

Entwicklung potenzieller Inhibitoren der Hitzeschockkomponenten HSF1 und HSP70 am Modell des Multiplen Myeloms

Dissertation zur Erlangung des
naturwissenschaftlichen Doktorgrades
der Julius-Maximilians-Universität Würzburg



Vorgelegt von

Anna Lehmann (geb. Hofmann)

Aus Talmenka (Russland)

Würzburg 2017

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Februar 2013 bis Februar 2017 unter der
Anleitung von Prof. Dr. Ulrike Holzgrabe mit finanzieller Unterstützung der Klinischen
Forscherguppe 2016 (CRU216, DFG) am Institut für Pharmazie und Lebensmittelchemie der
Universität Würzburg angefertigt.

Eingereicht am: _____

Bei der Fakultät für Chemie und Pharmazie

Gutachter der schriftlichen Arbeit:

1. Gutachter: _____

2. Gutachter: _____

Prüfer des öffentlichen Promotionskolloquiums:

1. Prüfer: _____

2. Prüfer: _____

3. Prüfer: _____

Datum des öffentlichen Promotionskolloquiums: _____

Doktorurkunde ausgehändigt am: _____

Teilergebnisse der vorliegenden Arbeit sind Gegenstand folgender wissenschaftlichen Publikationen und einer Posterpräsentation:

1. A. Lehmann, L. Lechner, K. Radacki, H. Braunschweig, U. Holzgrabe, „Crystal structure of *cis*-4-fluoro-3-(4-methoxyphenyl)-1-oxo-2-phenyl-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline-4-carboxylic acid”, *Acta Cryst.*, **2017**, *in Revision*.
2. M. Bach*, A. Lehmann*, D. Brännert*, J.T. Vanselow, A. Hartung, R.C. Bargou, U. Holzgrabe, A. Schlosser, M. Chatterjee, „Ugi reaction-derived α -acyl aminocarboxamides bind to PI 3-kinase-related kinases, inhibit HSF1-dependent heat shock response, and induce apoptosis in multiple myeloma cells”, *J. Med. Chem.*, **2016**, doi: 10.1021/acs.jmedchem.6b01613.
3. A. Lehmann, “Development of novel inhibitors against transcription factor HSF1 in the multiple myeloma”, XXIV EFMC International Symposium on Medicinal Chemistry, Manchester, UK, **2016**.

* geteilte Autorenschaft

Meinen Eltern und Ehemann,

In ewiger Dankbarkeit

„Befiel dem Herrn deine Wege [...], er wird es wohl machen.“

Psalm 37, Vers 5

Danksagung

Mein herzlicher Dank gilt Prof. Dr. Ulrike Holzgrabe für die freundliche Aufnahme in die Arbeitsgruppe und das Anvertrauen eines spannenden Projektes innerhalb einer interdisziplinären Forschungsgruppe. Ebenso danke ich für die gewährten wissenschaftlichen Freiräume und das hervorragende Arbeitsumfeld.

Weiterhin möchte ich folgenden Kooperationspartnern für die erfolgreiche Zusammenarbeit und Unterstützung während meiner Forschungsarbeit danken:

- Prof. Dr. Christoph Sotriffer und Christina Plank für die Anwendung der Syntheseprodukte für die Proteinkristallisation, die Entwicklung eines Assays und den regen wissenschaftlichen Austausch.
- Prof. Dr. Ralf Bargou, Dr. Manik Chatterjee, Dr. Daniela Brännert, sowie Stefanie Kreßmann und Heike Schraut für die stete biologische Evaluierung der Substanzen.
- Prof. Dr. Andreas Schlosser und Matthias Bach für die Zusammenarbeit an der Affinitätschromatographie.
- Prof. Dr. Dr. Lorenz Meinel und Nina Hecht für die Durchführung der physikochemischen Messungen.

Prof. Dr. Dr. h.c. mult. Gerhard Bringmann und Dr. Franziska Witterauf danke ich für die Messung der CD-Spektren.

Dr. Krzysztof Radacki möchte ich herzlichst für die Durchführung der Röntgenbeugungsanalyse danken.

Weiterhin möchte ich Joachim Wahl für die Unterstützung bei der Durchführung der Messungen mittels Kapillarelektrophorese und Dr. Oliver Wahl für die zahlreichen analytischen Hilfestellungen danken.

Dem gesamten Arbeitskreis und allen Mitarbeitern bin ich für die angenehme und außergewöhnliche Arbeitsatmosphäre dankbar. Explizit möchte ich die Kollegen und Kolleginnen im Syntheselabor und die Gesellschaft bei den Mittagessen hervorheben.

Lisa Lechner und Florian Geyer, die meine Forschungsarbeit im Rahmen einer Masterarbeit bzw. eines Praktikums unterstützten, möchte ich herzlichst danken.

Dr. Roman Sommer danke ich für die stetige Unterstützung in jeglichen wissenschaftlichen Fragestellungen und das Korrekturlesen dieser Arbeit.

Und nicht zuletzt danke ich vom ganzen Herzen meinen Freunden und meiner Familie, die immer an meiner Seite standen und ohne die meine Erfolge nicht möglich wären.

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|----------|--|-----------|
| 1 | Einleitung | 1 |
| 1.1 | Krebserkrankung Multiples Myelom | 3 |
| 1.1.1 | Krankheitsbild und Entstehung | 3 |
| 1.1.2 | Therapieansätze gegen Multiples Myelom | 6 |
| 1.2 | Hitzeschocksystem als therapeutisches Ziel | 9 |
| 1.2.1 | HSP70 als pharmakologisches Target | 9 |
| 1.2.2 | HSF1 als pharmakologisches Target | 14 |
| 2 | Zielsetzung | 19 |
| 3 | Entwicklung der HSP70-Inhibitoren | 21 |
| 3.1 | Erweiterung der Substanzbibliothek | 21 |
| 3.1.1 | Synthese der trans-3,4-Dihydroisochinolin-1(2H)-on-carbonsäuren | 25 |
| 3.1.2 | Biologische Evaluierung der trans-3,4-Dihydroisochinolin-1(2H)-on-carbonsäuren | 26 |
| 3.1.3 | Synthese der trans-3,4-Dihydroisochinolin-1(2H)-on-carbonsäureamide | 27 |
| 3.1.4 | Biologische Evaluierung der trans-3,4-Dihydroisochinolin-1(2H)-on-carbonsäureamide | 28 |
| 3.2 | Untersuchung der enantiospezifischen Aktivität | 29 |
| 3.3 | Synthese der enantiomerenreinen Isochinolinoncarbonsäureamide | 31 |
| 3.4 | Isostere Substitution des aciden H-4 | 32 |
| 3.4.1 | Schützung der Carbonsäurefunktion | 33 |
| 3.4.2 | Elektrophile Fluorierung des Kohlenstoffs C-4 | 34 |
| 3.4.3 | Entschützung des tert-Butylesters | 37 |
| 3.4.4 | Alkylierung des Kohlenstoffs C-4 | 39 |
| 3.4.5 | Bestimmung der Absolutkonformation | 40 |
| 3.4.6 | Löslichkeitsbestimmung der Derivate 11, 15, 16 | 42 |
| 3.4.7 | Biologische Evaluierung der Derivate 11, 15, 16 | 44 |
| 3.5 | Synthese eines TMAO-Hybrides zur Proteincokristallisation | 44 |
| 3.5.1 | Biologische Evaluierung des TMAO-Hybrides | 50 |
| 3.6 | Entwicklung eines Radioaktivliganden für den Szintillationsnähennachweis | 50 |
| 3.7 | Liganden für die Affinitätschromatographie | 55 |
| 3.7.1 | Beschreibung der Buchwald-Hartwig-Kreuzkupplung | 56 |
| 3.7.2 | Anwendung der Buchwald-Hartwig-Kreuzkupplung | 58 |
| 3.7.3 | Alternative Synthese der biotinylierten Liganden | 61 |
| 3.7.4 | Durchführung der Affinitätschromatographie | 64 |
| 3.8 | Stabilitätsmessung von AH073tS | 67 |
| 4 | Entwicklung der HSF1-Inhibitoren | 71 |
| 4.1 | Erweiterung der Substanzbibliothek | 71 |
| 4.2 | Liganden für die Affinitätschromatographie | 75 |
| 4.2.1 | Synthese der biotinylierten Liganden | 75 |
| 4.2.2 | Durchführung der Affinitätschromatographie | 77 |

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|-----------|---|------------|
| 5 | NCI-Screening | 81 |
| 6 | Ausblick | 87 |
| 6.1 | Radioaktivliganden für den Szintillationsnähennachweis | 87 |
| 6.2 | Liganden für die Affinitätschromatographie | 87 |
| 6.2.1 | HSP70-Liganden | 87 |
| 6.2.2 | HSF1-Liganden..... | 88 |
| 7 | Zusammenfassung | 89 |
| 7.1 | Inhibitoren des Chaperons HSP70 | 89 |
| 7.2 | Inhibitoren des Transkriptionsfaktors HSF1 | 91 |
| 8 | Summary | 93 |
| 8.1 | Inhibitors of the chaperon HSP70 | 93 |
| 8.2 | Inhibitors of the transcription factor HSF1 | 95 |
| 9 | Experimenteller Teil | 97 |
| 9.1 | Allgemeine Angaben zu verwendeten Apparaturen und Methoden | 97 |
| 9.2 | Synthetische Methoden | 105 |
| 9.2.1 | Synthesen der Imin-Derivate..... | 105 |
| 9.2.2 | Synthesen der Tetrahydroisochinolinon-4-carbonsäure-Derivate..... | 110 |
| 9.2.3 | Synthesen der α -Acylaminocarboxamid-Derivate | 142 |
| 10 | Anhang | 154 |
| 10.1 | Kalibriergeraden von (\pm) 6a, (\pm) 15, (\pm) 16 | 154 |
| 10.2 | NCI-Datenblätter | 155 |
| 10.2.1 | AH083t | 155 |
| 10.2.2 | AH100t | 156 |
| 10.2.3 | AH122t | 157 |
| 10.2.4 | AH316 | 158 |
| 10.3 | Übersicht der Substanzendstufen..... | 159 |
| 10.3.1 | 3,4-Dihydroisochinolin-1(2H)-on-Derivate | 159 |
| 10.3.2 | α -Acylaminocarboxamid-Derivate..... | 161 |
| 11 | Referenzen | 162 |

1 Einleitung

Jährlich erkranken ca. 8 Mio. Menschen weltweit an malignen Tumorerkrankungen, womit Krebs zu einer der zentralen Krankheiten des 21. Jahrhunderts gehört.¹ Laut dem Bericht der *American Cancer Society* ist im Jahr 2012 jeder siebte Tod weltweit auf Krebsleiden zurückzuführen. In den einkommensstarken Ländern ist diese Erkrankung die zweithäufigste Todesursache (15 % aller Sterbefälle) nach kardiovaskulären Leiden.² Zum aktuellen Zeitpunkt Krebs. Das Zentrum für Krebsregisterdaten (ZfKD) hat im Jahr 2012 rund 478.000 Neuerkrankungen in Deutschland registriert.³ Altersstandardisierte Statistiken belegen zwar einen Rückgang der Gesamtsterberaten um 20 % seit 1980,⁴ jedoch haben die absoluten Zahlen der Neuerkrankungen an Krebs in Deutschland zwischen 2002 und 2012 zugenommen (um 13 % bei Männern und 10 % bei Frauen).³ Luengo-Fernandez et al.⁵ untersuchten die finanziellen Folgen des Krebsleiden innerhalb der Europäischen Union (EU). Die Gesamtkosten der EU, die im Jahr 2009 entstanden sind, beliefen sich auf mehr als 126 Mrd. € (1.07 % des Bruttoinlandsproduktes, BIP). In Deutschland entstanden dabei die höchsten Kosten in Höhe von 35 Mrd. €, was 1.48 % des BIP entsprach.

Die Erforschung der Chemotherapeutika begann in den 1940ern (Abbildung 1),⁶ als Louis Goodman und Alfred Gilman feststellten, dass die Verabreichung von chlorierten Amininen (Stickstofflose) zur Verkleinerung von Tumormasse führte. Die Wissenschaftler haben zu diesem Zeitpunkt den Alkylierungsmechanismus bereits aufgeklärt, jedoch noch nicht die Ursachen verstanden, warum das befallene Gewebe empfindlicher auf Toxine reagierte als das gesunde Gewebe. Ebenso wurden bereits zu dieser frühen Entwicklungszeit Resistenzen gegenüber Chemotherapeutika beobachtet. Der nächste große Durchbruch gelang mit Folsäure-Antagonisten (Methotrexat), die die Dihydrofolatreduktase inhibierten, um die akute lymphatische Leukämie (ALL) bei Kindern zu behandeln. Bereits 10 Jahre später wurde durch die alleinige Anwendung von Methotrexat der erste solide Tumor, das Chorionkarzinom, erfolgreich behandelt. Den weiteren Erfolg erlebte Methotrexat in der Kombination mit Cyclophosphamid und Fluoruracil im Rahmen einer adjuvanten Behandlung nach operativen Eingriffen. Taxol war einer der ersten Naturstoffe, der als Krebsmittel Aktivität zeigte. Da Taxol anfangs synthetisch schwer zugänglich war und schlechte Löslichkeit aufwies, hat es mehr als 20 Jahre gedauert, bis der Arzneistoff auf den Markt kam, um anschließend zum ersten onkologischen Blockbuster zu werden. In den 70ern und 80ern hat das *National Cancer Institute* (NCI, USA) die Forschung und Entwicklung der Chemotherapeutika vorangetrieben und Erfolg mit der Zulassung von Cisplatin verzeichnet.

