, 1H, OH), 8,43 (s, 2H, NH_2), 7,12 (s, 1H, 6-H), 6,66 (d, $J = 2,3$ Hz, 2H, 7-H, 9-H), 6,17 (s, 1H, 3-H), 3,96 (s, 2H, CH_2), 2,23 (d, $J = 0,9$ Hz, 3H, CH_3).

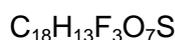
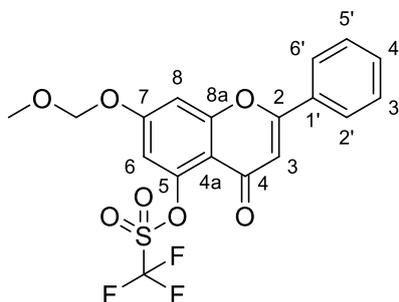
¹³C-NMR [126 MHz, $CD_3)_2SO$]: δ (ppm) = 161,2 (C-8), 159,8 (C-2), 154,8 (C-9a), 150,9 (C-3a), 148,4 (C-5), 137,3 (C-6a), 113,1 (C-3a¹), 112,1 (C6), 105,4 (C-3), 101,6 (C-7), 100,1 (C-9), 43,2 (CH_2), 19,5 (CH_3)

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ (cm^{-1}) = 3354, 2918, 1654, 1607, 1425, 1396, 1367, 1160, 1082, 833

HRMS (EI): $m/z = 228,0892$ (berechnet für $[C_{13}H_{12}N_2O_2]^+$: $m/z = 228,0893$)

Schmelzpunkt: 120°C

HPLC-Reinheit: 97% (210 nm; Methode 1), 98% (254 nm; Methode 1)

7-(Methoxymethoxy)-4-oxo-2-phenyl-4H-chromen-5-yl-trifluormethansulfonat (103)

$$M = 430,35 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$$

Chrysin (**102**; 4,00 g, 15,7 mmol) wurde in einem 250 mL Kolben in 90 mL DMF gelöst und mit DIPEA (4,68 g, 6,30 mL, 36,2 mmol) versetzt. Die Lösung wurde unter Rühren auf 0°C gekühlt und 15 Minuten weitergerührt. Anschließend wurde (Chlormethyl)methylether (1,52 g, 1,43 mL, 18,9 mmol) mit einer Spritze langsam zugetropft, der Kolben verschlossen, auf Raumtemperatur erwärmt und 7 h bei dieser Temperatur gerührt. Danach wurden 150 mL Wasser zugegeben und mit 3 x 100 mL Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit 2 x 100 mL gesättigter Kochsalzlösung gewaschen, über wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet, filtriert und am Rotationsverdampfer zur Trockene eingeeengt. Der Rückstand wurde in einem 250 mL Kolben in 50 mL THF gelöst und auf 0°C gekühlt. Anschließend wurden 942 mg (23,5 mmol) Natriumhydrid (60%ige Dispersion in Paraffinöl) zugegeben und die Mischung 15 Minuten bei 0°C gerührt. In einem zweiten Gefäß wurden 8,41 g (23,5 mmol) *N*-Phenyl-bis-(trifluormethansulfonimid) in 20 mL THF gelöst und mit einer Spritze der ursprünglichen Reaktionsmischung zugetropft. Die gelbe Suspension wurde auf Raumtemperatur erwärmt und 3 h bei dieser Temperatur gerührt, wobei sich eine orange Lösung bildete. Anschließend wurden - langsam und unter starkem Rühren - 150 mL gesättigte Ammoniumchloridlösung zugegeben und die resultierende wässrige Suspension mit 3 x 100 mL Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit 2 x 70 mL gesättigter Kochsalzlösung gewaschen, über wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet, filtriert und am Rotationsverdampfer zur Trockene eingeeengt. Der Rückstand wurde mittels FSC (Kieselgel, Isohexan/Ethylacetat 5:1) aufgereinigt.

Ausbeute: 6,60 g (15,4 mmol) gelber Feststoff (98%)

Experimenteller Teil

¹H-NMR [400 MHz, (CD₃)₂SO]: δ (ppm) = 8,12 (dt, *J* = 7,5, 1,1 Hz, 2H, 2'-H, 6'H), 7,68 – 7,54 (m, 4H, 8-H, 3'-H, 4'-H, 5'-H), 7,17 – 7,11 (m, 1H, 6-H), 7,01 (s, 1H, 3-H), 5,43 (s, 2H, CH₂), 3,45 (s, 3H, CH₃).

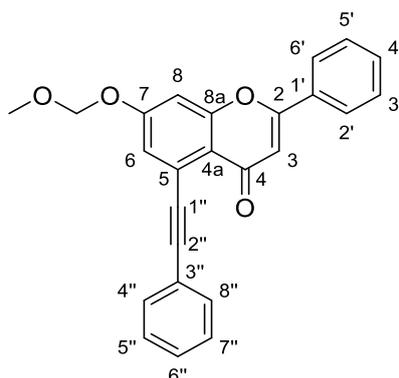
¹³C-NMR [101 MHz, (CD₃)₂SO]: δ (ppm) = 175,4 (C-4), 162,4 (C-2), 160,8 (C-7), 158,2 (C-8a), 147,2 (C-5), 132,6 (C-4'), 130,8 (C-1'), 129,6 (C-3', C-5'), 126,9 (C-2', C-6'), 117,2 (CF₃), 111,9 (C-4a), 109,9 (C-6), 108,1 (C-3), 105,3 (C-8), 95,1 (CH₂), 56,8 (CH₃)

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) = 2925, 1637, 1609, 1427, 1346, 1216, 1147, 1023, 974, 927, 846, 819, 772

HRMS (EI): *m/z* = 430,0328 (berechnet für [C₂₁H₂₈N₂O₂Si]⁺: *m/z* = 430,0329)

Schmelzpunkt: 120°C

7-(Methoxymethoxy)-2-phenyl-5-(phenylethynyl)-4*H*-chromen-4-on (104)



C₂₅H₁₈O₄

M = 382,42 g · mol⁻¹

Die Darstellung von **104** erfolgte nach Synthesevorschrift E unter Verwendung 861 mg (2,00 mmol) 7-(Methoxymethoxy)-4-oxo-2-phenyl-4*H*-chromen-5-yl-trifluormethansulfonat (**103**) und 0,264 mL (245 mg, 2,40 mmol) Phenylacetylen. Die Aufreinigung erfolgte mittels FSC (Kieselgel, Isohexan/Ethylacetat 3:1).

Ausbeute: 358 mg (0,936 mmol) gelber Feststoff (47%)

¹H-NMR [400 MHz, CDCl₃]: δ (ppm) = 7,95 – 7,86 (m, 2H, 2'-H, 6'-H), 7,74 – 7,67 (m, 2H, 4''-H, 8''-H), 7,52 (dd, *J* = 5,3, 2,0 Hz, 3H, 3'-H, 4'-H, 5'-H), 7,42 – 7,31 (m, 3H, 5''-H, 6''-H, 7''-

Experimenteller Teil

H), 7,26 (d, $J = 2,3$ Hz, 1H, 6-H), 7,17 (d, $J = 2,4$ Hz, 1H, 8-H), 6,74 (s, 1H, 3-H), 5,30 (s, 2H, CH₂), 3,53 (s, 3H, OCH₃)

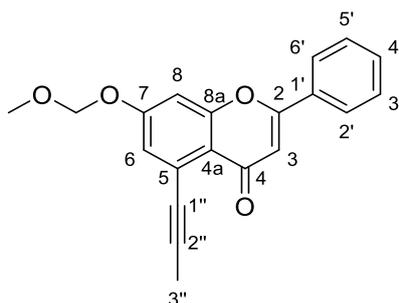
¹³C-NMR [101 MHz, CDCl₃]: δ (ppm) = 177,2 (C-4), 161,8 (C-2), 160,1 (C-7), 158,4 (C-8a), 132,1 (C-4'', C-8''), 131,5 (C-1'), 131,5 (C-4'), 129,0 (C-3', C-5'), 128,7 (C-6''), 128,3 (C-5'', C-7''), 126,1 (C-2', C-6'), 123,6 (C-5), 123,4 (C-3''), 120,6 (C-6), 118,9 (C-4a), 108,4 (C-3), 104,0 (C-8), 95,3 (C-2''), 94,4 (CH₂), 88,6 (C-1''), 56,5 (OCH₃)

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) = 3056, 1646, 0595, 1374, 1346, 1229, 1151, 1071, 1016, 833, 760

HRMS (EI): $m/z = 382,1198$ (berechnet für [C₂₅H₁₈O₄]⁺: $m/z = 382,1200$)

Schmelzpunkt: 141°C

7-(Methoxymethoxy)-2-phenyl-5-(prop-1-in-1-yl)-4H-chromen-4-on (105)



C₂₀H₁₆O₄

$M = 320,34 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$

Die Darstellung von **105** erfolgte nach Synthesevorschrift E unter Verwendung von 861 mg (2,00 mmol) 7-(Methoxymethoxy)-4-oxo-2-phenyl-4H-chromen-5-yl-trifluormethansulfonat (**103**) und Propin (1 M in DMF, 2,4 mL, 2,4 mmol). Die Aufreinigung erfolgte mittels FSC (Kieselgel, Isohexan/Ethylacetat 2:1). Es konnten außerdem 323 mg (0,751 mmol) Edukt (**103**) zurückgewonnen werden.

Ausbeute: 313 mg (0,976 mmol) oranger Feststoff (49%)

¹H-NMR [400 MHz, (CD₃)₂SO]: δ (ppm) = 8,13 – 8,04 (m, 2H, 2'-H, 6'-H), 7,60 – 7,56 (m, 3H, 3'-H, 4'-H, 5'-H), 7,35 (d, $J = 2,4$ Hz, 1H, 8-H), 7,10 (d, $J = 2,4$ Hz, 1H, 6-H), 6,88 (s, 1H, 3-H), 5,36 (s, 2H, CH₂), 3,42 (s, 3H, OCH₃), 2,11 (s, 3H, 3''-H)

Experimenteller Teil

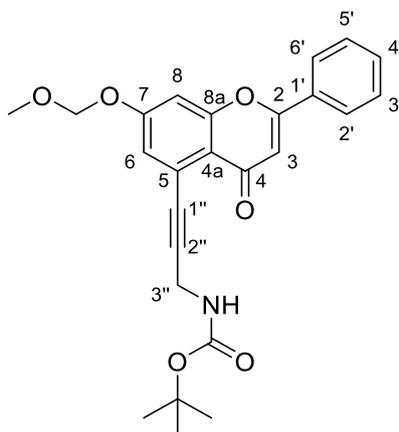
$^{13}\text{C-NMR}$ [101 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$]: δ (ppm) = 175,6 (C-4), 160,8 (C-2), 159,6 (C-7), 157,8 (C-8a), 131,7 (C-4'), 130,8 (C-1'), 129,1 (C-3', C-5'), 126,2 (C-2', C-6'), 123,2 (C-5), 120,4 (C-6), 118,1 (C-4a), 107,5 (C-3), 104,1 (C-8), 94,0 (CH_2), 92,5 (C-2''), 78,8 (C-1''), 56,1 (OCH_3), 4,7 (C-3'')

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ (cm^{-1}) = 2912, 1647, 1597, 1375, 1342, 1164, 1076, 991, 917, 843, 763

HRMS (ESI): m/z = 321,1122 (berechnet für $[\text{C}_{20}\text{H}_{17}\text{O}_4]^{+}$: m/z = 321,1121)

Schmelzpunkt: 123°C

***tert*-Butyl (3-(7-(methoxymethoxy)-4-oxo-2-phenyl-4*H*-chromen-5-yl)prop-2-in-1-yl)carbammat (**106**)**



$\text{C}_{25}\text{H}_{25}\text{NO}_6$

$M = 435,48 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$

Die Darstellung von **106** erfolgte nach Synthesevorschrift E unter Verwendung von 861 mg (2,00 mmol) 7-(Methoxymethoxy)-4-oxo-2-phenyl-4*H*-chromen-5-yl-trifluormethansulfonat (**103**) und 372 mg (2,40 mmol) *N*-(*tert*-Butoxycarbonyl)propargylamin. Die Aufreinigung erfolgte mittels FSC (Kieselgel, Isohexan/Ethylacetat 1:1).

Ausbeute: 420 mg (0,964 mmol) orangeroter Feststoff (48%)

$^1\text{H-NMR}$ [500 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$]: δ (ppm) = 8,10 (dt, $J = 6,5, 1,7$ Hz, 2H, 2'-H, 6'-H), 7,59 (td, $J = 8,8, 7,3, 4,7$ Hz, 3H, 3'-H, 4'-H, 5'-H), 7,40 (d, $J = 2,4$ Hz, 1H, 8-H), 7,35 (d, $J = 6,2$ Hz, 1H, NH), 7,12 (d, $J = 2,4$ Hz, 1H, 6-H), 6,90 (s, 1H, 3-H), 5,38 (s, 2H, OCH_2O), 4,06 (d, $J = 5,7$ Hz, 2H, 3''-H), 3,43 (s, 3H, OCH_3), 1,42 (s, 9H, *tert*-Butyl)

Experimenteller Teil

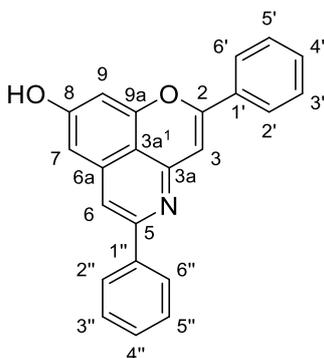
¹³C-NMR [126 MHz, (CD₃)₂SO]: δ (ppm) = 176,0 (C-4), 161,5 (C-2), 160,1 (C-7), 158,3 (C-8a), 155,8 (N-C=O), 132,2 (C-4'), 131,2 (C-1'), 129,6 (C-3', C-5'), 126,7 (C-2', C-6'), 122,7 (C-5), 121,1 (C-6), 118,5 (C-4a), 108,0 (C-3), 105,1 (C-8), 94,5 (OCH₂O), 93,5 (C-2''), 81,2 (C-1''), 78,8 (C-7''), 31,1 (C-3''), 28,7 (3 CH₃, *tert*-Butyl)

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) = 338, 1681, 1648, 1598, 1520, 1377, 1342, 1266, 1249, 1161, 1148, 1080, 1045, 992, 950, 844, 764

HRMS (ESI): m/z = 436,1763(berechnet für [C₂₅H₂₆NO₆]⁺: m/z = 436,1755)

Schmelzpunkt: 156°C

2,5-Diphenylpyrano[2,3,4-*ij*]isochinolin-8-ol (**107**)



C₂₃H₁₅NO₂

$M = 337,38 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$

Die Darstellung von **107** erfolgte nach Synthesevorschrift F unter Verwendung von 191 mg (0,500 mmol) 7-(Methoxymethoxy)-2-phenyl-5-(phenylethynyl)-4*H*-chromen-4-on (**104**). Die Aufreinigung erfolgte mittels FSC (Kieselgel, Dichlormethan/Methanol 8:1).

Ausbeute: 38 mg (0,11 mmol) gelber Feststoff (23%)

¹H-NMR [500 MHz, (CD₃)₂SO]: δ (ppm) = 10,46 (s, 1H, OH), 8,16 – 8,08 (m, 2H, 2''-H, 6''-H), 8,02 (dd, $J = 7,6, 2,2 \text{ Hz}$, 2H, 2'-H, 6'-H), 7,71 (s, 1H, 6-H), 7,59 – 7,37 (m, 6H, 3'-H, 4'-H, 5'-H, 3''-H, 4''-H, 5''-H), 7,11 (s, 1H, 3-H), 6,79 – 6,73 (m, 2H, 7-H, 9-H).

¹³C-NMR [126 MHz, (CD₃)₂SO]: δ (ppm) = 160,9 (C-8), 156,7 (C-2), 154,4 (C-9a), 151,7 (C-5), 150,4 (C-3a), 139,1 (C-6a), 138,1 (C-1''), 131,7 (C-1'), 130,5 (C-4', C4''), 128,9 (C-3', C-

Experimenteller Teil

5'), 128,5 (C-3'', C-5''), 126,5 (C-2'', C-6''), 125,3 (C-2', C-6'), 112,7 (C-3a¹), 111,3 (C-6), 104,7 (C-3), 102,1 (C-7), 100,0 (C-9)

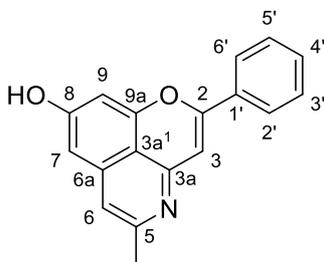
IR (ATR): $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) = 2168, 1655, 1608, 1468, 1299, 834, 764

HRMS (EI): m/z = 337,1103 (berechnet für [C₁₅H₁₄N₂O]⁺⁺: m/z = 337,1097)

Schmelzpunkt: 149°C

HPLC-Reinheit: >99% (210 nm; Methode 1), >99% (254 nm; Methode 1)

5-Methyl-2-phenylpyrano[2,3,4-*ij*]isochinolin-8-ol (**108**)



C₁₈H₁₃NO₂

$M = 275,31 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$

Die Darstellung von **108** erfolgte nach Synthesvorschrift F unter Verwendung von 160 mg (0,500 mmol) 7-(Methoxymethoxy)-2-phenyl-5-(prop-1-in-1-yl)-4*H*-chromen-4-on (**105**). Die Aufreinigung erfolgte mittels FSC (Kieselgel, Dichlormethan/Methanol 10:1).

Ausbeute: 44 mg (0,16 mmol) gelber Feststoff (32%)

¹H-NMR [400 MHz, (CD₃)₂SO]: δ (ppm) = 10,32 (s, 1H, OH), 8,00 – 7,92 (m, 2H, 2'-H, 6'-H), 7,58 – 7,47 (m, 3H, 3'-H, 4'-H, 5'-H), 6,98 (s, 1H, 3-H), 6,93 (d, $J = 0,9 \text{ Hz}$, 1H, 6-H), 6,66 (d, $J = 2,0 \text{ Hz}$, 1H, 7-H), 6,56 (d, $J = 2,0 \text{ Hz}$, 1H, 9-H), 2,41 – 2,36 (m, 3H, CH₃)

¹³C-NMR [101 MHz, (CD₃)₂SO]: δ (ppm) = 160,7 (C-8), 156,2 (C-2), 154,5 (C-9a), 153,3 (C-5), 149,9 (C-3a), 138,0 (C-6a), 131,8 (C-4'), 130,3 (C-1'), 128,9 (C-3', C-5'), 125,1 (C-2', C-6'), 112,9 (C-6), 112,0 (C-3a¹), 104,5 (C-7), 100,6 (C-3), 99,1 (C-9), 24,1 (CH₃)

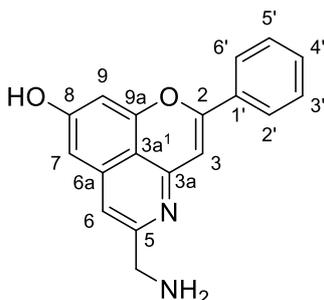
IR (ATR): $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) = 2453, 1654, 1640, 1614, 1417, 1329, 1280, 1161, 896, 836, 768

HRMS (EI): m/z = 275,0938 (berechnet für [C₁₈H₁₃NO₂]⁺⁺: m/z = 275,0941)

Schmelzpunkt: 290°C

HPLC-Reinheit: >99% (210 nm; Methode 1), >99% (254 nm; Methode 1)

5-(Aminomethyl)-2-phenylpyrano[2,3,4-*ij*]isochinolin-8-ol (109)



$C_{18}H_{14}N_2O_2$

$M = 290,32 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$

Die Darstellung von **109** erfolgte nach Synthesevorschrift F unter Verwendung von 218 mg (0,500 mmol) *tert*-Butyl (3-(7-(methoxymethoxy)-4-oxo-2-phenyl-4*H*-chromen-5-yl)prop-2-yn-1-yl)carbammat (**106**). Die Aufreinigung erfolgte mittels FSC (Kieselgel, Dichlormethan/Methanol 8:1 unter Zusatz von 0,1% Triethylamin).

Ausbeute: 22 mg (14,9 mmol) gelber Feststoff (15%)

$^1\text{H-NMR}$ [400 MHz, CD_3OD]: δ (ppm) = 7,92 (dd, $J = 6,7, 2,9$ Hz, 2H, 2'-H, 6'-H), 7,53 (dd, $J = 5,2, 2,0$ Hz, 3H, 3'-H, 4'-H, 5'-H), 7,09 (s, 1H, 6-H), 6,88 (s, 1H, 3-H), 6,78 (d, $J = 1,9$ Hz, 1H, 9-H), 6,68 (d, $J = 2,0$ Hz, 1H, 7-H), 4,05 (s, 2H, CH_2).

$^{13}\text{C-NMR}$ [101 MHz, CD_3OD]: δ (ppm) = 163,7 (C-8), 159,8 (C-2), 156,5 (C-9a), 152,9 (C-3a), 150,6 (C-5), 139,5 (C-6a), 133,4 (C-1'), 131,8 (C-4'), 130,0 (C-3', C-5'), 126,4 (C-2', C-6'), 114,5 (C-3a¹ oder C-6), 114,4 (C-3a¹ oder C-6), 104,6 (C-3), 103,4 (C-7), 101,7 (C-9), 45,6 (CH_2)

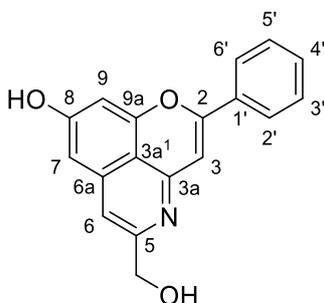
IR (ATR): $\tilde{\nu}$ (cm^{-1}) = 2729, 1644, 1598, 1574, 1451, 1391, 1290, 1208, 1171, 1146, 1005, 849, 770

HRMS (EI): $m/z = 290,1052$ (berechnet für $[\text{C}_{18}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_2]^+$: $m/z = 290,1050$)

Schmelzpunkt: 280°C

HPLC-Reinheit: 98% (210 nm; Methode 1), 96% (254 nm; Methode 1)

5-(Hydroxymethyl)-2-phenylpyrano[2,3,4-*ij*]isochinolin-8-ol (110)



$C_{18}H_{13}NO_3$

$M = 291,31 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$

Die Darstellung von **110** erfolgte nach Synthesevorschrift F unter Verwendung von 168 mg (0,500 mmol) 5-(3-Hydroxyprop-1-in-1-yl)-7-(methoxymethoxy)-2-phenyl-4*H*-chromen-4-on (**114**). Die Aufreinigung erfolgte mittels FSC (Kieselgel, Dichlormethan/Methanol 8:1).

Ausbeute: 21 mg (0,072 mmol) gelber Feststoff (14%)

$^1\text{H-NMR}$ [500 MHz, CD_3OD]: δ (ppm) = 8,10 – 8,06 (m, 2H, 2'-H, 6'-H), 7,71 – 7,61 (m, 3H, 3'-H, 4'-H, 5'-H), 7,28 (t, $J = 1,1 \text{ Hz}$, 1H, 6-H), 7,25 (s, 1H, 3-H), 7,15 (d, $J = 2,0 \text{ Hz}$, 1H, 9-H), 7,01 (d, $J = 2,0 \text{ Hz}$, 1H, 7-H), 4,70 (d, $J = 1,0 \text{ Hz}$, 2H, CH_2).

$^{13}\text{C-NMR}$ [126 MHz, CD_3OD]: δ (ppm) = 167,9 (C-8), 165,7 (C-2), 157,5 (C-9a), 150,0 (C-3a), 145,5 (C-5), 139,2 (C-6a), 134,0 (C-4'), 131,7 (C-1'), 130,5 (C-3', C-5'), 127,7 (C-2', C-6'), 114,1 (C-6), 112,0 (C-3a'), 106,8 (C-7), 103,3 (C-9), 97,1 (C-3), 61,3 (CH_2)

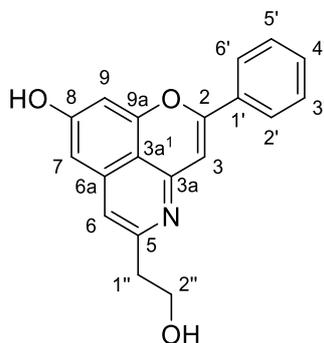
IR (ATR): $\tilde{\nu}$ (cm^{-1}) = 3322, 3063, 1652, 1634, 1608, 1598, 1434, 1377, 1353, 1162, 1137, 1098, 979, 848, 770

HRMS (EI): $m/z = 291,0892$ (berechnet für $[\text{C}_{18}\text{H}_{13}\text{NO}_3]^+$: $m/z = 291,0890$)

Schmelzpunkt: 290°C

HPLC-Reinheit: 97% (210 nm; Methode 1), >99% (254 nm; Methode 1)

5-(2-Hydroxyethyl)-2-phenylpyrano[2,3,4-*ij*]isochinolin-8-ol (111)



$C_{19}H_{15}NO_3$

$M = 305,33 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$

Die Darstellung von **111** erfolgte nach Synthesevorschrift F unter Verwendung von 175 mg (0,500 mmol) 5-(4-Hydroxybut-1-in-1-yl)-7-(methoxymethoxy)-2-phenyl-4*H*-chromen-4-on (**115**). Die Aufreinigung erfolgte mittels FSC (Kieselgel, Dichlormethan/Methanol 8:1).

Ausbeute: 18 mg (0,061 mmol) gelber Feststoff (12%)

$^1\text{H-NMR}$ [400 MHz, CD_3OD]: δ (ppm) = 7,75 (dd, $J = 7,4, 2,3$ Hz, 2H, 2'-H, 6'-H), 7,47 – 7,34 (m, 3H, 3'-H, 4'-H, 5'-H), 6,80 (s, 1H, 6-H), 6,69 (s, 1H, 3-H), 6,58 (d, $J = 1,8$ Hz, 1H, 9-H), 6,49 (d, $J = 1,9$ Hz, 1H, 7-H), 3,81 (t, $J = 6,4$ Hz, 2H, 2''-H), 2,76 (t, $J = 6,5$ Hz, 2H, 1''-H)

$^{13}\text{C-NMR}$ [101 MHz, CD_3OD]: δ (ppm) = 165,3 (C-8), 161,1 (C-2), 156,6 (C-9a), 151,0 (C-5), 150,7 (C-3a), 139,5 (C-6a), 132,7 (C-1'), 132,3 (C-4'), 130,1 (C-3', C-5'), 126,7 (C-2', C-6'), 115,7 (C-6), 112,8 (C-3a¹), 104,0 (C-7), 101,6 (C-9), 101,5 (C-3), 62,0 (C-2''), 40,2 (C-1'')

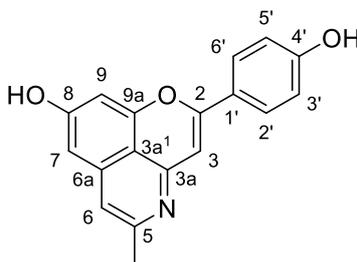
IR (ATR): $\tilde{\nu}$ (cm^{-1}) = 3387, 3087, 2930, 1653, 1636, 1608, 1597, 1439, 1373, 1278, 1163, 1075, 1027, 853, 774

HRMS (EI): $m/z = 305,1046$ (berechnet für $[C_{19}H_{15}NO_3]^{+}$: $m/z = 305,1046$)

Schmelzpunkt: 280°C

HPLC-Reinheit: 98% (210 nm; Methode 1), >99% (254 nm; Methode 1)

2-(4-Hydroxyphenyl)-5-methylpyrano[2,3,4-*ij*]isochinolin-8-ol (113)



$C_{18}H_{13}NO_3$

$M = 291,31 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$

Die Darstellung von **113** erfolgte nach Synthesevorschrift F unter Verwendung von 190 mg (0,500 mmol) 7-(Methoxymethoxy)-2-(4-(methoxymethoxy)phenyl)-5-(prop-1-in-1-yl)-4*H*-chromen-4-on (**118**). Die Aufreinigung erfolgte mittels FSC (Kieselgel, Dichlormethan/Methanol 8:1).

Ausbeute: 27 mg (0,235 mmol) gelber Feststoff (19%)

¹H-NMR [500 MHz, (CD₃)₂SO]: δ (ppm) = 11,58 (s, 1H, 8-OH), 10,62 (s, 1H, 4'-OH), 7,92 – 7,85 (m, 2H, 2'-H, 6'-H), 7,13 (d, $J = 1,2$ Hz, 1H, 6-H), 7,07 (d, $J = 2,0$ Hz, 1H, 9-H), 7,06 (s, 1H, 3-H), 7,03 – 6,98 (m, 2H, 3'-H, 5'-H), 6,89 (d, $J = 2,0$ Hz, 1H, 7-H), 2,45 (s, 3H, CH₃)

¹³C-NMR [126 MHz, (CD₃)₂SO]: δ (ppm) = 165,4 (C-8), 163,0 (C-2), 161,9 (C-4'), 155,3 (C-9a), 147,9 (C-3a), 141,1 (C-5), 137,4 (C-6a), 128,6 (C-2', C-6'), 120,4 (C-1'), 116,3 (C-3', C-5'), 113,7 (C6), 109,2 (C-3a¹), 104,3 (C-7), 101,3 (C-9), 93,6 (C-3), 18,7 (CH₃)

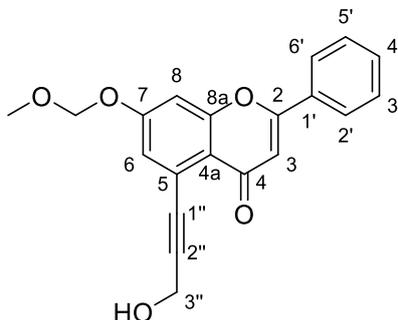
IR (ATR): $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) = 3092, 2932, 1650, 1636, 1600, 1581, 1556, 1500, 1429, 1368, 1294, 1220, 1168, 847, 838

HRMS (EI): $m/z = 291,0895$ (berechnet für [C₁₇H₁₅N₃O₂]⁺: $m/z = 291,0890$)

Schmelzpunkt: 280°C

HPLC-Reinheit: >99% (210 nm; Methode 1), >99% (254 nm; Methode 1)

5-(3-Hydroxyprop-1-in-1-yl)-7-(methoxymethoxy)-2-phenyl-4*H*-chromen-4-on (114)



$C_{20}H_{16}O_5$

$M = 336,34 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$

Die Darstellung von **114** erfolgte nach Synthesevorschrift E unter Verwendung von 861 mg (2,00 mmol) 7-(Methoxymethoxy)-4-oxo-2-phenyl-4*H*-chromen-5-yl-trifluormethansulfonat (**103**) und 0,142 mL (135 mg, 2,40 mmol) Propargylalkohol. Die Aufreinigung erfolgte mittels FSC (Kieselgel, Isohexan/Ethylacetat 2:1).