Einleitung

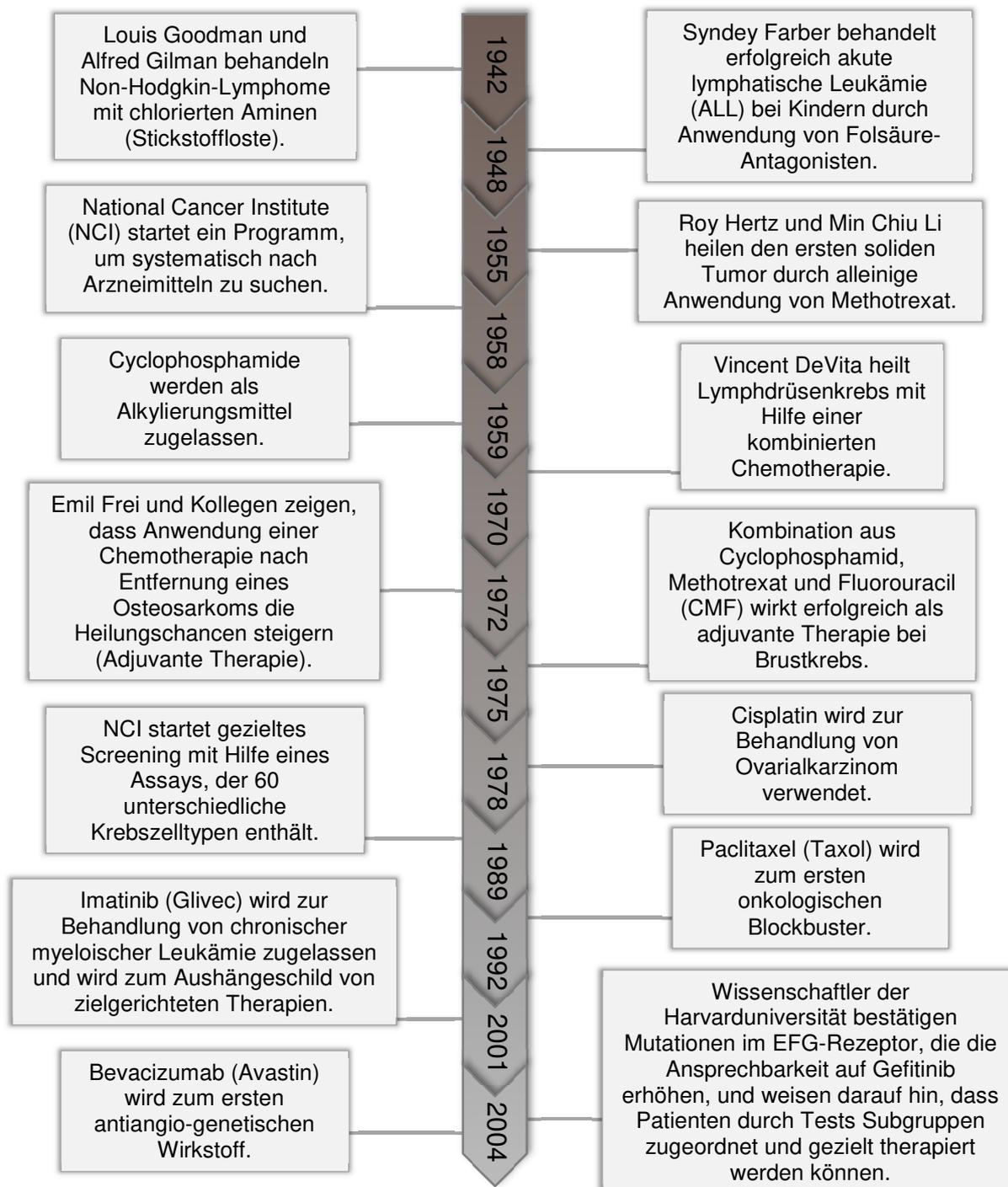


Abbildung 1: Die Zeitachse zeigt die wichtigsten Entwicklungsschritte bis zur modernen Chemotherapie.
Abbildung adaptiert von B. A. Chabner.⁶

Die systematische Suche nach potentiellen Wirkstoffen wurde erfolgreich ausgebaut, nachdem das NCI im Jahr 1989 einen Assay etablierte, der 60 unterschiedliche Krebszelltypen enthielt, um Hochdurchsatz-Experimente zu ermöglichen. Parallel hierzu gab es zahlreiche wissenschaftliche Ansätze, um die Proliferation, das Überleben und die Signaltransduktion der veränderten Zellen zu verstehen. Einer der großen Meilensteine der zielgerichteten Therapie (*engl. targeted therapy*) wurde mit Hilfe von Imatinib gelegt, welches Tyrosinkinase ausschließlich in den Krebszellen blockiert. Anfang des 21. Jahrhunderts haben die

Wissenschaftler der Harvarduniversität bestätigt, dass der Erfolg einer Chemotherapie maßgeblich von bestimmten Mutationen z.B. im epidermalen Wachstumsfaktor (*engl. epidermal growth factor, EFG*) abhängt. Diese Befunde führten zur Erkenntnis, dass Patienten bereits vor einer Chemotherapie mit Hilfe von genetischen und kinomischen Untersuchungen einem Empfindlichkeitstyp zugeordnet und gezielt behandelt werden können.⁷⁻⁸

1.1 Krebserkrankung Multiples Myelom

Das Multiple Myelom (MM) ist eine maligne Neoplasie und ist durch die unkontrollierte Proliferation monoklonaler Plasmazellen im Knochenmark gekennzeichnet.⁹ MM ist zwar sehr selten und machte im Jahr 2012 1.3 % aller Krebsneuerkrankungen in Deutschland aus, verläuft jedoch meist tödlich.³

1.1.1 Krankheitsbild und Entstehung

Das MM wird in drei deutlich unterscheidbare Entwicklungsstadien unterteilt. Als Vorstufe wird die Monoklonale Gammopathie unklarer Signifikanz (MGUS) betrachtet, die in der Regel asymptomatisch verläuft, sodass die daran erkrankten Personen selten von ihrem Zustand wissen. Das Übergangsstadium zur symptomatischen MM-Form kann sich schleichend (*engl. smouldering MM*) über mehrere Jahrzehnte entwickeln und wird über den ansteigenden M-Proteingehalt im Serum (> 30 g/l) verfolgt. Lediglich 1 % der an MGUS erkrankten Personen entwickeln die symptomatische MM-Form, die anhand des ansteigenden M-Proteingehalts im Urin und Organschäden nachzuweisen ist.⁹⁻¹⁰ Die Hauptsymptome der akuten Erkrankung sind Hyperkalzämie, Niereninsuffizienz, Anämie und Knochenschäden und -schmerzen (*engl. hypercalcemia, renal failure, anaemia, bone lesions, CRAB criteria*).¹⁰⁻¹¹ In Abbildung 2 ist ein Schädel eines MM-Patienten mit deutlich sichtbaren Läsionen abgebildet. Die bisherigen Statistiken zeigen, dass die afroamerikanische Bevölkerung etwa doppelt so häufig erkrankt als die kaukasische, wobei das Alter ab 50 Jahren, das männliches Geschlecht und ein geschwächtes Immunsystem ebenso wichtige Risikofaktoren sind.^{9,12} Eine Erblichkeit ist bisher nicht sicher bestätigt.³

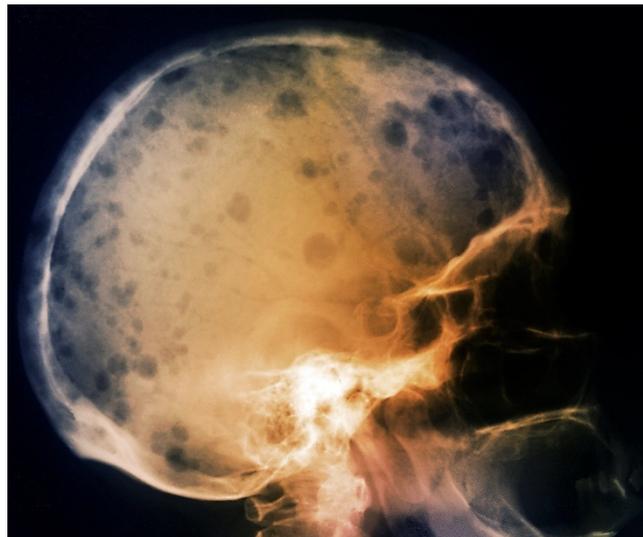


Abbildung 2: Knochenläsionen am Schädel (sog. Schrotschussschädel) eines MM-Patienten. Quelle: Science Photo Library

Einleitung

MM ist eine Erkrankung des blutbildenden Systems und auf die fehlerhafte Entwicklung der Plasmazellen zurückzuführen, die sich aus B-Lymphozyten entwickeln. Diese sind die einzigen Zellen im Körper, die Antikörper bilden, und neben den T-Lymphozyten ein wichtiger Bestandteil des adaptiven Immunsystems. B-Zellen entstehen aus den pluripotenten hämatopoetischen Stammzellen, die als erstes eine multipotente Vorläuferzelle hervorbringen (Abbildung 3).¹³ Durch die Umlagerung der Immunglobulin-Ketten (Ig) und Expression von Prä-Antigenrezeptoren an der Zelloberfläche entstehen naive B-Zellen, die nach der Kontrolle des Rezeptors in das lymphatische Gewebe wandern. Naive B-Zellen ohne Rezeptoren werden ausgesiekt und durch Apoptose beseitigt. In der Umgebung des Lymphgewebes proliferieren die B-Zellen stark und können durch die somatische Hypermutation der Ig-Gene eine große Vielfalt an Antigenrezeptoren entwickeln, sodass letztendlich diejenigen B-Zellen überleben, die eine hohe Antigenaffinität gegenüber den Antigen-präsentierenden T-Zellen aufweisen. Durch den letzten Differenzierungsschritt entstehen aus den aktivierten B-Zellen Gedächtnis- und die bereits erwähnten Plasmazellen, die zurück in das Knochenmark wandern und durch Mutationen und fehlerhafte Prozesse zu der Erkrankung führen können.¹³

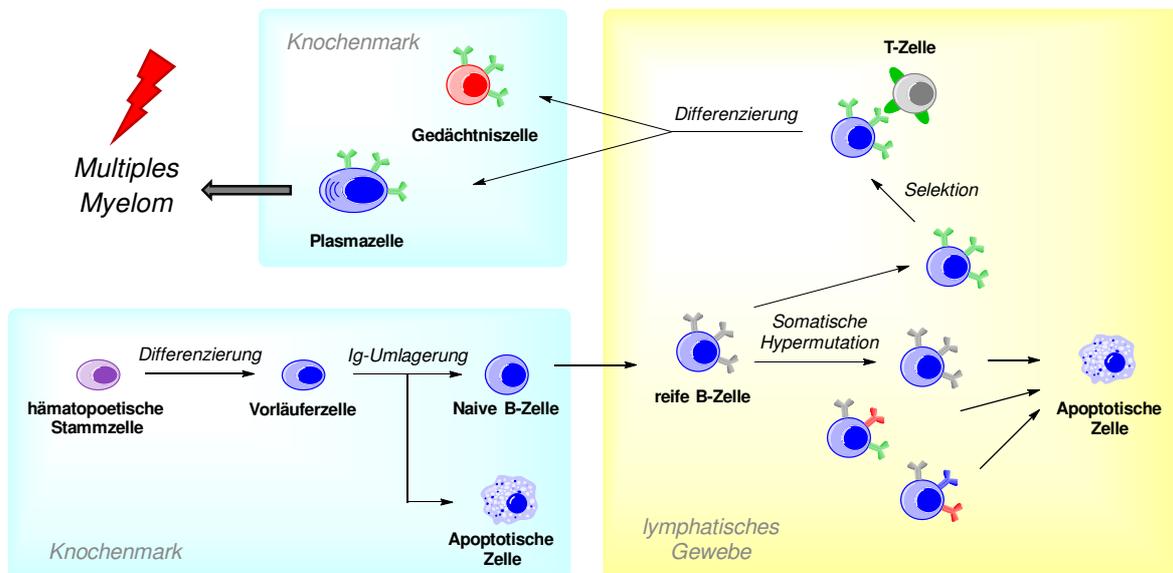


Abbildung 3: B-Zellen entwickeln sich aus den hämatopoetischen Stammzellen und durchlaufen zahlreiche Selektions- und Differenzierungsschritte im Knochenmark und Lymphgewebe. Aus aktivierten B-Zellen gehen Gedächtnis- und Plasmazellen hervor. Mutationen und Entstehung von Tumoren können in jedem Entwicklungsstadium ablaufen. Fehlerhafte, mutierte Plasmazellen führen zur Entstehung von Multiplen Myelom. Abbildung adaptiert von R. Küppers.¹³

Die erfolgreiche Entwicklung eines MM-Tumors ist stark von der Umgebung im Knochenmark abhängig. Interaktionen zwischen MM-Zellen und dem Umfeld, wie z.B. extrazellulärer Matrix (EZM), Makrophagen, Endothelzellen (EZ) und Knochenmarkstammzellen (KMSZ) (Abbildung 4A), bewirken bessere Proliferation, erhöhte Migration, Überleben, ausgeprägte Angiogenese und Wirkstoffresistenzen krankhafter

Zellen.¹⁴ Mutierte Plasmazelle sind dabei in der Lage, ihre Umgebung mit Hilfe von Botenstoffen (Zytokine, Wachstumsfaktoren), Rezeptoren und Adhäsionsmolekülen zum eigenen Vorteil zu modifizieren. Einer der wichtigsten Oberflächenmarker einer Plasmazelle ist das Transmembranglykan CD138, welches an die EZM bindet (Abbildung 4B). Die in der EZM enthaltenen Fibroblasten können als Richtungsgeber fungieren und es den MM-Plasmazellen mit Hilfe von pro-invasiven Zytokinen ermöglichen, das Knochenmarksgewebe zu verlassen und in die Blutbahn einzudringen.¹⁴ Die tumorassoziierten Makrophagen fördern das Überleben der Krebszellen, indem sie eine immuntolerante Mikroumgebung schaffen. Die Balance zwischen den Osteoklasten, die das Knochengewebe resorbieren, und den Osteoblasten, die das Knochengewebe aufbauen, ist im Fall einer MM-Erkrankung gestört. Osteoklasten werden durch Interleukin-6 (IL-6) dauerhaft aktiviert und mit Hilfe des Liganden RANKL (*engl. receptor activator of NF- κ B ligand*) antiapoptotisch beeinflusst. Gleichzeitig wird die Osteoblastenaktivität unterdrückt, sodass es zu den bereits erwähnten Knochenläsionen kommt (Abbildung 2). Die tumorassoziierten Endothelzellen haben eine höhere Proliferationsrate als im gesunden Gewebe und spielen eine Schlüsselrolle in der Progression der Angiogenese.

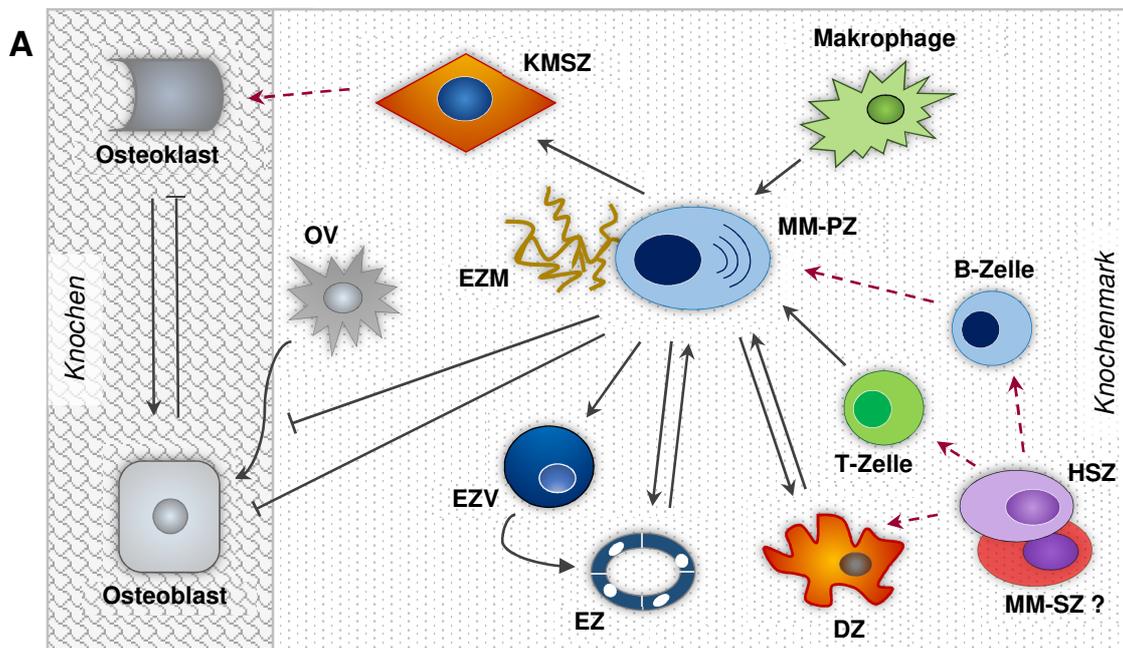


Abbildung 4A: Schematische Darstellung der Interaktionen der MM-Zellen mit ihrer Umgebung: MM-Plasmazellen (MM-PZ) sind auf das Milieu innerhalb des Knochenmarks angewiesen. Sie interagieren verstärkt mit ihrer Umgebung über Adhesion und/oder Botenstoffe und stören die Homöostase der Stromazellen zum eigenen Vorteil, wodurch Proliferation, Überleben, Migration, Resistenzen und Angiogenese der Tumorzellen erhöht und gefördert werden (KMSZ = Knochenmarkstammzelle, EZM = extrazelluläre Matrix, OV = Osteoblastvorgänger, EZV = Endothelzellenvorgänger, EZ = Endothelzelle, DZ = dendritische Zelle, HSZ = hämatopoetische Stammzelle, MM-SZ = MM-Stammzelle; graue Pfeile = Interaktion; gestrichelte Pfeile = Entstehungspfad).
Abbildung adaptiert von Podar et al.¹⁵