Ausbeute: 451 mg (1,34 mmol) oranger Feststoff (67%)

$^1\text{H-NMR}$ [400 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$]: δ (ppm) = 8,09 (dd, $J = 8,1, 1,7$ Hz, 2H, 2'-H, 6'-H), 7,61 – 7,55 (m, 3H, 3'-H, 4'-H, 5'-H), 7,40 (d, $J = 2,4$ Hz, 1H, 8-H), 7,14 (d, $J = 2,4$ Hz, 1H, 6-H), 6,90 (s, 1H, 3-H), 5,38 (s, 2H, OCH_2O), 4,37 (d, $J = 4,8$ Hz, 2H, CH_2), 3,44 (s, 1H, OH), 3,43 (s, 3H, CH_3)

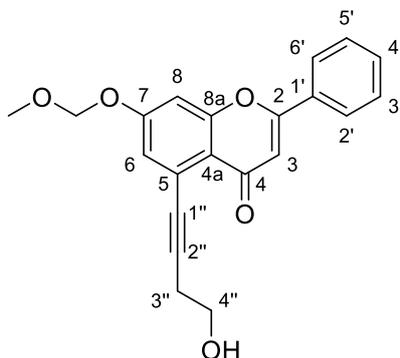
$^{13}\text{C-NMR}$ [101 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$]: δ (ppm) = 176,0 (C-4), 161,4 (C-2), 160,1 (C-7), 158,3 (C-8a), 132,2 (C-4'), 131,2 (C-1'), 129,6 (C-3', C-5'), 126,7 (C-2', C-6'), 122,8 (C-5), 121,0 (C-6), 118,4 (C-4a), 108,0 (C-3), 105,2 (C-8), 95,7 (C-2''), 94,5 (OCH_2O), 83,1 (C-1''), 56,6 (CH_3), 50,3 (C-3'')

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ (cm^{-1}) = 3272, 1645, 1595, 1451, 1377, 1344, 1150, 1102, 1075, 1045, 1015, 916, 842, 763

HRMS (EI): $m/z = 336,0987$ (berechnet für $[\text{C}_{16}\text{H}_{10}\text{N}_3\text{O}_4]^{+}$: $m/z = 336,0992$)

Schmelzpunkt: 290°C

5-(4-Hydroxybut-1-in-1-yl)-7-(methoxymethoxy)-2-phenyl-4*H*-chromen-4-on (115)



$C_{21}H_{18}O_5$

$M = 350,37 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$

Die Darstellung von **115** erfolgte nach Synthesevorschrift E unter Verwendung von 861 mg (2,00 mmol) 7-(Methoxymethoxy)-4-oxo-2-phenyl-4*H*-chromen-5-yl-trifluormethansulfonat (**103**) und 0,187 mL (173 mg, 2,40 mmol) But-3-in-1-ol. Die Aufreinigung erfolgte mittels FSC (Kieselgel, Isohexan/Ethylacetat 2:1).

Ausbeute: 412 mg (1,18 mmol) oranger Feststoff (59%)

$^1\text{H-NMR}$ [400 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$]: δ (ppm) = 7,96 – 7,79 (m, 2H, 2'-H, 6'-H), 7,57 – 7,48 (m, 3H, 3'-H, 4'-H, 5'-H), 7,07 (d, $J = 1,6 \text{ Hz}$, 1H, 6-H), 6,93 (d, $J = 1,6 \text{ Hz}$, 1H, 8-H), 6,73 (s, 1H, 3-H), 5,18 (s, 2H, OCH_2O), 3,77 (td, $J = 7,1, 5,7 \text{ Hz}$, 2H, 4''-H), 3,51 (s, 3H, OCH_3), 2,61 (t, $J = 7,1 \text{ Hz}$, 2H, 3''-H).

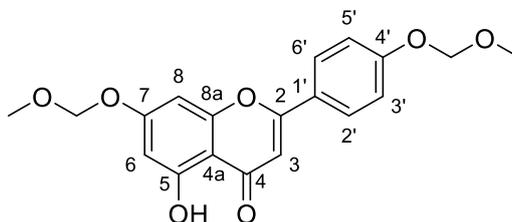
$^{13}\text{C-NMR}$ [101 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$]: δ (ppm) = 179,6 (C-4), 161,9 (C-2), 161,0 (C-7), 155,4 (C-8a), 131,6 (C-4'), 131,1 (C-1'), 129,0 (C-3', C-5'), 126,6 (C-2', C-6'), 125,6 (C-5), 121,2 (C-4a), 115,8 (C-6), 107,4 (C-3), 106,7 (C-8), 94,3 (OCH_2O), 86,6 (C-2''), 81,3 (C-1''), 60,1 (C-4''), 56,1 (OCH_3), 23,6 (C-3'').

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ (cm^{-1}) = 3448, 1940, 1636, 1598, 1382, 1347, 1152, 1075, 1045, 993, 920, 767

HRMS (EI): $m/z = 350,1150$ (berechnet für $[\text{C}_{21}\text{H}_{18}\text{O}_5]^+$: $m/z = 350,1149$)

Schmelzpunkt: 111°C

**5-Hydroxy-7-(methoxymethoxy)-2-(4-(methoxymethoxy)phenyl)-4*H*-chromen-4-on
(116)***



$C_{19}H_{18}O_7$

$M = 358,35 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$

In einem 250 mL Kolben wurde Apigenin (**112**; 4,05 g, 15,0 mmol) in 50 mL DMF gelöst und im Eisbad auf 0°C gekühlt. DIPEA (7,92 mL, 5,88 g, 45,0 mmol) wurde zugegeben und die gelbe Lösung 10 Minuten weitergerührt. Anschließend wurden 2,85 mL (3,02 g, 37,5 mmol) (Chlormethyl)methylether zugegeben, der Kolben verschlossen und 2 Stunden bei 0°C gerührt. 60 mL 1 M Salzsäure wurden langsam unter Eiskühlung zugegeben und mit 3 x 50 mL Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit 30 mL gesättigter Kochsalzlösung gewaschen, über wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet, filtriert und am Rotationsverdampfer zur Trockene eingengt. Der Rückstand wurde mittels FSC (Kieselgel, Isohexan/Ethylacetat 3:1) aufgereinigt.

Ausbeute: 5,32 g (14,9 mmol) farbloser Feststoff (99%)

$^1\text{H-NMR}$ [400 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$]: δ (ppm) = 12,89 (s, 1H, OH), 8,12 – 8,03 (m, 2H, 2'-H, 6'-H), 7,24 – 7,16 (m, 2H, 3'-H, 5'-H), 6,96 (s, 1H, 3-H), 6,85 (d, $J = 2,2$ Hz, 1H, 8-H), 6,46 (d, $J = 2,1$ Hz, 1H, 6-H), 5,33 (s, 2H, CH_2), 5,32 (s, 2H, CH_2), 3,42 (s, 3H, CH_3), 3,41 (s, 3H, CH_3)

$^{13}\text{C-NMR}$ [101 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$]: δ (ppm) = 182,1 (C-4), 163,6 (C-2), 162,5 (C-7), 161,1 (C-5), 159,9 (C-8a), 157,0 (C-4'), 128,4 (C-2', C-6'), 123,7 (C-1'), 116,4 (C-3', C-5'), 105,3 (C-4a), 104,0 (C-3), 99,5 (C-6), 94,6 (C-8), 93,9 (CH_2), 93,7 (CH_2), 56,1 (CH_3), 55,9 (CH_3)

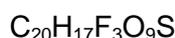
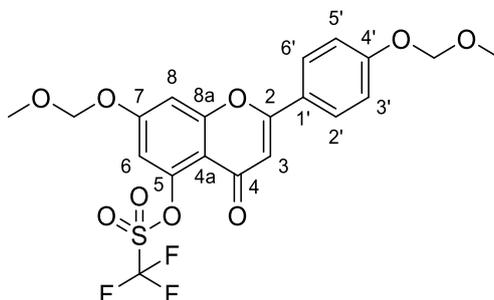
IR (ATR): $\tilde{\nu}$ (cm^{-1}) = 2956, 1643, 1612, 1513, 1424, 1375, 1207, 1150, 1139, 1088, 1078, 1010, 999, 986, 927, 858, 819

HRMS (EI): $m/z = 358,1048$ (berechnet für $[\text{C}_{19}\text{H}_{18}\text{O}_7]^+$: $m/z = 358,1047$)

Schmelzpunkt: 105°C

* Literaturbekannte Verbindung ^[151]. Die Darstellung erfolgte durch eine neue Methode.

7-(Methoxymethoxy)-2-(4-(methoxymethoxy)phenyl)-4-oxo-4*H*-chromen-5-yl trifluoromethansulfonat (117)



$$M = 490,40 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$$

5-(Hydroxymethyl)-2-phenylpyrano[2,3,4-*ij*]isochinolin-8-ol (**116**) (2,00 g, 5,57 mmol) wurde in einem 250 mL Kolben in 50 mL THF gelöst und auf 0°C gekühlt. Anschließend wurden 334 mg (8,36 mmol) Natriumhydrid (60%ige Dispersion in Paraffinöl) zugegeben und die Mischung 30 Minuten bei 0°C gerührt, wobei schnell eine gelbe Suspension entstand. In einem zweiten Gefäß wurden 2,99 g (8,36 mmol) *N*-Phenyl-bis-(trifluormethansulfonimid) in 15 mL THF gelöst und mit einer Spritze der ursprünglichen Reaktionsmischung zugetropft. Die gelbe Suspension wurde auf Raumtemperatur erwärmt und 3 h bei dieser Temperatur gerührt, wobei sich eine klare, orange Lösung bildete. Anschließend wurden - langsam und unter starkem Rühren – 100 mL gesättigte Ammoniumchloridlösung zugegeben und die resultierende wässrige Suspension mit 3 x 100 mL Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit 70 mL gesättigter Kochsalzlösung gewaschen, über wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet, filtriert und am Rotationsverdampfer zur Trockene eingengt. Der Rückstand wurde mittels FSC (Kieselgel, Isohexan/Ethylacetat 5:1) aufgereinigt.

Ausbeute: 2,55 g (5,20 mmol) farbloser Feststoff (93%)

¹H-NMR [400 MHz, (CD₃)₂SO]: δ (ppm) = 8,12 – 8,02 (m, 2H, 2'-H, 6'-H), 7,56 (d, J = 2,3 Hz, 1H, 8-H), 7,24 – 7,16 (m, 2H, 3'-H, 5'-H), 7,11 (d, J = 2,3 Hz, 1H, 6-H), 6,91 (s, 1H, 3-H), 5,43 (s, 2H, OCH₂O), 5,31 (s, 2H, OCH₂O), 3,44 (s, 3H, OCH₃), 3,41 (s, 3H, OCH₃).

¹³C-NMR [126 MHz, (CD₃)₂SO]: δ (ppm) = 174,7 (C-4), 161,9 (C-2), 160,1 (C-7), 159,8 (C-4'), 157,6 (C-8a), 146,7 (C-5), 128,3 (C-2', C-6'), 123,4 (C-1'), 116,4 (C-3', C-5'), 111,3 (C-4a), 109,3 (C-6), 106,4 (C-3), 104,8 (C-8), 94,6 (OCH₂O), 93,7 (OCH₂O), 56,3 (OCH₃), 55,9 (OCH₃).

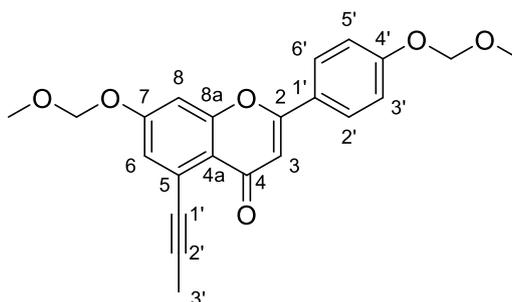
Experimenteller Teil

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) = 3092, 2967, 2843, 2785, 1968, 1789, 1325, 1222, 1104, 1050, 981

HRMS (EI): m/z = 491,0609 (berechnet für [C₂₀H₁₇F₃O₉S]⁺: m/z = 490,0613)

Schmelzpunkt: 131°C

7-(Methoxymethoxy)-2-(4-(methoxymethoxy)phenyl)-5-(prop-1-in-1-yl)-4H-chromen-4-on (118)



C₂₂H₂₀O₆

$M = 380,40 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$

Die Darstellung von **118** erfolgte nach Synthesevorschrift E unter Verwendung von 981 mg (2,00 mmol) 7-(Methoxymethoxy)-2-(4-(methoxymethoxy)phenyl)-4-oxo-4H-chromen-5-yl trifluormethansulfonat (**117**) und Propin (1 M in DMF, 2,4 mL, 2,4 mmol). Die Aufreinigung erfolgte mittels FSC (Kieselgel, Isohexan/Ethylacetat 2:1).

Ausbeute: 8,63 g (28,4 mmol) beiger, kristalliner Feststoff (62%)

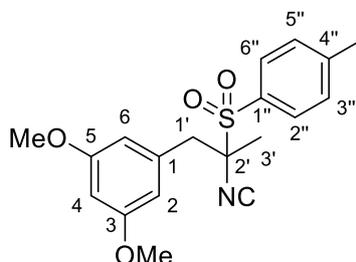
¹H-NMR [400 MHz, CD₂Cl₂]: δ (ppm) = 7,90 – 7,83 (m, 2H 2'-H, 6'-H), 7,17 – 7,13 (m, 2H, 3'-H, 5'-H), 7,11 (q, $J = 2,5 \text{ Hz}$, 3H, 6-H, 8-H), 6,57 (s, 1H, 3-H), 5,27 (s, 2H, CH₂), 5,25 (s, 2H, CH₂), 3,50 (s, 3H, OCH₃), 3,48 (s, 3H, OCH₃), 2,16 (s, 3H, 3'-H)

¹³C-NMR [101 MHz, CD₂Cl₂]: δ (ppm) = 176,5 (C-4), 161,4 (C-2), 159,9 (C-8a oder C-4'), 159,9 (C-8a oder C-4'), 158,3 (C-7), 127,6 (C-2', C-6'), 124,8 (C-1'), 124,0 (C-5), 120,8 (C-6), 118,8 (C-4a), 116,4 (C-3', 5'), 106,9 (C-3), 103,6 (C-8), 94,4 (CH₂), 94,3 (CH₂), 92,2 (C-2'), 78,6 (C-1'), 56,3 (OCH₃), 56,1 (OCH₃), 4,7 (C-3')

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) = 2910, 1636, 1595, 1508, 1375, 1344, 1241, 1142, 1075, 991, 950, 916, 836

HRMS (ESI): m/z = 381,1338 (berechnet für [C₂₂H₂₁O₆]⁺: m/z = 381,1333)

Schmelzpunkt: 123°C

1-(2-Isocyan-2-tosylpropyl)-3,5-dimethoxybenzen (123) $C_{19}H_{21}NO_4S$ $M = 359,44 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$

3,5-Dimethoxybenzylbromid (**122**; 4,35 g, 18,8 mmol) wurden in einem 500 mL Kolben in 100 mL Dichlormethan gelöst, Tetrabutylammoniumbromid (1,39 g, 3,76 mmol) und Tosylmethylisocyanid (**126**; 3,67 g, 18,8 mmol) zugegeben und die Lösung im Eisbad auf 0°C gekühlt. Anschließend wurden 100 mL Natriumhydroxid-Lösung (40% im Wasser) zugegeben, das Eisbad entfernt und das zweiphasige System 1 h intensiv gerührt. Nach Zugabe von 7,03 mL (16,0 g, 113 mmol) Iodmethan wurde das Gemisch 18 h intensiv weitergerührt. Danach wurden 150 mL Wasser zugegeben, die beiden Phasen getrennt und die wässrige Phase mit 3 x 50 mL Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit 2 x 25 mL gesättigter Kochsalzlösung gewaschen, über wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet, filtriert und am Rotationsverdampfer zur Trockene eingengt. Der Rückstand wurde mittels FSC (Kieselgel, Isohexan/Ethylacetat 5:1) aufgereinigt.

Ausbeute: 2,45 g (6,82 mmol) farbloser Feststoff (36%)

$^1\text{H-NMR}$ [400 MHz, CD_2Cl_2]: δ (ppm) = 7,91 (d, $J = 8,4$ Hz, 2H, 2''-H, 6''-H), 7,52 – 7,45 (m, 2H, 3''-H, 5''-H), 6,44 – 6,42 (m, 1H, 4-H), 6,41 (d, $J = 2,2$ Hz, 2H, 2-H, 6-H), 3,77 (s, 6H, OCH_3), 3,16 (q, $J = 13,4$ Hz, 2H, 1'-H), 2,50 (s, 4H, 4''- CH_3), 1,53 (s, 3H, 3'-H)

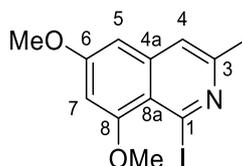
$^{13}\text{C-NMR}$ [101 MHz, CD_2Cl_2]: δ = 165,5 (NC), 161,3 (C-3, C-5), 147,3 (C-4''), 134,7 (C-1), 131,7 (C-3'', C-5''), 130,4 (C-2'', C-6''), 129,8 (C-1''), 109,2 (C-2, C-6), 100,2 (C-4), 79,2 (C-2'), 55,7 (OCH_3), 39,9 (C-1'), 22,0 (4''- CH_3), 20,8 (C-3')

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ (cm^{-1}) = 2940, 2128, 1697, 1596, 1456, 1429, 1322, 1295, 1208, 1154, 1071, 1053, 832, 816, 706

HRMS (EI): $m/z = 359,1189$ (berechnet für $[\text{C}_{19}\text{H}_{21}\text{NO}_4\text{S}]^{+}$: $m/z = 359,1186$)

Schmelzpunkt: 108°C

1-Iod-6,8-dimethoxy-3-methylisochinolin (124)



$\text{C}_{12}\text{H}_{12}\text{INO}_2$

$M = 329,14 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$

1-(2-Isocyan-2-tosylpropyl)-3,5-dimethoxybenzen (**123**; 2,00 g, 5,57 mmol) und *N*-Iodsuccinimid (2,58 g, 11,1 mmol) wurden in einem 250 mL Schlenkkolben in 100 mL Dichlormethan gelöst und unter Stickstoffatmosphäre gebracht. Nachdem die Lösung 22 h bei Raumtemperatur gerührt wurde, wurde sie im Eisbad auf 0°C gekühlt, LiHMDS (1 M in THF, 22,3 mL, 22,3 mmol) langsam zugetropft und das Gemisch 30 Minuten bei 0°C weitergerührt. Anschließend wurde das Eisbad entfernt und 7 h bei Raumtemperatur gerührt. Danach wurden vorsichtig und unter starkem Rühren 75 mL Wasser zugegeben, die beiden Phasen separiert und die wässrige Phase mit 3 x 30 mL Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit 2 x 25 mL gesättigter Kochsalzlösung gewaschen, über wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet, filtriert und am Rotationsverdampfer zur Trockene eingengt. Der Rückstand wurde mittels FSC (Kieselgel, Isohexan/Ethylacetat 5:1) aufgereinigt.

Ausbeute: 1,21 g (3,69 mmol) leicht gelblicher Feststoff (66%)

$^1\text{H-NMR}$ [500 MHz, CDCl_3]: δ (ppm) = 7,17 (s, 1H, 4-H), 6,51 (d, $J = 2,4$ Hz, 1H, 5-H oder 7-H), 6,50 (d, $J = 2,4$ Hz, 1H, 5-H oder 7-H), 3,93 (s, 3H, OCH_3), 3,89 (s, 3H, OCH_3), 2,55 (d, $J = 0,8$ Hz, 3H, CH_3)

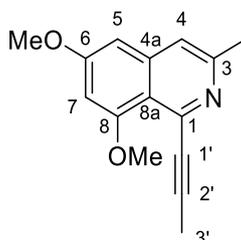
$^{13}\text{C-NMR}$ [126 MHz, CDCl_3]: δ (ppm) = 161,5 (C-6), 156,1 (C-8), 153,1 (C3), 141,1 (C4a), 118,4 (C4), 117,0 (C-8a), 112,4 (C1), 99,7 (C-7), 97,4 (C-5), 55,6 (OCH_3), 54,9 (OCH_3), 23,7 (CH_3)

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ (cm^{-1}) = 2920, 1619, 1557, 1391, 1378, 1275, 1210, 1148, 1057, 862, 932, 817

HRMS (EI): $m/z = 328,9916$ (berechnet für $[\text{C}_{12}\text{H}_{12}\text{INO}_2]^{+}$: $m/z = 328,9907$)

Schmelzpunkt: 110°C

6,8-Dimethoxy-3-methyl-1-(prop-1-in-1-yl)isochinolin (125)



$C_{15}H_{15}NO_2$

$M = 241,29 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$

Die Darstellung von **125** erfolgte nach Synthesevorschrift G unter Verwendung von 1,22 mL (1,22 mmol) Propin (1 M in THF). Die Aufreinigung erfolgte mittels FSC (Kieselgel, Isohexan/Ethylacetat 1:1).

Ausbeute: 136 mg (0,564 mmol) farbloser Feststoff (93%)

$^1\text{H-NMR}$ [400 MHz, CD_2Cl_2]: δ (ppm) = 7,23 (s, 1H, 4-H), 6,57 (d, $J = 2,3$ Hz, 1H, 7-H), 6,47 (d, $J = 2,3$ Hz, 1H, 5-H), 3,95 (s, 3H, OCH_3), 3,89 (s, 3H, OCH_3), 2,53 (d, $J = 0,7$ Hz, 3H, CH_3), 2,16 (s, 3H, 3'-H)

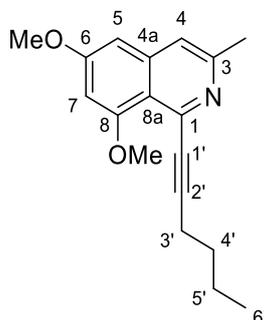
$^{13}\text{C-NMR}$ [101 MHz, CD_2Cl_2]: δ (ppm) = 162,0 (C-6), 158,6 (C-8), 152,9 (C-3), 141,3 (C-4a), 140,3 (C-1), 118,0 (C-4), 116,6 (C-8a), 99,4 (C-5), 97,1 (C-7), 89,3 (C-2'), 82,1 (C-1'), 56,4 (OCH_3), 56,0 (OCH_3), 24,3 (CH_3), 5,0 (C-3')

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ (cm^{-1}) = 2914, 1612, 1558, 1459, 1396, 1363, 1258, 1204, 1160, 1119, 1049, 911, 936, 858, 825, 790

HRMS (EI): $m/z = 241,1093$ (berechnet für $[\text{C}_{15}\text{H}_{15}\text{NO}_2]^+$: $m/z = 241,1097$)

Schmelzpunkt: 125 – 126°C

1-(Hex-1-in-1-yl)-6,8-dimethoxy-3-methylisochinolin (133)



$C_{18}H_{21}NO_2$

$M = 283,37 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$

Die Darstellung von **133** erfolgte nach Synthesevorschrift G unter Verwendung von 144 μL (102 mg, 1,22 mmol) Hex-1-in. Die Aufreinigung erfolgte mittels FSC (Kieselgel, Isohexan/Ethylacetat 1:1).

Ausbeute: 158 mg (0,558 mmol) gelber Feststoff (92%).

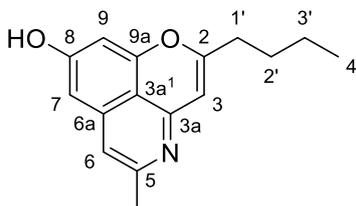
$^1\text{H-NMR}$ [400 MHz, CD_2Cl_2]: δ (ppm) = 7,24 (s, 1H, 4-H), 6,57 (d, $J = 2,3 \text{ Hz}$, 1H, 5-H), 6,47 (d, $J = 2,2 \text{ Hz}$, 1H, 7-H), 3,94 (s, 3H, OCH_3), 3,89 (s, 3H, OCH_3), 2,58 – 2,50 (m, 5H, 3'-H, CH_3), 1,77 – 1,60 (m, 2H, 4'-H), 1,61 – 1,47 (m, 2H, 5'-H), 0,98 (t, $J = 7,3 \text{ Hz}$, 3H, 6'-H).

$^{13}\text{C-NMR}$ [101 MHz, CD_2Cl_2]: δ (ppm) = 162,1 (C-6), 158,6 (C-8), 152,7 (C-3), 141,3 (C-1), 140,4 (C-4a), 118,1 (C-4), 116,5 (C-8a), 99,4 (C-5), 97,1 (C-7), 94,3 (C-2'), 82,9 (C-1'), 56,1 (OCH_3), 56,0 (OCH_3) 31,4 (C-4'), 24,2 (CH_3), 22,7 (C-5'), 20,1 (C-3'), 14,0 (C-6')

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ (cm^{-1}) = 1957, 2932, 2871, 1617, 1561, 1452, 1397, 1365, 1201, 1161, 1119, 826, 723

HRMS (EI): $m/z = 283,1568$ (berechnet für $[\text{C}_{18}\text{H}_{21}\text{NO}_2]^+$: $m/z = 283,1567$)

Schmelzpunkt: 137°C

2-Butyl-5-methylpyrano[2,3,4-*ij*]isochinolin-8-ol (134)

$C_{16}H_{17}NO_2$

$M = 255,32 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$

1-(Hex-1-in-1-yl)-6,8-dimethoxy-3-methylisochinolin (**133**) (198 mg, 0,700 mmol) wurde in einem 10 mL Schlenkkolben in 7 mL Dichlormethan gelöst und unter Stickstoffatmosphäre gebracht. Bortribromid (1,82 mL, 1,58 g, 6,31 mmol) wurde über eine Spritze tropfenweise zugegeben und die orange Lösung 6 h zum Rückfluss erhitzt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurden 6 mL Methanol und 5 mL 10% Ammoniaklösung zugegeben und die Mischung 15 Minuten stark gerührt. Die gesamte Reaktionsmischung wurde am Rotationsverdampfer eingengt und mittels FSC (Kieselgel, Dichlormethan/Methanol 10:1) aufgereinigt.

Ausbeute: 113 mg (0,443 mmol) gelber Feststoff (63%).

$^1\text{H-NMR}$ [400 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$]: δ (ppm) = 10,25 (s, 1H, OH), 6,85 (d, $J = 0,9$ Hz, 1H, 6-H), 6,50 (d, $J = 2,0$ Hz, 1H, 9-H), 6,47 (d, $J = 2,0$ Hz, 1H, 7-H), 6,10 (s, 1H, 3-H), 2,46 (t, $J = 7,5$ Hz, 2H, 1'-H), 2,33 (d, $J = 0,8$ Hz, 3H, CH_3), 1,61 (p, $J = 7,5$ Hz, 2H, 2'-H), 1,44 – 1,33 (m, 2H, 3'-H), 0,93 (t, $J = 7,3$ Hz, 3H, 4'-H).

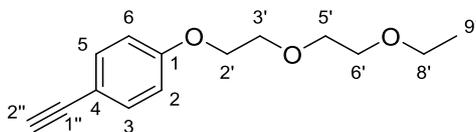
$^{13}\text{C-NMR}$ [101 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$]: δ (ppm) = 162,7 (C-2), 161,1 (C-9a), 155,4 (C-8), 153,2 (C-5), 150,5 (C-3a), 138,5 (C-6a), 112,9 (C-6), 111,9 (C-3a¹), 105,5 (C-3), 101,0 (C-7), 99,2 (C-9), 32,9 (C-1'), 28,8 (C-2'), 24,4 (CH_3), 22,0 (C-3'), 14,1 (C-4')

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ (cm^{-1}) = 2920, 2191, 1648, 1614, 1428, 1394, 1375, 1320, 1165, 834, 722

HRMS (EI): $m/z = 255,1335$ (berechnet für $[\text{C}_{14}\text{H}_{18}\text{O}_3]^+$: $m/z = 256,1332$)

Schmelzpunkt: 230°C

4-(2-(2-Ethoxyethoxy)ethoxy)-phenylacetylen (139)



$C_{14}H_{18}O_3$

$M = 234,30 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$

((4-(2-(2-Ethoxyethoxy)ethoxy)phenyl)ethynyl)trimethylsilan (**145**; 505 mg, 1,65 mmol) wurde in einem 100 mL Kolben in 20 mL Methanol gelöst und Kaliumcarbonat (300 mg, 1,82 mmol) zugegeben. Der Kolben wurde verschlossen und die orange Suspension 16 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurden 20 mL Wasser zugegeben und das Gemisch mit 3 x 25 mL Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit 2 x 25 mL gesättigter Kochsalzlösung gewaschen, über wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet, filtriert und am Rotationsverdampfer zur Trockene eingengt. Der Rückstand wurde mittels FSC (Kieselgel, Isohexan/Ethylacetat 5:2) aufgereinigt.

Ausbeute: 309 mg (1,32 mmol) leicht gelbliches Öl (80%).

$^1\text{H-NMR}$ [400 MHz, CD_2Cl_2]: δ (ppm) = 7,46 – 7,37 (m, 2H, 3-H, 5-H), 6,91 – 6,82 (m, 2H, 2-H, 6-H), 4,15 – 4,08 (m, 2H, 2'-H), 3,84 – 3,77 (m, 2H, 3'-H), 3,69 – 3,62 (m, 2H, 5'-H oder 6'-H), 3,60 – 3,53 (m, 2H, 5'-H oder 6'-H), 3,49 (qd, $J = 7,0, 0,7 \text{ Hz}$, 2H, 8'-H), 3,04 (s, 1H, 2''-H), 1,17 (td, $J = 7,0, 0,8 \text{ Hz}$, 3H, 9'-H).

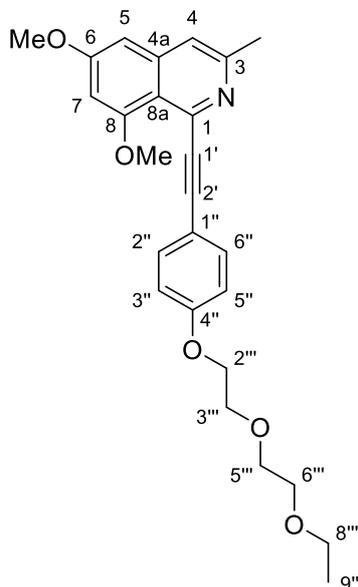
$^{13}\text{C-NMR}$ [126 MHz, CD_2Cl_2]: δ (ppm) = 159,9 (C-1), 134,1 (C3, C-5), 115,1 (C-2, C-6), 114,8 (C-4), 84,0 (C-1''), 76,2 (C-2''), 71,4 (C-5' oder C-6'), 70,4 (C-5' oder C-6'), 70,1 (C-3'), 68,2 (C-2'), 67,0 (C-8'), 15,6 (C-9')

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ (cm^{-1}) = 3284, 2870, 1605, 1506, 1288, 1246, 1101, 1058, 832

HRMS (EI): $m/z = 234,1250$ (berechnet für $[\text{C}_{14}\text{H}_{18}\text{O}_3]^+$: $m/z = 234,1250$)

HPLC-Reinheit: >99% (210 nm; Methode 1), >99% (254 nm; Methode 1)

**1-((4-(2-(2-Ethoxyethoxy)ethoxy)phenyl)ethynyl)-6,8-dimethoxy-3-methylisochinolin
(140)**



$C_{26}H_{29}NO_5$

$M = 435,52 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$

Die Darstellung von **140** erfolgte nach Synthesevorschrift G unter Verwendung von 285 mg (1,22 mmol) 4-(2-(2-Ethoxyethoxy)ethoxy)-phenylacetylen (**124**). Die Aufreinigung erfolgte mittels FSC (Kieselgel, Isohexan/Ethylacetat 1:1).