Einleitung

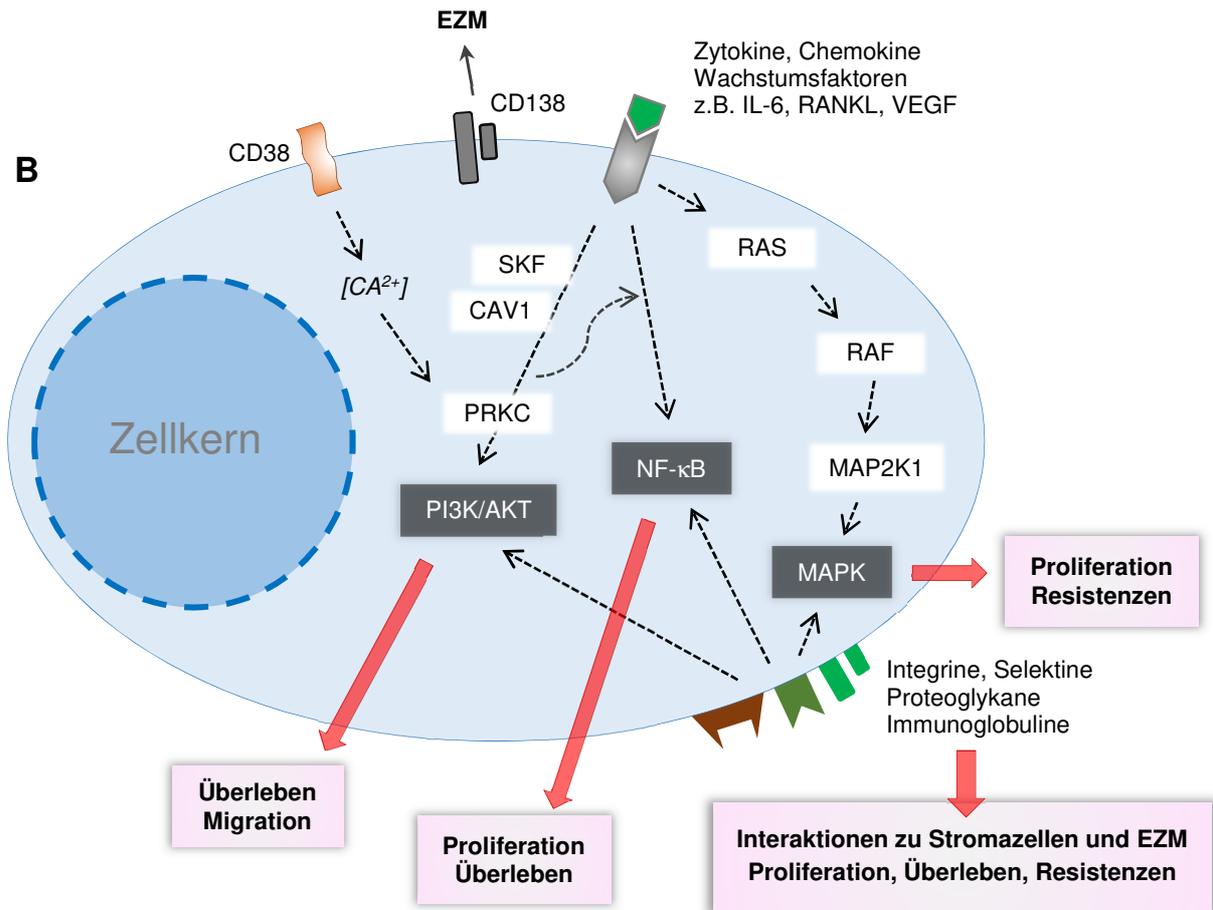


Abbildung 4B: Vereinfachte Darstellung exemplarischer Signalweitergabe innerhalb einer MM-Plasmazelle: Die extrazellulären Botenstoffe und Zell-Zell-Interaktionen führen zur Hyperaktivierung von Signaltransduktionswegen, die das Tumorwachstum und -überleben fördern. Abbildung adaptiert von Podar et al.¹⁵

Die extrinsischen Botenstoffe lösen zahlreiche intrazelluläre Signalkaskaden aus (Abbildung 4B). Zytokine wie beispielsweise IL-6 oder VEGF (*engl. vascular endothelial growth factor*) induzieren den MAP-Kinase-Weg (*engl. mitogen-activated protein*), der in das Zellwachstum, -proliferation und -differenzierung involviert ist und bei vielen Krebserkrankungen hyperaktiviert vorliegt.¹⁶ Der PI3K/Akt-Signalweg (Phosphoinositid-3-Kinasen-Weg) spielt ebenso eine essentielle Rolle in der IL-6-, VEGF- und Integrin-vermittelter Signaltransduktion und ermöglicht höhere Überlebenschancen einer MM-Plasmazelle.¹⁷

1.1.2 Therapieansätze gegen Multiples Myelom

Die erste erfolgreiche Behandlung einer MM-Erkrankung fand in den 1960ern mit Hilfe einer Kombinationstherapie aus Melphalan und Prednison¹⁸ (Abbildung 5) statt. Dennoch wurde das neue Zeitalter der Therapiemöglichkeiten erst in den 90ern mit Wiedereinführung von Thalidomid eingeläutet.¹¹ Als teratogenes Schlafmittel vom Markt genommen, weckte Thalidomid die Aufmerksamkeit der Onkologen als Angiogeneseinhibitor, welches die Gefäßneubildung eines Gewebes hemmt.¹⁹ Thalidomid ist heutzutage in Kombination mit

Einleitung

Melphalan und Prednison für Patienten ab einem Alter von 65 Jahren bzw. für Patienten, für die eine hochdosierte Chemotherapie nicht in Frage kommt, zugelassen.⁹ Das strukturelle Analogon Lenalidomid (Abbildung 5) gehört zur zweiten Generation der Immunmodulatoren und zeigt in Kombination mit Dexamethason bessere Wirksamkeit bei Patienten im fortgeschrittenen Stadium.²⁰ Lenalidomid verursacht zwar weniger Nebenwirkungen als Thalidomid, jedoch gibt es einige Hinweise auf den Zusammenhang zwischen Einnahme des Wirkstoffs und der Entstehung eines sekundären Krebses.²¹ Pomalidomid gehört zur dritten Generation der Immunmodulatoren und erwies sich als wirksam, wenn Vortherapien mit Lenalidomid und Bortezomib (Abbildung 5) nicht zum Erfolg führten.²² Da die mutierten Plasmazellen sich rapide reproduzieren, exprimieren diese viele fehlerhafte Proteine und sind stark von der Aktivität des Proteasoms abhängig, welches abnormale und nicht korrekt gefaltete Proteine degradiert und somit einen attraktiven onkologischen Angriffspunkt bietet. Bortezomib war der erste reversible Proteasominhibitor, dessen Schlüsselrolle jedoch vorwiegend die indirekte Aktivierungsblockade des Transkriptionsfaktors NF- κ B ist, der in den MM-Zellen konstitutiv exprimiert vorliegt und antiapoptotisch wirkt (Abbildung 4B).²³ Leider verursacht Bortezomib viele Nebenwirkungen wie beispielsweise Schädigung des peripheren Nervensystems, sodass einige Patienten die Behandlung vorzeitig abbrechen müssen.²¹ Der alternative Proteasominhibitor Carfilzomib (Abbildung 5) verbessert wesentlich die Lebensqualität der Patienten aufgrund geringerer Nebenwirkungen.²⁴

Im Jahr 2015 wurden drei weitere neuartige Wirkstoffe auf den Markt gebracht. Daratumumab²⁵ stellt den ersten monoklonalen Antikörper dar, der an das transmembrane Glykoprotein CD38 der Zellen bindet und als alleiniger Wirkstoff verabreicht wird. CD38 wird von MM-Zellen stärker als von normalen Lymphozyten exprimiert²⁶ und kontrolliert den cytoplasmatischen Ca^{2+} -Fluss (Abbildung 4B), welcher als eines der universellen Zellsignalsysteme fungiert.²⁷ Elotuzumab²⁸⁻²⁹ ist ebenfalls ein monoklonaler Antikörper, der sich spezifisch gegen das SLAMF7-Glykoprotein (*engl. signaling lymphocytic activation molecule F7*) richtet, das ausschließlich die gesunden und MM-Plasmazellen exprimieren, jedoch keine weiteren Körperzellen, sodass eine Schädigung des gesunden Gewebes bei einer Therapie minimiert werden kann. Im Juni 2015 sprach die Europäische Arzneimittelagentur (*engl. European Medicines Agency, EMA*) eine Empfehlung zur Zulassung des ersten Histon-Deacetylase-Inhibitors (HDAC) aus.³⁰ Panobinostat wirkt epigenetisch und soll in Kombination mit Bortezomib und Dexamethason verabreicht werden.³¹

Einleitung

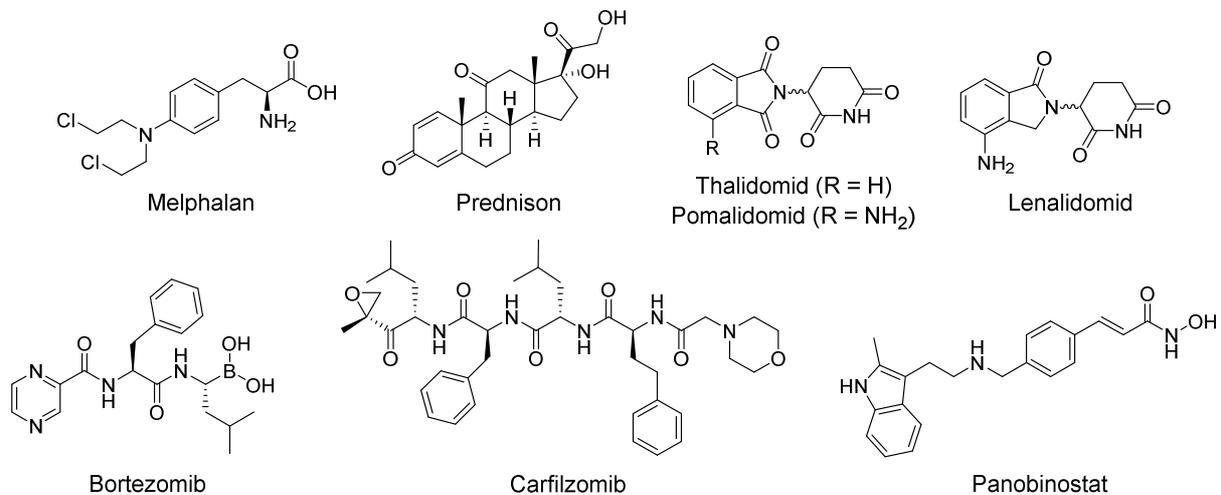


Abbildung 5: Strukturen der bisher zugelassenen Wirkstoffe, die zur Behandlung des Multiplen Myeloms eingesetzt werden.

Trotz vielseitiger Therapiemöglichkeiten sprechen heutzutage nur 80-90 % der erkrankten Personen auf eine Behandlung des MM an, wobei die meisten von ihnen einen Rückfall erleiden. Seit einigen Jahren häufen sich zudem die Beweise für eine hierarchische Entwicklung der krankhaften Zellen und für das Vorhandensein von extrem robusten Krebsstammzellen.³² Diese Hypothese widerspricht zwar dem Gedanken, dass aus jeder Krebszelle viele weitere hervorgehen können, erklärt jedoch die hohen Rückfallraten und die außerordentliche Wirkstoffresistenz der MM-Zellen.

Viele der zuvor erwähnten Signaltransduktionskomponenten wie z.B. PI3K/AKT, die prokarzinogen agieren, sind Klienten der sogenannten Hitzeschockproteine (*engl. heat shock proteins, HSPs*).³³ Die meisten der molekularen Chaperone sind stressinduzierbare Proteine, die in vielen Krebsarten überexprimiert werden und für die Aufrechterhaltung der Homöostase der Zellen sorgen. Stressinduzierbare Schutzmechanismen ermöglichen es den Zellen, umweltbedingten wie physikalischen und chemischen Stressfaktoren auszuweichen und bieten sogleich ein attraktives therapeutisches Target.³⁴

1.2 Hitzeschocksystem als therapeutisches Ziel

Maligne Zellen sind dauerhaft Stress ausgesetzt, hervorgerufen durch externe Faktoren wie Nährstoffmangel und chemische Therapeutika, was zu massiver Akkumulation fehlerhafter Proteine und Störungsanfälligkeit der Signaltransduktionswege führen kann. Aus diesem Grund sind Krebszellen auf die Aktivität der Hitzeschockproteine angewiesen.³⁵ Hitzeschockproteine (HSPs) sind hoch konservierte molekulare Chaperone, die ubiquitär in allen Organismen vorkommen und eine essenzielle Rolle in der Synthese neuer Proteine spielen. Sie binden naszierende Polypeptidketten direkt am Ribosom und stabilisieren so die korrekte Assoziation der hydrophoben Sequenzen der neu entstehenden Proteine. Weiterhin erkennen sie die bereits fehlgefalteten und aggregierten Proteine und unterstützen die Modifikation der Tertiärstruktur.³⁶

Die wesentlichen HSPs werden anhand ihrer Größe charakterisiert wie etwa HSP90 (90 kDa), HSP70 (70 kDa) oder HSP40 (40 kDa), wobei das HSP90 zurzeit zu den am meisten untersuchten Chaperonen zählt,³⁷ nicht zuletzt, weil es für zahlreiche Komponenten der tumorassoziierten Proliferations- und Überlebenssignalwege eine Rolle spielt.³³ Bislang sind einige HSP90-Inhibitoren bekannt, die an die N-terminale Nukleotidbindestelle (z.B. Geldanamycin, 17-AAG, Radicicol) oder an die C-terminale Domäne (Celastrol, Novobiocin, KU174) binden.³⁷ Der Wirkstoff Tanespimycin durchlief zwar die Phase-1 einer klinischen Studie, jedoch sprachen lediglich 3 % der Probanden minimal auf die Behandlung an und wiesen eine regressionsfreie Spanne von nur drei Monaten auf.³⁸ Bereits vor einigen Jahren wurde gezeigt, dass die Inhibition von HSP90 zur Hochregulation von HSP72 in MM-Zellen führt.³⁹⁻⁴⁰ Zugleich erzielte man durch simultanes Gen-Silencing von HSP72 und HSP73 den Abbau von HSP90-Klienten und die Reduktion des tumorspezifischen Wachstums.⁴¹ Diese Befunde bestätigen, dass HSP70 der Zytotoxizität, die durch Inhibition von HSP90 hervorgerufen wird, entgegen wirkt und zur Entstehung von Resistenzen beiträgt.