Ausbeute: 229 mg (0,526 mmol) gelber Feststoff (87%).

$^1\text{H-NMR}$ [400 MHz, CD_2Cl_2]: δ (ppm) = 7,62 – 7,54 (m, 2H, 2''-H, 6''-H), 7,31 – 7,25 (m, 1H, 4-H), 7,00 – 6,91 (m, 2H, 3''-H, 5''-H), 6,61 (d, $J = 2,3 \text{ Hz}$, 1H, 5-H), 6,52 (d, $J = 2,2 \text{ Hz}$, 1H, 7-H), 4,20 – 4,13 (m, 2H, 2'''-H), 4,02 (s, 3H, 8-OCH₃), 3,91 (s, 3H, 6-OCH₃), 3,87 – 3,80 (m, 2H, 3'''-H), 3,71 – 3,64 (m, 2H, 5'''-H oder 6'''-H), 3,61 – 3,54 (m, 2H, 5'''-H oder 6'''-H), 3,55 – 3,45 (qd, $J = 7,0, 0,7 \text{ Hz}$, 2H, 8'''-H), 2,58 (d, $J = 0,7 \text{ Hz}$, 3H, CH₃), 1,23 – 1,13 (td, $J = 7,0, 0,8 \text{ Hz}$, 3H, 9'''-H).

$^{13}\text{C-NMR}$ [101 MHz, CD_2Cl_2]: δ (ppm) = 162,1 (C-6), 159,9 (C-4''), 158,5 (C-8), 153,1 (C-3), 141,3 (C-4a), 140,1 (C-1), 134,1 (C-2'', C-6''), 118,2 (C-4), 116,6 (C-8a), 116,1 (C-1''), 115,3 (C-3'', C-5''), 99,6 (C7), 97,2 (C-5), 91,8 (C-2'), 91,0 (C-1'), 71,5 (C-5''' oder C-6'''), 70,4 (C-5''' oder C-6'''), 70,1 (C-3'''), 68,2 (C-2'''), 67,1 (C-8'''), 56,4 (8-OCH₃), 56,0 (6-OCH₃), 24,3 (CH₃), 15,6 (C-9''')

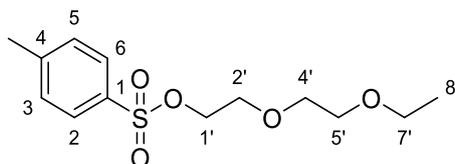
Experimenteller Teil

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ (cm^{-1}) = 2868, 2199, 1621, 1604, 1558, 1507, 1454, 1398, 1367, 1245, 1208, 1160, 1101, 1062, 1036, 856, 837, 822, 794

HRMS (EI): m/z = 435,2039 (berechnet für $[\text{C}_{26}\text{H}_{29}\text{NO}_5]^+$: m/z = 435,2040)

Schmelzpunkt: 85°C

2-(2-Ethoxyethoxy)ethyl 4-methylbenzolsulfonat (**143**)



$\text{C}_{13}\text{H}_{20}\text{O}_5\text{S}$

$M = 288,36 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$

Diethylenglycolmonoethylether (**142**; 6,72 mL, 6,71 g, 50,0 mmol) wurde in einem 250 mL Kolben mit 16 mL Wasser und 16 mL THF gemischt und im Eisbad auf 0°C gekühlt. Nach Zugabe von 2 mL (200 mmol, 2M in Wasser) Natronlauge wurde die Lösung 5 Minuten gerührt. In einem zweiten Gefäß wurden 9,53 g (50,0 mmol) Tosylchlorid in 16 mL THF gelöst und dem ursprünglichen Gemisch über einen Tropftrichter über einen Zeitraum von 30 Minuten langsam und unter Rühren zugetropft. Der Kolben wurde verschlossen und das Gemisch wurde 2 h gerührt. Anschließend wurde die Mischung mit ca. 40 mL Eiswasser gemischt und mit 3 x 25 mL Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit 2 x 25 mL gesättigter Kochsalzlösung gewaschen, über wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet, filtriert und am Rotationsverdampfer zur Trockene eingengt.

Ausbeute: 13,8 g (47,9 mmol) farbloses Öl (96%)

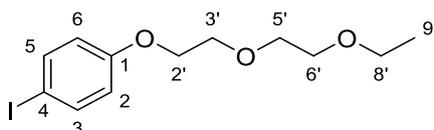
$^1\text{H-NMR}$ [400 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$]: δ (ppm) = 7,81 – 7,76 (m, 2H, 2-H, 6-H), 7,52 – 7,46 (m, 2H, 3-H, 5-H), 4,13 – 4,07 (m, 2H, CH_2), 3,57 (dd, $J = 5,1, 3,8$ Hz, 2H, CH_2), 3,49 – 3,31 (m, 6H, CH_2), 2,42 (s, 3H, CH_3), 1,08 (t, $J = 7,0$ Hz, 3H, 8'-H).

$^{13}\text{C-NMR}$ [101 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$]: δ (ppm) = 145,4 (C-4), 132,9 (C-1), 130,6 (C-3, C-5), 128,1 (C-2, C-6), 70,5 (CH_2), 70,2 (CH_2), 69,5 (CH_2), 68,4 (CH_2), 66,0 (CH_2), 21,6 (CH_3), 15,6 (C-8')

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ (cm^{-1}) = 2870, 1598, 1353, 1162, 1110, 1096, 917, 815, 772

HRMS (EI): m/z = Der Molekülpeak konnte nicht beobachtet werden. Ein Signal mit m/z = 199,0423 (berechnet für $[\text{C}_9\text{H}_{11}\text{O}_3\text{S}]^{+}$: m/z = 199,0418) deutet auf die Fragmentierung des Radikalkations unter Spaltung der Oligoethylenglycolkette zwischen C-2' und dem benachbarten Sauerstoff hin.

1-(2-(2-Ethoxyethoxy)ethoxy)-4-iodbenzol (144)



$\text{C}_{12}\text{H}_{17}\text{IO}_3$

$M = 336,17 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$

2-(2-Ethoxyethoxy)ethyl 4-methylbenzolsulfonat (**143**; 5,19 g, 18,0 mmol) wurde in einem 250 mL Kolben mit 4-Iodphenol (4,16 g, 18,9 mmol) und Kaliumcarbonat (2,50 g, 18,0 mmol) in 100 mL DMF dispergiert und 16 h bei 90°C gerührt. Anschließend wurden 100 mL Ethylacetat zugegeben und die Suspension filtriert. Das Filtrat wurde mit jeweils 100 mL Wasser und Ethylacetat versetzt und die Phasen getrennt. Die wässrige Phase wurde mit 3 x 50 mL Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit 3 x 25 mL gesättigter Kochsalzlösung gewaschen, über wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet, filtriert und am Rotationsverdampfer zur Trockene eingengt. Der Rückstand wurde mittels FSC (Kieselgel, Isohexan/Ethylacetat 5:1) aufgereinigt.

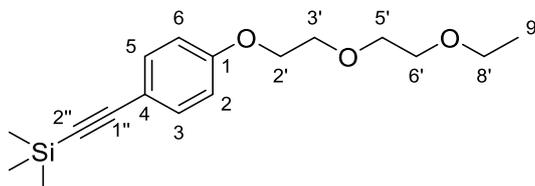
Ausbeute: 4,80 g (14,3 mmol) leicht gelbliches Öl (79%)

$^1\text{H-NMR}$ [400 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$]: δ (ppm) = 7,61 – 7,55 (m, 2H, 3-H, 5-H), 6,82 – 6,77 (m, 2H, 2-H, 6-H), 4,08 – 4,04 (m, 2H, 2'-H), 3,74 – 3,69 (m, 2H, 3'-H), 3,58 – 3,54 (m, 2H, 5'-H oder 6'-H), 3,50 – 3,46 (m, 2H, 5'-H oder 6'-H), 3,42 (q, $J = 7,0 \text{ Hz}$, 2H, 8'-H), 1,09 (t, $J = 7,0 \text{ Hz}$, 3H, 9'-H).

$^{13}\text{C-NMR}$ [101 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$]: δ (ppm) = 158,4 (C-1), 137,9 (C-3, C-5), 117,3 (C-2, C-6), 83,1 (C-4), 70,0 (C-5' oder C-6'), 69,2 (C-5' oder C-6'), 68,8 (C-3'), 67,27 (C-2'), 65,6 (C-8'), 15,1 (C-9')

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ (cm^{-1}) = 2869, 1586, 1484, 1453, 1282, 1199, 1176, 1108, 1056, 998, 818

HRMS (EI): m/z = 336,0224 (berechnet für $[\text{C}_{12}\text{H}_{17}\text{IO}_3]^{+}$: m/z = 336,0217)

((4-(2-(2-Ethoxyethoxy)ethoxy)phenyl)ethynyl)trimethylsilan (145)

$C_{17}H_{26}O_3Si$

$M = 306,48 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$

In einem Mikrowellenreaktorgefäß wurden 672 mg (2,00 mmol) 1-(2-(2-Ethoxyethoxy)ethoxy)-4-iodbenzol (**144**) in je 5 mL DMF und Triethylamin gelöst und Bis(triphenylphosphin)palladium(II)dichlorid (70,2 mg, 0,100 mmol) und Kupfer(I)iodid (19 mg, 0,10 mmol) zugegeben. Nach Zugabe von Trimethylsilylacetylen (0,424 mL, 295 mg, 3,00 mmol) wurde das Gefäß über eine Kanüle 5 Minuten mit Stickstoff gespült, dann schnell verschlossen und 20 Minuten im Reaktor gerührt ($p_{\text{max}} = 8 \text{ bar}$, $P = 100 \text{ W}$, $T = 60^\circ\text{C}$). Das schwarze Gemisch wurde in je 50 mL Wasser und Dichlormethan aufgenommen und die Phasen separiert. Die wässrige Phase wurde mit 2 x 25 mL Dichlormethan extrahiert, die vereinigten organischen Phasen mit 2 x 25 mL gesättigter Kochsalzlösung gewaschen, über wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet, filtriert und am Rotationsverdampfer zur Trockene eingengt. Der Rückstand wurde mittels FSC (Kieselgel, Isohexan/Ethylacetat 5:1) aufgereinigt.

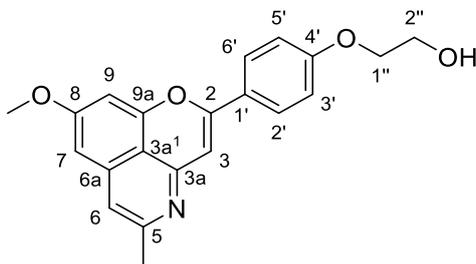
Ausbeute: 527 mg (1,72 mmol) dunkelgelbes Öl (86%).

$^1\text{H-NMR}$ [400 MHz, CD_2Cl_2]: δ (ppm) = 7,42 – 7,33 (m, 2H, 3-H, 5-H), 6,89 – 6,81 (m, 2H, 2-H, 6-H), 4,14 – 4,07 (m, 2H, 2'-H), 3,84 – 3,77 (m, 2H, 3'-H), 3,68 – 3,61 (m, 2H, 5'-H oder 6'-H), 3,59 – 3,52 (m, 2H, 5'-H oder 6'-H), 3,49 (q, $J = 7,0 \text{ Hz}$, 2H, 8'-H), 1,17 (td, $J = 7,0, 0,8 \text{ Hz}$, 3H, 9'-H), 0,23 (d, $J = 0,8 \text{ Hz}$, 9H, $\text{Si}(\text{CH}_3)_3$).

$^{13}\text{C-NMR}$ [101 MHz, CD_2Cl_2]: δ (ppm) = 159,6 (C-1), 133,9 (C-3, C-5), 115,9 (C-4), 115,0 (C-2, C-6), 105,5 (C-1''), 93,0 (C-2''), 71,4 (C-5' oder C-6'), 70,4 (C-5' oder C-6'), 70,1 (C-3'), 68,2 (C-2'), 67,0 (C-8'), 15,6 (C-9'), 0,3 ($\text{Si}(\text{CH}_3)_3$)

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ (cm^{-1}) = 2872, 1577, 1483, 1410, 1300, 1221, 1170, 1141, 1051, 972, 854, 745

HRMS (EI): $m/z = 306,1653$ (berechnet für $[\text{C}_{17}\text{H}_{26}\text{O}_3\text{Si}]^{+}$: $m/z = 306,1646$)

2-(4-(8-Methoxy-5-methylpyrano[2,3,4-*i*]isochinolin-2-yl)phenoxy)ethan-1-ol (146)

$C_{21}H_{19}NO_4$

$M = 349,39 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$

1-((4-(2-(2-Ethoxyethoxy)ethoxy)phenyl)ethynyl)-6,8-dimethoxy-3-methylisochinolin (**140**; 135 mg, 0,311 mmol) wurde in einem 10 mL Schlenkkolben in 2 mL Dichlormethan gelöst und unter Stickstoffatmosphäre gebracht. Bortribromid (65,9 μL , 0,684 mmol) wurde über eine Spritze tropfenweise zugegeben und die dunkelgelbe Lösung 16 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurden 1,5 mL Methanol und 3 mL 10% Ammoniaklösung zugegeben und die Mischung 15 Minuten stark gerührt. Die gesamte Reaktionsmischung wurde am Rotationsverdampfer eingengt und mittels FSC (Kieselgel, Dichlormethan/Methanol 10:1) aufgereinigt.

Ausbeute: 13 mg (0,037 mmol) gelber Feststoff (12%).

$^1\text{H-NMR}$ [400 MHz, CD_2Cl_2]: δ (ppm) = 7,83 – 7,75 (m, 2H, 2'-H, 6'-H), 7,05 – 6,99 (m, 2H, 3'-H, 5'-H), 6,90 (d, $J = 0,9 \text{ Hz}$, 1H, 6-H), 6,71 (s, 1H, 3-H), 6,66 (d, $J = 2,1 \text{ Hz}$, 1H, 7-H oder 9-H), 6,58 (d, $J = 2,2 \text{ Hz}$, 1H, 7-H oder 9-H), 4,14 (dd, $J = 5,1, 4,0 \text{ Hz}$, 2H, 1''-H oder 2''-H), 3,96 (dd, $J = 5,2, 3,9 \text{ Hz}$, 2H, 1''-H oder 2''-H), 3,89 (s, 3H, OCH_3), 2,46 (d, $J = 0,8 \text{ Hz}$, 3H, CH_3)

$^{13}\text{C-NMR}$ [101 MHz, CD_2Cl_2]: δ (ppm) = 163,1 (C-8), 161,0 (C-4'), 157,8 (C-2), 155,7 (C-3a), 155,7 (C-5), 151,4 (C-9a), 139,1 (C-6a), 127,4 (C-2', C-6'), 125,8 (C-1'), 115,3 (C-3', C-5'), 113,8 (C-6), 113,7 (C-3a'), 103,8 (C-3), 99,1 (C-7 oder C-9), 98,5 (C-7 oder C-9), 70,2 (C-2'' oder C-3''), 61,8 (C-2'' oder C-3''), 56,2 (OCH_3), 24,7 (CH_3)

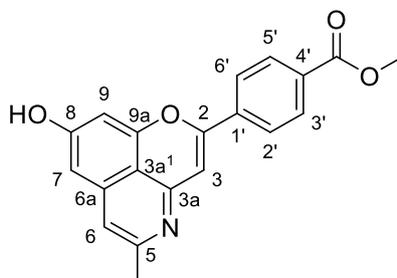
IR (ATR): $\tilde{\nu}$ (cm^{-1}) = 3172, 2920, 1648, 1607, 1573, 1512, 1496, 1450, 1413, 1363, 1258, 1165, 1053, 1034, 920, 850, 812, 793

HRMS (EI): $m/z = 349,1305$ (berechnet für $[\text{C}_{14}\text{H}_{18}\text{O}_3]^+$: $m/z = 349,1309$)

Schmelzpunkt: 216°C

HPLC-Reinheit: >99% (210 nm; Methode 1), >99% (254 nm; Methode 1)

Methyl 4-(8-hydroxy-5-methylpyrano[2,3,4-*ij*]isochinolin-2-yl)benzoat (150)



$C_{20}H_{15}NO_4$

$M = 333,34 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$

Methyl 4-((6,8-bis(methoxymethoxy)-3-methylisochinolin-1-yl)ethynyl)benzoat (**165**; 126 mg, 0,300 mmol) wurde in einem 50 mL Kolben in 10 mL Methanol gelöst. Anschließend wurden langsam und unter Rühren 5 mL 10%ige Salzsäure zugetropft, wobei sich die Reaktionsmischung schnell gelb verfärbte. Der Kolben wurde verschlossen, auf 40°C erwärmt und das Gemisch 36 h gerührt. Das Gemisch wurde am Rotationsverdampfer zur Trockene eingengt. Der Rückstand wurde mittels FSC (Kieselgel, Dichlormethan/Methanol 20:1) aufgereinigt.

Ausbeute: 84 mg (0,25 mmol) gelber Feststoff (84%).

$^1\text{H-NMR}$ [500 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$]: δ (ppm) = 10,40 (s, 1H, OH), 8,18 – 8,02 (m, 4H, 2'-H, 3'-H, 5'-H, 6'-H), 7,15 (s, 1H, 6-H), 6,98 (s, 1H, 9-H), 6,69 (s, 1H, 7-H), 6,59 (s, 1H, 3-H), 3,90 (s, 3H, COOCH_3), 2,40 (s, 3H, CH_3).

$^{13}\text{C-NMR}$ [126 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$]: δ (ppm) = 166,1 (COO), 161,3 (C-2), 155,6 (C-8), 154,8 (C-9a), 149,9 (C-3a), 138,5 (C-5), 136,5 (C-1'), 135,1 (C-6a), 131,2 (C-4'), 130,1 (C-3', C-5'), 125,9 (C-2', C-6'), 113,9 (C-6), 112,7 (C-C-3a¹), 106,8 (C-3), 101,3 (C-7), 99,8 (C-9), 52,9 (COOCH_3), 24,4 (CH_3)

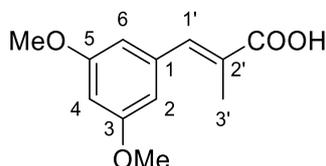
IR (ATR): $\tilde{\nu}$ (cm^{-1}) = 3435, 1733, 1613, 1423, 1280, 1171, 1108, 834, 768

HRMS (EI): $m/z = 333,0988$ (berechnet für $[\text{C}_{20}\text{H}_{15}\text{NO}_4]^+$: $m/z = 333,0996$)

Schmelzpunkt: 248°C unter Zersetzung

HPLC-Reinheit: >99% (210 nm; Methode 1), >99% (254 nm; Methode 1)

(E)-3-(3,5-Dimethoxyphenyl)-2-methylacrylsäure (158)*



$C_{12}H_{14}O_4$

$M = 222,24 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$

In einem 500 mL Kolben wurde 3,5-Dimethoxybenzaldehyd (**157**; 10,0 g, 60,4 mmol) mit Natriumpropionat (6,22 g, 63,4 mmol) und Propionsäureanhydrid (8,3 mL, 8,42 g, 63,4 mmol) gemischt, der Kolben verschlossen und 16 h bei 160°C gerührt. Nachdem die Lösung auf ca. 80°C abgekühlt worden war, wurden nach und nach 50 mL Wasser langsam zugegeben und die Mischung im Kühlschrank auf 7°C abgekühlt. Anschließend wurde die Suspension filtriert. Der erhaltene Feststoff wurde in 40 mL 2M Natronlauge gelöst und mit 4 x 30 mL Ether gewaschen. Die vereinigten Etherphasen wurden mit 4 x 25 mL gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung extrahiert. Alle wässrigen Phasen wurden vereinigt und mit konzentrierter Salzsäure auf pH 2 angesäuert, wobei ein beiger Feststoff ausfiel, der mit 100 mL eiskalter 2M Salzsäure gewaschen wurde. Der angefallene Feststoff wurde im Feinvakuum (bei 10^{-3} – 10^{-2} mbar) 72 Stunden getrocknet.

Ausbeute: 12,9 g (58,0 mmol) beiger Feststoff (96%).

$^1\text{H-NMR}$ [400 MHz, CD_2Cl_2]: δ (ppm) = 12,51 (s, 1H, COOH), 7,52 (d, $J = 1,9$ Hz, 1H, 1'-H), 6,60 (d, $J = 2,2$ Hz, 2H, 2-H, 6-H), 6,50 (t, $J = 2,3$ Hz, 1H, 4-H), 3,76 (s, 6H, OCH_3), 2,02 (d, $J = 1,4$ Hz, 3H, 3'-H).

$^{13}\text{C-NMR}$ [101 MHz, CD_2Cl_2]: δ (ppm) = 169,3 (COOH), 160,3 (C-3, C-5), 137,7 (C-1), 137,4 (C-1'), 129,2 (C-2'), 107,5 (C-2, C-6), 100,4 (C-4), 55,3 (OCH_3), 14,1 (C-3')

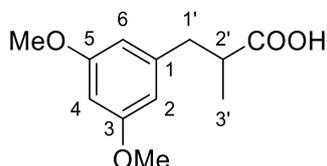
IR (ATR): $\tilde{\nu}$ (cm^{-1}) = 2968, 1660, 1588, 1424, 1280, 1255, 1207, 1159, 1061, 913, 841, 824, 817

HRMS (EI): $m/z = 222,0886$ (berechnet für $[\text{C}_{12}\text{H}_{14}\text{O}_4]^+$: $m/z = 222,0887$)

Schmelzpunkt: 155°C (Literaturwert: 152-153°C^[94])

* Literaturbekannte Verbindung^[94]

3-(3,5-Dimethoxyphenyl)-2-methylpropansäure (159)*



$C_{14}H_{16}O_4$

$M = 224,26 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$

(*E*)-3-(3,5-Dimethoxyphenyl)-2-methylacrylsäure (**158**; 5,00 g, 22,5 mmol) wurden in einem 500 mL Schlenk Kolben in 125 mL Ethylacetat gelöst und 239 mg (0,225 mmol) Palladium/Aktivkohle (10%) zugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde bei Raumtemperatur und unter Normaldruck 16 h hydriert. Anschließend wurde das Gemisch filtriert und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt.

Ausbeute: 4,70 g (21,0 mmol) gelbes Öl (93%).

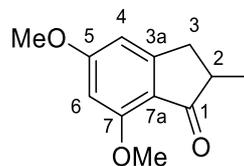
¹H-NMR [400 MHz, CD_2Cl_2]: δ (ppm) = 6,36 – 6,32 (m, 3H, 2-H, 4-H, 6-H), 3,77 (s, 6H, OCH_3), 3,03 (dd, $J = 13,5, 6,5$ Hz, 1H, 1'-H), 2,82 – 2,71 (m, 1H, 2'-H), 2,60 (dd, $J = 13,5, 8,1$ Hz, 1H, 1'-H), 1,18 (d, $J = 6,9$ Hz, 3H, 3'-H).

¹³C-NMR [101 MHz, CD_2Cl_2]: δ (ppm) = 182,6 (COOH), 160,7 (C-3, C-5), 141,3 (C-1), 106,9 (C-2, C-6), 98,3 (C-4), 55,1 (OCH_3), 41,0 (C2'), 39,5 (C1'), 16,4 C-3')

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ (cm^{-1}) = 3002, 2937, 1689, 1595, 1460, 1426, 1281, 1208, 1145, 1112, 1059, 928, 868, 828, 810

HRMS (EI): $m/z = 224,1042$ (berechnet für $[C_{14}H_{18}O_3]^+$: $m/z = 224,1043$)

* Literaturbekannte Verbindung^[94]

5,7-Dimethoxy-2-methyl-2,3-dihydro-1H-inden-1-on (160)*

$C_{12}H_{14}O_3$

$M = 206,24 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$

3-(3,5-Dimethoxyphenyl)-2-methylpropansäure (**159**; 4,60 g, 20,5 mmol) wurden in einem 250 mL Kolben mit 36,9 g (154 mmol) Polyphosphorsäure gemischt und unter Rühren mit einem Glasstab auf 90°C erwärmt. Die heiße, zähe Mischung wurde 30 Minuten bei dieser Temperatur weitergerührt. Anschließend wurden 100 mL Wasser zugegeben, der Kolben verschlossen und die orange Lösung mit einem Rührfisch und Magnetrührer über Nacht bei 90°C weitergerührt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurde die wässrige Lösung mit 4 x 50 mL Dichlormethan extrahiert, die organischen Phasen vereinigt, mit 2 x 25 mL gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung gewaschen, über wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet, filtriert und am Rotationsverdampfer zur Trockene eingeeengt. Der Rückstand wurde mittels FSC (Kieselgel, Isohexan/Ethylacetat 2:1) aufgereinigt.

Ausbeute: 3,52 g (17,1 mmol) farbloses Öl, welches bei Raumtemperatur schnell fest wird (83%).

$^1\text{H-NMR}$ [400 MHz, CD_3Cl]: δ (ppm) = 6,46 (dt, $J = 1,8, 0,9$ Hz, 1H, 4-H), 6,30 (d, $J = 1,9$ Hz, 1H, 6-H), 3,91 (s, 3H, OCH_3), 3,87 (s, 3H, OCH_3), 3,33 – 3,22 (m, 1H, 2-H), 2,72 – 2,55 (m, 2H, 3-H), 1,27 (d, $J = 7,3$ Hz, 3H, CH_3)

$^{13}\text{C-NMR}$ [101 MHz, CD_3Cl]: δ (ppm) = 205,6 (C-1), 166,9 (C-5), 159,5 (C-7), 158,6 (C-3a), 118,5 (C-7a), 101,5 (C-4), 97,4 (C-6), 55,7 (OCH_3), 55,2 (OCH_3), 42,3 (C-2), 35,0 (C-3), 17,1 (CH_3).

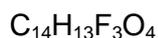
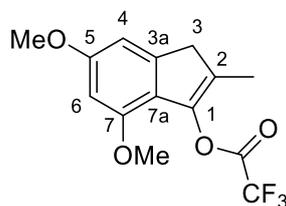
IR (ATR): $\tilde{\nu}$ (cm^{-1}) = 2930, 1697, 1601, 1468, 1325, 1210, 1156, 1076, 968, 830, 810

HRMS (EI): $m/z = 206,0936$ (berechnet für $[\text{C}_{12}\text{H}_{14}\text{O}_3]^+$: $m/z = 206,0937$)

Schmelzpunkt: 78°C (Literaturwert: 76-77°C^[94])

* Literaturbekannte Verbindung^[94].

4,6-Dimethoxy-2-methyl-1*H*-inden-3-yl 2,2,2-trifluoracetat (161)*



$M = 234,30 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$

5,7-Dimethoxy-2-methyl-2,3-dihydro-1*H*-inden-1-on (2,06 g, 10,0 mmol) wurden in einem 100 mL Kolben in Trifluoressigsäureanhydrid (40,4 mL, 290 mmol) dispergiert. Die anfängliche Suspension entwickelte sich dabei schnell zu einer grünen Lösung, die nach ca. 10 Minuten in einer dunkelgrünen Suspension resultierte. Nach insgesamt 20 Minuten wurde der Ansatz am Rotationsverdampfer zur Trockene eingengt und der Rückstand mittels FSC (Kieselgel, Isohexan/Ethylacetat 10:1) aufgereinigt.

Ausbeute: 1,93 mg (6,40 mmol) gräulicher Feststoff (64%).

¹H-NMR [400 MHz, CD₃Cl]: δ (ppm) = 6,65 – 6,56 (m, 1H, 6-H), 6,36 (d, $J = 1,9$ Hz, 1H, 2-H), 3,80 (s, 3H, OCH₃), 3,75 (s, 3H, OCH₃), 3,31 (s, 2H, 3-H), 1,96 (d, $J = 0,9$ Hz, 3H, CH₃).

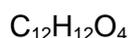
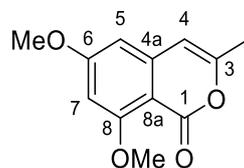
¹³C-NMR [101 MHz, CD₃Cl]: δ (ppm) = 159,8 (C-5), 155,6 (COO), 152,1 (C-7), 143,1 (C-1), 141,5 (C-3a), 124,7 (C-7a), 118,9 (C-2), 114,7 (CF₃), 102,2 (C-4), 97,2 (C-6), 55,5 (OCH₃), 55,2 (OCH₃), 39,2 (C-3), 11,2 (CH₃).

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) = 2925, 1796, 1590, 1460, 1325, 1212, 1168, 1080, 820

HRMS (EI): $m/z = 302,0760$ (berechnet für [C₁₄H₁₈O₃]⁺: $m/z = 302,0760$)

Schmelzpunkt: 96°C (Literaturwert 96-98°C^[94])

* Literaturbekannte Verbindung^[94].

6,8-Dimethoxy-3-methyl-1*H*-isochromen-1-on (162)*

$$M = 220,22 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$$

4,6-Dimethoxy-2-methyl-1*H*-inden-3-yl 2,2,2-trifluoracetat (**161**; 1,21 g, 4,00 mmol) wurde in 80 mL Ethylacetat gelöst und auf -55°C gekühlt, während das System permanent mit Stickstoff gespült wurde. Nach Zugabe einer Spatelspitze Sudanrot III wurde Ozon eingeleitet (60 L/h, 40 W, 4:40 Minuten) bis der Indikator entfärbt war. Anschließend wurde das System 15 Minuten lang mit Stickstoff gespült. Nach Zugabe von 1,5 mL Dimethylsulfid wurde das Gemisch langsam über Nacht auf Raumtemperatur erwärmt und gerührt. Anschließend wurden 50 mL Wasser zugegeben, die Phasen separiert und die wässrige Phase mit 2 x 25 mL Ethylacetat extrahiert. Die organischen Phasen wurden vereinigt, mit 2 x 25 mL gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung gewaschen, über wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet, filtriert und am Rotationsverdampfer zur Trockene eingeeengt. Der Rückstand wurde mittels FSC (Isohexan/Ethylacetat 1:1) aufgereinigt.

Ausbeute: 704 mg (3,2 mmol) leicht gelblicher Feststoff (80%).

$^1\text{H-NMR}$ [400 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$]: δ (ppm) = 6,56 (s, 2H, 5-H, 7-H), 6,34 (s, 1H, 4-H), 3,87 (s, 3H, OCH_3), 3,85 (s, 3H, OCH_3), 2,16 (d, $J = 1,0 \text{ Hz}$, 3H, CH_3).

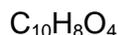
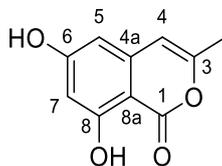
$^{13}\text{C-NMR}$ [101 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$]: δ (ppm) = 165,1 (C-6), 162,8 (C-1), 157,8 (C-8), 155,1 (C-3), 142,0 (C-4a), 103,2 (C-4), 101,6 (C-8a), 100,1 (C-7), 98,2 (C-5), 56,0 (OCH_3), 55,8 (OCH_3), 19,0 (CH_3).

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ (cm^{-1}) = 2947, 1702, 1662, 1594, 1566, 1454, 1424, 1360, 1247, 1172, 1116, 1032, 970, 872, 820

HRMS (EI): $m/z = 220,0729$ (berechnet für $[\text{C}_{14}\text{H}_{18}\text{O}_3]^+$: $m/z = 220,0730$)

Schmelzpunkt: 144°C (Literaturwert $154\text{-}155^\circ\text{C}$ ^[94])

* Literaturbekannte Verbindung^[94].

6,8-Dihydroxy-3-methyl-1*H*-isochromen-1-on (163)*

$$M = 192,17 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$$

6,8-Dimethoxy-3-methyl-1*H*-isochromen-1-on (**162**; 661 mg, 3,00 mmol) wurde in einem 100 mL Schlenkkolben in 35 mL Dichlormethan gelöst und unter Stickstoffatmosphäre gebracht. Nachdem die Lösung auf -70°C gekühlt wurde, wurde ein Bortribromid (2,59 mL, 2,26 g 9 mmol) über eine Spritze tropfenweise zugegeben und die gelbe Lösung über Nacht über Nacht gerührt, wobei sie langsam auf Raumtemperatur erwärmt wurde. Anschließend wurden 50 mL Wasser vorsichtig zugegeben, die Phasen getrennt und die wässrige Phase mit 2 x 25 mL Dichlormethan extrahiert. Die organischen Phasen wurden vereinigt, mit 2 x 30 mL gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung gewaschen, über wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet, filtriert und am Rotationsverdampfer zur Trockene eingengt. Der Rückstand wurde mittels FSC (Dichlormethan/Methanol 20:1) aufgereinigt.

Ausbeute: 555 mg (2,89 mmol) farbloser Feststoff (96%).

$^1\text{H-NMR}$ [400 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$]: δ (ppm) = 10,95 (s, 1H, OH), 10,81 (s, 1H, OH), 6,47 (d, $J = 1,2$ Hz, 1H, 4-H), 6,33 (d, $J = 2,2$ Hz, 1H, 5-H), 6,30 (d, $J = 2,1$ Hz, 1H, 7-H), 2,20 (d, $J = 1,0$ Hz, 3H, CH_3).

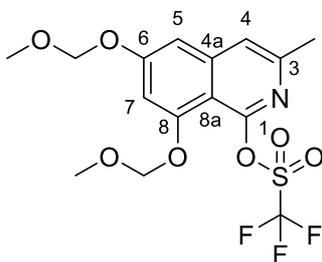
$^{13}\text{C-NMR}$ [101 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$]: δ (ppm) = 165,6 (C-1), 165,5 (C-6), 162,7 (C-8), 154,1 (C-3), 139,7 (C-4a), 104,2 (C-4), 102,4 (C-5), 101,3 (C-7), 97,9 (C-8a), 18,8 (CH_3)

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ (cm^{-1}) = 3248, 1676, 1625, 1381, 1249, 1168, 865, 716

HRMS (EI): $m/z = 192,0416$ (berechnet für $[\text{C}_{14}\text{H}_{18}\text{O}_3]^+$: $m/z = 192,0417$)

Schmelzpunkt: 283°C (Literaturwert: $250\text{-}252^\circ\text{C}$ ^[94])

* Literaturbekannte Verbindung^[94].

6,8-Bis(methoxymethoxy)-3-methylisochinolin-1-yl trifluormethansulfonat (164)*

$C_{15}H_{16}F_3NO_7S$

$M = 411,35 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$

6,8-Bis(methoxymethoxy)-3-methylisochinolin-1(2*H*)-on (**26**; 475 mg, 1,70 mmol) wurde in einem 100 mL Kolben in 10 mL DMF gelöst und im Eisbad auf 0°C gekühlt. Anschließend wurden 81,6 mg (2,04 mmol) Natriumhydrid (60%ige Dispersion in Paraffinöl) zugegeben, der Kolben verschlossen und das Gemisch 15 Minuten bei 0°C gerührt. *N*-Phenyl-bis-(trifluormethansulfonimid) (911 mg, 2,55 mmol) wurde zugegeben, das Eisbad entfernt und die resultierende orange Lösung 16 h bei Raumtemperatur gerührt. Danach wurden 50 mL Diethylether zugegeben und die Lösung mit jeweils 25 mL Wasser und gesättigter Kochsalzlösung gewaschen. Die organische Phase wurde über wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet, filtriert und am Rotationsverdampfer zur Trockene eingengt. Der Rückstand wurde mittels FSC (Kieselgel, Isohexan/Ethylacetat 2:1) aufgereinigt.

Ausbeute: 504 mg (1,23 mmol) farbloser Feststoff (72%).

¹H-NMR [400 MHz, CDCl₃]: δ (ppm) = 7,33 (d, $J = 1,0$ Hz, 1H, 4-H), 6,96 (d, $J = 2,1$ Hz, 1H, 5-H oder 7-H), 6,94 (d, $J = 2,1$ Hz, 1H, 5-H oder 7-H), 5,39 (s, 2H, CH₂), 5,28 (s, 2H, CH₂), 3,56 (s, 3H, OCH₃), 3,51 (s, 3H, OCH₃), 2,54 (d, $J = 0,9$ Hz, 3H, CH₃).

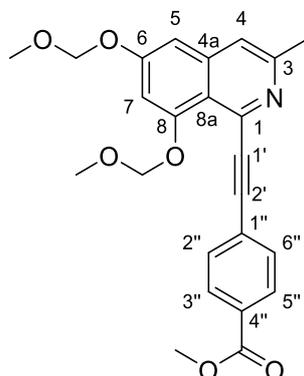
¹³C-NMR [101 MHz, CDCl₃]: δ (ppm) = 160,1 (C-6), 154,4 (C-8), 150,4 (C-1), 150,3 (C-3), 144,0 (C-4a), 119,9 (C-4), 118,8 (q, $J = 320,3$ Hz, CF₃), 107,8 (C-8a), 104,0 (C-5), 101,3 (C-7), 94,7 (CH₂), 94,5 (CH₂), 56,9 (OCH₃), 56,6 (OCH₃), 23,4 (CH₃)

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) = 3352, 2228, 1593, 1507, 1264, 1201, 1170, 1028, 903, 878, 801

HRMS (EI): $m/z = 411,0596$ (berechnet für [C₁₅H₁₆F₃NO₇S]⁺: $m/z = 411,0594$)

Schmelzpunkt: 85 - 86°C (Literaturwert: 85-86°C^[31])

* Literaturbekannte Verbindung^[31].

Methyl 4-((6,8-bis(methoxymethoxy)-3-methylisochinolin-1-yl)ethynyl)benzoat (165)

$C_{24}H_{23}NO_6$

$M = 421,45 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$

6,8-Bis(methoxymethoxy)-3-methylisochinolin-1-yl trifluormethansulfonat (**164**) (411 mg, 1,00 mmol) wurde in einem 50 mL Schlenkkolben zusammen mit Bis(triphenylphosphin)-palladium(II)dichlorid (35,1 mg, 0,0500 mmol) und Kupferiodid (19 mg, 0,10 mmol) und in 7 mL THF suspendiert, der Kolben mit einem Septum verschlossen und Methyl 4-ethynylbenzoat (0,294 mL, 327 mg, 2 mmol) unter Stickstoffatmosphäre gebracht. Anschließend wurden 7 mL Diisopropylamin zugegeben. Nachdem das Gemisch 18 h gerührt wurde, wurde es am Rotationsverdampfer zur Trockene eingengt. Der Rückstand wurde mittels FSC (Kieselgel, Isohexan/Ethylacetat 2:1) aufgereinigt.

Ausbeute: 84 mg (0,25 mmol) gelber Feststoff (84%).

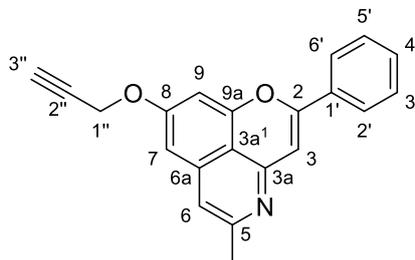
$^1\text{H-NMR}$ [400 MHz, CDCl_3]: δ (ppm) = 8,09 – 8,01 (m, 2H, 3''-H, 5''-H), 7,75 – 7,67 (m, 2H, 2''-H, 6''-H), 7,32 (s, 1H, 4-H), 6,90 (d, $J = 2,2 \text{ Hz}$, 1H, 5-H), 6,83 (d, $J = 2,2 \text{ Hz}$, 1H, 7-H), 5,38 (s, 2H, CH_2), 5,28 (d, $J = 0,9 \text{ Hz}$, 2H, CH_2), 3,93 (d, $J = 0,8 \text{ Hz}$, 3H, COOCH_3), 3,52 (s, 3H, OCH_3), 3,51 (s, 3H, OCH_3), 2,65 (d, $J = 0,8 \text{ Hz}$, 3H, CH_3).

$^{13}\text{C-NMR}$ [101 MHz, CDCl_3]: δ (ppm) = 166,7 (COO), 159,0 (C-6), 155,2 (C-8), 152,6 (C-3), 140,5 (C-4a), 139,3 (C-1), 132,0 (C-2'', C6''), 130,0 (C-1''), 129,6 (C-3'', C-5''), 128,2 (C-4''), 119,0 (C-4), 117,1 (C-8a), 103,5 (C-7), 101,5 (C-5), 95,1 (CH_2), 94,5 (CH_2), 94,0 (C-1'), 90,5 (C-2'), 56,8 (OCH_3), 56,6 (OCH_3), 52,4 (COOCH_3), 24,3 (CH_3)

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ (cm^{-1}) = 3435, 2923, 1721, 1619, 1561, 1278, 1153, 1018, 927, 767

HRMS (EI): $m/z = 421,1519$ (berechnet für $[\text{C}_{24}\text{H}_{23}\text{NO}_6]^+$: $m/z = 421,1520$)

Schmelzpunkt: 120°C

5-Methyl-2-phenyl-8-(prop-2-in-1-yloxy)pyrano[2,3,4-*ij*]isochinolin (166)

$C_{21}H_{15}NO_2$

$M = 313,36 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$

5-Methyl-2-phenylpyrano[2,3,4-*ij*]isochinolin-8-ol (**108**) (12,4 mg, 45,0 μmol) wurde in einem 5 mL Kolben in 1 mL DMF gelöst. Cäsiumcarbonat (29,3 mg, 90,0 μmol) wurde zugegeben und die Suspension 15 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde Propargylbromid (4,8 μL , 6,4 mg, 54 μmol) zugegeben und die Mischung 16 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde am Rotationsverdampfer zur Trockene eingengt. Der Rückstand wurde mittels FSC (Kieselgel, Dichlormethan/Methanol 10:1) aufgereinigt.

Ausbeute: 13 mg (42 μmol) gelber Feststoff (92%).

$^1\text{H-NMR}$ [500 MHz, CD_2Cl_2]: δ (ppm) = 7,91 – 7,82 (m, 2H, 2'-H, 6'-H), 7,48 (qt, $J = 5,1, 2,2$ Hz, 3H, 3'-H, 4'-H, 5'-H), 6,93 (s, 1H, 6-H), 6,81 (s, 1H, 3-H), 6,72 (d, $J = 2,1$ Hz, 1H, 9-H), 6,66 (d, $J = 2,1$ Hz, 1H, 7-H), 4,80 (d, $J = 2,3$ Hz, 2H, 1''-H), 2,64 (t, $J = 2,4$ Hz, 1H, 3''-H), 2,47 (s, 3H, CH_3)

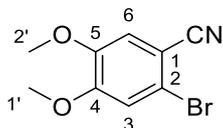
$^{13}\text{C-NMR}$ [126 MHz, CD_2Cl_2]: δ (ppm) = 160,8 (C-8), 157,8 (C-2), 155,8 (C-9a), 155,1 (C-5), 151,2 (C-3a), 138,9 (C-6a), 133,0 (C-1'), 130,7 (C-4'), 129,3 (C-2', C-5'), 125,8 (C-2', C-6'), 114,3 (C-3a¹), 114,2 (C-6), 105,6 (C-3), 99,7 (C-7), 99,4 (C-9), 78,6 (C-2''), 76,3 (C-3''), 56,6 (C-2''), 24,9 (CH_3)

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ (cm^{-1}) = 3123, 2104, 1646, 1612, 1573, 1418, 1361, 1268, 1159, 1105, 841, 759

HRMS (ESI): $m/z = 314,1176$ (berechnet für $[\text{C}_{14}\text{H}_{18}\text{O}_3]^{+}$: $m/z = 314,1176$)

Schmelzpunkt: 201°C

2-Brom-4,5-dimethoxybenzonitril (174)*



$M = 242,07 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$

Die Darstellung von **174** erfolgte nach Synthesevorschrift A unter Verwendung von 2,45 g (10,0 mmol) 2-Brom-4,5-dimethoxybenzaldehyd (**170**). Die Aufreinigung erfolgte mittels FSC (Isohexan/Ethylacetat 5:1).

Ausbeute: 2,23 g (9,22 mmol) farbloser Feststoff (92%)

$^1\text{H NMR}$ [400 MHz, CD_2Cl_2] δ (ppm) = 7,10 (s, 1H, 3-H), 7,07 (s, 1H, 6-H), 3,89 (s, 3H, 1'-H), 3,84 (s, 3H, 2'-H)

$^{13}\text{C NMR}$ [101 MHz, CD_2Cl_2] δ 153,5 (C-4), 148,7 (C-5), 117,6 (C-2), 117,2 (CN), 115,5 (C-6), 115,4 (C-3), 106,6 (C-1), 56,4 (C-1'), 56,3 (C-2').

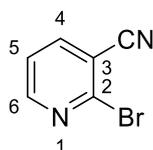
IR (ATR): $\tilde{\nu}$ (cm^{-1}) = 2942, 2229, 1592, 1505, 1377, 1261, 1219, 1168, 1035, 952, 874, 853, 794

HRMS (EI): $m/z = 240,9736$ (berechnet für $[\text{C}_9\text{H}_8\text{BrNO}_2]^+$: $m/z = 240,9733$)

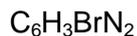
Schmelzpunkt: 117-119°C (Literaturwert: 115-117°C^[152])

* Literaturbekannte Verbindung^[152]. Die Darstellung erfolgte durch eine neue Methode.

2-Bromnicotinonitril (176)*



Experimenteller Teil



$$M = 183,01 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$$

Die Darstellung von **176** erfolgte nach Synthesevorschrift A unter Verwendung von 1,89 g (10,0 mmol) 2-Brom-3-pyridincarbaldehyd (**172**). Die Aufreinigung erfolgte mittels FSC (Isohexan/Ethylacetat 5:1).

Ausbeute: 1,72g (9,41 mmol) farbloser Feststoff (94%)

¹H NMR [400 MHz, CD₂Cl₂] δ (ppm) = 8,60 (dd, $J = 4,9, 1,9$ Hz, 1H, 6-H), 8,03 (dd, $J = 7,7, 2,0$ Hz, 1H, 4-H), 7,41 (dd, $J = 7,7, 4,9$ Hz, 1H, 5-H)

¹³C NMR [101 MHz, CD₂Cl₂] δ (ppm) = 152,9 (C-6), 152,5 (C-2), 142,7 (C-4), 122,4 (C-5), 114,7 (CN), 110,8 (C-3)

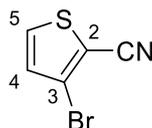
IR (ATR): $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) = 3081, 3065, 2236, 1577, 1398, 1145, 1131, 1079, 807, 7356, 672

HRMS (EI): $m/z = 181,9478$ (berechnet für [C₆H₃BrN₂]⁺: $m/z = 181,9474$)

Schmelzpunkt: 107-109°C (Literaturwert: 114-118°C^[153])

* Literaturbekannte Verbindung^[153] Die Darstellung erfolgte durch eine neue Methode.

3-Bromthiophen-2-carbonitril (**177**)*



$$M = 188,04 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$$

Die Darstellung von **177** erfolgte nach Synthesevorschrift A unter Verwendung von 1,89 g (10,0 mmol) 3-Bromthiophen-2-carbaldehyd (**173**). Die Aufreinigung erfolgte mittels FSC (Isohexan/Ethylacetat 5:1).

Ausbeute: 1,69 g (8,99 mmol) farbloser Feststoff (90%)

¹H NMR [400 MHz, CD₂Cl₂] δ (ppm) = 7,60 (d, $J = 5,3$ Hz, 1H, 4-H), 7,14 (d, $J = 5,3$ Hz, 1H, 5-H).

Experimenteller Teil

^{13}C NMR [101 MHz, CD_2Cl_2] δ (ppm) = 133,2 (C-4), 130,9 (C-5), 121,8 (C-3), 112,8 (CN), 108,8 (C-2)

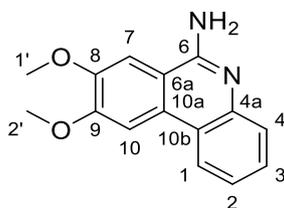
IR (ATR): $\tilde{\nu}$ (cm^{-1}) = 3107, 2220, 1663, 1497, 1416, 1352. 1343, 1212, 1168, 888, 873, 732, 663

HRMS (EI): m/z = 186,9087 (berechnet für $[\text{C}_{17}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_3]^+$: m/z = 186,9086)

Schmelzpunkt: 51 – 52°C

* Literaturbekannte Verbindung^[154]. Die Darstellung erfolgte durch eine neue Methode.

8,9-Dimethoxyphenanthridin-6-amin (178)



$\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_2$

$M = 254,29 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$

Die Darstellung von **178** erfolgte nach Synthesevorschrift B unter Verwendung von 605 mg (2,50 mmol) 2-Brom-4,5-dimethoxybenzonitril (**174**). Die Aufreinigung erfolgte mittels FSC (Kieselgel, Ethylacetat/Triethylamin 99:1).

Ausbeute: 403 mg (1,58 mmol) beiger Feststoff (63%)

^1H -NMR [500 MHz, CD_2Cl_2]: δ (ppm) = 8,29 (dd, $J = 8,1, 1,4$ Hz, 1H, 4-H), 7,86 (s, 1H, 7-H), 7,66 (dd, $J = 8,2, 1,4$ Hz, 1H, 1-H), 7,52 (ddd, $J = 8,2, 7,0, 1,4$ Hz, 1H, 2-H), 7,37 (ddd, $J = 8,2, 7,0, 1,4$ Hz, 1H, 3-H), 7,20 (s, 1H, 10-H), 5,20 – 5,15 (br s, 2H, NH_2), 4,08 (s, 3H, 2'-H), 4,00 (s, 3H, 1'-H)

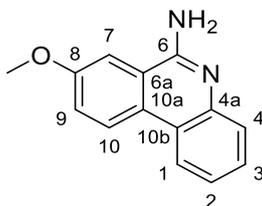
^{13}C -NMR [101 MHz, CD_2Cl_2]: δ (ppm) = 154,6 (C-6), 153,2 (C-9), 150,3 (C-8), 144,6 (C-4a), 130,0 (C-10a), 128,5 (C-3), 127,2 (C-2), 123,3 (C-1), 122,1 (C-4), 121,9 (C-10b), 113,6 (C-6a), 104,3 (C-10), 103,6 (C-7), 56,6 (C-2'), 56,5 (C-1')

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ (cm^{-1}) = 3102, 1652, 1470, 1104, 740

HRMS (EI): m/z = 254,1051 (berechnet für $[\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_2]^+$: m/z = 254,1050)

Schmelzpunkt: 215 - 216°C

8-Methoxyphenanthridin-6-amin (179)*



$C_{14}H_{12}N_2O$

$M = 224,26 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$

Die Darstellung von **179** erfolgte nach Synthesevorschrift B unter Verwendung von 530 mg (2,50 mmol) 2-Brom-5-methoxybenzonitril (**175**). Die Aufreinigung erfolgte mittels FSC (Kieselgel, Ethylacetat/Triethylamin 99:1).

Ausbeute: 450 mg (2,01 mmol) beiger Feststoff (80%)

$^1\text{H-NMR}$ [400 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$]: δ (ppm) = 8,56 (d, $J = 9,0$ Hz, 1H, 10-H), 8,37 (dd, $J = 8,2, 1,4$ Hz, 1H, 4-H), 7,77 (d, $J = 2,6$ Hz, 1H, 7-H), 7,51 (dd, $J = 8,2, 1,4$ Hz, 1H, 1-H), 7,43 (m, 2H, 9-H, 2-H), 7,24 (ddd, $J = 8,2, 6,8, 1,4$ Hz, 1H, 3-H), 6,99 (s, 2H, NH_2), 3,93 (s, 3H, OCH_3)

$^{13}\text{C-NMR}$ [101 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$]: δ (ppm) = 158,5 (C-8), 155,1 (C-6), 144,0 (C-4a), 127,5 (C-10a), 127,3 (C-3), 125,5 (C-2), 124,3 (C-4), 121,7 (C-9, C-10), 120,4 (C-10b), 120,2 (C-1), 119,9 (C-6a), 105,8 (C-7), 55,7 (OCH_3)

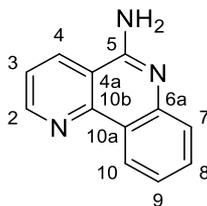
IR (ATR): $\tilde{\nu}$ (cm^{-1}) = 3392, 3099, 1616, 1532, 1407, 1345, 1254, 1221, 1035, 999, 821, 752, 745, 729

HRMS (EI): $m/z = 224,0950$ (berechnet für $[\text{C}_{14}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}]^+$: $m/z = 224,0944$)

Schmelzpunkt: 174 - 175°C

* Literaturbekannte Verbindung^[43] Die Darstellung erfolgte durch eine neue Methode.

Benzo[*h*][1,6]naphthyridin-5-amin (180)*



$C_{12}H_9N_3$

$M = 195,23 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$

Die Darstellung von **180** erfolgte nach Synthesvorschrift B unter Verwendung von 565 mg (2,50 mmol) 2-Bromnicotinonitril (**176**). Die Aufreinigung erfolgte mittels FSC (Kieselgel, Ethylacetat/Triethylamin 99:1).

Ausbeute: 475 mg (2,43 mmol) beiger Feststoff (97%)

$^1\text{H-NMR}$ [400 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$]: δ (ppm) = 9,09 (dd, $J = 4,4, 1,6$ Hz, 1H, 2-H), 8,75 (m, 2H, 4-H, 10-H), 7,71 (ddd, $J = 8,3, 4,4, 0,7$ Hz, 1H, 3-H), 7,64 – 7,53 (m, 2H, 7-H, 8-H), 7,32 (ddd, $J = 8,2, 6,8, 1,4$ Hz, 1H, 9-H), 7,23 (s, 2H, NH_2)

$^{13}\text{C-NMR}$ [101 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$]: δ (ppm) = 156,1 (C-5), 153,2 (C-2), 149,7 (C-10b), 147,5 (C-6a), 133,3 (C-4), 130,7 (C-8), 125,7 (C-7), 123,7 (C-10), 122,9 (C-3), 122,4 (C-9), 121,8 (C-10a), 114,3 (C-4a)

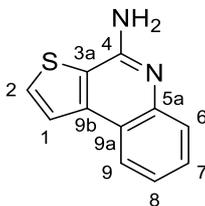
IR (ATR): $\tilde{\nu}$ (cm^{-1}) = 3102, 1652, 1470, 1104, 740

HRMS (EI): $m/z = 195,0791$ (berechnet für $[\text{C}_{12}\text{H}_9\text{N}_3]^+$: $m/z = 195,0791$)

Schmelzpunkt: 128 - 130°C

* Literaturbekannte Verbindung^[40] Die Darstellung erfolgte durch eine neue Methode.

Thieno[2,3-c]chinolin-4-amin (181)



$C_{11}H_8N_2S$

$M = 200,26 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$

Die Darstellung von **181** erfolgte nach Synthesevorschrift B unter Verwendung von 470 mg (2,50 mmol) 3-Bromthiophen-2-carbonitril (**177**). Die Aufreinigung erfolgte mittels FSC (Kieselgel, Ethylacetat/Triethylamin 99:1).

Ausbeute: 357 mg (1,78 mmol) beiger Feststoff (71%)

$^1\text{H-NMR}$ [400 MHz, CDCl_3]: δ (ppm) = 8,14 (ddd, $J = 8,1, 1,6, 0,7 \text{ Hz}$, 1H, 6-H), 7,95 (d, $J = 5,3 \text{ Hz}$, 1H, 2-H), 7,83 – 7,71 (m, 2H, 1-H, 7-H), 7,57 (ddd, $J = 8,4, 7,0, 1,5 \text{ Hz}$, 1H, 8-H), 7,39 (ddd, $J = 8,1, 7,0, 1,2 \text{ Hz}$, 1H, 7-H), 5,10 (s, 2H, NH_2).

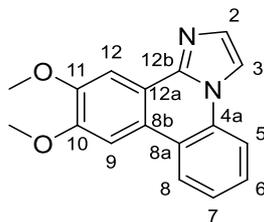
$^{13}\text{C-NMR}$ [101 MHz, CDCl_3]: δ (ppm) = 152,0 (C-4), 146,0 (C-5a), 144,0 (C-9b), 130,0 (C-7), 128,7 (C-2), 127,1 (C-8), 123,8 (C-6), 123,5 (C-9), 123,2 (C-1), 122,9 (C-9a), 121,8 (C-3a).

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ (cm^{-1}) = 3444, 3289, 3070, 1627, 1608, 1556, 1503, 1471, 1457, 1384, 1143, 903, 817, 756, 726

HRMS (EI): $m/z = 200,0402$ (berechnet für $[\text{C}_{11}\text{H}_8\text{N}_2\text{S}]^{+}$: $m/z = 200,0408$)

Schmelzpunkt: 209°C

10,11-Dimethoxyimidazo[1,2-*f*]phenanthridin (182)



$C_{17}H_{14}N_2O_2$

$M = 278,31 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$

Die Darstellung von **182** erfolgte nach Synthesevorschrift C unter Verwendung von 107 mg (0,420 mmol) 8,9-Dimethoxyphenanthridin-6-amin (**178**). Die Aufreinigung erfolgte mittels FSC (Kieselgel, Isohexan/Ethylacetat 1:1).

Ausbeute: 99 mg (0,36 mmol) beiger Feststoff (85%)

$^1\text{H-NMR}$ [400 MHz, CD_2Cl_2]: δ (ppm) = 8,34 (dd, $J = 8,2, 1,4 \text{ Hz}$, 1H, 5-H), 8,01 – 7,98 (m, 2H, 3-H, 12-H), 7,88 (dd, $J = 8,2, 1,3 \text{ Hz}$, 1H, 8-H), 7,71 (s, 1H, 2-H), 7,59 (ddd, $J = 8,3, 7,2, 1,4 \text{ Hz}$, 1H, 6-H), 7,51 (s, 1H, 9-H), 7,51 (td, $J = 7,0, 1,3 \text{ Hz}$, 1H, 7-H), 4,05 (s, 3H, OCH_3), 4,04 (s, 3H, OCH_3).

$^{13}\text{C-NMR}$ [101 MHz, CD_2Cl_2]: δ (ppm) = 151,2 (C-10 oder C-11), 151,2 (C-10 oder C-11), 142,9 (C-12b), 131,8 (C-4a), 131,6 (C-2), 128,4 (C-6), 125,4 (C-8), 124,2 (C-7), 122,1 (C-8b), 122,0 (C-8a), 118,6 (C-12a), 116,5 (C-5), 112,2 (C-3), 105,4 (C-12), 104,5 (C-9), 56,6 (OCH_3), 56,5 (OCH_3).

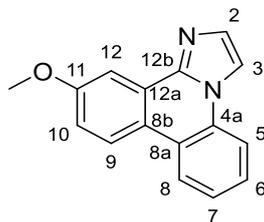
IR (ATR): $\tilde{\nu}$ (cm^{-1}) = 2830, 1615, 1516, 1478, 1455, 1274, 1212, 1161, 1142, 1033, 1017, 854, 793, 753, 711

HRMS (EI): $m/z = 278,1050$ (berechnet für $[\text{C}_{17}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_2]^+$: $m/z = 278,1050$)

Schmelzpunkt: 165 – 166°C

HPLC-Reinheit: >99% (210 nm; Methode 2), >99% (254 nm; Methode 2)

11-Methoxyimidazo[1,2-f]phenanthridin (183)*



$C_{16}H_{12}N_2O$

$M = 248,29 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$

Die Darstellung von **183** erfolgte nach Synthesevorschrift C unter Verwendung von 94 mg (0,42 mmol) 8-Methoxyphenanthridin-6-amin (**179**). Die Aufreinigung erfolgte mittels FSC (Kieselgel, Isohexan/Ethylacetat 1:1).

Ausbeute: 85 mg (0,34 mmol) hellbrauner Feststoff (82%)

$^1\text{H-NMR}$ [400 MHz, CD_2Cl_2]: δ (ppm) = 8,40 (dd, $J = 8,1, 1,4$ Hz, 1H, 9-H), 8,32 (d, $J = 9,0$ Hz, 1H, 5-H), 8,06 (d, $J = 2,8$ Hz, 1H, 2-H), 8,04 (d, $J = 1,4$ Hz, 1H, 3-H), 7,90 (dd, $J = 8,2, 1,3$ Hz, 1H, 8-H), 7,60 (ddd, $J = 8,4, 7,2, 1,5$ Hz, 1H, 6-H), 7,56 (d, $J = 1,3$ Hz, 1H, 12-H), 7,52 (ddd, $J = 8,4, 7,2, 1,3$ Hz, 1H, 7-H), 7,25 (dd, $J = 9,0, 2,8$ Hz, 1H, 10-H), 4,00 (s, 3H, OCH_3)

$^{13}\text{C-NMR}$ [101 MHz, CD_2Cl_2]: δ (ppm) = 160,0 (C-11), 142,0 (C-12b), 130,8 (C-4a oder C-2), 130,7 (C-4a oder C-2), 127,83 (C-7), 125,3 (C-6), 124,7 (C-12a), 124,3 (C-9), 123,6 (C-5), 121,9 (C-8a), 121,1 (C-8b), 118,4 (C-10), 115,8 (C-8), 112,4 (C-3), 105,2 (C-12), 55,8 (OCH_3)

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ (cm^{-1}) = 3434, 1617, 1472, 1325, 1291, 1036, 862, 750

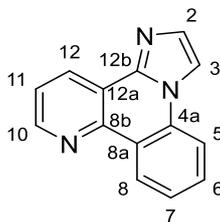
HRMS (EI): $m/z = 248,0943$ (berechnet für $[\text{C}_{16}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}]^{+}$: $m/z = 248,0944$)

Schmelzpunkt: 89°C

HPLC-Reinheit: >99% (210 nm; Methode 2), >99% (254 nm; Methode 2)

* Literaturbekannte Verbindung^[43]

Benzo[*h*]imidazo[2,1-*f*][1,6]naphthyridin (184)



$C_{14}H_9N_3$

$M = 219,25 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$

Die Darstellung von **184** erfolgte nach Synthesevorschrift C unter Verwendung von 82 mg (0,42 mmol) Benzo[*h*][1,6]naphthyridin-5-amin (**180**). Die Aufreinigung erfolgte mittels FSC (Kieselgel, Ethylacetat/Triethylamin 99:1).