1.2.1 HSP70 als pharmakologisches Target

Die humane HSP70-Familie besteht aus mindestens acht Homologen, wobei die meisten davon im Cytosol lokalisiert sind. Während HSP70 nach der stressinduzierten transkriptionellen Aktivierung durch den Hitzeschockfaktor 1 (*engl. heat shock factor 1, HSF1*) exprimiert wird, wird HSC70 (*engl. heat shock cognate protein 70*) ubiquitär in den meisten Zellen exprimiert und fungiert als Haushaltschaperon. Die HSP70-Homologe bestehen aus einer hochkonservierten N-terminalen Nukleotidbindedomäne (NBD), einer Substratbindedomäne (SBD) und einem gering konservierten C-Terminus, welcher die Interaktion mit Co-Chaperonen ermöglicht (Abbildung 6).⁴²

Einleitung

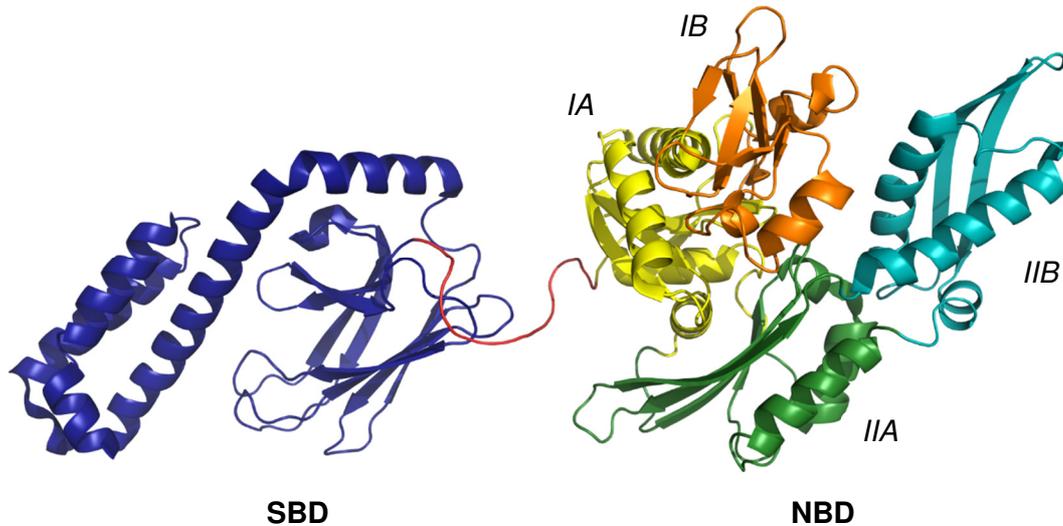


Abbildung 6: Proteinkristallstruktur des bakteriellen analogen Chaperons DnaK von *E. coli* zeigt die Substratbindedomäne (SBD, blau) bestehend aus einem β -Faltblatt gefolgt von einer α -Helix und die Nukleotidbindedomäne (NBD) mit vier Untereinheiten (IA, IB, IIA und IIB, mehrfarbig).⁴² Die NBD-Untereinheiten bilden einen Hohlraum für die Bindung von ATP/ADP. Die SBD und NBD sind über einen flexiblen hydrophoben Linker (rot) verbunden, der die ATPase-Aktivität des Chaperons kontrolliert. (Proteinkristallstruktur PDB-Kennzahl 2KHO).⁴³

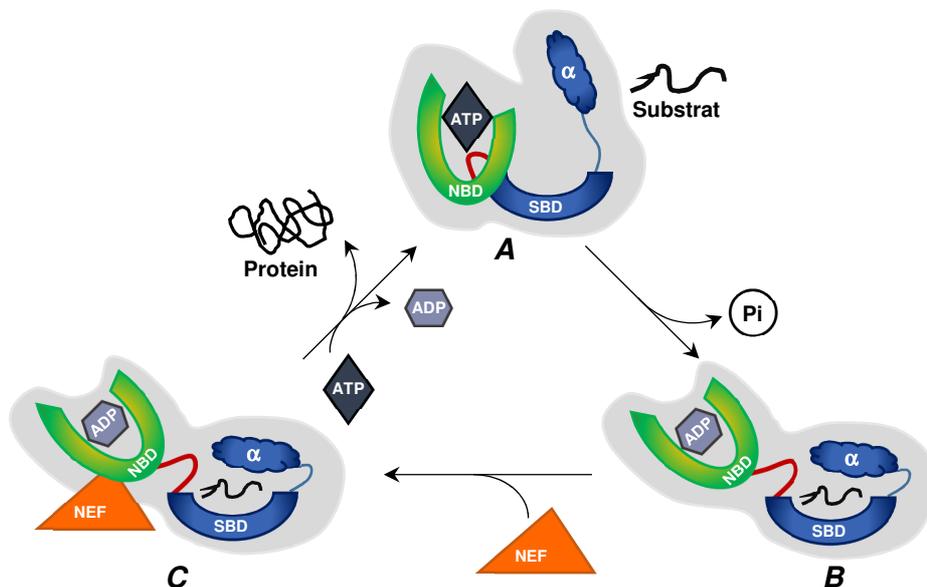


Abbildung 7: Schematische Darstellung eines HSP70-Arbeitszyklus. **A:** SBD und NBD kommen in die räumliche Nähe durch die Bindung von ATP. **B:** Durch die ATP-Hydrolyse verringert sich die Interaktion zwischen SBD und NBD gefolgt von erhöhter Affinität zum Substrat. **C:** Durch die Bindung eines Faktors (z.B. NEF, engl. nucleotide exchange factor) wird das korrekt gefaltete Protein entlassen und der SBD-NBD-Komplex ändert seine Konformation. Abbildung adaptiert von Powers et al.⁴²

Strukturanalysen von HSP70-Analoga unterschiedlicher Spezies haben gezeigt, dass NBD aus vier Untereinheiten (IA, IB und IIA, IIB) besteht, die eine klammerähnliche Struktur mit einem Hohlraum formen, um ATP bzw. ADP zu binden. Die SBD besteht aus einem

Einleitung

β -Faltblatt gefolgt von einer α -helikalen Struktur.⁴² Die NBD und SBD sind über einen hydrophoben Linker verbunden (Abbildung 6 und 7, rot), der die ATPase-Aktivität des Chaperons kontrolliert. In dem ATP-gebundenen Zustand legt sich der flexible Linker in die hydrophobe Furche zwischen den Untereinheiten IA und IIA und bringt dadurch die Chaperondomänen in die räumliche Nähe (Abbildung 7A).⁴⁴ Nach der Hydrolyse von ATP verringert sich die Wechselwirkung zwischen den Bindedomänen, sodass zugleich die Affinität zu einem Substrat erhöht und dieses mit Hilfe der α -Helix gebunden wird (Abbildung 7B). Die Anlagerung eines Faktors wie beispielsweise NEF (*engl. nucleotide exchange factor*) führt zur erneuten Bindung von ATP. Dieser Schritt hat eine räumliche Konformationsänderung der Chaperonuntereinheiten und damit verbundenes Entlassen des reifen Proteins zur Folge (Abbildung 7C).⁴²

Wie bereits zuvor erwähnt regulieren HSPs die Homöostase einer Zelle, unterstützen ihre Proliferation und blockieren den programmierten Zelltod. Maligne Zellen exprimieren mehr HSPs als gesunde Zellen und sind somit vermutlich in der Lage, Resistenzen auszubilden. Untersuchungen haben gezeigt, dass Krebszellen empfindlicher gegenüber apoptotischen Faktoren werden, wenn HSP70 gezielt inhibiert oder runterreguliert wird.⁴⁵ Aus diesem Grund gibt es mittlerweile zahlreiche molekulare Ansätze, um die Aktivität von HSP70 zu kontrollieren.

Apoptozol galt bis vor kurzem als eines der aktivsten HSP70-Inhibitoren (Abbildung 8) mit nanomolaren K_D -Werten gegenüber HSC70 (210 nM) und HSP72 (140 nM).^{42,45} Mit Hilfe eines pull-down-Assays wurde HSC70 als potentielles Target von Apoptozol identifiziert, wobei der exakte Wirkmechanismus nicht geklärt wurde.⁴⁶ Neuerdings konnten Jones und seine Kollegen⁴⁷ keine molekulare Wirkung von Apoptozol gegenüber Hitzeschockproteinen nachweisen. Vielmehr haben sie gezeigt, dass diese lipophile Substanz Aggregate bildet und möglicherweise unspezifisch die Aktivität der Chaperone blockiert.

Die Substanz 2-Phenylacetylenylsulfonamid (PES, auch bekannt als Pifithrin- μ)⁴⁸ (Abbildung 8) wurde ebenfalls mit Hilfe eines pull-down-Experiments als potentieller Inhibitor von HSP70 identifiziert. Proteinkristalluntersuchungen des strukturellen Analogons PET-16 zeigten, dass die Bindestelle im C-terminalen Bereich von HSP70 und DnaK lokalisiert war.⁴⁹ Die inhibitorische Aktivität von PES wurde auch hier nachträglich in Frage gestellt, weil diese Substanz unspezifische Ergebnisse zeigte.⁵⁰ Das synthetische Adenosinanalogen VER-155008 adressiert die ATP-Bindetasche, blockiert erfolgreich die Chaperonaktivität⁴⁵ und induziert sogleich die Degradation von HSP90-Klienten.³⁵ *In-vivo*-Untersuchungen zeigten, dass VER-155008 zu schnell metabolisiert wird und nicht die pharmakologisch relevante Konzentration erreicht.³⁵ Ein weiterer Inhibitor der N-terminalen Domäne ist der allosterisch bindende Ligand MKT-077. Der kationische Farbstoff migriert in die Mitochondrien und inhibiert dort HSP70. In der Klinischen Phase-1 zeigte diese Substanz jedoch irreversible Nierentoxizität.^{45,51}

Einleitung

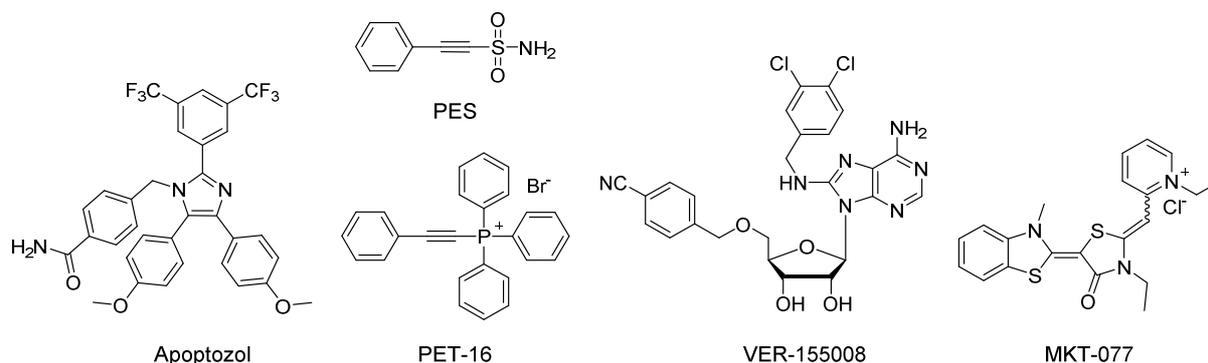


Abbildung 8: Einige Beispiele der bisher bekannten HSP70-Inhibitoren. VER-155008 bindet in der ATP-Bindetasche und blockiert die Chaperonaktivität. Apoptozol und PES zeigen unspezifische Aktivität. MKT-077 durchlief die klinische Phase-1 und zeigte irreversible Nierentoxizität.

Wie die exemplarisch erwähnten Substanzen in der Abbildung 8 adressieren die meisten bisher bekannten HSP70-Inhibitoren entweder die N-terminale NBD oder die C-terminale SBD.⁴⁵ Die ATPase-Aktivität, die unmittelbar die Funktion des HSP70 reguliert, ist unter den Chaperonen einzigartig.^{42,45} Aus diesem Grund bieten sich Nukleotidanaloga⁵² (z.B. VER-155008) als potentielle Inhibitoren an. Es ist jedoch zu beachten, dass zahlreiche Enzyme des Proteoms eine Nukleotidbindetasche aufweisen, sodass eine selektive Inhibition erschwert wird. Im Unterschied hierzu gibt es Inhibitoren, die an die SBD binden (z.B. PET-16) und dadurch die Substratbindung an das Chaperon verhindern sollen.⁴⁹ Aufgrund der promiskuitiven Bindungseigenschaften der SBD zu vielzähligen Polypeptiden⁵³ ist es ebenso herausfordernd, einen gezielt bindenden Inhibitor zu entwickeln. Eine weitere Herausforderung stellt die dynamische Struktur des Proteins dar. Die Konformationsänderung folgt einem allosteren Mechanismus, indem der flexible Linker die Interaktion der Domänen reguliert, was entscheidend für die korrekte Funktionsweise des Chaperons ist.^{44,54} Für die Entwicklung eines Inhibitors bedeutet dies, dass das Chaperon nicht in jedem Konformationszustand einen Liganden, sowohl in der NBD als auch in der SBD, gleich stark bindet. Denn während eines ADP-gebundenen Zustandes ist die Affinität zu einem Substrat erhöht und sinkt rapide nach dem Nukleotidaustausch.⁴⁴

Einleitung

Ein neuartiger Ansatz stellt die Blockade der Interdomain-Oberfläche dar. Jiang et al. haben gezeigt, dass bereits einzelne Mutationen in diesem Bereich entscheidend zur Senkung der Aktivität des Chaperons beitragen.⁵⁵ Im Arbeitskreis Sottriffer wurde anhand des bovinen HSP70-Proteins (Abbildung 9A, PDB-Kennzahl 1YUW⁵⁵) ein virtuelles Screening durchgeführt und dabei die Interface-Oberfläche als eine potentielle Bindestelle für Inhibitoren identifiziert (Abbildung 9B).⁵⁶ Von über 3 Mio. untersuchten Substanzen wurden neun Substanzen auf die biologische Aktivität evaluiert, wobei die Verbindung C066-0757 den niedrigsten EC₅₀-Wert von 0.70 µM zeigte (**1**, Abbildung 9C).