Ausbeute: 57 mg (0,26 mmol) beiger Feststoff (62%)

$^1\text{H-NMR}$ [400 MHz, CD_2Cl_2]: δ (ppm) = 9,06 (dd, $J = 8,1, 1,5 \text{ Hz}$, 1H, 5-H), 8,91 (dd, $J = 4,5, 1,8 \text{ Hz}$, 1H, 10-H), 8,85 (dd, $J = 8,0, 1,8 \text{ Hz}$, 1H, 12-H), 8,07 (d, $J = 1,4 \text{ Hz}$, 1H, 3-H), 7,91 (dd, $J = 8,3, 1,1 \text{ Hz}$, 1H, 8-H), 7,74 (ddd, $J = 8,4, 7,1, 1,5 \text{ Hz}$, 1H, 6-H), 7,63 – 7,54 (m, 3H, 2-H, 7-H, 11-H)

$^{13}\text{C-NMR}$ [101 MHz, CD_2Cl_2]: δ (ppm) = 150,1 (C-10), 144,7 (C-8b), 141,4 (C-12b), 133,2 (C-4a), 131,9 (C-2), 131,4 (C-12), 130,5 (C-6), 126,1 (C-8), 125,3 (C-7), 123,4 (C-11), 122,7 (C-8a), 119,4 (C-12a), 115,3 (C-5), 112,6 (C-3)

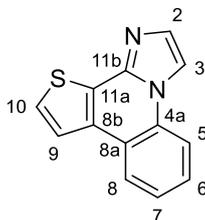
IR (ATR): $\tilde{\nu}$ (cm^{-1}) = 3319, 3148, 1653, 1581, 1479, 1472, 1395, 1295, 1080, 750, 726

HRMS (EI): $m/z = 219,0790$ (berechnet für $[\text{C}_{14}\text{H}_9\text{N}_3]^+$: $m/z = 219,0791$)

Schmelzpunkt: 253 - 255°C

HPLC-Reinheit: 98% (210 nm; Methode 2), >99% (254 nm; Methode 2)

Imidazo[1,2-a]thieno[2,3-c]chinolin (185)



$C_{13}H_8N_2S$

$M = 224,28 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$

Die Darstellung von **185** erfolgte nach Synthesevorschrift C unter Verwendung von 84 mg (0,42 mmol) Thieno[2,3-c]chinolin-4-amin (**181**). Die Aufreinigung erfolgte mittels FSC (Kieselgel, Isohexan/Ethylacetat 1:1).

Ausbeute: 0,183 g (0,430 mmol) gelbes Öl (86%)

$^1\text{H-NMR}$ [400 MHz, CD_2Cl_2]: δ (ppm) = 8,14 – 8,09 (m, 1H, 5-H), 7,96 (d, $J = 1,5$ Hz, 1H, 9-H), 7,87 (dd, $J = 8,2, 1,2$ Hz, 1H, 8-H), 7,74 (d, $J = 5,2$ Hz, 1H, 3-H), 7,57 – 7,51 (m, 2H, 6-H, 10-H), 7,48 (d, $J = 1,5$ Hz, 1H, 2-H), 7,44 (ddd, $J = 8,4, 7,3, 1,2$ Hz, 1H, 7-H).

$^{13}\text{C-NMR}$ [101 MHz, CD_2Cl_2]: δ (ppm) = 140,3 (C-11b), 134,2 (C-8b), 131,4 (C-8a), 131,4 (C-2), 128,0 (C-10), 127,1 (C-6), 127,0 (C-4a), 125,1 (C-8), 125,0 (C-7), 122,4 (C-9), 120,5 (C-11a), 115,9 (C-5), 111,6 (C-3)

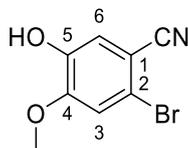
IR (ATR): $\tilde{\nu}$ (cm^{-1}) = 3091, 1596, 1549, 1430, 1321, 1070, 896, 748, 720, 706

HRMS (EI): $m/z = 224,0401$ (berechnet für $\text{C}_{13}\text{H}_8\text{N}_2\text{S}]^{+}$: $m/z = 224,0403$)

Schmelzpunkt: 107 - 108°C

HPLC-Reinheit: >99% (210 nm; Methode 2), >99% (254 nm; Methode 2)

2-Brom-5-hydroxy-4-methoxybenzonitril (188)



$M = 228,05 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$

Die Darstellung von **188** erfolgte nach Synthesevorschrift A unter Verwendung von 2,33 g (10,0 mmol) 2-Brom-5-hydroxy-4-methoxybenzaldehyd (**186**). Die Aufreinigung erfolgte mittels FSC (Isohexan/Ethylacetat 1:1).

Ausbeute: 2,19 g (9,63 mmol) farbloser Feststoff (96%)

$^1\text{H NMR}$ [400 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$] δ (ppm) = 10,07 (s, 1H, OH), 7,35 (s, 1H, 6-H), 7,17 (s, 1H, 3-H), 3,87 (s, 3H, OCH_3)

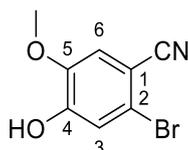
$^{13}\text{C NMR}$ [101 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$] δ (ppm) = 152,7 (C-4), 146,5 (C-5), 119,4 (C-3), 117,7 (C-2), 116,2 (C-6), 114,4 (CN), 105,4 (C-1), 56,4 (OCH_3)

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ (cm^{-1}) = 3367, 2229, 1608, 1508, 1438, 1286, 1267, 1211, 1160, 1020, 867, 842, 804, 697

HRMS (EI): $m/z = 226,9582$ (berechnet für $[\text{C}_8\text{H}_6\text{BrNO}_2]^+$: $m/z = 226,9576$)

Schmelzpunkt: 160°C

2-Brom-4-hydroxy-5-methoxybenzonitril (189)



$M = 228,05 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$

Experimenteller Teil

Die Darstellung von **189** erfolgte nach Synthesevorschrift A unter Verwendung von 2,31 g (10,0 mmol) 6-Bromvanillin (**187**). Die Aufreinigung erfolgte mittels FSC (Isohexan/Ethylacetat 1:1).

Ausbeute: 2,16 g (9,49 mmol) farbloser Feststoff (95%)

¹H NMR [400 MHz, (CD₃)₂SO] δ (ppm) = 10,79 (s, 1H, OH), 7,46 (s, 1H, 3-H), 7,13 (s, 1H, 6-H), 3,81 (s, 3H, OCH₃)

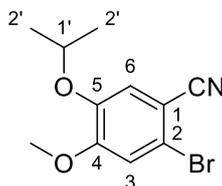
¹³C-NMR [101 MHz, (CD₃)₂SO]: δ (ppm) = 152,8 (C-5), 148,1 (C-4), 119,7 (C-3), 118,4 (C-2), 117,5 (C-6), 116,8 (CN), 104,1 (C-1), 56,7 (OCH₃)

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) = 3245, 2234, 1574, 1501, 1456, 1285, 1212, 1161, 1041, 963, 877, 845, 815

HRMS (EI): m/z = 226,9580 (berechnet für [C₈H₆BrNO₂]⁺: m/z = 226,9576)

Schmelzpunkt: 139 - 140°C

2-Brom-5-isopropoxy-4-methoxybenzonitril (**192**)



C₁₁H₁₂BrNO₂

$M = 270,13 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$

Die Darstellung von **192** erfolgte nach Synthesevorschrift D unter Verwendung von 1,14 g (5,00 mmol) 2-Brom-5-hydroxy-4-methoxybenzonitril (**186**) und 1,5 mL (15 mmol) 2-Iodpropan. Die Aufreinigung erfolgte mittels FSC (Isohexan/Ethylacetat 2:1).

Ausbeute: 1,28g (4,73 mmol) farbloser Feststoff (95%)

¹H NMR [400 MHz, CD₂Cl₂] δ (ppm) = 7,10 (s, 1H, 3-H oder 6-H), 7,09 (s, 1H, 3-H oder 6-H), 4,49 (hept, $J = 6,1 \text{ Hz}$, 1H, 1'-H), 3,87 (s, 3H, -OCH₃), 1,33 (d, $J = 6,1 \text{ Hz}$, 6H, 2'-H).

¹³C NMR [101 MHz, CD₂Cl₂] δ (ppm) = 154,7 (C-4), 146,8 (C-5), 119,2 (C-6), 117,7 (C-2), 117,1 (-CN), 116,0 (C-3), 106,6 (C-1), 72,2 (C-1'), 56,4 (-OCH₃), 21,5 (C-2').

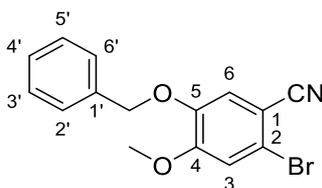
Experimenteller Teil

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) = 2922, 2223, 1588, 1504, 1437, 1377, 1339, 1268, 1259, 1217, 1166, 1138, 1113, 1027, 921, 859, 836, 798

HRMS (EI): m/z = 269,0049 (berechnet für [C₁₁H₁₂BrNO₂]⁺: m/z = 269,0046)

Schmelzpunkt: 89 - 91°C

5-(Benzyloxy)-2-brom-4-methoxybenzonitril (**193**)



C₁₅H₁₂BrNO₂

$M = 318,17 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$

Die Darstellung von **193** erfolgte nach Synthesevorschrift D unter Verwendung von 1,14 g (5,00 mmol) 2-Brom-5-hydroxy-4-methoxybenzonitril (**186**) und 1,2 mL (15 mmol) Benzylbromid. Die Aufreinigung erfolgte mittels FSC (Isohexan/Ethylacetat 2:1).

Ausbeute: 1,41 g (4,44 mmol) farbloser Feststoff (89%)

¹H-NMR [400 MHz, (CD₃)₂SO]: δ (ppm) = 7,61 (s, 1H, 6-H), 7,47 – 7,33 (m, 6H, 3-H, 2'-H, 3'-H, 4'-H, 5'-H, 6'-H), 5,14 (s, 2H, OCH₂), 3,88 (s, 3H, OCH₃).

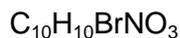
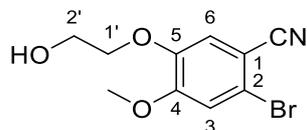
¹³C-NMR [101 MHz, (CD₃)₂SO]: δ (ppm) = 153,6 (C-4), 147,3 (C-5), 136,0 (C-1'), 128,5 (C-2', C-6'), 128,2 (C-4'), 128,1 (C-3', C-5'), 117,7 (C-2), 117,6 (C-6), 117,1 (CN), 116,1 (C-3), 105,2 (C-1), 70,4 (OCH₂), 56,5 (OCH₃).

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) = 2931, 2229, 1723, 1589, 1504, 1455, 1436, 1376, 1339, 1254, 1215, 1166, 1024, 962, 911, 852, 798, 750, 698

HRMS (EI): m/z = 317,0044 (berechnet für [C₁₅H₁₂BrNO₂]⁺: m/z = 317,0046)

Schmelzpunkt: 102 – 103°C

2-Brom-5-(2-hydroxyethoxy)-4-methoxybenzonitril (194)



$M = 272,10 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$

Die Darstellung von **194** erfolgte nach Synthesevorschrift D unter Verwendung von 1,14 g (5,00 mmol) 2-Brom-4-hydroxy-5-methoxybenzonitril (**186**) und 1,06 mL (15 mmol) 2-Bromethanol. Die Aufreinigung erfolgte mittels FSC (Isohexan/Ethylacetat 2:1).

Ausbeute: 1,31 g (4,81 mmol) farbloser Feststoff (96%)

$^1\text{H-NMR}$ [500 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$]: δ (ppm) = 7,50 (s, 1H, 6-H), 7,39 (s, 1H, 3-H), 4,89 (t, J = 5,4 Hz, 1H, OH), 4,03 (t, J = 4,9 Hz, 2H, 1'-H), 3,87 (s, 3H, OCH_3), 3,70 (q, J = 5,1 Hz, 2H, 2'-H).

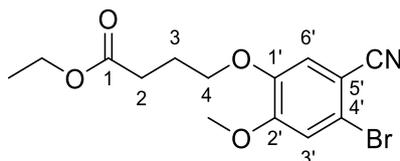
$^{13}\text{C-NMR}$ [126 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$]: δ (ppm) = 153,5 (C-4), 147,8 (C-5), 117,8 (CN), 117,1 (C-6), 116,7 (C-2), 116,0 (C-3), 105,3 (C-1), 70,8 (C-1'), 59,3 (C-2'), 56,4 (OCH_3).

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ (cm^{-1}) = 3352, 2228, 1593, 1507, 1430, 1376, 1336, 1264, 1200, 1170, 1028, 903, 878, 801

HRMS (EI): $m/z = 270,9838$ (berechnet für $[\text{C}_{10}\text{H}_{10}\text{BrNO}_3]^+$: $m/z = 270,9839$)

Schmelzpunkt: 135 - 136°C

Ethyl 4-(4-brom-5-cyano-2-methoxyphenoxy)butanoat (195)



$M = 342,19 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$

Experimenteller Teil

Die Darstellung von **195** erfolgte nach Synthesevorschrift D unter Verwendung von 1,14 g (5,00 mmol) 2-Brom-5-hydroxy-4-methoxybenzonnitril (**186**) und 2,15 mL (15,0 mmol) 4-Brombuttersäureethylester. Die Aufreinigung erfolgte mittels FSC (Isohexan/Ethylacetat 2:1).

Ausbeute: 1,70 g (4,97 mmol) farbloser Feststoff (99%)

¹H-NMR [500 MHz, CDCl₃]: δ (ppm) = 7,07 (s, 1H, 6'-H), 7,04 (s, 1H, 3'-H), 4,15 (q, J = 7,1 Hz, 2H, OCH₂CH₃), 4,10 (t, J = 6,3 Hz, 2H, 4-H), 3,86 (s, 3H, OCH₃), 2,52 (t, J = 7,1 Hz, 2H, 2-H), 2,21 – 2,13 (m, 2H, 3-H), 1,26 (t, J = 7,1 Hz, 3H, OCH₂CH₃).

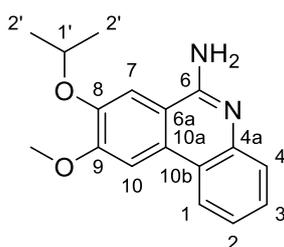
¹³C-NMR [126 MHz, CDCl₃]: δ (ppm) = 172,9 (C-1), 152,7 (C-2'), 148,9 (C-1'), 117,8 (C-4'), 117,6 (CN), 116,7 (C-6'), 115,7 (C-3'), 107,0 (C-5'), 68,5 (C-4), 60,8 (OCH₂CH₃), 56,5 (OCH₃), 30,5 (C-2), 24,3 (C-4), 14,4 (OCH₂CH₃).

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) = 2986, 1951, 2229, 1729, 1593, 1508, 1375, 1339, 1313, 1267, 1250, 1214, 1154, 1026, 917, 880, 822, 775

HRMS (EI): m/z = Der Molekülpeak konnte nicht beobachtet werden. Ein Signal mit m/z = 295,9915 (berechnet für [C₁₂H₁₁BrNO₃]⁺: m/z = 295,9917) deutet auf die Fragmentierung des Radikalkations unter Abspaltung eines Ethanolats hin.

Schmelzpunkt: 90 - 91°C

8-Isopropoxy-9-methoxyphenanthridin-6-amin (**196**)



C₁₇H₁₈N₂O₂

$M = 282,34 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$

Die Darstellung von **196** erfolgte nach Synthesevorschrift B unter Verwendung von 675 mg (2,50 mmol) 2-Brom-5-isopropoxy-4-methoxybenzonnitril (**192**). Die Aufreinigung erfolgte mittels FSC (Kieselgel, Ethylacetat/Triethylamin 99:1).

Ausbeute: 564 mg (2,00 mmol) hellbrauner Feststoff (80%)

Experimenteller Teil

¹H-NMR [400 MHz, (CD₃)₂SO]: δ (ppm) = 8,42 (dd, *J* = 8,2, 1,4 Hz, 1H, 4-H), 7,97 (s, 1H, 7-H), 7,74 (s, 1H, 10-H), 7,51 – 7,37 (m, 2H, 1-H, 3-H), 7,22 (ddd, *J* = 8,2, 6,8, 1,5 Hz, 1H, 2-H), 6,85 (s, 2H, NH₂), 4,86 (hept, *J* = 6,1 Hz, 1H, 1'-H), 4,01 (s, 3H, OCH₃), 1,34 (d, *J* = 6,0 Hz, 6H, 2'-H)

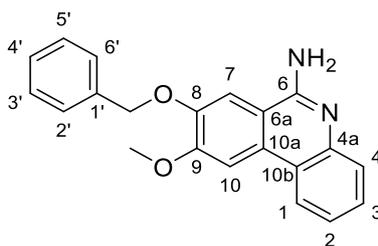
¹³C-NMR [101 MHz, (CD₃)₂SO]: δ (ppm) = 155,4 (C-6), 153,2 (C-9), 147,5 (C-8), 145,0 (C-4a), 129,1 (C-10a), 128,0 (C-3), 125,9 (C-1), 122,7 (C-4), 121,7 (C-2), 120,8 (C-10b), 113,4 (C-6a), 108,5 (C-10), 104,0 (C-7), 70,7 (C-1'), 56,3 (OCH₃), 22,3 (C-2')

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) = 3460, 3133, 1646, 1506, 1450, 1263, 1203, 1106, 1022, 850, 761, 737

HRMS (EI): *m/z* (%) = 282,1358 (berechnet für [C₁₇H₁₈N₂O₂]⁺⁺: *m/z* = 282,1368)

Schmelzpunkt: 208 – 210°C

8-(Benzyloxy)-9-methoxyphenanthridin-6-amin (197)



C₂₁H₁₈N₂O₂

M = 330,39 g · mol⁻¹

Die Darstellung von **197** erfolgte nach Synthesevorschrift B unter Verwendung von 795 mg (2,50 mmol) 5-(Benzyloxy)-2-brom-4-methoxybenzonitril (**193**). Die Aufreinigung erfolgte mittels FSC (Kieselgel, Ethylacetat/Triethylamin 99:1).

Ausbeute: 720 mg (2,18 mmol) hellbrauner Feststoff (87%)

¹H-NMR [500 MHz, (CD₃)₂SO]: δ (ppm) = 8,44 (dd, *J* = 8,3, 1,4 Hz, 1H, 4-H), 8,01 (s, 1H, 10-H), 7,89 (s, 1H, 7-H), 7,57 – 7,52 (m, 2H, 2'-H, 6'-H), 7,49 (dd, *J* = 8,2, 1,4 Hz, 1H, 1-H), 7,43 (dd, *J* = 8,3, 6,6 Hz, 3H, 3'-H, 4'-H, 5'-H), 7,41 – 7,34 (m, 1H, 3-H), 7,24 (ddd, *J* = 8,2, 6,8, 1,4 Hz, 1H, 2-H), 6,86 (s, 2H, NH₂), 5,25 (s, 2H, OCH₂), 4,03 (s, 3H, OCH₃).

¹³C-NMR [126 MHz, (CD₃)₂SO]: δ (ppm) = 155,0 (C-6), 152,1 (C-9), 148,1 (C-8), 144,6 (C-4a), 136,7 (C-1'), 128,9 (C-10a), 128,5 (C-3', C-5'), 128,3 (C-2', C-6'), 128,1 (C-3), 127,6 (C-

Experimenteller Teil

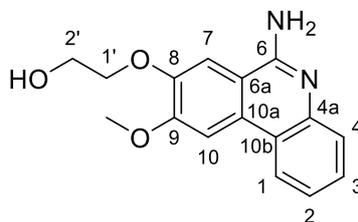
4'), 125,5 (C-1), 122,3 (C-4), 121,2 (C-2), 120,3 (C-10b), 112,8 (C-6a), 106,9 (C-7), 103,5 (C-10), 70,2 (OCH₂), 55,9 (OCH₃).

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) = 3465, 3308, 3064, 1649, 1617, 1525, 1438, 1380, 1265, 1201, 1143, 1009, 836, 742

HRMS (ESI): m/z = 331,1438 (berechnet für [C₂₁H₁₉N₂O₂]⁺⁺: m/z = 331,1436)

Schmelzpunkt: 179 - 180°C

2-((6-Amino-9-methoxyphenanthridin-8-yl)oxy)ethan-1-ol (**198**)



C₁₆H₁₆N₂O₃

$M = 284,32 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$

Die Darstellung von **198** erfolgte nach Synthesevorschrift B unter Verwendung von 680 mg (2,50 mmol) 2-Brom-5-(2-hydroxyethoxy)-4-methoxybenzonnitril (**194**). Die Aufreinigung erfolgte mittels FSC (Kieselgel, Dichlormethan/Methanol/ Triethylamin 20:1:1).

Ausbeute: 690 mg (1,83 mmol) dunkelbrauner Feststoff (97%)

¹H-NMR [500 MHz, CDCl₃]: δ (ppm) = 8,40 (dd, $J = 7,3, 1,7$ Hz, 1H, 1-H), 8,25 (dd, $J = 7,4, 1,7$ Hz, 1H, 4-H), 7,67 (m, 2H, 2-H, 3-H), 7,27 (s, 1H, 7-H oder 10 H), 7,17 (s, 1H, 7-H oder 10-H), 4,18 (t, $J = 7,1$ Hz, 2H, 1''-H), 3,87 (s, 3H, OCH₃), 3,71 (q, $J = 7,1$ Hz, 2H, 2''-H).

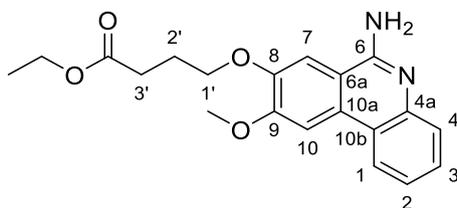
¹³C-NMR [126 MHz, CDCl₃]: δ (ppm) = 155,2 (C-6), 150,4 (C-9), 148,0 (C-4a), 140,5 (C-4a), 133,9 (C-3), 132,9 (C-10a), 129,2 (C-2), 124,5 (C-1), 124,2 (C-4), 120,0 (C-10b), 110,5 (C-6a), 107,9 (C-7), 106,1 (C-10), 90,7 (C-1''), 60,4 (C-2''), 55,6 (OCH₃)

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) = 3128, 2930, 1676, 1664, 1600, 1517, 1425, 1366, 1278, 1260, 1216, 1060, 1015, 904, 852, 840, 741

HRMS (ESI): m/z = 285,1232 (berechnet für [C₁₆H₁₇N₂O₃]⁺⁺: m/z = 285,1234)

Schmelzpunkt: >265°C unter Zersetzung

Ethyl 4-((6-amino-9-methoxyphenanthridin-8-yl)oxy)butanoat (199)



$C_{20}H_{22}N_2O_4$

$M = 354,41 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$

Die Darstellung von **199** erfolgte nach Synthesevorschrift B unter Verwendung von 855 mg (2,50 mmol) Ethyl-4-(4-brom-5-cyano-2-methoxyphenoxy)butanoat (**195**). Die Aufreinigung erfolgte mittels FSC (Kieselgel, Ethylacetat/Triethylamin 99:1).

Ausbeute: 702 mg (1,98 mmol) brauner Feststoff (79%)

$^1\text{H-NMR}$ [500 MHz, CD_2Cl_2]: δ (ppm) = 8,31 (dd, $J = 8,2, 1,4$ Hz, 1H, 4-H), 7,89 (d, $J = 2,2$ Hz, 1H, 10-H), 7,63 (dd, $J = 8,2, 1,3$ Hz, 1H, 1-H), 7,45 (ddd, $J = 8,2, 7,0, 1,4$ Hz, 1H, 3-H), 7,32 (ddd, $J = 8,2, 6,9, 1,3$ Hz, 1H, 2-H), 7,20 (s, 1H, 7-H), 5,21 (s, 2H, NH_2), 4,25 (t, $J = 6,3$ Hz, 2H, 1'-H), 4,15 (q, $J = 7,1$ Hz, 2H, OCH_2CH_3), 3,99 (s, 3H, OCH_3), 2,59 (dt, $J = 9,9, 7,2$ Hz, 2H, 3'-H), 2,24 (m, 2'-H), 1,26 (t, $J = 7,1$ Hz, 3H, OCH_2CH_3).

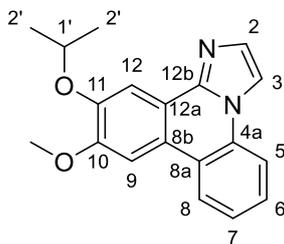
$^{13}\text{C-NMR}$ [126 MHz, CD_2Cl_2]: δ (ppm) = 173,2 (COO), 154,4 (C-6), 152,4 (C-9), 150,4 (C-8), 144,6 (C-4a), 129,9 (C-10a), 128,4 (C-3), 127,1 (C-2), 123,1 (C-1), 122,1 (C-4), 121,6 (C-10b), 112,5 (C-6a), 104,8 (C-7 oder C-10), 104,5 (C-7 oder C-10), 68,4 (C-1'), 61,0 (OCH_2CH_3), 56,6 (OCH_3), 31,2 (C-3'), 25,0 (C-2'), 14,6 (OCH_2CH_3).

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ (cm^{-1}) = 3415, 3095, 1722, 1642, 1528, 1439, 1393, 1365, 1268, 1203, 1184, 1091, 1017, 872, 820, 766

HRMS (ESI): $m/z = 355,1650$ (berechnet für $[\text{C}_{20}\text{H}_{23}\text{N}_2\text{O}_4]^+$: $m/z = 355,1652$)

Schmelzpunkt: 185°C

11-Isopropoxy-10-methoxyimidazo[1,2-*f*]phenanthridin (200**)**



$C_{19}H_{18}N_2O_2$

$M = 306,37 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$

Die Darstellung von **200** erfolgte nach Synthesevorschrift C unter Verwendung von 119 mg (0,420 mmol) 8-Isopropoxy-9-methoxyphenanthridin-6-amin (**196**). Die Aufreinigung erfolgte mittels FSC (Kieselgel, Isohexan/Ethylacetat 1:1).

Ausbeute: 91 mg (0,41 mmol) brauner Feststoff (81%)

$^1\text{H-NMR}$ [400 MHz, CD_2Cl_2]: δ (ppm) = 8,36 (dd, $J = 8,1, 1,5$ Hz, 1H, 5-H), 8,03 (s, 1H, 12-H), 8,00 (d, $J = 1,5$ Hz, 1H, 3-H), 7,90 (dd, $J = 8,2, 1,3$ Hz, 1H, 8-H), 7,76 (s, 1H, 9-H), 7,60 (ddd, $J = 8,3, 7,2, 1,4$ Hz, 1H, 7-H), 7,54 – 7,50 (m, 2H, 2-H, 6-H), 4,87 (hept, 1H, 1'-H), 4,05 (s, 3H, OCH_3), 1,45 (d, $J = 6,1$ Hz, 6H, 2'-H)

$^{13}\text{C-NMR}$ [101 MHz, CD_2Cl_2]: δ (ppm) = 152,1 (C-10), 149,5 (C-11), 143,0 (C-12b), 131,8 (C-4a), 131,5 (C-2), 128,3 (C-6), 125,4 (C-8), 124,2 (C-7), 122,2 (C-8b), 121,9 (C-8a), 118,6 (C-12a), 116,5 (C-5), 112,2 (C-3), 108,0 (C-12), 105,0 (C-9), 71,6 (C-1'), 56,6 (OCH_3), 22,3 (C-2')

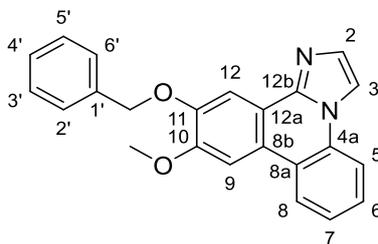
IR (ATR): $\tilde{\nu}$ (cm^{-1}) = 2976, 1614, 1514, 1453, 1384, 1263, 1209, 1107, 1022, 953, 924, 849, 798, 718

HRMS (EI): $m/z = 306,1364$ (berechnet für $[\text{C}_{19}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_2]^+$: $m/z = 306,1363$)

Schmelzpunkt: 73°C

HPLC-Reinheit: >99% (210 nm; Methode 2), >99% (254 nm; Methode 2)

11-(Benzyloxy)-10-methoxyimidazo[1,2-f]phenanthridin (201)



$C_{23}H_{18}N_2O_2$

$M = 354,41 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$

Die Darstellung von **201** erfolgte nach Synthesevorschrift C unter Verwendung von 134 mg (0,42 mmol) 8-(Benzyloxy)-9-methoxyphenanthridin-6-amin (**197**). Die Aufreinigung erfolgte mittels FSC (Kieselgel, Isohexan/Ethylacetat 2:3).

Ausbeute: 137 mg (0,387 mmol) beiger Feststoff (92%)

$^1\text{H-NMR}$ [500 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$]: δ (ppm) = 8,72 – 8,67 (m, 1H, 8-H), 8,54 (d, $J = 1,5 \text{ Hz}$, 1H, 3-H), 8,28 (d, $J = 8,2 \text{ Hz}$, 1H, 5-H), 8,04 (d, $J = 1,8 \text{ Hz}$, 1H, 12-H), 8,01 (s, 1H, 9-H), 7,69 – 7,64 (m, 1H, 6-H), 7,59 – 7,49 (m, 4H, 2-H, 7-H, 2'-H, 6'-H), 7,43 (t, $J = 7,6 \text{ Hz}$, 2H, 3'-H, 5'-H), 7,36 (t, $J = 7,4 \text{ Hz}$, 1H, 4'-H), 5,31 (s, 2H, OCH_2), 4,04 (s, 3H, OCH_3).

$^{13}\text{C-NMR}$ [126 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$]: δ (ppm) = 150,6 (C-11), 149,1 (C-10), 141,3 (C-12b), 136,7 (C-1'), 130,9 (C-2), 130,8 (C-4a), 128,5 (C-3', C-5'), 128,3 (C-4'), 128,0 (C-6), 127,9 (C-2', C-6'), 125,1 C-7), 124,5 (C-8), 121,3 (C-12a), 120,9 (C-8a), 117,2 (C-8b), 116,5 (C-5), 113,2 (C-3), 105,8 (C-12), 105,2 (C-9), 69,9 (OCH_2), 56,1 (OCH_3).

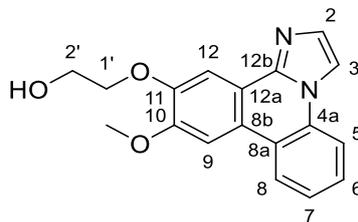
IR (ATR): $\tilde{\nu}$ (cm^{-1}) = 1924, 1617, 1514, 1457, 1264, 1206, 1016, 857, 746, 725

HRMS (EI): $m/z = 354,1362$ (berechnet für $[\text{C}_{23}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_2]^+$: $m/z = 354,1363$)

Schmelzpunkt: 184°C

HPLC-Reinheit: 96% (210 nm; Methode 2), 96% (254 nm; Methode 2)

2-((10-Methoxyimidazo[1,2-f]phenanthridin-11-yl)oxy)ethan-1-ol (202)



$C_{18}H_{16}N_2O_3$

$M = 308,34 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$

Die Darstellung von **202** erfolgte nach Synthesevorschrift C unter Verwendung von 161 mg (0,42 mmol) 2-((6-Amino-9-methoxyphenanthridin-8-yl)oxy)ethan-1-ol (**198**). Die Aufreinigung erfolgte mittels FSC (Kieselgel, Dichlormethan/Methanol 20:1).

Ausbeute: 81 mg (0,26 mmol) farbloser Feststoff (88%)

$^1\text{H-NMR}$ [400 MHz, CD_2Cl_2]: δ (ppm) = 8,29 (dd, $J = 8,2, 1,5$ Hz, 1H, 5-H), 7,97 (t, $J = 1,6$ Hz, 1H, 3-H), 7,92 (d, $J = 1,9$ Hz, 1H, 2-H), 7,85 (dt, $J = 8,2, 1,6$ Hz, 1H, 8-H), 7,70 (d, $J = 1,6$ Hz, 1H, 12-H), 7,54 (ddt, $J = 8,4, 7,1, 1,5$ Hz, 1H, 7-H), 7,50 – 7,41 (m, 2H, 6-H, 9-H), 4,21 (td, $J = 4,7, 1,8$ Hz, 2H, 1'-H), 4,01 (d, $J = 1,9$ Hz, 3H, OCH_3), 3,92 (dq, $J = 5,4, 1,8$ Hz, 2H, 2'-H)

$^{13}\text{C-NMR}$ [101 MHz, CD_2Cl_2]: δ (ppm) = 151,3 (C-10), 150,4 (C-11), 142,9 (C-12b), 131,6 (C-4a), 130,9 (C-2), 128,7 (C-6), 125,8 (C-8), 124,3 (C-7), 122,7 (C-8b), 122,1 (C-8a), 118,0 (C-12a), 116,6 (C-5), 112,6 (C-3), 106,5 (C-12), 104,8 (C-9), 71,2 (C-1'), 61,1 (C-2'), 56,6 (OCH_3)

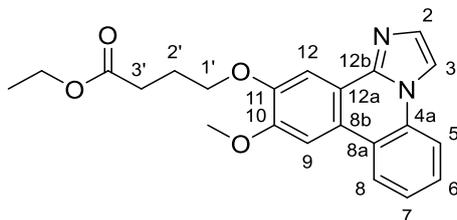
IR (ATR): $\tilde{\nu}$ (cm^{-1}) = 3164, 1620, 1539, 1518, 1478, 1454, 1268, 1212, 1177, 1071, 1027, 918, 901, 830, 731

HRMS (EI): $m/z = 308,1155$ (berechnet für $[\text{C}_{18}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_3]^+$: $m/z = 308,1155$)

Schmelzpunkt: 237 - 238°C

HPLC-Reinheit: 98% (210 nm; Methode 2), >99% (254 nm; Methode 2)

Ethyl 4-((10-methoxyimidazo[1,2-f]phenanthridin-11-yl)oxy)butanoat (203)



$C_{22}H_{22}N_2O_4$

$M = 378,43 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$

Die Darstellung von **203** erfolgte nach Synthesevorschrift C unter Verwendung von 149 mg (0,42 mmol) Ethyl 4-((6-amino-9-methoxyphenanthridin-8-yl)oxy)butanoat (**199**). Die Aufreinigung erfolgte mittels FSC (Kieselgel, Isohexan/Ethylacetat 2:3).

Ausbeute: 77 mg (0,23 mmol) farbloser Feststoff (77%)

$^1\text{H-NMR}$ [400 MHz, CD_2Cl_2]: δ (ppm) = 8,34 (dd, $J = 8,1, 1,4$ Hz, 1H, 5-H), 7,99 (m, 2H, 3-H, 12-H), 7,88 (dd, $J = 8,1, 1,2$ Hz, 1H, 8-H), 7,73 (s, 1H, 9-H), 7,64 – 7,55 (m, 1H, 7-H), 7,54 – 7,49 (m, 2H, 2-H, 6-H), 4,24 (t, $J = 6,4$ Hz, 2H, 1'-H), 4,15 (q, $J = 7,1$ Hz, 2H, 1''-H), 4,05 (s, 3H, OCH_3), 2,56 (t, $J = 7,4$ Hz, 2H, 3'-H), 2,26 – 2,16 (m, 2H, 2'-H), 1,26 (t, $J = 7,1$ Hz, 3H, 2''-H)

$^{13}\text{C-NMR}$ [101 MHz, CD_2Cl_2]: δ (ppm) = 172,8 (COO), 150,8 (C-10), 149,9 (C-11), 142,3 (C-12b), 131,9 (C-4a), 131,3 (C-8b), 131,0 (C-2), 127,8 (C-7), 124,8 (C-6), 123,6 (C-5), 121,6 (C-8a), 118,0 (C-12a), 115,9 (C-8), 111,7 (C-3), 105,9 (C-12), 104,2 (C-9), 68,0 (C-1'), 60,4 (C-1''), 56,0 (OCH_3), 30,8 (C-3'), 24,6 (C-2'), 14,0 (C-2'').

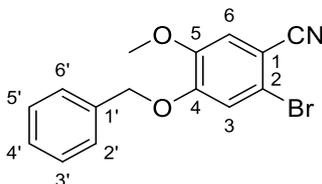
IR (ATR): $\tilde{\nu}$ (cm^{-1}) = 1937, 1727, 1616, 1538, 1515, 1454, 1387, 1327, 1314, 1263, 1208, 1181, 1022, 858, 748, 721

HRMS (EI): $m/z = 378,1573$ (berechnet für $\text{C}_{22}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}_4$)⁺: $m/z = 378,1574$)

Schmelzpunkt: 115°C

HPLC-Reinheit: 97% (210 nm; Methode 2), 98% (254 nm; Methode 2)

4-(Benzyloxy)-2-brom-5-methoxybenzonitril (204)



$C_{15}H_{12}BrNO_2$

$M = 318,17 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$

Die Darstellung von **204** erfolgte nach Synthesevorschrift D unter Verwendung von 1,14 g (5,00 mmol) 2-Brom-4-hydroxy-5-methoxybenzonitril (**187**) und 1,2 mL (15 mmol) Benzylbromid. Die Aufreinigung erfolgte mittels FSC (Isohexan/Ethylacetat 2:1).

Ausbeute: 1,29 g (4,05 mmol) farbloser Feststoff (81%)

$^1\text{H-NMR}$ [400 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$]: δ (ppm) = 7,52 (d, $J = 1,5 \text{ Hz}$, 2H, 3-H, 6-H), 7,46 – 7,35 (m, 5H, 2'-H, 3'-H, 4'-H, 5'-H, 6'-H), 5,21 (s, 2H, OCH_2), 3,81 (s, 3H, OCH_3).

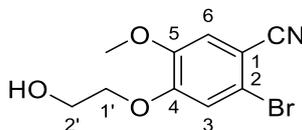
$^{13}\text{C-NMR}$ [101 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$]: δ (ppm) = 152,3 (C-4), 148,6 (C-5), 135,7 (C-1'), 128,5 (C-3', C-5'), 128,3 (C-4'), 128,1 (C-2', C-6'), 117,7 (C-2), 117,0 (C-3), 116,6 (CN), 116,4 (C-6), 105,6 (C-1), 70,5 (OCH_2), 56,3 (OCH_3).

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ (cm^{-1}) = 2939, 2234, 1590, 1503, 1489, 1463, 1376, 1339, 1264, 1207, 1170, 1029, 994, 954, 917, 886, 860, 841, 741, 697

HRMS (EI): $m/z = 317,0045$ (berechnet für $[\text{C}_{15}\text{H}_{12}\text{BrNO}_2]^+$: $m/z = 317,0046$)

Schmelzpunkt: 153 - 154°C

2-Brom-4-(2-hydroxyethoxy)-5-methoxybenzonitril (205)



$C_{10}H_{10}BrNO_3$

Experimenteller Teil

$$M = 272,10 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$$

Die Darstellung von **205** erfolgte nach Synthesevorschrift D unter Verwendung von 1,14 g (5,00 mmol) 2-Brom-4-hydroxy-5-methoxybenzonitril (**187**) und 1,06 mL (15 mmol) 2-Bromethanol. Die Aufreinigung erfolgte mittels FSC (Isohexan/Ethylacetat 2:1).

Ausbeute: 1,13 g (4,15 mmol) farbloser Feststoff (83%)

¹H-NMR [400 MHz, CD₂Cl₂]: δ (ppm) = 7,12 (d, J = 1,5 Hz, 2H, 3-H, 6-H), 4,07 (dd, J = 5,1, 3,8 Hz, 2H, 1'-H), 3,96 – 3,91 (m, 2H, 2'-H), 3,90 (s, 3H, OCH₃), 2,16 – 2,12 (m, 1H, OH).

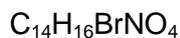
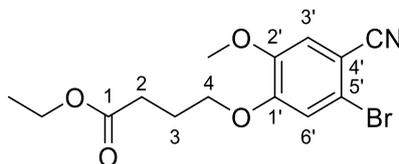
¹³C-NMR [101 MHz, CD₂Cl₂]: δ (ppm) = 154,5 (C-5), 148,4 (C-4), 118,4 (C-2), 118,2 (C-3 oder C-6), 118,1 (CN), 116,4 (C-3 oder C-6), 107,3 (C-1), 71,8 (C-1'), 61,5 (C-2'), 57,0 (OCH₃).

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) = 3854, 3355, 2920, 2230, 1502, 1263, 1170, 1072, 877, 801

HRMS (EI): $m/z = 270,9838$ (berechnet für [C₁₀H₁₀BrNO₃]⁺: $m/z = 270,9839$)

Schmelzpunkt: 160 – 161°C

Ethyl 4-(5-brom-4-cyano-2-methoxyphenoxy)butanoat (**206**)



$$M = 342,19 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$$

Die Darstellung von **206** erfolgte nach Synthesevorschrift D unter Verwendung von 1,14 g (5,00 mmol) 2-Brom-4-hydroxy-5-methoxybenzonitril (**187**) und 2,15 mL (15,0 mmol) 4-Brombuttersäureethylester. Die Aufreinigung erfolgte mittels FSC (Isohexan/Ethylacetat 2:1).

Ausbeute: 1,62 g (4,73 mmol) farbloser Feststoff (95%)

¹H-NMR [400 MHz, CD₂Cl₂]: δ (ppm) = 7,10 (s, 1H, 3'-H), 7,07 (s, 1H, 6'-H), 4,16 – 4,09 (m, 2H, OCH₂CH₃), 4,07 (t, J = 6,3 Hz, 2H, 4-H), 3,83 (d, J = 0,8 Hz, 3H, OCH₃), 2,49 (t, J = 7,2 Hz, 2H, 2-H), 2,18 – 2,08 (m, 2H, 3-H), 1,24 (t, J = 7,2 Hz, 3H, OCH₂CH₃).

Experimenteller Teil

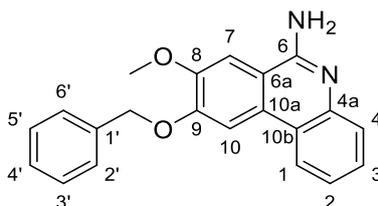
¹³C-NMR [101 MHz, CD₂Cl₂]: δ (ppm) = 173,2 (C-1), 153,3 (C-1'), 149,5 (C-2'), 118,2 (C-5'), 117,7 (CN), 117,1 (C-6'), 116,3 (C-3'), 107,2 (C-4'), 69,0 (C-4), 61,0 (OCH₂CH₃), 56,9 (OCH₃), 30,9 (C-2), 24,8 (C-3), 14,6 (OCH₂CH₃).

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) = 2971, 2221, 1714, 1586, 1499, 1376, 1342, 1266, 1248, 1200, 1172, 1033, 1022, 1012, 954, 882, 860, 777

HRMS (EI): m/z = Der Molekülpeak konnte nicht beobachtet werden. Ein Signal mit m/z = 295,9915 (berechnet für [C₁₂H₁₁BrNO₃]⁺: m/z = 295,9917) deutet auf die Fragmentierung des Radikalkations unter Abspaltung eines Ethanolats hin.

Schmelzpunkt: 95 - 96°C

9-(Benzyloxy)-8-methoxyphenanthridin-6-amin (207)



C₂₁H₁₈N₂O₂

$M = 330,39 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$

Die Darstellung von **207** erfolgte nach Synthesevorschrift B unter Verwendung von 795 mg (2,50 mmol) 4-(Benzyloxy)-2-brom-5-methoxybenzonitril (**204**). Die Aufreinigung erfolgte mittels FSC (Kieselgel, Ethylacetat/Triethylamin 99:1).

Ausbeute: 693 mg (2,10 mmol) beiger Feststoff (84%)

¹H-NMR [500 MHz, CDCl₃]: δ (ppm) = 8,40 (dd, $J = 7,3, 1,7 \text{ Hz}$, 1H, 1-H), 8,25 (dd, $J = 7,4, 1,7 \text{ Hz}$, 1H, 4-H), 7,67 (m, 2H, 2-H, 3-H), 7,44 – 7,25 (m, 6H, 2'-H, 3'-H, 4'-H, 5'-H, 6'-H, 7-H), 7,17 (s, 1H, 10-H), 5,13 (t, $J = 1,0 \text{ Hz}$, 2H, OCH₂), 3,87 (s, 3H, OCH₃).

¹³C-NMR [126 MHz, CDCl₃]: δ (ppm) = 155,2 (C-6), 149,3 (C-8 oder C-9), 149,2 (C-8 oder C-9), 140,5 (C-4a), 136,6 (C-1'), 133,9 (C-3), 132,9 (C-10a), 129,2 (C-2), 128,5 (C-3', C-5'), 128,0 (C-4'), 127,1 (C-2', C-6'), 124,5 (C-1 oder C-4), 124,1 (C-1 oder C-4), 120,1 (C-10b), 110,5 (C-6a), 107,4 (C-7 oder C-10), 107,1 (C-7 oder C-10), 71,0 (OCH₂), 55,5 (OCH₃).

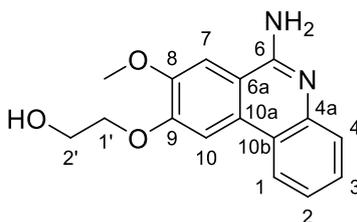
Experimenteller Teil

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) = 3474, 3300, 3036, 1637, 1570, 1522, 1450, 1434, 1379, 1360, 1263, 1199, 1138, 987, 850, 837, 748, 727

HRMS (ESI): m/z = 331,1438 (berechnet für [C₂₁H₁₉N₂O₂]⁺⁺: m/z = 331,1436)

Schmelzpunkt: 204 – 205°C

2-((6-Amino-8-methoxyphenanthridin-9-yl)oxy)ethan-1-ol (**208**)



C₁₆H₁₆N₂O₃

$M = 284,32 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$

Die Darstellung von **211** erfolgte nach Synthesevorschrift B unter Verwendung von 680 mg (2,50 mmol) 2-Brom-4-(2-hydroxyethoxy)-5-methoxybenzonitril (**208**). Die Aufreinigung erfolgte mittels FSC (Kieselgel, Dichlormethan/Methanol/Triethylamin 20:1:1).

Ausbeute: 521 mg (1,83 mmol) brauner Feststoff (73%)

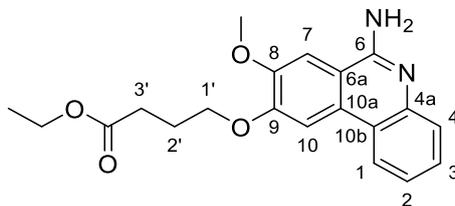
¹H-NMR [500 MHz, CDCl₃]: δ (ppm) = 8,68 (dd, $J = 7,5, 1,6$ Hz, 1H, 1-H), 8,22 (dd, $J = 7,5, 1,6$ Hz, 1H, 4-H), 7,78 (m, 1H, 2-H), 7,60 (m, 1H, 3-H), 7,27 (s, 1H, 7-H), 7,17 (s, 1H, 10-H), 4,24 (t, $J = 7,1$ Hz, 2H, 1'-H), 3,89 (s, 3H, OCH₃), 3,71 (q, $J = 7,1$ Hz, 2H, 2'-H).

¹³C-NMR [126 MHz, CDCl₃]: δ (ppm) = 154,6 (C-6), 152,4 (C-9), 150,5 (C-8), 144,6 (C-4a), 130,0 (C-10a), 128,4 (C-3), 127,2 (C-2), 123,3 (C-1), 122,1 (C-4), 121,9 (C-10b), 113,6 (C-6a), 104,8 (C-7 oder C-10), 104,5 (C-7 oder C-10), 70,7 (C-1'), 60,4 (C-2'), 55,6 (OCH₃).

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) = 3154, 2936, 2677, 1654, 1524, 1418, 1271, 1214, 1023, 917, 899, 806, 753, 732

HRMS (ESI): m/z = 285,1232 (berechnet für [C₁₆H₁₇N₂O₃]⁺⁺: m/z = 285,1234)

Schmelzpunkt: >265°C unter Zersetzung

Ethyl 4-((6-amino-8-methoxyphenanthridin-9-yl)oxy)butanoat (209)

$C_{20}H_{22}N_2O_4$

$M = 354,41 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$

Die Darstellung von **209** erfolgte nach Synthesevorschrift B unter Verwendung von 855 mg (2,50 mmol) Ethyl-4-(5-brom-4-cyano-2-methoxyphenoxy)butanoat (**206**). Die Aufreinigung erfolgte mittels FSC (Kieselgel, Ethylacetat/Triethylamin 99:1).

Ausbeute: 751 mg (2,12 mmol) beiger Feststoff (85%)

$^1\text{H-NMR}$ [500 MHz, CD_2Cl_2]: δ (ppm) = 8,29 (dd, $J = 8,2, 1,4$ Hz, 1H, 4-H), 7,88 (d, $J = 2,2$ Hz, 1H, 10-H), 7,65 (dd, $J = 8,2, 1,3$ Hz, 1H, 1-H), 7,51 (ddd, $J = 8,2, 7,0, 1,4$ Hz, 1H, 3-H), 7,36 (ddd, $J = 8,2, 6,9, 1,3$ Hz, 1H, 2-H), 7,21 (s, 1H, 7-H), 5,20 (s, 2H, NH_2), 4,29 (t, $J = 6,3$ Hz, 2H, 1'-H), 4,15 (q, $J = 7,1$ Hz, 2H, OCH_2CH_3), 4,00 (s, 3H, OCH_3), 2,59 (dt, $J = 9,9, 7,2$ Hz, 2H, 3'-H), 2,24 (pd, $J = 6,7, 1,8$ Hz, 2H, 2'-H), 1,26 (t, $J = 7,1$ Hz, 3H, OCH_2CH_3).

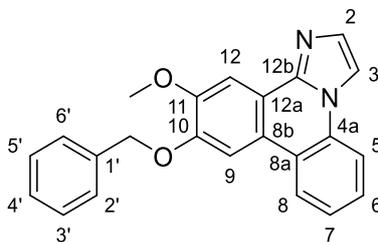
$^{13}\text{C-NMR}$ [126 MHz, CD_2Cl_2]: δ (ppm) = 173,4 (COO), 154,6 (C-6), 152,4 (C-9), 150,5 (C-8), 144,6 (C-4a), 130,0 (C-10a), 128,4 (C-3), 127,2 (C-2), 123,3 (C-1), 122,1 (C-4), 121,9 (C-10b), 113,6 (C-6a), 104,8 (C-7 oder C-10), 104,5 (C-7 oder C-10), 68,4 (C-1'), 61,0 (OCH_2CH_3), 56,6 (OCH_3), 31,2 (C-3'), 25,0 (C-2'), 14,6 (OCH_2CH_3).

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ (cm^{-1}) = 3482, 1734, 1653, 1526, 1438, 1270, 11998, 1172, 1040, 939, 842, 833, 753

HRMS (ESI): $m/z = 355,1650$ (berechnet für $[\text{C}_{20}\text{H}_{23}\text{N}_2\text{O}_4]^{+}$): $m/z = 355,1652$)

Schmelzpunkt: 195°C

10-(Benzyloxy)-11-methoxyimidazo[1,2-f]phenanthridin (210)



$C_{23}H_{18}N_2O_2$

$M = 354,41 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$

Die Darstellung von **210** erfolgte nach Synthesevorschrift C unter Verwendung von 134 mg (0,42 mmol) 9-(Benzyloxy)-8-methoxyphenanthridin-6-amin (**207**). Die Aufreinigung erfolgte mittels FSC (Kieselgel, Isohexan/Ethylacetat 2:3).

Ausbeute: 81 mg (0,23 mmol) beiger Feststoff (76%)

$^1\text{H-NMR}$ [400 MHz, CDCl_3]: δ (ppm) = 8,67 (d, $J = 8,1 \text{ Hz}$, 1H, 8-H), 8,55 (d, $J = 1,5 \text{ Hz}$, 1H, 3-H), 8,29 (d, $J = 8,2 \text{ Hz}$, 1H, 5-H), 8,17 (s, 1H, 12-H), 7,93 (s, 1H, 9-H), 7,67 (t, $J = 7,6 \text{ Hz}$, 1H, 6-H), 7,61 – 7,54 (m, 3H, 7-H, 2'-H, 6'-H), 7,52 (d, $J = 1,5 \text{ Hz}$, 1H, 2-H), 7,44 (t, $J = 7,5 \text{ Hz}$, 2H, 3'-H, 5'-H), 7,37 (t, $J = 7,4 \text{ Hz}$, 1H, 4'-H), 5,38 (s, 2H, OCH_2), 3,98 (s, 3H, OCH_3).

$^{13}\text{C-NMR}$ [101 MHz, CDCl_3]: δ (ppm) = 150,9 (C-11), 149,8 (C-10), 141,8 (C-12b), 137,3 (C-1'), 131,5 (C-2), 131,3 (C-4a), 129,0 (C-3', C-5'), 128,7 (C-4'), 128,6 (C-2', C-6'), 128,5 (C-6), 125,6 (C-7), 124,9 (C-8), 121,5 (C-12a), 121,4 (C-8a), 118,0 (C-8b), 117,0 (C-5), 113,7 (C-3), 107,0 (C-12), 105,0 (C-9), 70,7 (OCH_2), 56,2 (OCH_3).

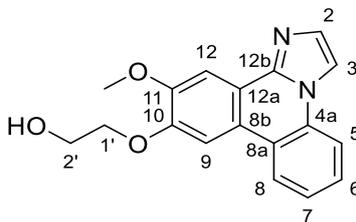
IR (ATR): $\tilde{\nu}$ (cm^{-1}) = 3110, 1827, 1618, 1510, 1460, 1448, 1394, 1270, 1256, 1205, 1194, 1142, 1042, 1017, 858, 791, 732

HRMS (ESI): $m/z = 355,1438$ (berechnet für $[\text{C}_{23}\text{H}_{19}\text{N}_2\text{O}_2]^{+}$: $m/z = 355,1441$)

Schmelzpunkt: 202°C

HPLC-Reinheit: 98% (210 nm; Methode 2), 98% (254 nm; Methode 2)

2-((11-Methoxyimidazo[1,2-f]phenanthridin-10-yl)oxy)ethan-1-ol (211)



$C_{18}H_{16}N_2O_3$

$M = 308,34 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$

Die Darstellung von **211** erfolgte nach Synthesevorschrift C unter Verwendung von 161 mg (0,42 mmol) 2-((6-Amino-8-methoxyphenanthridin-9-yl)oxy)ethan-1-ol (**208**). Die Aufreinigung erfolgte mittels FSC (Kieselgel, Dichlormethan/Methanol 20:1).

Ausbeute: 52 mg (0,17 mmol) farbloser Feststoff (56%)

$^1\text{H-NMR}$ [500 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$]: δ (ppm) = 8,71 – 8,65 (m, 1H, 8-H), 8,55 (d, $J = 1,5 \text{ Hz}$, 1H, 3-H), 8,29 (d, $J = 8,2 \text{ Hz}$, 1H, 5-H), 8,04 (s, 1H, 12-H), 7,91 (s, 1H, 9-H), 7,70 – 7,62 (m, 1H, 6-H), 7,56 (t, $J = 7,6 \text{ Hz}$, 1H, 7-H), 7,53 (d, $J = 1,4 \text{ Hz}$, 1H, 2-H), 4,96 (t, $J = 5,5 \text{ Hz}$, 1H, OH), 4,27 (t, $J = 5,0 \text{ Hz}$, 2H, 1'-H), 3,97 (s, 3H, OCH_3), 3,84 (q, $J = 4,8 \text{ Hz}$, 2H, 2'-H).

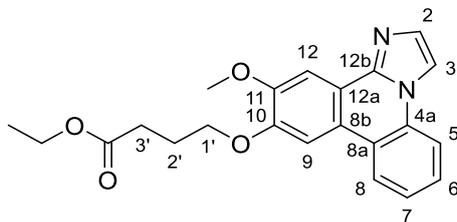
$^{13}\text{C-NMR}$ [126 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$]: δ (ppm) = 150,8 (C-11), 150,3 (C-10), 141,7 (C-12b), 131,2 (C-4a, C-2), 128,7 (C-6), 125,6 (C-7), 125,0 (C-8), 121,7 (C-12a), 121,4 (C-8a), 117,6 (C-8b), 117,0 (C-5), 113,7 (C-3), 106,4 (C-12), 104,9 (C-9), 71,1 (C-1'), 60,0 (C-2'), 56,1 (OCH_3).

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ (cm^{-1}) = 3102, 2835, 1618, 1540, 1518, 1476, 1456, 1266, 1210, 1085, 1033, 867, 801, 734

HRMS (EI): $m/z = 308,1156$ (berechnet für $[\text{C}_{18}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_3]^+$: $m/z = 308,1155$)

Schmelzpunkt: 174 - 175°C

HPLC-Reinheit: >99% (210 nm; Methode 2), >99% (254 nm; Methode 2)

Ethyl 4-((11-methoxyimidazo[1,2-f]phenanthridin-10-yl)oxy)butanoat (212)

$C_{22}H_{22}N_2O_4$

$M = 378,43 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$

Die Darstellung von **212** erfolgte nach Synthesevorschrift C unter Verwendung von 149 mg (0,42 mmol) Ethyl 4-((6-amino-8-methoxyphenanthridin-9-yl)oxy)butanoat (**209**). Die Aufreinigung erfolgte mittels FSC (Kieselgel, Isohexan/Ethylacetat 2:3).

Ausbeute: 90 mg (0,24 mmol) farbloser Feststoff (79%)

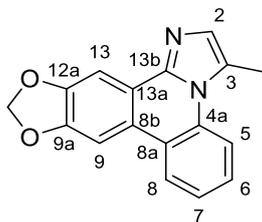
$^1\text{H-NMR}$ [500 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$]: δ (ppm) = 8,68 (dd, $J = 8,4, 1,4$ Hz, 1H, 8-H), 8,53 (d, $J = 1,4$ Hz, 1H, 3-H), 8,27 (dd, $J = 8,3, 1,2$ Hz, 1H, 5-H), 8,02 (s, 1H, 12-H), 7,90 (s, 1H, 9-H), 7,66 (ddd, $J = 8,3, 7,2, 1,4$ Hz, 1H, 6-H), 7,58 – 7,53 (m, 1H, 7-H), 7,51 (d, $J = 1,3$ Hz, 1H, 2-H), 4,26 (t, $J = 6,4$ Hz, 2H, 1'-H), 4,10 (q, $J = 7,1$ Hz, 2H, OCH_2CH_3), 3,97 (s, 3H, OCH_3), 2,54 (dd, $J = 10,2, 7,3$ Hz, 2H, 3'-H), 2,08 (pd, $J = 6,8, 2,5$ Hz, 2H, 2'-H), 1,20 (t, $J = 7,1$ Hz, 2H, OCH_2CH_3).

$^{13}\text{C-NMR}$ [126 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$]: δ (ppm) = 173,1 (COO), 150,8 (C-11), 150,0 (C-10), 141,8 (C-12b), 131,4 (C-2), 131,3 (C-4a), 128,7 (C-6), 125,5 (C-7), 125,0 (C-8), 121,6 (C-12a), 121,4 (C-8a), 117,8 (C-8b), 116,9 (C-5), 113,7 (C-3), 106,5 (C-12), 104,9 (C-9), 68,1 (C-1'), 60,4 (OCH_2CH_3), 56,1 (OCH_3), 30,6 (C-3'), 24,7 (C-2'), 14,6 (OCH_2CH_3).

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ (cm^{-1}) = 3388, 3155, 1731, 1616, 1539, 1518, 1454, 1435, 1273, 1209, 1174, 1033, 1018, 814, 750, 736

HRMS (EI): $m/z = 378,1573$ (berechnet für $[\text{C}_{22}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}_4]^+$: $m/z = 378,1574$)

Schmelzpunkt: 175 - 176°C

3-Methyl-[1,3]dioxolo[4,5-*j*]imidazo[1,2-*f*]phenanthridin (218)

$C_{17}H_{12}N_2O_2$

$M = 276,30 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$

[1,3]Dioxolo[4,5-*j*]phenanthridin-6-amin (**68**; 48 mg, 0,20 mmol) und Schwefel (103 mg, 3,20 mmol) wurden in 1 mL DMSO/Cyclohexan (2:1) suspendiert und Propanal (23 μL , 0,30 mmol) zugegeben. Das Gemisch wurde über Nacht bei 120°C gerührt. Nachdem das Reaktionsgemisch auf Raumtemperatur abgekühlt war, wurden 10 mL Wasser zugegeben und die schwarze Suspension mit 3 x 10 mL Dichlormethan extrahiert. Die organischen Phasen wurden vereinigt und mit 2 x 10 mL gesättigter Kochsalzlösung gewaschen, über wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet, filtriert und am Rotationsverdampfer zur Trockene eingeeengt. Das anfallende Rohprodukt wurde mittels FSC (Kieselgel, Isohexan/Ethylacetat 1:1) aufgereinigt.

Ausbeute: 29 mg (0,11 mmol) farbloser Feststoff (53%)

$^1\text{H-NMR}$ [400 MHz, CD_2Cl_2]: δ (ppm) = 8,34 (dd, $J = 8,5, 1,3$ Hz, 1H, 5-H), 8,30 (dd, $J = 8,1, 1,6$ Hz, 1H, 8-H), 7,97 (s, 1H, 13-H), 7,73 (s, 1H, 9-H), 7,56 (ddd, $J = 8,5, 7,2, 1,6$ Hz, 1H, 7-H oder 6-H), 7,49 (ddd, $J = 8,3, 7,2, 1,3$ Hz, 1H, 7-H oder 6-H), 7,21 (q, $J = 1,1$ Hz, 1H, 2-H), 6,12 (s, 2H, OCH_2O), 2,91 (d, $J = 1,1$ Hz, 3H, CH_3)

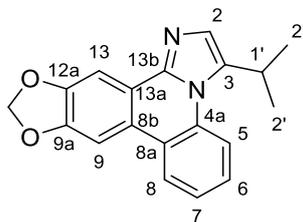
$^{13}\text{C-NMR}$ [101 MHz, CD_2Cl_2]: δ (ppm) = 149,8 (C-9a oder C-12a), 149,3 (C-9a oder C-12a), 143,8 (C-13b), 134,3 (C-8a), 131,4 (C-2), 128,0 (C-6), 125,7 (C-3), 125,0 (C-7), 124,3 (C-8), 123,4 (C-8a), 122,9 (C-4a), 120,6 (C-13a), 117,0 (C-5), 102,9 (C-13), 102,5 (OCH_2O), 101,6 (C-9), 15,6 (CH_3)

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ (cm^{-1}) = 2874, 1504, 1445, 1380, 1291, 1247, 1040, 871, 744

HRMS (EI): $m/z = 276,0898$ (berechnet für $[\text{C}_{17}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_2]^+$: $m/z = 276,0893$)

Schmelzpunkt: 180 – 182°C

HPLC-Reinheit: 96% (210 nm; Methode 2), 95% (254 nm; Methode 2)

3-Isopropyl-[1,3]dioxolo[4,5-*j*]imidazo[1,2-*f*]phenanthridin (219)

$C_{19}H_{16}N_2O_2$

$M = 304,35 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$

[1,3]Dioxolo[4,5-*j*]phenanthridin-6-amin (**68**; 48 mg, 0,20 mmol) und Schwefel (103 mg, 3,20 mmol) wurden in 1 mL DMSO/Cyclohexan (2:1) suspendiert und Isovaleraldehyd (32 μL , 0,30 mmol) zugegeben. Das Gemisch wurde über Nacht bei 120°C gerührt. Nachdem das Reaktionsgemisch auf Raumtemperatur abgekühlt war, wurden 10 mL Wasser zugegeben und die schwarze Suspension mit 3 x 10 mL Dichlormethan extrahiert. Die organischen Phasen wurden vereinigt und mit 2 x 10 mL gesättigter Kochsalzlösung gewaschen, über wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet, filtriert und am Rotationsverdampfer zur Trockene eingengt. Das anfallende Rohprodukt wurde mittels FSC (Kieselgel, Isohexan/Ethylacetat 2:1) aufgereinigt.