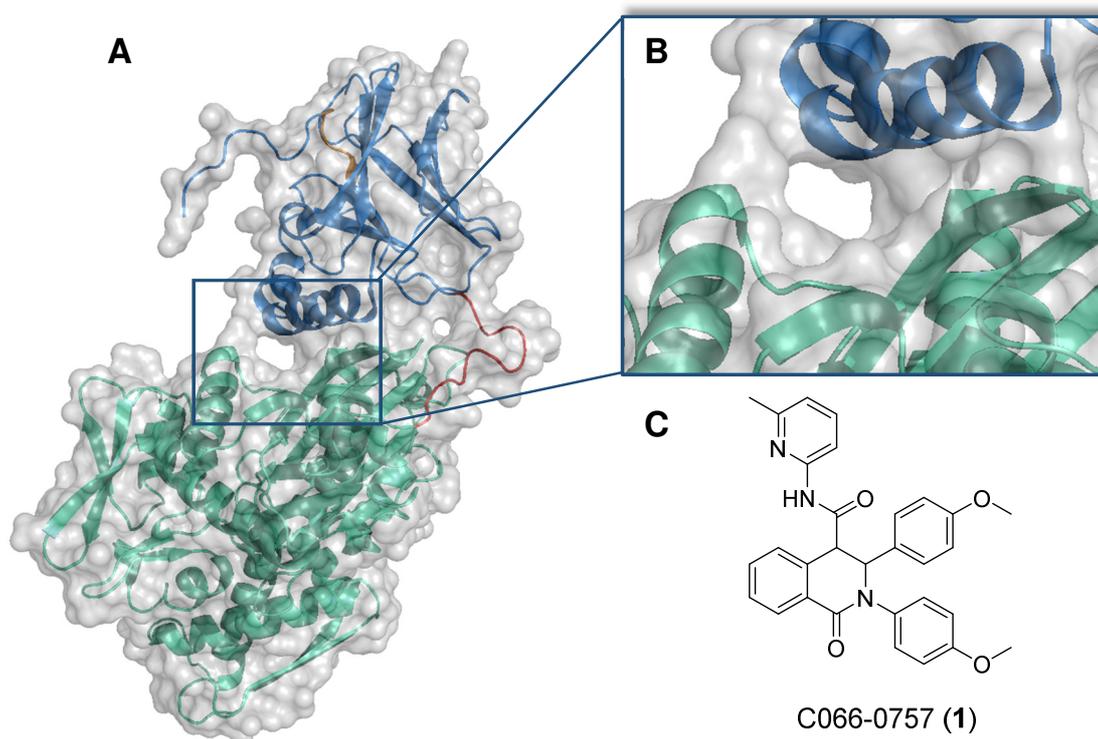


Abbildung 9: **A:** Proteinkristallstruktur des truncierten bovinen HSP70 (NBD in grün, truncierte SBD in grün, Linker in rot) (Proteindatenbank, PDB-Kennzahl 1YUW⁵⁵). **B:** Ein virtuelles Screening zeigte, dass die Oberfläche zwischen den Domänen (blau und grün) eine potentielle Bindestasche für Pharmakophore darstellt. **C:** Die Substanz C066-0757 (**1**) gehörte zu den aktivsten Substanzen der virtuellen Untersuchung und zeigte nach einer biologischen Untersuchung einen EC₅₀-Wert von 0.70 µM.⁵⁶

Beruhend auf dem Screeningergebnis hat A. Hartung im Rahmen seiner Doktorarbeit eine Substanzbibliothek von 3,4-Dihydroisochinolin-1(2H)-on-Derivaten aufgebaut (Abbildung 10). Im Arbeitskreis Chatterjee wurde anschließend ein Zellviabilitäts-Assay durchgeführt und die pharmakologische Aktivität der Substanzen bestimmt, sodass es möglich war, die Struktur-Wirkungs-Beziehungen abzuleiten.⁵⁷ Hierfür wurden MM-INA-6-Zellen mit der zu testenden Substanzen 72 h inkubiert und anschließend der Anteil lebender und apoptotischer Zellen *via* Annexin V-FITC/PI-Anfärbung detektiert. In der Abbildung 10 sind einige Beispiele aus der Bibliothek der Inhibitoren dargestellt. Der Vergleich der Diastereomere **2a** und **2b** zeigt, dass *trans*-Verbindungen wirksamer als *cis*-Verbindungen sind. Die Eliminierung einer phenolischen Methoxygruppe (**2c**) führte zur weiteren Steigerung der

Aktivität. Das Proton der Amidgruppe scheint für die Interaktion mit der Target eine wichtige Rolle zu spielen, da das sekundäre Amid **2e** wirksamer als das tertiäre Amid **2d** ist. Zum Schluss hat sich gezeigt, dass aromatische Amide (**2f-g**) eine Inhibition im nanomolaren Bereich erreichen können. Diese Ergebnisse bekräftigten die virtuelle Bindungsstudie und die Substanz **1** als potentiellen Inhibitor der MM-Zellen.

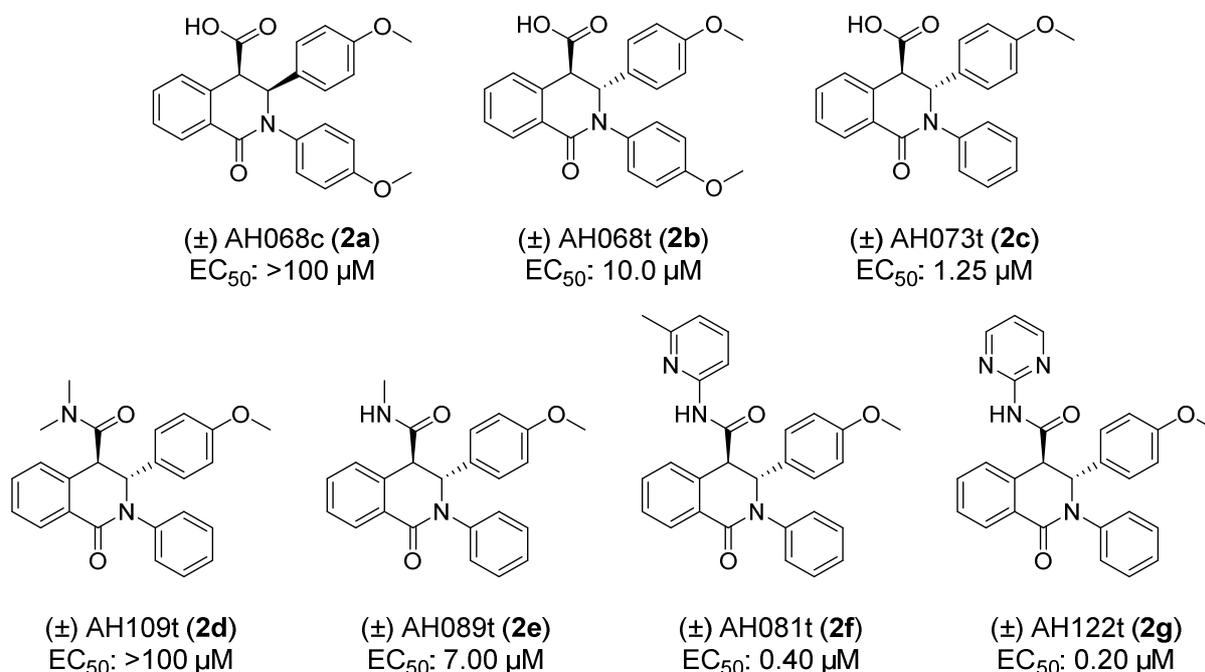


Abbildung 10: Einige Beispiele der Substanzbibliothek der 3,4-Dihydroisochinolin-1(2H)-on-Derivate.⁵⁷ Anhand der EC₅₀-Werte war es möglich, Struktur-Wirkungs-Beziehungen abzuleiten. Hierbei wurde die biologische Aktivität zwischen cis- und trans-Enantiomeren (**2a** und **2b**), zwischen sekundären und tertiären Amiden (**2d** und **2e**), und aliphatischen und aromatischen Amiden (**2e** und **2g**) verglichen.

1.2.2 HSF1 als pharmakologisches Target

Einige der zuvor erwähnten Substanzen (Abbildung 8), aber auch viele weitere Inhibitoren wurden bereits in den klinischen Studien evaluiert. Dabei wurden bei den Probanden wiederkehrend hohe HSP70-Expressionsraten beobachtet. Durch die Aktivierung des Hitzeschockfaktors 1 (HSF1), der an alle HSP-Promoterregionen bindet, sind Zellen in der Lage, sofort auf Stressfaktoren (z.B. Therapeutika) mit Transkription und Synthese zahlreicher neuer HSPs zu reagieren.^{35,58} Untersuchungen haben gezeigt, dass das genetische Ausschalten von HSF1 zur Sensibilisierung der MM-Zellen gegenüber inhibierenden Substanzen führt,^{33,59} sodass der HSF1 als ein potentielles Therapietarget betrachtet werden kann.

HSF1 ist ein 57 kDa großes zytoplasmatisches Protein und gilt als wichtigster Transkriptionsfaktor für die Regulation der Zellhomöostase unter Stressbedingungen.⁶⁰⁻⁶¹ Unter stressfreien Bedingungen bildet HSF1 ein Heterotetramer mit HSP40, 70 und 90 (Abbildung 11).⁶¹ Durch die Einwirkung von extrinsischen Faktoren, wie z.B. therapeutische Wirkstoffe, oder intrinsischen Stressfaktoren, wie z.B. Akkumulation fehlerhafter Proteine, wird HSF1 aus dem Komplex gelöst, trimerisiert und wandert in den Zellkern. Dort kann er an die Hitzeschockelemente (HSE) der HSP-Promoterregionen binden und die Translation von Chaperonen initiieren.⁶¹ Die neu exprimierten Proteine wirken in der Regel sogleich als negative Regulatoren und deaktivieren das HSF1-Trimer. Dieser löst sich anschließend von der DNA, verlässt den Zellkern und wird von den Co-Chaperonen erneut komplexiert. Da in den mutierten Krebszellen viele Proteine überexprimieren bzw. viele Onkogene konstitutiv aktiviert sind, ist auch der reguläre HSF1-Aktivitätszyklus oft gestört und hat höhere HSF1-Werte als in gesunden Gewebezellen zur Folge.⁵⁸

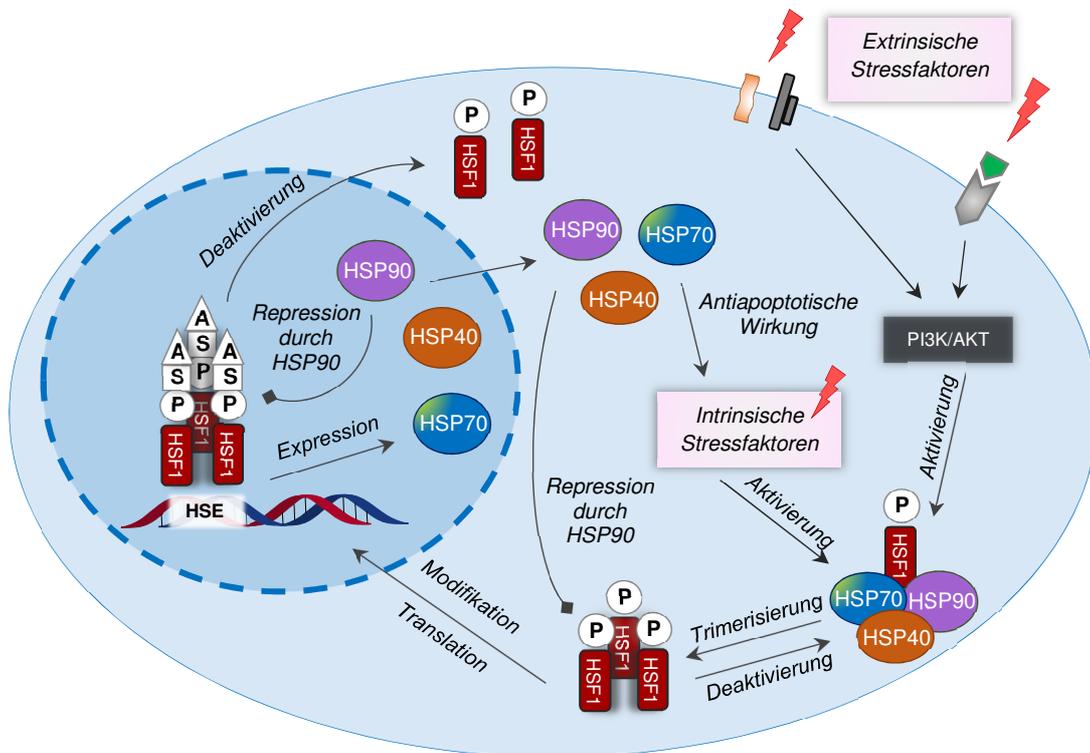


Abbildung 11: Schematische Darstellung des Aktivierungszyklus von HSF1. Inaktives HSF1 verbleibt in einem Komplex mit anderen HSPs. Nach der Aktivierung und posttranslationalen Modifikationen (P=Phosphorylierung, A=Acetylierung, S=SUMOylierung) bindet HSF1 an die HSE-Region und initiiert die Translation neuer HSPs. HSP90 wirkt zugleich als HSF1-Repressor und verhindert weitere Trimerisierung. Abbildung adaptiert von Shah et al.⁶¹ und Calderwood et al.⁵⁸

Einleitung

Zusätzlich zu der Oligomerisierung bzw. Interaktion mit anderen Proteinen durchläuft HSF1 zahlreiche posttranslationale Modifikationen, um vollständig aktiviert zu werden. Dabei handelt es sich um Phosphorylierungen, Acetylierungen und Derivatisierung mit SUMO-Protein (Abbildung 11).⁶¹ Die Modifikationen finden an unterschiedlichen Aminosäuren statt und werden mit aktivierenden Kinasen wie PI3K und mTOR,⁵⁸ aber auch vielen weiteren experimentell in Verbindung gebracht.

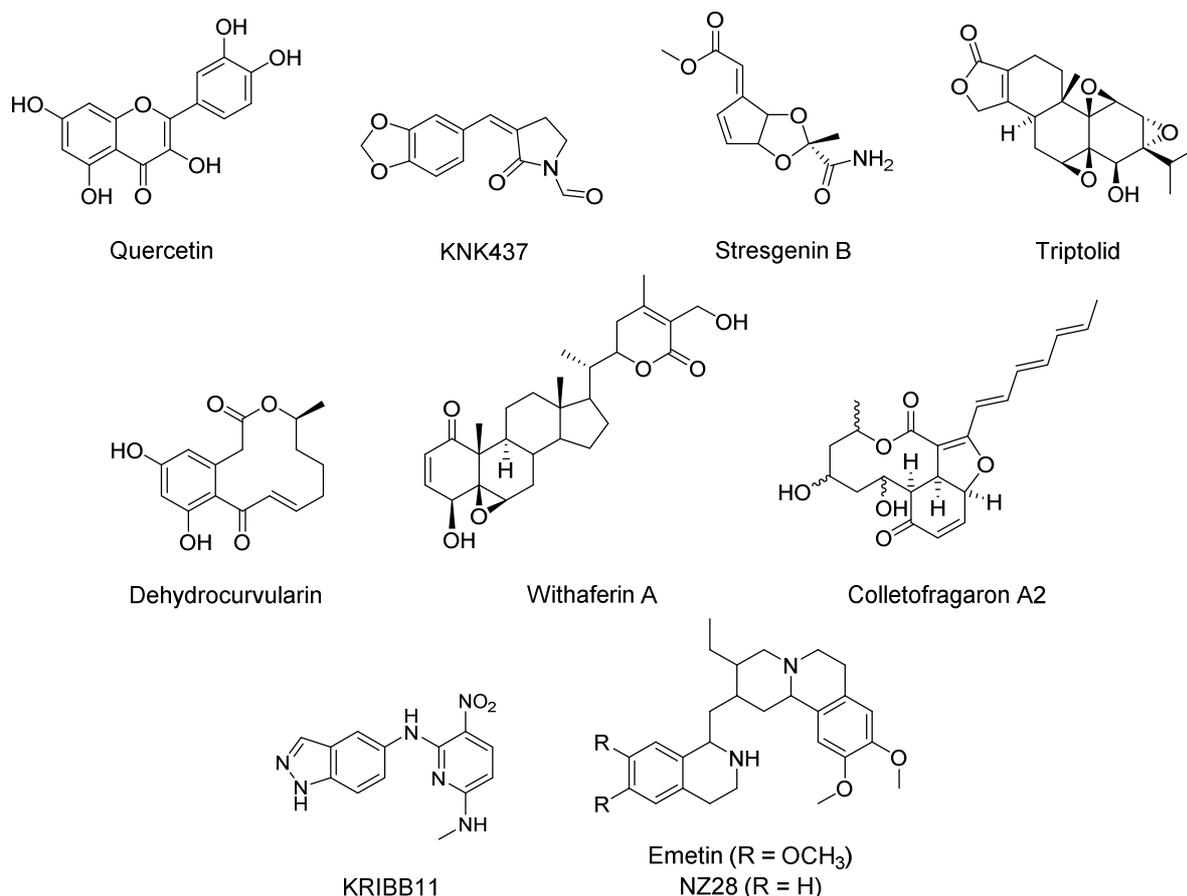


Abbildung 12: Laut dem aktuellen Forschungsstand sind zahlreiche Substanzen bekannt, die in die HSF1-abhängige hitzeschockaktivierte Regulation eingreifen und Inhibitionsaktivität zeigen. Einige sind des natürlichen Ursprungs wie Quercetin, Stresgenin B oder Triptolid. KRIBB11 und NZ28 wurden anhand einer Screeninganalyse aus einer Substanzbibliothek als potentielle Inhibitoren identifiziert. Viele der Substanzen zeigen zu geringe Wirksamkeit in der Anwendung oder der exakte Wirkmechanismus wurde bisher nicht aufgeklärt.