Ausbeute: 35 mg (0,12 mmol) farbloser Feststoff (58%)

$^1\text{H-NMR}$ [400 MHz, CD_2Cl_2]: δ (ppm) = 8,28 (ddd, $J = 10,9, 8,3, 1,1$ Hz, 2H, 5-H, 8-H), 7,99 (s, 1H, 13-H), 7,72 (s, 1H, 9-H), 7,57 (ddd, $J = 8,5, 7,1, 1,6$ Hz, 1H, 7-H), 7,48 (ddd, $J = 8,1, 7,1, 1,2$ Hz, 1H, 6-H), 7,31 (d, $J = 1,0$ Hz, 1H, 2-H), 6,11 (s, 2H, OCH_2O), 3,79 (hept, $J = 6,7$ Hz, 1H, 1'-H), 1,49 (d, $J = 6,6$ Hz, 6H, 2'-H)

$^{13}\text{C-NMR}$ [101 MHz, CD_2Cl_2]: δ (ppm) = 149,2 (C-12a), 148,7 (C-9a), 143,5 (C-13b), 136,8 (C-3), 133,5 (C-4a), 127,8 (C-2), 127,4 (C-7), 124,3 (C-6), 123,8 (C-8), 122,9 (C-8b), 122,6 (C-13a), 120,2 (C-8a), 117,1 (C-5), 102,5 (C-13), 101,9 (OCH_2O), 100,9 (C-9), 27,6 (C-1'), 22,5 (C-2')

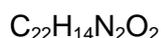
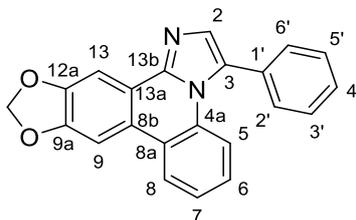
IR (ATR): $\tilde{\nu}$ (cm^{-1}) = 1459, 1247, 1041, 871, 744

HRMS (EI): $m/z = 304,1203$ (berechnet für $[\text{C}_{19}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_2]^+$: $m/z = 304,1206$)

Schmelzpunkt: 170 – 171°C

HPLC-Reinheit: 97% (210 nm; Methode 2), 96% (254 nm; Methode 2)

3-Phenyl-[1,3]dioxolo[4,5-*j*]imidazo[1,2-*f*]phenanthridin (220)



$M = 338,37 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$

[1,3]Dioxolo[4,5-*j*]phenanthridin-6-amin (**68**; 48 mg, 0,20 mmol) und Schwefel (103 mg, 3,20 mmol) wurden in 1 mL DMSO/Cyclohexan (2:1) suspendiert und Phenylacetaldehyd (35 μL , 0,30 mmol) zugegeben. Das Gemisch wurde über Nacht bei 120°C gerührt. Nachdem das Reaktionsgemisch auf Raumtemperatur abgekühlt war, wurden 10 mL Wasser zugegeben und die schwarze Suspension mit 3 x 10 mL Dichlormethan extrahiert. Die organischen Phasen wurden vereinigt und mit 2 x 10 mL gesättigter Kochsalzlösung gewaschen, über wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet, filtriert und am Rotationsverdampfer zur Trockene eingengt. Das anfallende Rohprodukt wurde mittels FSC (Kieselgel, Isohexan/Ethylacetat 1:1) aufgereinigt.

Ausbeute: 14 mg (0,12 mmol) farbloser Feststoff (21%)

$^1\text{H-NMR}$ [400 MHz, CD_2Cl_2]: δ (ppm) = 8,27 (dd, $J = 8,2, 1,5$ Hz, 1H, 5-H), 8,04 (s, 1H, 13-H), 7,77 (s, 1H, 9-H), 7,57 (dd, $J = 8,5, 1,2$ Hz, 1H, 8-H), 7,55 – 7,49 (m, 5H, 2'-h, 3'-H, 4'-H, 5'-H, 6'-H), 7,40 (ddd, $J = 8,3, 7,1, 1,2$ Hz, 1H, 7-H), 7,38 (s, 1H, 2-H), 7,23 – 7,18 (m, 1H, 6-H), 6,15 (s, 2H, OCH_2O)

$^{13}\text{C-NMR}$ [101 MHz, CD_2Cl_2]: δ (ppm) = 149,5 (C-12a), 148,8 (C-9a), 143,7 (C-13b), 132,5 (C-3), 132,4 (C-2), 132,3 (C-1'), 129,9 (C-3', C-5'), 129,5 (C-4'), 128,8 (C-2', C-6'), 128,5 (C-4a), 126,9 (C-6), 124,6 (C-7), 123,8 (C-5), 123,5 (C-8a), 122,5 (C-13a), 119,9 (C-8b), 117,9 (C-8), 102,6 (C-13), 102,0 (OCH_2O), 101,2 (C-9)

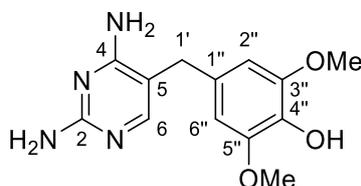
IR (ATR): $\tilde{\nu}$ (cm^{-1}) = 2904, 1449, 1237, 1036, 910, 860, 767, 754, 748, 704

HRMS (EI): $m/z = 338,1051$ (berechnet für $[\text{C}_{22}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_2]^+$: $m/z = 338,1050$)

Schmelzpunkt: 232 – 233°C

HPLC-Reinheit: >99% (210 nm; Methode 2), >99% (254 nm; Methode 2)

4-((2,4-Diaminopyrimidin-5-yl)methyl)-2,6-dimethoxyphenol (222**)***



$C_{13}H_{16}N_4O_3$

$M = 276,12 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$

Trimethoprim (**221**; 5,02 g, 17,3 mmol) wurde in einem 250 mL Kolben in 90°C warmer Bromwasserstoffsäure (48% in Wasser, 60 mL) gelöst. Nachdem die Lösung 20 Minuten zum Rückfluss erhitzt wurde, wurden der noch heißen Lösung 12 mL NaOH (50% in Wasser) langsam, unter kontinuierlichem Rühren zugetropft, wobei die Lösung bei Kontrolle des pH-Wertes noch leicht sauer war. Die Lösung wurde auf Raumtemperatur abgekühlt und über Nacht bei 4°C gelagert, wobei **222** als beiger, kristalliner Feststoff ausfiel. Die Suspension wurde filtriert und der dadurch gewonnene Feststoff aus Wasser umkristallisiert, wobei der pH der heißen Lösung mit NaOH (50% in Wasser) auf 7 eingestellt wurde. Die entstandenen farblosen Kristalle wurden abfiltriert, mit 25 mL eiskaltem Wasser gewaschen und im Feinvakuum (bei 10^{-3} – 10^{-2} mbar) mehrere Stunden getrocknet.

Ausbeute: 2,89 g (10,5 mmol) farblose Kristalle (61%)

$^1\text{H NMR}$ [400 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$] δ (ppm) = 8,13 (s, 1H, 4''-OH), 7,46 (s, 1H, 6-H), 6,49 (s, 2H, 2''-H, 6''-H), 6,13 (s, 2H, 4-NH₂), 5,76 (s, 2H, 2-NH₂), 3,70 (s, 6H, 3''-OCH₃, 5''-OCH₃), 3,47 (s, 2H, 1'-H)

$^{13}\text{C NMR}$ [101 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$] δ (ppm) = 162,7 (C-2), 162,3 (C-4), 155,2 (C-6), 148,3 (C-3'', C-5''), 134,2 (C-4''), 130,3 (C-1''), 106,8 (C-5), 106,6 (C-2'', C-6''), 56,4 (3''-OCH₃, 5''-OCH₃), 33,2 (C-1')

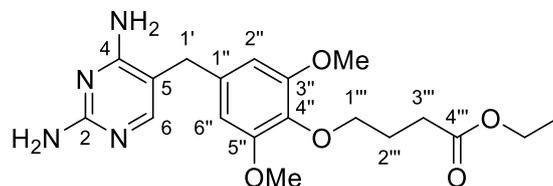
IR (ATR): $\tilde{\nu}_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$ = 3328, 3175, 2841, 1667, 1498, 1448, 1403, 1347, 1321, 1293, 1240, 1120, 1035, 968, 921, 867, 811, 781, 765, 621,

HRMS (EI): m/z = 276,1216 (berechnet für $[\text{C}_{13}\text{H}_{16}\text{N}_4\text{O}_3]^+$: m/z = 276,1217)

Schmelzpunkt: 267°C unter Zersetzung (Literaturwert: 265-270°C unter Zersetzung^[124])

* Literaturbekannte Verbindung^[124]

Ethyl 4-(4-((2,4-diaminopyrimidin-5-yl)methyl)-2,6-dimethoxyphenoxy)-butanoat (227)*



$C_{19}H_{26}N_4O_5$

$M = 390,44 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$

4-((2,4-Diaminopyrimidin-5-yl)methyl)-2,6-dimethoxyphenol (**222**; 1,33 g, 4,83 mmol) und Cäsiumcarbonat (3,15 g, 9,66 mmol) wurden in einem 250 mL Kolben in 25 mL DMF suspendiert und 20 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Zu der orangen Mischung wurden 1,04 mL (7,24 mmol) 4-Brombuttersäureethylester getropft und das Reaktionsgemisch 5 h bei 50°C gerührt. Anschließend wurden 50 mL Wasser zugegeben und mit 4 x 25 mL Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit 2 x 25 mL gesättigter Kochsalzlösung gewaschen, über wasserfreiem $MgSO_4$ getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde durch Flash-Säulenchromatographie (Kieselgel, Dichlormethan/Methanol 30:1) gereinigt.

Ausbeute: 830 mg (2,13 mmol) gelber Feststoff (44%)

1H NMR [400 MHz, Methanol- d_4] δ (ppm) = 7,52 (s, 1H, 6-H), 6,53 (s, 2H, 2''-H, 6''-H), 4,14 (q, $J = 7,1$ Hz, 2H, $\underline{CH_2}$ -CH₃), 3,94 (t, $J = 6,0$ Hz, 2H, 1'''-H), 3,79 (s, 6H, 3''-OCH₃, 5''-OCH₃), 3,65 (s, $J = 0,8$ Hz, 2H, 1'-H), 2,61 (t, $J = 7,3$ Hz, 2H, 3'''-H), 1,96 (tt, $J = 7,3, 6,0$ Hz, 2H, 2'''-H), 1,26 (t, $J = 7,1$ Hz, 3H, CH₂- $\underline{CH_3}$)

^{13}C NMR [101 MHz, Methanol- d_4] δ (ppm) = 176,3 (C-4'''), 165,4 (C-2), 163,9 (C-4), 156,4 (C-6), 155,7 (C3'', C5''), 137,4 (C-4''), 137,2(C-1''), 109,0 (C-5), 107,6 (C-2'', C-6''), 74,1 (C-1'''), 62,3 ($\underline{CH_2}$ -CH₃), 57,4 (3''-OCH₃, 5''-OCH₃), 35,3 (C-1'), 32,4 (C-3'''), 27,3 (C-2'''), 15,4 (CH₂- $\underline{CH_3}$).

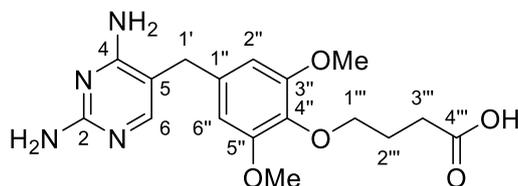
IR (ATR): $\tilde{\nu}_{max}/cm^{-1} = 3473, 3334, 3180, 2942, 1734, 1664, 1619, 1600, 1559, 1506, 1460, 1426, 1376, 1336, 1321, 1238, 1175, 1125, 1046, 980, 926, 836, 791, 767, 702, 635, 579, 527, 459$

HRMS (EI): $m/z = 390,1896$ (berechnet für $[C_{19}H_{26}N_4O_5]^+$: $m/z = 390,1898$)

Schmelzpunkt: 144°C

* Literaturbekannte Verbindung^[124].

4-(4-((2,4-Diaminopyrimidin-5-yl)methyl)-2,6-dimethoxyphenoxy)buttersäure(228)*



$C_{17}H_{22}N_4O_5$

$M = 362,39 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$

Ethyl 4-(4-((2,4-diaminopyrimidin-5-yl)methyl)-2,6-dimethoxyphenoxy)-butanoat (**227**; 636 mg, 1,63 mmol) wurden in einem Rundkolben in 7 mL Methanol gelöst und 2,5 mL NaOH (2 M in Wasser) zugegeben. Nachdem die Lösung 2 h bei 45°C gerührt wurde, wurde das Methanol am Rotationsverdampfer entfernt. Der wässrigen Suspension wurden 1,6 mL Wasser zugegeben und der pH-Wert mit Salzsäure (2 M in Wasser) auf pH 7 eingestellt. Die resultierende Suspension wurde über Nacht bei 7°C gelagert. Der Niederschlag, der aus der Suspension durch Filtration gewonnen wurde, wurde mit 20 mL eiskaltem Wasser gewaschen und im Feinvakuum (bei 10^{-3} – 10^{-2} mbar) mehrere Stunden getrocknet.

Ausbeute: 464 mg (1,28 mmol) gelblicher Feststoff (79%)

¹H NMR [400 MHz, (CD₃)₂SO] δ (ppm) = 7,50 (s, 1H, 6-H), 6,54 (s, 2H, 2''-H, 6''-H), 6,14 (s, 2H, 4-NH₂), 5,77 (s, 2H, 2-NH₂), 3,80 (t, J = 6,2 Hz, 2H, 1'''-H), 3,70 (s, 6H, 3''-OCH₃, 5''-OCH₃), 3,52 (s, 2H, 1'-H), 2,41 (t, J = 7,4 Hz, 2H, 3'''-H), 1,79 (p, J = 6,2 Hz 2H, 2'''-H)

¹³C NMR [101 MHz, (CD₃)₂SO] δ (ppm) = 175,0 (COOH), 162,7 (C-4), 162,5 (C-2), 155,6 (C-6), 153,3 (C-3'', C-5''), 136,2 (C-1''), 135,1 (C-4''), 106,3 (C-5), 106,3 (C-2'', C-6''), 72,0 (C-1'''), 56,3 (3''-OCH₃, 5''-OCH₃), 33,4 (C-1'), 30,6 (C-3'''), 25,6 (C-2''')

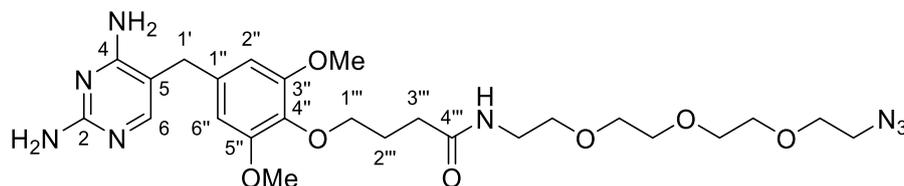
IR (ATR): $\tilde{\nu}_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$ = 3284, 3111, 2940, 1665, 1591, 1560, 1504, 1642, 1422, 1400, 1334, 1319, 1307, 1237, 1135, 1049, 1012, 884, 846, 794, 715, 576, 537, 419,

HRMS (EI): m/z = 362,1582 (berechnet für [C₁₇H₂₂N₄O₅]⁺: m/z = 362,1585)

Schmelzpunkt: 245°C

* Literaturbekannte Verbindung^[124]

***N*-2-(2-(2-(2-Azidoethoxy)ethoxy)ethoxy)ethyl)-4-(4-((2,4-diaminopyrimidin-5-yl)methyl)-2,6-dimethoxyphenoxy)butanamid (**229**)**



$C_{25}H_{38}N_8O_7$

$M = 562,63 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$

4-(4-((2,4-Diaminopyrimidin-5-yl)methyl)-2,6-dimethoxyphenoxy)buttersäure (**228**; 150 mg, 0,415 mmol), 4-(Dimethylamino)pyridin (25,3 mg, 0,207 mmol) und 1-(3-Dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimid-Hydrochlorid (95,5 mg, 0,498 mmol) wurden in einem 25 mL Kolben in 3 mL DMF gelöst und 11-Azido-3,6,9-trioxyundecan-1-amin (**225**; 109 mg, 0,498 mmol) zugegeben. Die farblose Suspension wurde 24 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde das Gemisch am Rotationsverdampfer eingeeengt und das Rohprodukt mittels FSC (Kieselgel, Dichlormethan/Methanol 5:1) aufgereinigt.

Ausbeute: 146 mg (0,259 mmol) hellgelber Feststoff (63%)

$^1\text{H NMR}$ [400 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$] δ (ppm) = 7,84 (t, $J = 5,7 \text{ Hz}$, 1H, 4'''-CONH), 7,51 (s, 1H, 6-H), 6,55 (s, 2H, 2''-H, 6''-H), 6,27 (s, 2H, 4-NH₂), 5,87 (s, 2H, 2-NH₂), 3,77 (t, $J = 6,5 \text{ Hz}$, 2H, 1'''-H), 3,72 (s, 6H, 3''-OCH₃, 5''-OCH₃), 3,68 – 3,34 (m, 14H, 7 OCH₂), 3,20 (q, $J = 5,6 \text{ Hz}$, 2H, NCH₂), 2,25 (t, $J = 7,5 \text{ Hz}$, 2H, 3'''-H), 1,80 (dq, $J = 8,2, 6,6 \text{ Hz}$, 2H, 2'''-H)

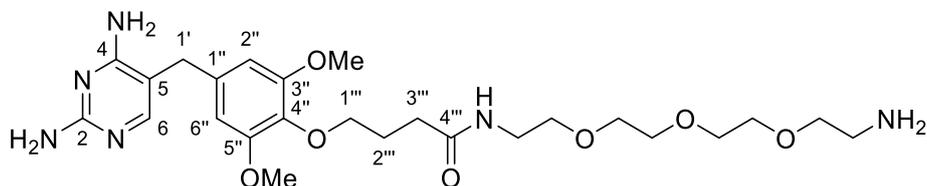
$^{13}\text{C NMR}$ [101 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$] δ (ppm) = 172,4 (C-4'''), 162,8 (C-2), 162,0 (C-4), 154,7 (C-6), 153,3 (C-3'', C-5''), 135,9 (C-4''), 135,2 (C-1''), 106,5 (C-5), 106,3 (C-2'', C-6''), 72,4 (C-1'''), 70,3 (OCH₂), 70,2 (OCH₂), 70,2 (OCH₂), 70,0 (OCH₂), 69,7 (OCH₂), 69,6 (OCH₂), 56,3 (3''-OCH₃, 5''-OCH₃), 50,5 (CH₂-N₃), 39,0 (NCH₂), 33,4 (C-1'), 32,3 (C-3'''), 26,3 (C-2''').

IR (ATR): $\tilde{\nu}_{\text{max}}/\text{cm}^{-1} = 3354, 3195, 2896, 2103, 1662, 1620, 1593, 1553, 1504, 1458, 1419, 1365, 1324, 1243, 1127, 1094, 1035, 973, 939, 861, 837, 794, 675, 581$

HRMS (EI): $m/z = 562,2854$ (berechnet für $[\text{C}_{25}\text{H}_{38}\text{N}_8\text{O}_7]^+$: $m/z = 562,2858$)

Schmelzpunkt: 80°C

***N*-2-(2-(2-(2-Aminoethoxy)ethoxy)ethoxy)ethyl)-4-(4-((2,4-diaminopyrimidin-5-yl)methyl)-2,6-dimethoxyphenoxy)butanamid (230)**



$C_{25}H_{40}N_6O_7$

$M = 536,63 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$

N-2-(2-(2-(2-Azidoethoxy)ethoxy)ethoxy)ethyl)-4-(4-((2,4-diaminopyrimidin-5-yl)methyl)-2,6-dimethoxyphenoxy)butanamid (**229**; 120 mg, 0,210 mmol) wurde in einem 10 mL Kolben in 1,5 mL Methanol und 75 μL Wasser gelöst. Anschließend wurden 169 mg Triphenylphosphin (0,640 mmol) zugegeben und die farblose Suspension 18 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach Entfernen des Lösungsmittels am Rotationsverdampfer wurde das Rohprodukt mittels FSC (Dichlormethan/Methanol 7:1 mit 1% Triethylamin als Zusatz) aufgereinigt.

Ausbeute: 72 mg (0,13 mmol) gelbes Öl (64%)

$^1\text{H NMR}$ [500 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$] δ (ppm) = 7,86 (t, $J = 5,7 \text{ Hz}$, 1H, 4'''-CONH), 7,51 (s, 1H, 6-H), 6,54 (s, 2H, 2''-H, 6''-H), 6,07 (s, 2H, 4-NH₂), 5,67 (s, 2H, 2-NH₂), 3,76 (t, $J = 6,4 \text{ Hz}$, 2H, 1'''-H), 3,71 (s, 6H, 3''-OCH₃, 5''-OCH₃), 3,51 (s, 2H, 1'-H), 3,51 – 3,33 (m, 12H, 6 OCH₂, CH₂NH₂), 3,19 (m, 2H, NHCH₂), 2,66 (t, 2H, CH₂NH₂), 2,24 (t, $J = 7,5 \text{ Hz}$, 2H, 3'''-H), 1,85 – 1,73 (m, 2H, 2'''-H)

$^{13}\text{C NMR}$ [126 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$] δ (ppm) = 172,4 (C-4'''), 162,7 (C-2), 162,7 (C-4), 156,2 (C-6), 153,3 (C-3'', C-5''), 136,2 (C-4''), 135,2 (C-1''), 106,3 (C-2'', C-6''), 106,2 (C-5), 72,4 (C-1'''), 70,2 (OCH₂), 70,2 (OCH₂), 70,0 (OCH₂), 69,6 (OCH₂), 56,3 (3''-OCH₃, 5''-OCH₃), 41,5 (CH₂NH₂), 39,0 (NCH₂), 33,5 (C-1'), 32,3 (C-3'''), 26,3 (C-2''').

IR (ATR): $\tilde{\nu}_{\text{max}}/\text{cm}^{-1} = 3348, 1630, 1458, 1241, 1124, 1036, 806, 584,$

HRMS (EI): $m/z = 536,2949$ (berechnet für $[\text{C}_{25}\text{H}_{40}\text{N}_6\text{O}_7]^+$: $m/z = 536,2953$)

6.4 Biologische Testmethoden

Die Testungen auf antimikrobielle Aktivität (mittels Agar-Diffusionstest) und cytotoxische Aktivität (MTT-Test an der HL-60 Zelllinie) wurden von Martina Stadler am Arbeitskreis Bracher durchgeführt. Die Versuchsbeschreibungen werden in den folgenden Abschnitten erläutert.

6.4.1 Agar-Diffusionstest

Zunächst wurde aus den zu testenden Verbindungen eine Lösung in DMSO mit einer Konzentration von 0,01 g/mL angefertigt. Von dieser Lösung wurden 3,0 µL auf ein rundes Filterpapierplättchen (Firma Macherey-Nagel, Durchmesser 6 mm) aufgetragen und 24 Stunden getrocknet. Die Referenzsubstanzen – Clotrimazol als Referenzsubstanz für antimykotische, Tetrazyklin für antibiotische Aktivität – wurden nach derselben Prozedur angefertigt und auf die Plättchen gegeben. Auch diese wurden 24 Stunden getrocknet. Als Negativkontrolle wurde reines DMSO (3,0 µL pro Filterpapierplättchen) verwendet.

Die Zellen und Bakterien wurden von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ, Braunschweig) bezogen und in den mitgelieferten wässrigen Nährmedien gemäß der mitgelieferten Anweisungen der DSMZ kultiviert. Für die Herstellung der Agarplatten für die Stämme *Escherichia coli*, *Pseudomonas marginalis* und *Yarrowia lipolytica* wurden 35,0 g AC Agar zusammen mit 20,0 g Agar in 1,0 L Wasser suspendiert. Für *Staphylococcus equorum* und *Streptococcus entericus* wurden 10,0 g Sojamehlpepton, 5,0 g Hefeextrakt, 5,0 g Glucose, 5,0 g Natriumchlorid und 15,0 g Agar in 1,0 L Wasser suspendiert. Für *Saccharomyces cerevisiae* wurden 35,0 g AC Agar in 1,0 L Wasser suspendiert. Die Agarmedien wurden nach der Herstellung autoklaviert. Etwa 15-20 mL des noch flüssigen Mediums wurden unter sterilen Bedingungen in Petrischalen gegossen und bei 8°C gelagert bis der Agar erstarrte (mindestens eine Stunde).

Die Agarplatten wurden mit einem Wattestäbchen, welches zuvor in die jeweilige Zellkultur getaucht wurde, bestrichen und mit jeweils vier Filterpapierplättchen mit Testsubstanzen sowie je einem Plättchen mit der jeweiligen Referenzsubstanz und der Blindprobe im Kreis angeordnet versehen. Die so präparierten Agar-Platten wurden anschließend 36 Stunden bei 32,0°C (für Bakterien) bzw. bei 28,0°C (für Pilze) inkubiert. Die Durchmesser der resultierenden Hemmhöfe wurden händisch vermessen.

6.4.2 MTT-Test an der HL-60 Zelllinie

Die Testung der Verbindungen auf cytotoxische Aktivität wurde an HL-60 Zellen (Humane-Leukämie-Zelllinie) untersucht. Dabei wurde die Zelldichte der Zellsuspension mithilfe einer Hämozyten-Zählkammer (Fuchs-Rosenthal-Zählkammer) bestimmt und durch Verdünnen mit Nährmedium auf eine Zelldichte von $9 \cdot 10^5$ Zellen eingestellt. Jeweils 99 μL dieser Zellsuspension wurden anschließend in einer 96-Well Mikrotiterplatte in jedes Well ausgesät und 24 h bei 37°C im Trockenschrank inkubiert. Die zu untersuchenden Substanzen wurden in DMSO gelöst und mit DMSO zu 10 mM Stammlösungen verdünnt. Aus dieser Stammlösung wurde durch Verdünnen mit DMSO eine Verdünnungsreihe angefertigt (10 mM, 5 mM, 2,5 mM, 1,25 mM, 0,625 mM und 0,3125 mM).

Die 96-Wellplatte wurde anschließend pro zu untersuchender Verbindung folgendermaßen befüllt: Für die Nullwertbestimmung wurde 1 μL DMSO in das erste Well pipettiert. Anschließend wurde die Verdünnungsreihe beginnend bei der niedrigsten Konzentration (0,3125 mM) in die nachfolgenden Wells pipettiert. Als Positivkontrolle wurde 1 μL einer Triton[®] X-100-Lösung (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) in das nächste Well gegeben. Die Kontrollzellen im letzten Well wurden nicht behandelt. Die Mikrotiterplatte wurde anschließend 24 Stunden bei 37°C und 5% CO_2 inkubiert. Anschließend wurden in jedes Well 10 μL einer MTT-Lösung (5 mg MTT in 1,0 mL phosphatgepufferter Salzlösung) eingebracht und die Platte zwei weitere Stunden bei 37°C und 5% CO_2 inkubiert. Nachdem in jedes Well 190 μL DMSO pipettiert wurden, wurde die Platte eine Stunde unter Lichtausschluss kontinuierlich gerüttelt. Zuletzt wurde die Mikrotiterplatte bei einer Wellenlänge von 570 nm photometrisch mit einem MRX Microplate Reader (DYNEX Technologies, USA) vermessen. Die Auswertung und Berechnung der IC_{50} -Werte erfolgte mithilfe der Software Prism 8.2.1 (GraphPad, USA).