Zahlreiche experimentelle Befunde zeigen, dass HSF1 einen starken Einfluss auf die onkologische Entwicklung der mutierten Zellen ausübt und zur Resistenzentwicklung beiträgt. HSF1 kontrolliert eine Vielzahl zellulärer Prozesse z.B. Proliferation und Metabolismus, womit er ein attraktives pharmakologisches Ziel darstellt.^{59-60,62} Bis heute wurden bereits zahlreiche Substanzen untersucht und als potentielle Inhibitoren der HSF1-vermittelten Aktivierung identifiziert (Abbildung 12).^{60,63} Die anfänglichen Inhibitionsuntersuchungen des HSP-Syntheseweges brachten die Naturstoffe Quercetin⁶⁴, Stresgenin B⁶⁵ und Triptolid⁶⁶ hervor. Während die Anwendung von Quercetin viele Nebenwirkungen verursacht,⁶⁷ zeigt

Einleitung

Stresgenin B eine zu geringe Wirksamkeit. Das Benzylidenlactam KNK437⁶⁸ inhibiert zwar die HSP-Expression, jedoch wurde der genaue Wirkmechanismus bisher nicht geklärt. Der Wirkstoff Triptolid ist bis heute einer der aktivsten Inhibitoren der HSF1-Funktion, indem er den RNA-Polymerase-anhängigen Transkriptionsvorgang stört.^{63,66} Santaga et al.⁶⁹ untersuchten vor wenigen Jahren mehr als 80.000 Substanzen natürlichen und synthetischen Ursprungs. Dabei konnten die aktivsten Substanzen, die in die HSF1-abhängige Stressregulation eingreifen, einigen großen Substanzklassen zugeordnet werden. Beispiele wie Dehydrocurvularin, Withaferin A und Colletofragaron A2 sind in der Abbildung 12 dargestellt.

Yoon et al. identifizierten eine neue Substanz KRIBB11 (Abbildung 12), die nicht nur die HSF1-induzierten Targetproteine wie HSP70 blockiert, sondern direkt an HSF1 bindet, was mittels biotinbasierter Affinitätschromatographie gezeigt wurde.⁷⁰ Ein weiteres Screening von über 20.000 Molekülen brachte NZ28 und dessen Strukturanalogon Emetin (Abbildung 12) hervor.⁶⁷ Diese Substanzen weisen neben geringer Toxizität weitaus höhere inhibitorische Aktivität als beispielsweise Quercetin auf. Weiterhin beschreiben Zaarur und Kollegen,⁶⁷ dass NZ28 und Emetin nicht die transkriptionelle Aktivität des HSF1 beeinträchtigen, sondern vielmehr einen Einfluss auf die Translation der Hitzeschockproteine ausüben. Außerdem führte die Anwendung von NZ28 und Emetin zur Sensibilisierung von Krebszellen gegenüber HSP90- und Proteasominhibitoren.

Das breitgefächerte strukturelle Spektrum bisher beschriebener Inhibitoren der HSF1-vermittelten Stressregulation verdeutlicht, wie herausfordernd HSF1 als ein Target für die Therapie ist. Bei der Entwicklung potentieller Hemmstoffe des Transkriptionsfaktors sollte beachtet werden, dass dieser an die negativ geladene DNA bindet und damit selbst höchst wahrscheinlich große positiv geladene Strukturareale aufzeigt. In diesem Fall wären negativ geladene Liganden eine denkbare Option. Weiterhin ist die Kontaktfläche zu den DNA-Promotorregionen relativ groß, sodass kleine Moleküle eher ungeeignet sind.⁶¹ Zusätzlich wird die Suche nach potentiellen Substanzen dadurch erschwert, dass kein direkter experimenteller Readout möglich ist, sondern der Umweg über die Klienten der HSF1-Regulation genommen wird, z.B. anhand der Runterregulation von HSP72.³³ Nichtsdestotrotz werden immer neue Erfolge in der Inhibition der HSF1-vermittelten Transkription mit Entwicklung neuer Substanzen verzeichnet, sodass dieses Target weiterhin überaus interessant bleibt.⁷¹ Weiterhin zeigen Kombinationen aus Wirkstoffen unterschiedlicher Targets vielversprechende Ergebnisse, indem beispielsweise HSF1-inhibitorische Substanzen die krankhaften Zellen gegen über HSP90-Inhibitoren sensibilisieren, der Resistenzentwicklung entgegenwirken und die Lebenserwartungen der Probanden dadurch erhöhen.⁶¹⁻⁶²

2 Zielsetzung

Die Hitzeschockantwort ist ein hochkonservierter Schutzmechanismus, der die Zellen dazu veranlasst, in Stresssituationen vermehrt sogenannte Hitzeschockproteine (HSPs) zu exprimieren, um dem programmierten Zelltod zu entgehen.⁷² Es wurde nachgewiesen, dass HSP90 in den Zellen des Multiplen Myeloms (MM) überexprimiert wird,¹⁶ und dass die Inhibition von HSP90 zu einer starken HSF1-regulierten Expression von HSP70 führt.^{41,59} Weiterhin haben Untersuchungen gezeigt, dass eine genetische Herunterregulation von HSF1, HSP72 oder HSP73 zur erhöhten Sensibilisierung der MM-Zellen gegenüber inhibierenden HSP90-Substanzen führt.³³ Diese Befunde bestärken die pathogene Rolle des HSF1/HSP70-Systems bei der Erkrankung des Multiplen Myeloms. Trotz moderner Therapieansätze gilt MM bisher als nicht heilbar, da die meisten erkrankten Personen Resistenzen gegen die Wirkstoffe entwickeln oder einen Rückfall nach einer Behandlung erleiden.³² Die Inhibition des HSF1/HSP70-Systems wird daher als ein vielversprechender Ansatz im Kampf gegen diesen Krebs betrachtet und bedarf weiterführender Untersuchungen.

Im Rahmen der Klinischen Forschergruppe 216 (CRU 216) wurde an Multitarget-orientierten Behandlungsmöglichkeiten gegen MM gearbeitet. Ein Forschungsbereich basierte auf dem Ergebnis eines virtuellen Screenings im Arbeitskreis Sottriffer.⁵⁶ Mit Hilfe der Proteinstruktur des bovinen HSP70 wurde festgestellt, dass ein Tetrahydroisochinolinonderivat (**1**, Abbildung 13) einen potentiellen Liganden für die Interface-Oberfläche zwischen den Domänen des Chaperons darstellt. Ausgehend von dem Ergebnis des Screenings baute A. Hartung im Rahmen seiner Doktorarbeit eine Tetrahydroisochinolinon-Bibliothek ((±) **2**, Abbildung 13) auf.⁵⁷ Die Substanzen wurden anschließend auf die inhibitorische Aktivität im Arbeitskreis Chatterjee evaluiert und Struktur-Wirkungs-Beziehungen abgeleitet.

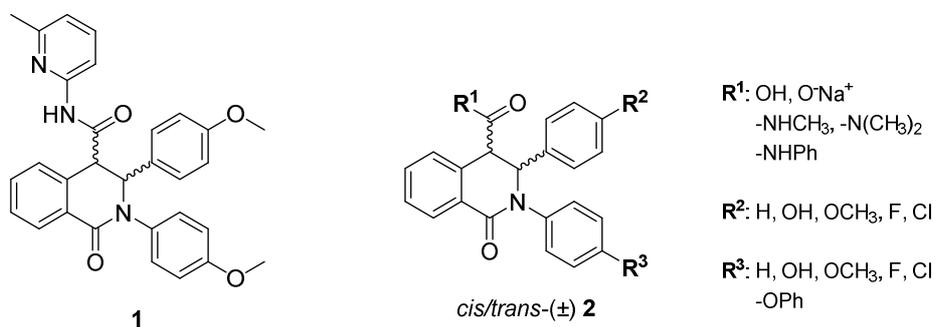


Abbildung 13: Substanz **1** ist das Ergebnis eines virtuellen Screenings anhand der Proteinstruktur des bovinen HSP70. Ausgehend davon wurde eine Tetrahydroisochinolinon-Bibliothek der Substanzderivate (±) **2** aufgebaut.

Zielsetzung

Die vorhandene Substanzbibliothek sollte im Rahmen dieser Arbeit erweitert und evaluiert werden. Um das HSP70 als Target zu bestätigen, war im Rahmen des Forschungsprojektes Durchführung von Affinitätschromatographie im Arbeitskreis A. Schlosser geplant. Hierfür sollten die aktivsten HSP70-Inhibitoren mit Biotin gelabelt werden (Abbildung 14), um die gebundenen Proteine der MM-Zellen mit Hilfe von Streptavidinmatrix zu eluieren und mittels nanoLC-MS/MS zu untersuchen. Die Aufklärung der Proteinkristallstruktur des bovinen HSC70 durch C. Grimm zeigte, dass in der Nähe der vorhergesagten Interface-Oberfläche das Trimethylaminoxid (TMAO) gebunden war. Basierend darauf sollte hier ein TMAO-Hybrid eines Tetrahydroisochinolinons synthetisiert werden (Abbildung 14), um weitere Proteinkristallisationsversuche durchzuführen und die inhibitorische Aktivität zu untersuchen.

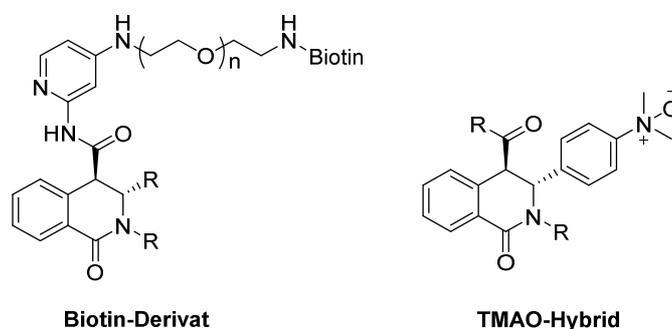


Abbildung 14: Allgemeine Strukturen eines biotinylierten Derivates (links) und eines TMAO-Derivates (rechts).

Der zweite Teil dieser Arbeit soll sich mit der Entwicklung und Evaluation der Inhibitoren von HSF1 beschäftigen. A. Hartung hat eine kleine Bibliothek divers substituierter α -Acylaminocarboxamide (Abbildung 15) unter der Anwendung der Ugi-Multikomponentenreaktion aufgebaut.⁵⁷ Einige dieser Substanzen zeigten hohe Aktivitätswerte gegenüber der HSF1-vermittelten HSP72-Regulation. Basierend auf diesen Ergebnissen sollte die Substanzbibliothek erweitert werden. Um HSF1 als Target zu untersuchen, sollte auch hier die Affinitätschromatographie mit Biotin-markierten Substanzen durchgeführt werden.

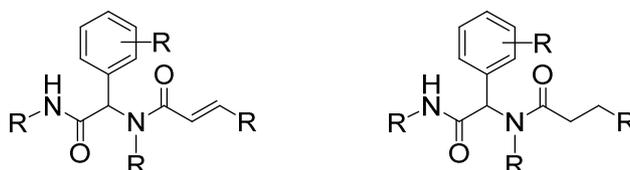
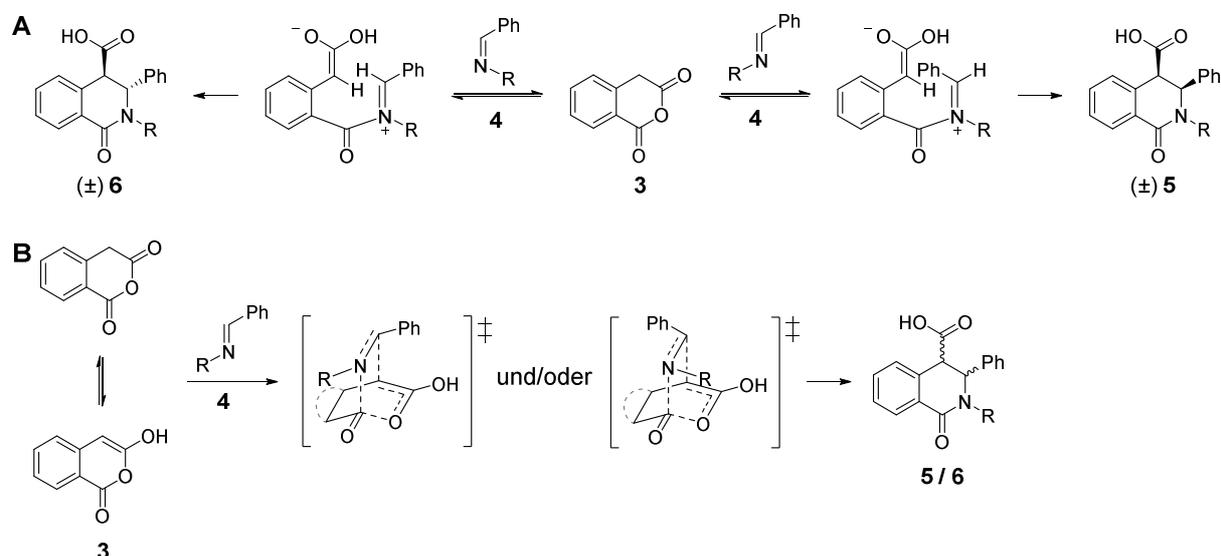


Abbildung 15: Allgemeine Struktur der α -Acylaminocarboxamide mit (links) und ohne (rechts) α,β -gesättigter Carbonylgruppe.

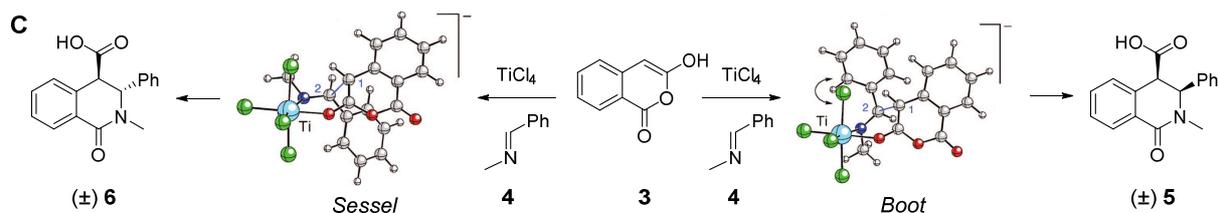
3 Entwicklung der HSP70-Inhibitoren

3.1 Erweiterung der Substanzbibliothek

Eine detaillierte Analyse der Struktur-Wirkungs-Beziehungen ist nur mit Hilfe vielfältiger Substanzderivate möglich, sodass im Rahmen dieser Arbeit die Bibliothek der Dihydroisochinolinone vergrößert wurde. Untersuchungen der stereoselektiven Kondensationsreaktion zwischen dem Homophthalsäureanhydrid (**3**) (Schema 1) und einer Schiffschen Base (**4**) ist Gegenstand vielzähliger Publikationen.⁷³⁻⁷⁶ Cushman et al.⁷³ schlussfolgerten, dass der Reaktionsverlauf von der Konfiguration der beteiligten Imine abhängt. *E*-Imine führen zu einem *cis*-Produkt ((±) **5**), während im Fall von *Z*-Iminen *trans*-Produkte ((±) **6**) gebildet werden (Schema 1A). Theoretische Berechnungen von Kaneti et al.⁷⁴ haben gezeigt, dass die Reaktion eines Anhydrids und einer Schiffschen Base über eine enolische Form verläuft. Dabei laufen der nukleophile Angriff des Stickstoffs an der Carbonylgruppe und die Abspaltung der Carboxylgruppe zeitgleich ab, sodass die *cis*-Form begünstigt wird (Schema 1B). Durch Zugabe von TiCl₄ und DIPEA gelang es Vara et al.⁷⁵ die Produktbildung stereoselektiv zu kontrollieren, sodass meist das *trans*-Derivat ((±) **6**) erhalten wurde. Nachdem das Enol durch die nicht nukleophile Base deprotoniert wird, bindet es TiCl₄, sodass sich im nächsten Schritt die Schiffsche Base anlagern kann. In diesem Fall werden zwei Übergangszustände unterschieden, die zu unterschiedlichen Produkten führen. Nach der stabileren Sesselkonformation entsteht das *trans*-Isomer, wohingegen der bootförmige Übergangszustand zu *cis*-Isomeren führt (Schema 1C). Unabhängig von dem Reaktionsmechanismus ist zu beachten, dass die *cis*-Isoform das kinetische Reaktionsprodukt darstellt, welches zur Epimerisierung in die thermodynamisch stabilere *trans*-Form neigt.⁷⁶

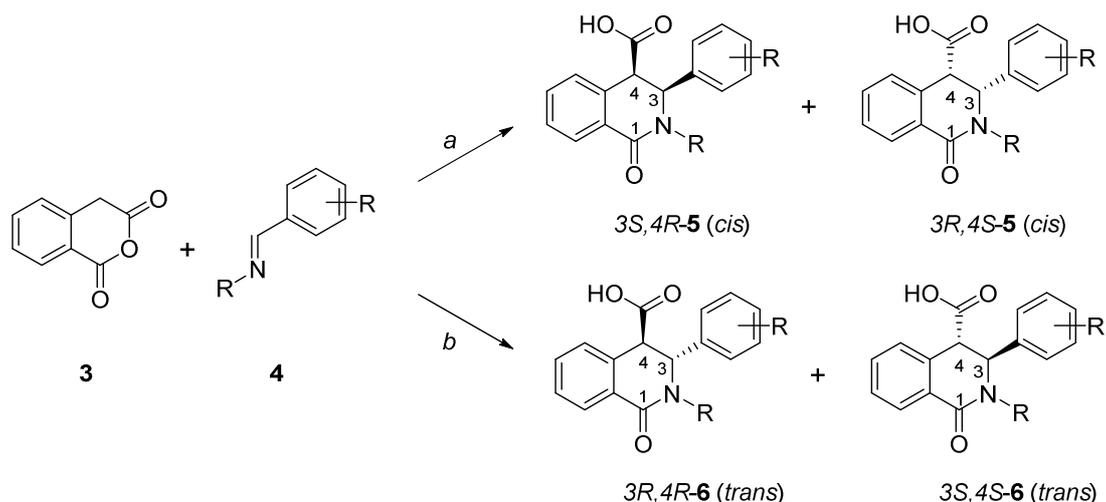


Ergebnisse und Diskussion



Schema 1: Stereochemische Untersuchungen der Kondensationsreaktion zwischen Homophthalsäureanhydrid **3** und einer Schiffschen Base **4**. **A:** Nach Cushman et al. ist die Bildung der Enantiomere von der Konfiguration der Imine (*E*- bzw. *Z*-Form) abhängig.⁷³ **B:** Die theoretischen Berechnungen von Kaneti et al. zeigten, dass die Reaktion über einen Enol-Übergangszustand verläuft.⁷⁴ **C:** Durch Zusatz der Lewissäure TiCl_4 verläuft die Reaktion über zwei Enolat-Übergangszustände. Die stabilere Sesselform führt zur Bildung von *trans*-Isomeren, während nach dem bootförmigen Übergangszustand die *cis*-Isomere entstehen. Die Kristallstrukturen wurden von Vara et al. adaptiert.⁷⁵

A. Hartung wendete zwei stereospezifische Synthesen zur Herstellung von *cis*- bzw. *trans*-Isochinolinoncarbonsäuren (Schema 2) an.⁵⁷ Die Umsetzung des Homophthalsäureanhydrids **3** und eines Aldiminis **4** in CHCl_3 bei RT führte hauptsächlich zum Racemat der *cis*-Enantiomere (\pm) **5**.⁷⁷ Durch den zusätzlichen Einsatz von TiCl_4 als Lewissäure und Diisopropylethylamin (DIPEA) als Base war es möglich, den Reaktionsverlauf stereoselektiv zu den *trans*-Enantiomere (\pm) **6** zu steuern.⁷⁵



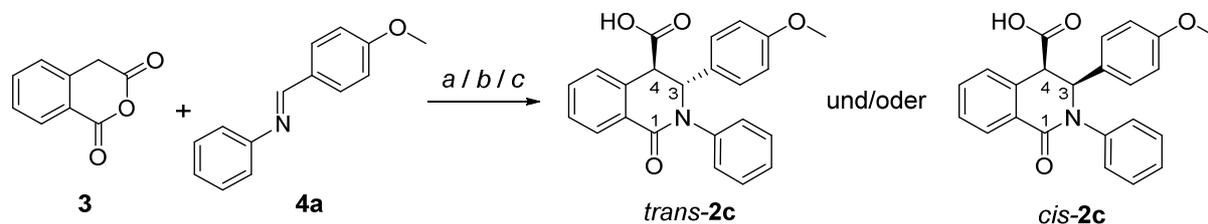
Schema 2: Zwei unterschiedliche Ansätze zur stereoselektiven Synthese von *cis*- (\pm) **5** bzw. *trans*-3,4-Dihydroisochinolin-1(2*H*)-onen (\pm) **6** nach Cushman et al. (**a:** CHCl_3 , RT)⁷⁷ bzw. Vara et al. (**b:** TiCl_4 , DIPEA, Argon, 0 °C-RT)⁷⁵ ausgehend von Homophthalsäureanhydrid **3** und Iminderivaten **4**.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Substanzbibliothek um weitere 3,4-Dihydroisochinolinonsäuren und deren Amidderivate erweitert. Da die bisherige Evaluierung der Substanzen die Aktivität der *trans*-Enantiomere bestätigte (Abbildung 10, Kapitel 1.2.1), wurde der Syntheseablauf soweit optimiert, dass ausschließlich die aktiven Isomere erhalten wurden. Die beschriebenen stereoselektiven Reaktionsbedingungen wurden anfangs an einem bereits bekannten Molekül (\pm) AH073t (**2c**, Abbildung 10) getestet (Tabelle 1). Ansätze 1-4 zeigen die Reaktionen in Gegenwart von TiCl_4 und DIPEA. Das Homophthalsäureanhydrid **3** wurde jeweils im Lösungsmittel unter Argonatmosphäre gelöst und auf 0 °C gekühlt. Nach der langsamen Zugabe von TiCl_4 und DIPEA wurde das zuvor in

Lösungsmittel gelöste Imin **4a** hinzuge tropft und das Reaktionsgemisch bei RT umgesetzt. Das erhaltene Rohprodukt wurde direkt mittels Schwerkraftsäulen chromatographie (Normalphase) gereinigt und das gewünschte Produkt meistens als Mischung der diastereomeren *cis*- ((±) **5**) und *trans*-Carbonsäuren ((±) **6**) in unterschiedlichen Verhältnissen isoliert (Tabelle 1). Cushman et al.⁷⁷ beobachtete, dass die Umwandlung der *cis*-3,4-Dihydroisochinolinone in die thermodynamisch stabilere *trans*-Form in Gegenwart von Essigsäure unter Wärmezufuhr verläuft. Anhand dieser Beschreibung wurde **3** und **4a** direkt in konzentrierter Essigsäure unter Rückfluss umgesetzt (Ansatz 5, 6). Doch auch hier wurde jeweils eine Mischung der Diastereomere erhalten. Haimova et al.⁷⁸ berichteten über eine stereoselektive Synthese von 3,4-Dihydroisochinolin-1(2*H*)-onen durch Kondensation von **3** und eines Imins und einer anschließenden basischen Aufarbeitung. Ansatz 7 (Tabelle 1) zeigt die erweiterte Synthesemethode, indem die Kondensation erst in konzentrierter Essigsäure unter Rückfluss durchgeführt und das Rohprodukt anschließend in Gegenwart von 8 M NaOH-Lösung bei RT gerührt wurde, sodass die Isolierung des reinen *trans*-Carbonsäurederivates AH073t (**2c**) schließlich gelang.

Tabelle 1: Reaktionsbedingungen zur stereoselektiven Synthese von *trans*-3,4-Dihydroisochinolinon AH073t (**2c**) ausgehend von Homophthalsäureanhydrid **3** und *N*-(4-Methoxybenzyliden)anilin **4a**.

Reaktionsbedingungen: ^a Anhydrid (1.0 equiv.), Imin (1.3-1.5 equiv.), CH₂Cl₂, Argonatmosphäre, 0 °C-RT, 3-20 h; ^b Anhydrid (1.0 equiv.), Imin (1.0 equiv.), Rühren unter Rückfluss, 3-7 h; ^c Anhydrid (1.0 equiv.), Imin (1.5 equiv.), Rühren unter Rückfluss, 15 h; EtOH, 8 M NaOH-Lösung, RT, 1-20 h; ^d Verhältnis der Diastereomere wurde mittels ¹H-NMR bestimmt; ^e Ausbeuten beziehen sich auf das Gesamtprodukt.



| Ansatz | Reaktionsbedingungen | Produkt ^d | Ausbeute [%] ^e |
|--------|---|---------------------------------|---------------------------|
| 1 | TiCl ₄ (1.0 equiv.), DIPEA (1.0 equiv.) ^a | <i>cis</i> / <i>trans</i> 1.3/1 | 15 |
| 2 | TiCl ₄ (1.0 equiv.), DIPEA (1.0 equiv.) ^a | <i>cis</i> | 15 |
| 3 | TiCl ₄ (1.1 equiv.), DIPEA (1.0 equiv.) ^a | <i>cis</i> / <i>trans</i> 1.8/1 | 41 |
| 4 | TiCl ₄ (1.3 equiv.), DIPEA (1.0 equiv.) ^a | <i>cis</i> / <i>trans</i> 1/1 | 56 |
| 5 | Konz. HOAc, 130 °C ^b | <i>cis</i> / <i>trans</i> 1.3/1 | 56 |
| 6 | Konz. HOAc, 140 °C ^b | <i>cis</i> / <i>trans</i> 1/1 | 56 |
| 7 | Konz. HOAc, 140 °C; 8 M NaOH ^c | <i>trans</i> | 77 |

Die $^1\text{H-NMR}$ -Untersuchungen aller Derivate haben ergeben, dass die *trans*-3,4-Dihydroisochinolinonverbindungen wie (\pm) **6** eine kleinere 3J -Kopplungskonstante zwischen dem Protonen H-3 und H-4 von ca. 1.5 Hz aufweisen, während sie bei *cis*-Verbindungen (\pm) **5** bei ca. 6.0 Hz. Zum einen decken sich diese Befunde mit den beschriebenen Beobachtungen von Cushman et al.⁷⁷ Weiterhin war die Zuordnung der jeweiligen Diastereomere mittels der Karplus-Beziehung und der energieminierten Molekülmodelle möglich. Beispielsweise weist das *trans*-3*S*,4*S*-Isomers einen Torsionswinkel von $\phi = 74^\circ$ auf (Abbildung 16), was einer 3J -Kopplungskonstante von 0-2 Hz entspricht. Während das *cis*-3*S*,4*R*-Isomer mit dem Torsionswinkel von $\phi = 40^\circ$ eine größere 3J -Kopplungskonstante von 5-9 Hz zeigen kann.

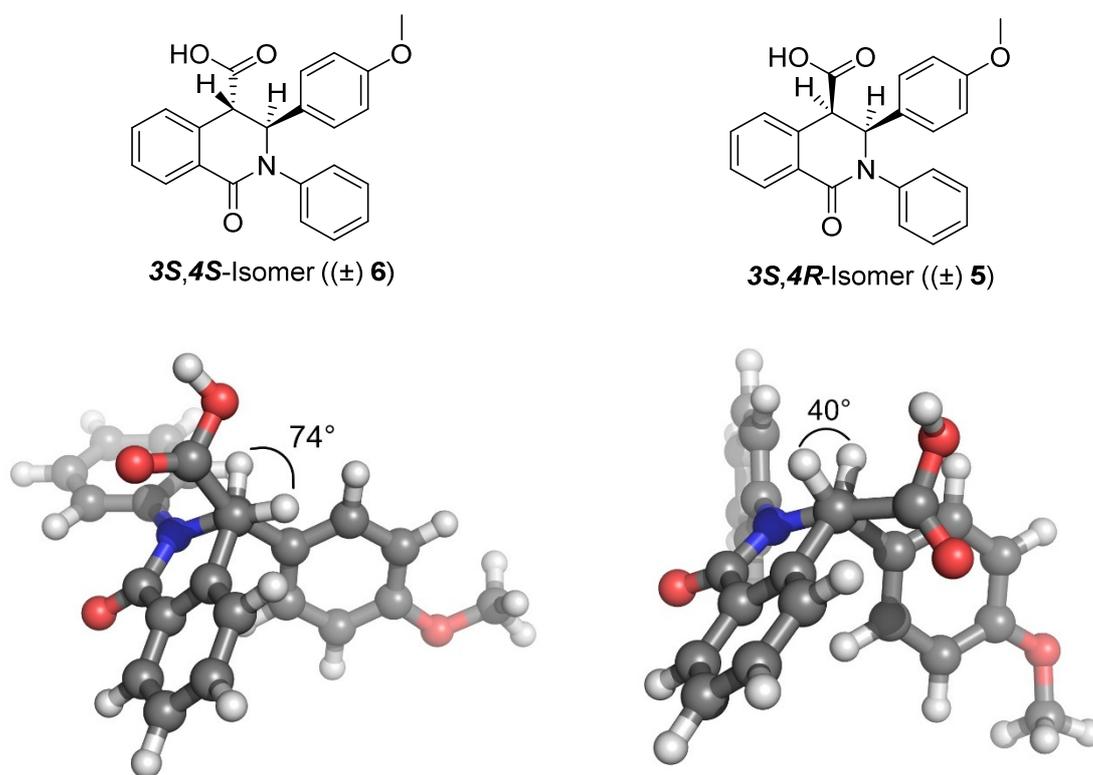
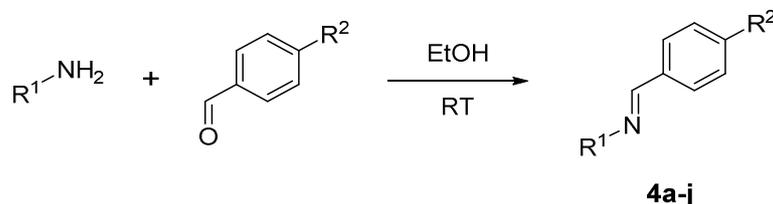


Abbildung 16: Strukturformeln der *trans*-3*S*,4*S*- und *cis*-3*S*,4*R*-3,4-Dihydroisochinolinon-Derivate und deren Molekülmodelle mit dem Torsionswinkel ϕ zwischen den Protonen H-3 und H-4. Die Kohlenstoffe sind in grau, Sauerstoffe in rot, Stickstoffe in blau und Wasserstoffe in weiß gezeigt.

Ergebnisse und Diskussion

Zur Erweiterung der Bibliothek der 3,4-Dihydroisochinolinone wurde eine Reihe an Aldiminen **4a-j** hergestellt (Tabelle 2). Hierbei reagierten ein Aldehyd und ein Amin in EtOH bei RT in guten Ausbeuten zwischen 60-97 %.

Tabelle 2: Übersicht der Iminderivate **4a-j**, die aus dem jeweiligen Amin und Aldehyd synthetisiert wurden. ^a Die Iminderivate sind literaturbekannt.