6.4.3 MTT-Test an MCF-7-, MDA-MB-231-, Jurkat-, HL-60- und CCRF-CEM-Zelllinien durch Dr. Florian Lengauer

Ausgewählte Substanzen wurden im Rahmen einer Kooperation auf cytotoxische Aktivität am Arbeitskreis von Prof. Dr. Angelika Vollmar (LMU) innerhalb der Arbeitsgruppe von Dr. Karin Bartel von Dr. Florian Lengauer im Rahmen seiner Doktorarbeit durchgeführt. Die Durchführung der Testung wurde im Rahmen seiner Dissertation publiziert und wird hier noch einmal übersetzt zitiert:

„ $5,0 \cdot 10^3$ Zellen pro Well (MCF-7, MDA-MB-231) [...] wurden in 96-Well-Platten ausgesät und 24 Stunden lang bei 37°C inkubiert. $20 \cdot 10^3$ Zellen pro Well (Jurkat, HL-60, CCRF-CEM)

wurden in 96-Well-Platten ausgesät und 4 Stunden lang bei 37°C inkubiert. Die Behandlung erfolgte 72 Stunden lang mit den angegebenen Konzentrationen. Die anfängliche Stoffwechselaktivität wurde 2 Stunden nach der Aussaat bestimmt und als Nullwert für alle Zelllinien verwendet. 2 Stunden vor dem Ende der Stimulationszeit wurden 20 µl CellTiter-Blue®-Reagenz in jede Vertiefung gegeben und die Fluoreszenz bei 550 nm wurde mit einem Tecan SpectraFluor Plus™ Mikroplatten-Lesegerät gemessen. Die Proliferation [%] wurde relativ zur DMSO-Kontrolle bestimmt. Halbmaximale inhibitorische Konzentrationen (IC₅₀-Werte) wurden durch nichtlineare Regression mit der Software GraphPad Prism 8.2.1 Software berechnet.^{“[155]}

6.4.4 Testung auf antiplasmodiale Aktivität durch Dr. Julius Ngwa

In einer weiteren Kooperation wurden ausgewählte Substanzen an den Arbeitskreis von Prof. Dr. Gabriele Pradel (Fachbereich Biologie RWTH Aachen) geschickt, um dort auf antiplasmodiale Aktivität gegenüber Malariaerregern getestet zu werden. Diese Testungen wurden von Dr. Julius Ngwa nach einer der Arbeitsgruppe etablierten Methode durchgeführt. Die Durchführung der Testung wurde bereits an anderer Stelle publiziert und wird hier noch einmal übersetzt zitiert:

„[...] *P. falciparum*-Stämme wurden für die Prüfung der Wirkstoffe verwendet: der gegen Chloroquin (CQ) empfindliche Stamm 3D7 und der gegen CQ resistente Stamm Dd2 [...]. Die Stämme 3D7 und Dd2 wurden verwendet, um die Wirkung der Verbindungen auf die Vermehrung im asexuellen Blutstadium zu untersuchen. Sie wurden in RPMI 1640/HEPES-Medium (Gibco, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) mit 10 µg/mL Gentamicin (Gibco Thermo Scientific, Waltham, MA, USA), 50 µg/mL Hypoxanthin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), 0,5% v/v Albumax II (Gibco, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) und 5% Hämatokrit kultiviert. Die Kulturen wurden bei 37°C in einem Gasgemisch aus 5% CO₂, 5% O₂ und 90% N₂ gehalten [...]. Um hochsynchronisierte Kulturen zu erhalten, wurden Parasitenkulturen, die hauptsächlich aus Ringstadien bestanden, zentrifugiert, das Pellet wurde in 10 mL 5% w/v Sorbitol/ddH₂O resuspendiert und für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dem Waschen der Zellen mit RPMI, um restliches Sorbitol zu entfernen, wurden sie erneut wie oben beschrieben kultiviert. Erythrozytenkonzentrat und Serumproben wurden von der Abteilung für Transfusionsmedizin des Universitätsklinikums Aachen, Deutschland, bezogen. Die Serumproben wurden gemischt und gepoolt, und die Spender wurden anonym gehalten. Die Arbeit mit Blutkomponenten vom Menschen wurde von der Ethikkommission der Uniklinik RWTH genehmigt (EK 007/13).“^{“[78]}

7 Abkürzungsverzeichnis

AChE	Acetylcholinesterase
Äq	Äquivalente
ASAP	<i>atmospheric solid analysis probe</i>
Boc	<i>tert</i> -Butyloxycarbonyl
Bn	Benzyl
br	<i>broad</i> (breites Signal im NMR-Spektrum)
Bu	Butyl
<i>t</i> -Bu	<i>tert</i> -Butyl
bzw.	beziehungsweise
d	Dublett
DC	Dünnschichtchromatographie
DCM	Dichlormethan
DIPA	Diisopropylamin
DIPEA	Diisopropylethylamin
4-DMAP	4-(Dimethylamino)pyridin
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
δ	chemische Verschiebung
EDC	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid
EI	<i>electron impact ionisation</i> , Elektronenstoßionisation
Et	Ethyl
et al.	et alii, und andere
HFIP	Hexafluoroisopropanol
HMPT	Hexamethylphosphorsäuretriamid
HRMS	<i>high resolution mass spectrometry</i> , hochauflösende Massenspektrometrie

Abkürzungsverzeichnis

IC ₅₀	<i>inhibitory concentration</i> (Konzentration eines Inhibitors, bei der die halbmaximale Inhibition beobachtet wird)
IR	infrarot
<i>J</i>	Kopplungskonstante
LiHMDS	Lithiumhexamethyldisilazid
<i>M</i>	molare Masse
M	mol · L ⁻¹
m	Multipllett
Me	Methyl
MeOH	Methanol
MHK	minimale Hemmkonzentration
min	Minuten
MOM	Methoxymethyl
MS	Massenspektrometrie
MTT	2-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-3,5-diphenyl-2 <i>H</i> -tetrazol-3-iumbromid
<i>m/z</i>	Masse-zu-Ladung-Verhältnis
NBS	<i>N</i> -Bromsuccinimid
NCS	<i>N</i> -Chlorsuccinimid
NMP	<i>N</i> -Methyl-2-pyrrolidon
NMR	<i>nuclear magnetic resonance</i> , Kernspinresonanzspektroskopie
$\tilde{\nu}$	Wellenzahl
OLED	<i>organic light-emitting diode</i> (organische Leuchtdiode)
PCC	Pyridiniumchlorochromat
Ph	Phenyl
PIFA	Phenylod(III)bis(trifluoracetat)
PPA	Polyphosphorsäure
q	Quartett

Abkürzungsverzeichnis

RT	Raumtemperatur
s	Singulett
sext	Sextett
t	Triplett
TBAB	Tetrabutylammoniumbromid
TBAI	Tetrabutylammoniumiodid
TBDMSCI	<i>tert</i> -Butyldimethylsilylchlorid
TEA	Triethylamin
TFA	Trifluoressigsäure
TFAA	Trifluoressigsäureanhydrid
THF	Tetrahydrofuran
TMS	Trimethylsilyl oder Tetramethylsilan
TosMIC	Tosylmethylisocyanid
UV	ultraviolett
vgl.	vergleiche
W	Watt

8 Literaturverzeichnis

- [1] M. Heinrich, J. Mah, V. Amirkia, *Molecules* **2021**, 26 (7)
- [2] E. Eich, U. Förstermann, C. Franz, H. Rimpler, *Pharmazeutische Biologie 2 Biogene Arzneistoffe*, 2. Auflage, Deutscher Apotheker Verlag, Stuttgart, **1999**
- [3] S. W. Pelletier. *Alkaloids: Chemical and Biological Perspectives* Volume 7 Springer Verlag: New York **1991**.
- [4] E. Winterstein, G. Trier, *Die Alkaloide: Eine Monographie der natürlichen Basen*, Gebrüder Borntraeger, Berlin **1910**
- [5] F. Bracher, T. Tremmel, *Archiv der Pharmazie (Weinheim)* **2017**, 350 (7)
- [6] M. E. Wall, M. C. Wani, C. E. Cook, K. H. Palmer, A. T. McPhail, G. A. Sim, *Journal of the American Chemical Society* **2002**, 88 (16) 3888-3890
- [7] Y. H. Hsiang, R. Hertzberg, S. Hecht, L. F. Liu, *Journal of Biological Chemistry* **1985**, 260 (27) 14873-14878
- [8] M. Schlitzer, *Archiv der Pharmazie (Weinheim)* **2008**, 341 (3) 149-163
- [9] F. Nosten, N. J. White, *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **2007**, 77 (6_Suppl) 181-192
- [10] R. Soni, G. Shankar, P. Mukhopadhyay, V. Gupta, *Industrial Crops and Products* **2022**, 184
- [11] V. I. Carrara, J. Zwang, E. A. Ashley, R. N. Price, K. Stepniewska, M. Barends, A. Brockman, T. Anderson, R. McGready, L. Phaiphun, S. Proux, M. van Vugt, R. Hutagalung, K. M. Lwin, A. P. Phyto, P. Preechapornkul, M. Imwong, S. Pukrittayakamee, P. Singhasivanon, N. J. White, F. Nosten, *PLoS One* **2009**, 4 (2) e4551
- [12] A. A. El-Moamly, M. A. El-Sweify, *Tropical Medicine and Health* **2023**, 51 (1) 29
- [13] W. G. Metzger, Z. Sulyok, A. Theurer, C. Kohler, *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz* **2020**, 63 (1) 45-55
- [14] H. Morita, S. Oshimi, Y. Hirasawa, K. Koyama, T. Honda, W. Ekasari, G. Indrayanto, N. C. Zaini, *Organic Letters* **2007**, 9 (18) 3691-3693
- [15] W. Trager, J. B. Jensen, *Science* **1976**, 193 (4254) 673-675
- [16] D. Menard, M. D. Matsika-Claquin, F. Yapou, A. Talarmin, S. Sana, A. Manirakiza, M. Nestor, V. Siadoua, D. Djalle, *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **2005**, 73 (2) 239-243
- [17] H. Morita, Y. Tomizawa, J. Deguchi, T. Ishikawa, H. Arai, K. Zaima, T. Hosoya, Y. Hirasawa, T. Matsumoto, K. Kamata, W. Ekasari, A. Widyawaruyanti, T. S. Wahyuni, N. C. Zaini, T. Honda, *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2009**, 17 (24) 8234-8240
- [18] T. Matsumoto, T. Kobayashi, K. Ishida, Y. Hirasawa, H. Morita, T. Honda, K. Kamata, *Biological and Pharmaceutical Bulletin* **2010**, 33 (5) 844-848

Literaturverzeichnis

- [19] U. Luesakul, T. Palaga, K. Krusong, N. Ngamrojanavanich, T. Vilaivan, S. Puthong, N. Muangsin, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2014**, 24 (13) 2845-2850
- [20] G. R. Pettit, G. M. Cragg, S. B. Singh, J. A. Duke, D. L. Doubek, *Journal of Natural Products* **1990**, 53 (1) 176-178
- [21] Z. Luo, F. Wang, J. Zhang, X. Li, M. Zhang, X. Hao, Y. Xue, Y. Li, F. D. Horgen, G. Yao, Y. Zhang, *Journal of Natural Products* **2012**, 75 (12) 2113-2120
- [22] G. Van Goietsenoven, A. Andolfi, B. Lallemand, A. Cimmino, D. Lamoral-Theys, T. Gras, A. Abou-Donia, J. Dubois, F. Lefranc, V. Mathieu, A. Kornienko, R. Kiss, A. Evidente, *Journal of Natural Products* **2010**, 73 (7) 1223-1227
- [23] A. Evidente, A. S. Kireev, A. R. Jenkins, A. E. Romero, W. F. Steelant, S. Van Slambrouck, A. Kornienko, *Planta Medica* **2009**, 75 (5) 501-507
- [24] J. Hohmann, P. Forgo, J. Molnar, K. Wolfard, A. Molnar, T. Thalhammer, I. Mathe, D. Sharples, *Planta Medica* **2002**, 68 (5) 454-457
- [25] D. Lamoral-Theys, A. Andolfi, G. Van Goietsenoven, A. Cimmino, B. Le Calve, N. Wauthoz, V. Megalizzi, T. Gras, C. Bruyere, J. Dubois, V. Mathieu, A. Kornienko, R. Kiss, A. Evidente, *Journal of Medicinal Chemistry* **2009**, 52 (20) 6244-6256
- [26] Z. Jin, *Natural Products Reports* **2009**, 26 (3) 363-381
- [27] M. Roy, L. Liang, X. Xiao, P. Feng, M. Ye, J. Liu, *Biomedicine & Pharmacotherapy* **2018**, 107 615-624
- [28] N. Cortes, K. Sierra, F. Alzate, E. H. Osorio, E. Osorio, *Phytochemical Analysis* **2018**, 29 (2) 217-227
- [29] L. Cahlikova, R. Vrabec, F. Pidany, R. Perinova, N. Maafi, A. A. Mamun, A. Ritomska, V. Wijaya, G. Blunden, *Molecules* **2021**, 26 (17)
- [30] G. Zhan, X. Qu, J. Liu, Q. Tong, J. Zhou, B. Sun, G. Yao, *Scientific Reports* **2016**, 6 33990
- [31] M. Rudyanto, Y. Tomizawa, H. Morita, T. Honda, *Organic Letters* **2008**, 10 (10) 1921-1922
- [32] Y. S. Yao, Z. J. Yao, *Journal of Organic Chemistry* **2008**, 73 (14) 5221-5225
- [33] V. V. S. Murti, T. R. Seshadri, *Proceedings of the Indian Academy of Sciences - Section A* **1949**, 30 (3) 107-113
- [34] S. Gutierrez, A. Coppola, D. Sucunza, C. Burgos, J. J. Vaquero, *Organic Letters* **2016**, 18 (14) 3378-3381
- [35] S. Gester, F. Wuest, B. Pawelke, R. Bergmann, J. Pietzsch, *Amino Acids* **2005**, 29 (4) 415-428
- [36] S. Kanputhorn, A. Petsom, P. Thamyongkit, *Tetrahedron* **2010**, 66 (38) 7539-7543
- [37] P. J. Murphy, J. Tibble-Howlings, R. M. Kowalczyk, K. Stevens, *Tetrahedron Letters* **2020**, 61 (16)

Literaturverzeichnis

- [38] P. Balczewski, E. Kowalska, J. Skalik, M. Koprowski, K. Owsianik, E. Rozycka-Sokolowska, *Ultrasonics Sonochemistry* **2019**, 58 104640
- [39] B. Sheng, C. Zeng, J. Chen, W. C. Ye, W. Tang, P. Lan, M. G. Banwell, *European Journal of Organic Chemistry* **2022**, 2022 (9)
- [40] I. Stengel, A. Morherr, F. May, A. Lackner, C. Pflumm, A. Mekic, N. Haase, Patent: WO2014094961
- [41] S. W. Lee, P. D. Q. Dao, H. J. Lim, C. S. Cho, *ACS Omega* **2022**, 7 (22) 18486-18497
- [42] A. Kamlah, Dissertation *Ludwig-Maximilians-Universität, München*, **2018**
- [43] W. Zhang, J. Ma, G.-J. Liu, X.-Y. Liu, J. Fan, L.-S. Liao, *Journal of Materials Chemistry C* **2017**, 5 (36) 9496-9503
- [44] Kouji Nato, Sakai Yumi, Izumi Kakimaki, Yasuyuki Goto Patent: WO2011021385
- [45] M. Christl, R. Huisgen, *Chemische Berichte* **2006**, 106 (10) 3345-3367
- [46] A. M. Jawalekar, E. Reubsæet, F. P. Rutjes, F. L. van Delft, *Chemical Communications (Cambridge)* **2011**, 47 (11) 3198-3200
- [47] S. Alaoui, M. Driowya, L. Demange, R. Benhida, K. Bougrin, *Ultrasonics Sonochemistry* **2018**, 40 (Pt A) 289-297
- [48] S. Tang, J. He, Y. Sun, L. He, X. She, *Organic Letters* **2009**, 11 (17) 3982-3985
- [49] J. P. Waldo, R. C. Larock, *Organic Letters* **2005**, 7 (23) 5203-5205
- [50] J. A. Crossley, D. L. Browne, *Journal of Organic Chemistry* **2010**, 75 (15) 5414-5416
- [51] J. C. Anderson, C. Headley, P. D. Stapleton, P. W. Taylor, *Tetrahedron* **2005**, 61 (32) 7703-7711
- [52] Y. Zhao, D. J. Weix, *Journal of the American Chemical Society* **2014**, 136 (1) 48-51
- [53] Nishizeki Masahito, Ikemizu Masaru, Kato Eisaku, Oshiyama Tomohiro, Otsu Shinya JP5412809
- [54] S. Narva, M. Zhang, C. Li, A. Chen, Y. Tanaka, W. Zhang, *Tetrahedron Letters* **2021**, 68
- [55] M. Breugst, H. U. Reißig, *Angewandte Chemie* **2020**, 132 (30) 12389-12404
- [56] R. Huisgen, *Angewandte Chemie International Edition in English* **2003**, 2 (11) 633-645
- [57] C. Grundmann, J. M. Dean, *The Journal of Organic Chemistry* **2002**, 30 (8) 2809-2812
- [58] P. V. Sri Ramya, L. Guntuku, S. Angapelly, S. Karri, C. S. Digwal, B. N. Babu, V. G. M. Naidu, A. Kamal, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2018**, 28 (5) 892-898
- [59] D. Chiarino, M. Napoletano, A. Sala, *Journal of Heterocyclic Chemistry* **2009**, 24 (1) 43-46

Literaturverzeichnis

- [60] L. Kurti B. Czako, *Strategic applications of named reactions in organic synthesis: background and detailed mechanisms*, **2005**
- [61] F. M. Hauser, V. M. Baghdanov, *The Journal of Organic Chemistry* **2002**, 53 (20) 4676-4681
- [62] P. K. Pradhan, S. Dey, P. Jaisankar, V. S. Giri, *Synthetic Communications* **2006**, 35 (7) 913-922
- [63] P. Gimeno, F. Besacier, M. Bottex, L. Dujourdy, H. Chaudron-Thozet, *Forensic Science International* **2005**, 155 (2-3) 141-157
- [64] J. Carreras, G. Gopakumar, L. Gu, A. Gimeno, P. Linowski, J. Petuskova, W. Thiel, M. Alcarazo, *Journal of the American Chemical Society* **2013**, 135 (50) 18815-18823
- [65] W. Chen, B. Wang, N. Liu, D. Huang, X. Wang, Y. Hu, *Organic Letters* **2014**, 16 (23) 6140-6143
- [66] M. Kociolek, N. Straub, E. Marton, *Letters in Organic Chemistry* **2005**, 2 (3) 280-282
- [67] S. Cabiddu, V. Solinas *Gazzetta Chimica Italiana* **1969**, 99 (11) 1107-1114
- [68] F. Lu, S. W. Chi, D. H. Kim, K. H. Han, I. D. Kuntz, R. K. Guy, *Journal of Combinatorial Chemistry* **2006**, 8 (3) 315-325
- [69] L. Wei, W. Yan, C. Tao Patent: CN2018-10188225
- [70] Y. Xu, X. Zhou, G. Zheng, X. Li, *Organic Letters* **2017**, 19 (19) 5256-5259
- [71] M. Barday, C. Janot, N. R. Halcovitch, J. Muir, C. Aissa, *Angewandte Chemie International Edition English* **2017**, 56 (42) 13117-13121
- [72] S. Pusch, T. Opatz, *Organic Letters* **2014**, 16 (20) 5430-5433
- [73] C. Janot, J. B. Chagnoleau, N. R. Halcovitch, J. Muir, C. Aissa, *Journal of Organic Chemistry* **2020**, 85 (2) 1126-1137
- [74] J. Allan, R. Robinson, *Journal of the Chemical Society, Transactions* **1924**, 125 (0) 2192-2195
- [75] E. Mundy, Favalaro. *Name reactions and reagents in organic synthesis*, Wiley-Interscience; 2. edition **2005**
- [76] K. Sonogashira, Y. Tohda, N. Hagihara, *Tetrahedron Letters* **1975**, 16 (50) 4467-4470
- [77] V. Reddy, A. S. Jadhav, R. Vijaya Anand, *Organic & Biomolecular Chemistry* **2015**, 13 (12) 3732-3741
- [78] C. J. Ngwa, R. Stratmann, J. P. Musabyimana, K. Pannen, J. H. Schobel, M. Frings, I. Schiffers, C. Quaranta, S. Koschmieder, N. Chatain, G. Pradel, C. Bolm, *Tropical Medicine and Infectious Disease* **2022**, 7 (12)
- [79] S. Gester, J. Pietzsch, F. R. Wuest, *Journal of Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals* **2007**, 50 (2) 105-113

Literaturverzeichnis

- [80] P. Wang, T. Klassmüller, C. A. Karg, M. Kretschmer, S. Zahler, S. Braig, F. Bracher, A. M. Vollmar, S. Moser, *Biological Chemistry* **2022**, 403 (4) 421-431
- [81] T. Wei, J. H. Jung, T. F. Scott, *Journal of the American Chemical Society* **2015**, 137 (51) 16196-16202
- [82] J. Krauss, U. Kopp, F. Bracher, *Zeitschrift für Naturforschung B* **2015**, 70 (9) 637-641
- [83] G. Majetich, Y. Zhang, K. Wheless, *Tetrahedron Letters* **1994**, 35 (47) 8727-8730
- [84] C. Che, J. Xiang, G. X. Wang, R. Fathi, J. M. Quan, Z. Yang, *Journal of Combinatorial Chemistry* **2007**, 9 (6) 982-989
- [85] R. Paulini, C. Lerner, F. Diederich, R. Jakob-Roetne, G. Zürcher, E. Borroni, *Helvetica Chimica Acta* **2006**, 89 (9) 1856-1887
- [86] E. J. Wilde, E. V. Blagova, T. J. Sanderson, D. J. Raines, R. P. Thomas, A. Routledge, A. K. Duhme-Klair, K. S. Wilson, *Journal of Inorganic Biochemistry* **2019**, 190 75-84
- [87] K. Yuan, R. J. Kahan, C. Si, A. Williams, S. Kirschner, M. Uzelac, E. Zysman-Colman, M. J. Ingleson, *Chemical Science* **2020**, 11 (12) 3258-3267
- [88] M. Hesse, H. Meier, B. Zeeh. *Spektroskopische Methoden in der org. Chemie*, Georg Thieme Verlag Stuttgart/New York, 2. erweiterte und verbesserte Auflage, **1984**
- [89] A. Kalivretenos, J. K. Stille, L. S. Hegedus, *The Journal of Organic Chemistry* **2002**, 56 (8) 2883-2894
- [90] O. Gbadebo, K. Fox, G. Sutton, P. V. Murphy, D. Smith, P. O'Leary, *Results in Chemistry* **2022**, 4
- [91] M.F. Bodroux *Comptes Rendus*, 138 (**1904**) 1427-1429
- [92] H. Gilman, R. L. Bebb, *Journal of the American Chemical Society* **2002**, 61 (1) 109-112
- [93] G. Wittig, G. Fuhrmann, *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft (A and B Series)* **2006**, 73 (11) 1197-1218
- [94] J. K. Kendall, T. H. Fisher, H. P. Schultz, T. P. Schultz, *The Journal of Organic Chemistry* **2002**, 54 (17) 4218-4220
- [95] W. H. Perkin, *Journal of the Chemical Society* **1868**, 21 (0) 181-186
- [96] T. J. Fisher, P. H. Dussault, *Tetrahedron* **2017**, 73 (30) 4233-4258
- [97] M. F. Jung, M. A. Lyster, *Journal of the American Chemical Society* **2002**, 99 (3) 968-969
- [98] F. C. Chang, N. F. Wood, *Tetrahedron Letters* **1964**, 5 (40) 2969-2973
- [99] P. Müller, B. Siegfried, *Helvetica Chimica Acta* **2004**, 57 (4) 987-994
- [100] *Encyclopedia of reagents for organic synthesis*, Wiley online library; **2022**, online ISBN: 9780470842898

Literaturverzeichnis

- [101] A. K. Bagdi, S. Santra, K. Monir, A. Hajra, *Chemical Communications (Cambridge)* **2015**, 51 (9) 1555-1575
- [102] Y. Zhang, Z. Chen, W. Wu, Y. Zhang, W. Su, *Journal of Organic Chemistry* **2013**, 78 (24) 12494-12504
- [103] Roslan, II, K. H. Ng, J. E. Wu, G. K. Chuah, S. Jaenicke, *Journal of Organic Chemistry* **2016**, 81 (19) 9167-9174
- [104] X. Zhou, Z. Wu, Y. Pan, *Synthesis* **2011**, 2011 (14) 2255-2260
- [105] M. Noto, Y. Sakai, I. Kakinoki, Y. Goto US 2012/0261651A1, **2010**
- [106] S. Beers, P.B. Mackenzie, J. Tsai, C. Lin, W. Yeager, E. Barron, D.B. Knowles, R.W. Walters, C.S. Brown US 8142909B2 **2008**
- [107] A.E. Tschitschibabin *Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft* **1925**, 58 1705
- [108] K. Schilling, F. Kröhnke, B. Kickhöfen, *Chemische Berichte* **2006**, 88 (7) 1093-1102
- [109] H. Ito, A. Harada, H. Ohmiya, M. Sawamura, *Advanced Synthesis & Catalysis* **2013**, 355 (4) 647-652
- [110] J. Augustine, A. Bombrun, R. Atta, *Synlett* **2011**, 2011 (15) 2223-2227
- [111] S.-Y. Kim, J.-H. Kim, M. R. Son, S. Yi, C. H. Kim, H.-J. Son, S. O. Kang, *The Journal of Physical Chemistry C* **2019**, 123 (31) 18771-18782
- [112] J. Tan, P. Ni, H. Huang, G. J. Deng, *Organic & Biomolecular Chemistry* **2018**, 16 (23) 4227-4230
- [113] E. J. Licitra, J. O. Liu, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1996**, 93 (23) 12817-12821
- [114] S. Rizzo, R. Lang, J. Franke, M. Rittner, *BIOspektrum* **2016**, 22 (7) 734-735
- [115] P. K. Mishra, C. M. Yoo, E. Hong, H. W. Rhee, *Chembiochem* **2020**, 21 (7) 924-932
- [116] A. Louche, S. P. Salcedo, S. Bigot, *Methods in Molecular Biology* **2017**, 1615 247-255
- [117] J. H. Morris, G. M. Knudsen, E. Verschueren, J. R. Johnson, P. Cimermancic, A. L. Greninger, A. R. Pico, *Nature Protocols* **2014**, 9 (11) 2539-2554
- [118] F. Becker, K. Murthi, C. Smith, J. Come, N. Costa-Roldan, C. Kaufmann, U. Hanke, C. Degenhart, S. Baumann, W. Wallner, A. Huber, S. Dedier, S. Dill, D. Kinsman, M. Hediger, N. Bockovich, S. Meier-Ewert, A. F. Kluge, N. Kley, *Chemical Biology* **2004**, 11 (2) 211-223
- [119] S. Banala, A. Arnold, K. Johnsson, *Chembiochem* **2008**, 9 (1) 38-41
- [120] C. Chidley, H. Haruki, M. G. Pedersen, C. Fellay, S. Moser, K. Johnsson, *Chimia (Aarau)* **2011**, 65 (9) 720-724
- [121] W. Liu, F. Li, X. Chen, J. Hou, L. Yi, Y. W. Wu, *Journal of the American Chemical Society* **2014**, 136 (12) 4468-4471

Literaturverzeichnis

- [122] D. Basak, S. Sridhar, A. K. Bera, N. Madhavan, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2017**, 27 (13) 2886-2889
- [123] X. k. Long, L. Q. Liao, Y. F. Zeng, Y. Zhang, F. Xiao, C. Li, Y. Guo, *ChemistrySelect* **2019**, 4 (19) 5662-5666
- [124] H. Li, S. Ma, X. Zhang, C. Li, B. Dong, M. G. Mujtaba, Y. Wei, X. Liang, X. Yu, K. Wen, W. Yu, J. Shen, Z. Wang, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2018**, 66 (42) 11170-11179
- [125] H. Möhrle, C. M. Seidel, *Archiv der Pharmazie (Weinheim)* **1976**, 309 (6) 503-511
- [126] M. Keller, K. Sauvageot-Witzku, F. Geisslinger, N. Urban, M. Schaefer, K. Bartel, F. Bracher, *Beilstein Journal of Organic Chemistry* **2021**, 17 2716-2725
- [127] <https://s100.copyright.com/AppDispatchServlet#formTop>
- [128] T. Mosmann, *Journal of Immunological Methods* **1983**, 65 (1-2) 55-63
- [129] M. V. Berridge, P. M. Herst, A. S. Tan, *Biotechnology Annual Review* **2005**, 11 127-152
- [130] R. Rahim, J. S. Strobl, *Anticancer Drugs* **2009**, 20 (8) 736-745
- [131] Y. Zheng, Y. L. Zhao, X. Deng, S. Yang, Y. Mao, Z. Li, P. Jiang, X. Zhao, Y. Wei, *Cancer Investigations* **2009**, 27 (3) 286-292
- [132] C. Fan, W. Wang, B. Zhao, S. Zhang, J. Miao, *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2006**, 14 (9) 3218-3222
- [133] A. Munshi, *Cancer* **2009**, 115 (11) 2380-2383
- [134] M. E. Egger, J. S. Huang, W. Yin, K. M. McMasters, L. R. McNally, *Journal of Surgical Research* **2013**, 184 (1) 274-281
- [135] A. Hamacher-Brady, H. A. Stein, S. Turschner, I. Toegel, R. Mora, N. Jennewein, T. Efferth, R. Eils, N. R. Brady, *Journal of Biological Chemistry* **2011**, 286 (8) 6587-6601
- [136] C. Morrissey, B. Gallis, J. W. Solazzi, B. J. Kim, R. Gulati, F. Vakar-Lopez, D. R. Goodlett, R. L. Vessella, T. Sasaki, *Anticancer Drugs* **2010**, 21 (4) 423-432
- [137] J. J. Lu, S. M. Chen, X. W. Zhang, J. Ding, L. H. Meng, *Investigational New Drugs* **2011**, 29 (6) 1276-1283
- [138] T. Efferth, T. Ramirez, E. Gebhart, M. E. Halatsch, *Biochemical Pharmacology* **2004**, 67 (9) 1689-1700
- [139] C. M. Cabello, S. D. Lamore, W. B. Bair, 3rd, S. Qiao, S. Azimian, J. L. Lesson, G. T. Wondrak, *Investigational New Drugs* **2012**, 30 (4) 1289-1301
- [140] D. Sadava, T. Phillips, C. Lin, S. E. Kane, *Cancer Letters* **2002**, 179 (2) 151-156
- [141] G. Giampieri. Dissertation *Ludwig-Maximilians-Universität, München*, **2018**
- [142] V. R. Solomon, H. Lee, *European Journal of Pharmacology* **2009**, 625 (1-3) 220-233

Literaturverzeichnis

- [143] S. Naha, S. Govindaiah, S. Sreenivasa, J. K. Prakash, S. Velmathi, *ChemistrySelect* **2020**, 5 (41) 12807-12818
- [144] R. Ikeda, *Yakugaku Zasshi* **2007**, 127 (7) 1097-1102
- [145] H. Derendorf, *International Journal of Antimicrobial Agents* **2020**, 55 (6) 106007
- [146] Y. Quiros, L. Vicente-Vicente, A. I. Morales, J. M. Lopez-Novoa, F. J. Lopez-Hernandez, *Toxicological Sciences* **2011**, 119 (2) 245-256
- [147] H. G. O. Becker, R. Beckert, W. Berger, G. Domschke, E. Fanghänel, J. Faust, M. Fischer, F. Gentz, K. Gewalt, R. Gluch, W. D. Habicher, H. -J. Knölker, R. Mayer, P. Metz, K. Müller, D. Pavel, H. Schmidt, K. Schollberg, K. Schwetlick, E. Seiler, G. Zeppenfeld, *Organikum* (23. Auflage), Wiley-VCH, Weinheim, 2009
- [148] Z. Li, W. Zhu, J. Bao, X. Zou, *Synthetic Communications* **2014**, 44 (8) 1155-1164
- [149] L. P. G. Keffler, *Journal of the Chemical Society, Transactions* **1921**, 119 (0) 1476-1482
- [150] B. Zhou, J. Dong, J. Xu, *Advanced Synthesis & Catalysis* **2019**, 361 (19) 4540-4548
- [151] J. B. Daskiewicz, F. Depeint, L. Viorner, C. Bayet, G. Comte-Sarrazin, G. Comte, J. M. Gee, I. T. Johnson, K. Ndjoko, K. Hostettmann, D. Barron, *Journal of Medicinal Chemistry* **2005**, 48 (8) 2790-2804
- [152] Y. Kawagoe, K. Moriyama, H. Togo, *European Journal of Organic Chemistry* **2014**, 2014 (19) 4115-4122
- [153] K. Kumpan, A. Nathubhai, C. Zhang, P. J. Wood, M. D. Lloyd, A. S. Thompson, T. Haikarainen, L. Lehtio, M. D. Threadgill, *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2015**, 23 (13) 3013-3032
- [154] G. C. Nandi, K. K. Laali, *Tetrahedron Letters* **2013**, 54 (17) 2177-2179
- [155] F. Lengauer. Dissertation *Ludwig-Maximilians-Universität, München*, **2023**