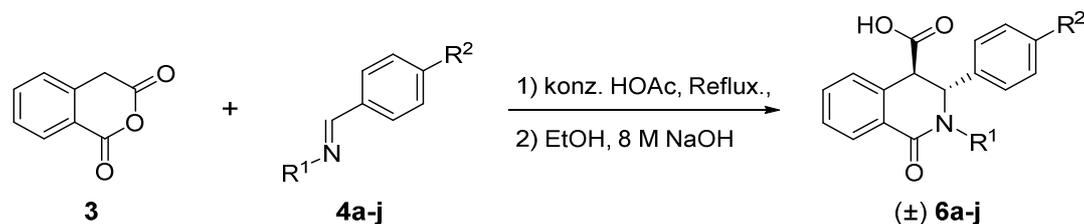
| Produkt | R ¹ | R ² | Ausbeute [%] |
|-----------------------|--------------------------|----------------------|--------------|
| 4a^a | Ph | 4-OMe | 94 |
| 4b | Ph | 4-OCF ₃ | 97 |
| 4c^a | Ph | 4-Br | 60 |
| 4d | Ph | 4-I | 97 |
| 4e^a | Ph | 4-NO ₂ | 77 |
| 4f^a | Ph | 4-N(Me) ₂ | 83 |
| 4g^a | 4-N(Me) ₂ -Ph | H | 82 |
| 4h | Allyl | 4-OMe | 93 |
| 4i | c-Propyl | 4-OMe | 89 |
| 4j | Ph | 4-(2-Bromoethoxy) | 94 |

3.1.1 Synthese der *trans*-3,4-Dihydroisochinolin-1(2*H*)-on-carbonsäuren

Die Synthese neuer *trans*-3,4-Dihydroisochinolin-1(2*H*)-on-carbonsäurederivate (\pm) **6a-j** erfolgte nach den optimierten Synthesebedingungen (Tabelle 1, Ansatz 7). Das jeweilige Iminderivat **4a-j** und das Homophthalsäureanhydrid **3** rührten in konzentrierter Essigsäure für 2-34 h unter Rückfluss. Nachdem das Rohprodukt erst mittels Schwerkräftsäulenchromatographie isoliert wurde, wurde es in EtOH gelöst und in Gegenwart von 8 M NaOH-Lösung für weitere 2-22 h bei RT gerührt und durch Extraktion in Ausbeuten zwischen 32-77 % erhalten (Tabelle 3). Die Verbindung **6f** stellt eine Ausnahme dar und wurde nach Yadav et al.⁷⁹ mit Hilfe einer ionischen Flüssigkeit [bmim]BF₄ hergestellt. Darauf wird im Detail im Kapitel 3.5 eingegangen.

Ergebnisse und Diskussion

Tabelle 3: Übersicht der *trans*-3,4-Dihydroisochinolin-1(2*H*)-on-carbonsäuren (\pm) **6a-j**. Die Substanzen wurden nach der optimierten Synthesemethode (Tabelle 1, Ansatz 7) hergestellt. Eine Ausnahme stellt **6f** dar: ^a [bmim]BF₄, 24 h, RT; H₂O, 8 M NaOH, 45 min.⁷⁹



| Produkt | Edukt | R ¹ | R ² | Ausbeute [%] | EC ₅₀ [μM] |
|------------------------|-----------|--------------------------|----------------------|----------------|---|
| (±) 6a (AH203) | 4a | Ph | 4-OMe | 77 | 1.52 (<i>R,R</i>) / > 50 (<i>S,S</i>) |
| (±) 6b (AH417) | 4b | Ph | 4-OCF ₃ | 65 | 0.85 |
| (±) 6c (AHFG06) | 4c | Ph | 4-Br | 55 | 0.17 |
| (±) 6d (AH316) | 4d | Ph | 4-I | 55 | > 50 |
| (±) 6e (AH423) | 4e | Ph | 4-NO ₂ | 70 | 10.8 |
| (±) 6f (AHFG19) | 4f | Ph | 4-N(Me) ₂ | 6 ^a | 1.10 |
| (±) 6g (AHLL04) | 4g | 4-N(Me) ₂ -Ph | H | 32 | > 50 |
| (±) 6h (AHLL08) | 4h | Allyl | 4-OMe | 62 | > 100 |
| (±) 6i (AHLL07) | 4i | <i>c</i> -Propyl | 4-OMe | 60 | > 100 |
| (±) 6j (AH463) | 4j | Ph | 4-(2-Bromoethoxy) | 65 | 0.18 |

3.1.2 Biologische Evaluierung der *trans*-3,4-Dihydroisochinolin-1(2*H*)-on-carbonsäuren

Die pharmakologische Aktivität der 3,4-Dihydroisochinolinonderivate wurde im Arbeitskreis Chatterjee mit Hilfe eines Zellviabilitäts-Assays untersucht. Hierbei wurden MM-INA-6-Zellen mit den zu testenden Substanzen 72 h inkubiert und anschließend der Anteil lebender und apoptotischer Zellen *via* Annexin V-FITC/PI-Anfärbung detektiert. Eine der aktivsten racemischen Carbonsäureverbindungen aus der bereits bestehenden Bibliothek stellt AH073t (**2c**, Abbildung 10) mit einem EC₅₀ = 1.30 μM dar. An dieser Stelle sei vorausgegriffen, dass die Enantiomere von (\pm) **6a** mit Hilfe einer chiralen Methode getrennt und einzeln auf die inhibitorische Aktivität untersucht wurden (siehe Kapitel 3.2). Das reine Isomer *3R,4R*-**6a** zeigte einen vergleichbaren EC₅₀-Wert von 1.52 μM, wobei hier eine höhere Aktivität aufgrund des getrennten nicht aktiven *3S,4S*-Derivates zu erwarten war. Da es sich bei dem Testsystem um lebende Zellen handelt, kann es zu schwankenden Testresultaten durch Verwendung von z.B. einer neuen Tochterzelllinie kommen. Die essentielle Erkenntnis an dieser Stelle ist, dass das *3R,4R*-Enantiomer im Gegensatz zum *3S,4S*-Derivat biologische Aktivität gezeigt hat.

Das Derivat (\pm) **6b** unterscheidet sich von der Leitstruktur AH073t durch die phenolische Trifluormethoxygruppe, die einen Wasserstoffbrückenakzeptor mit einem größeren effektiven van der Waals-Radius als die Methoxygruppe ($r_V(\text{CH}_3) = 1.80 \text{ \AA}$, $r_V(\text{CF}_3) = 2.20 \text{ \AA}$)⁸⁰ darstellt. Dieser sterische Aspekt hatte einen geringfügig positiven Einfluss auf die Aktivität von (\pm) **6b**, da ein EC_{50} -Wert von $0.85 \mu\text{M}$ bestimmt wurde. Das Derivat (\pm) **6f** mit einer basischen Dimethylamino-Seitengruppe in der Position R^2 zeigte ebenfalls eine vergleichbare biologische Aktivität von $1.10 \mu\text{M}$ zu der Leitstruktur AH073t. Im Fall der Verbindung (\pm) **6g** wurde der $\text{N}(\text{Me})_2$ -Substituent an dem phenolischen Rest R^1 eingefügt, was zum kompletten Verlust der Aktivität führte. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass ein Wasserstoffbrückenakzeptor in der *para*-Position R^2 für die Interaktion zum Target essentiell, während er in der Position R^1 hindern ist. Die Einführung einer elektronenziehenden Nitrogruppe in der *para*-Position R^2 der Verbindung (\pm) **6e** führte ebenfalls nicht zu Verbesserung der Aktivität. Die Untersuchung der Derivate mit aliphatischen Resten in der Position R^1 (\pm) **6h** und (\pm) **6i** zeigte weiterhin sehr deutlich, dass der Phenylrest an dieser Stelle notwendig ist. Hierbei kann es sich beispielsweise um *π - π* -Interaktionen zum Target handeln.

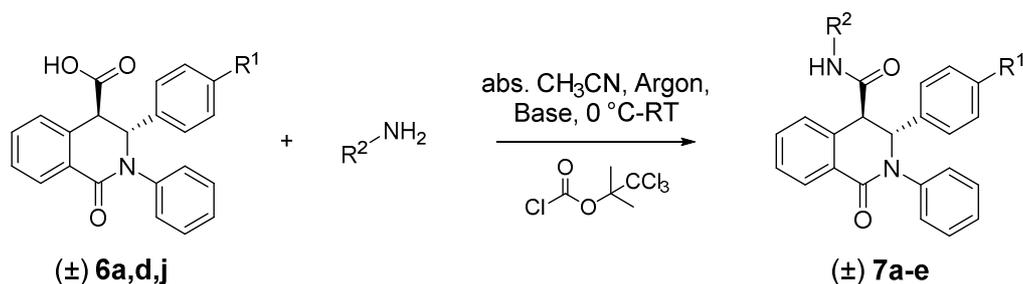
Einen ungewöhnlichen Unterschied zeigten die Derivate (\pm) **6c** und (\pm) **6d**, die jeweils einen phenolischen Halogensubstituenten in der Position R^2 aufweisen. Während das Bromderivat (\pm) **6c** mit einem EC_{50} -Wert von $0.17 \mu\text{M}$ zu den aktivsten Verbindungen der Substanzbibliothek gehört, wurde für die iodierter Carbonsäure (\pm) **6d** keine Aktivität festgestellt. Weiterhin zeigt die Carbonsäure (\pm) **6j** eine vergleichbare biologische Aktivität wie (\pm) **6c** mit einem EC_{50} -Wert von $0.18 \mu\text{M}$ und gehört somit ebenfalls zu den aktivsten Inhibitoren. (\pm) **6j** stellt dabei ein strukturelles Hybrid der Leitstruktur AH073t mit einem Wasserstoffbrückenakzeptor in der phenolischen *para*-Position R^2 und dem Bromsubstituenten an einem kurzen aliphatischen Linker in Anlehnung an die Verbindung (\pm) **6c** dar.

3.1.3 Synthese der *trans*-3,4-Dihydroisochinolin-1(2*H*)-on-carbonsäureamide

Die Umsetzung der racemischen Carbonsäuren (\pm) **6a,d,j** erfolgte mit Hilfe einer Base (NEt_3 oder DIPEA) und des 2,2,2-Trichlor-1,1-dimethylethylchlorformiats zu den *trans*-Amidderivaten (\pm) **7a-e**, die in Ausbeuten zwischen 23-58 % erhalten wurden (Tabelle 4).⁵⁷ Die Verbindung (\pm) **7a** stellt mit einem EC_{50} -Wert im nanomolaren Bereich eine der aktivsten Substanzen aus der vorherigen Arbeit dar und fungiert als inhibitorische Referenzsubstanz. Die Verbindungen (\pm) **7b** und (\pm) **7c** stellten Vorstufen für die Buchwald-Hartwig-Kreuzkupplungsreaktion der biotinylierten Liganden für die Affinitätschromatographie (Kapitel 3.7) dar. Ebenso wurde mit Hilfe von (\pm) **7e** ein Ligand für die Untersuchung mittels Affinitätschromatographie hergestellt (Kapitel 3.7). Die Verbindung (\pm) **7d** fungierte als Vorstufe zur Synthese eines Radioaktivliganden für den Szintillationsnähennachweis (Kapitel 3.6).

Ergebnisse und Diskussion

Tabelle 4: Übersicht der synthetisierten Isochinolinoncarbonsäureamide (\pm) **7a-e**. Die in abs. CH_3CN gelöste Carbonsäure wurde erst durch die Base und das Formiat aktiviert und anschließend durch den nukleophilen Angriff des jeweiligenamins umgesetzt.



| Produkt | Edukt | R ¹ | R ² | Ausbeute [%] | EC ₅₀ [μM] |
|------------------------------|---------------------|-------------------|----------------|--------------|------------------------------------|
| (\pm) 7a (AH122t) | (\pm) 6a | 4-OMe | | 23 | 0.20 |
| (\pm) 7b (AH313) | (\pm) 6a | 4-OMe | | 34 | 0.79 |
| (\pm) 7c (AH448) | (\pm) 6a | 4-OMe | | 43 | 0.47 |
| (\pm) 7d (AHLL13) | (\pm) 6d | 4-I | | 44 | 0.03 |
| (\pm) 7e (AH468) | (\pm) 6j | 4-(2-Bromoethoxy) | | 58 | 43.7 |

3.1.4 Biologische Evaluierung der *trans*-3,4-Dihydroisochinolin-1(2*H*)-on-carbonsäureamide

Die pharmakologische Analyse der Amidverbindungen erfolgte nach dem bereits beschriebenen Prinzip im Arbeitskreis Chatterjee. Die Substitution der aromatischen Amidreste mit einem Halogenid hatte keine essentielle Auswirkung auf die biologische Aktivität, da die Derivate (\pm) **7b** und (\pm) **7c** vergleichbare EC₅₀-Werte wie die Leitstruktur AH122t ((\pm) **7a**) zeigten. Das bedeutet, dass eine geringfügige räumliche Erweiterung der Amidgruppen die Interaktion zum Target nicht stört. Die aromatische Amidierung einer der aktivsten Carbonsäuren (\pm) **6j** (EC₅₀ = 0.18 μM) führte gegen die Erwartung zum Verlust der inhibitorischen Aktivität des Amids (\pm) **7e**. Im Gegensatz hierzu führte die Amidierung der nicht aktiven iodierten Carbonsäure (\pm) **6d** zur Isolierung der bisher aktivsten Verbindung (\pm) **7e**, deren biologische Aktivität mit einem EC₅₀-Wert von 0.03 μM sechsmal höher als die der Leitstruktur AH122t ist. Zur Aufklärung dieses Verhaltens müssen weitere Substitutionsmuster und -kombinationen untersucht werden.

3.2 Untersuchung der enantiospezifischen Aktivität

Die 3,4-Dihydroisochinolin-1(2*H*)-on-Verbindungen weisen zwei Stereozentren an den Kohlenstoffen C-3 und C-4 auf, sodass insgesamt vier Stereoisomere nebeneinander vorliegen können. Vorhergehende Untersuchungen haben bereits gezeigt, dass die racemische *cis*-Verbindungen keine biologische Aktivität gegenüber MM-INA-6-Zellen aufweisen (Abbildung 10).⁵⁷ Um die spezifische Aktivität der jeweiligen *trans*-Enantiomere (*3R,4R* und *3S,4S*) zu untersuchen, wurden in der Arbeit von A. Hartung⁵⁷ zwei Amidverbindungen mittels einer HPLC-Methode unter der Verwendung einer chiral modifizierten Säule getrennt. Die anschließende Untersuchung offenbarte eine höhere Aktivität des *3R,4R*-Derivats, was bedeutet, dass von insgesamt vier diastereomeren Verbindungen nur ein Isomer pharmakologische Wirkung an MM-Zellen aufweist.

Aufgrund der geringen Löslichkeit der Carbonsäureamide in den gängigen chromatographischen Elutionsmitteln (max. 1 mg/mL⁵⁷) wurde im Rahmen dieser Arbeit die Enantiomerentrennung der aktivsten Carbonsäure (\pm) **6a** (siehe AH073t (**2c**)) durchgeführt, die als Vorstufe für weitere Syntheseschritte zu enantiomerenreinen Amidverbindungen fungieren sollte. Zur Methodenentwicklung wurde eine analytische HPLC-Säule mit einer Polysachharid-modifizierten Matrix genutzt. Als mobile Phase wurden zuerst die gängigen Elutionsmittel wie H₂O und CH₃OH (Tabelle 5, Ansatz 1, 2) getestet, jedoch wurde nur eine geringe Auflösung erreicht. Die Verwendung von *iso*-PrOH als Elutionsmittel führte zur verbesserten Trennung (Ansatz 3). Letztlich wurde mit einem Elutionssystem aus CH₃OH und *iso*-PrOH mit Ameisensäure als Additiv eine zufriedenstellende Auflösung erreicht (Ansätze 4-6). Die Fließgeschwindigkeit durfte hierbei 0.7 mL/min nicht überschreiten, um aufgrund der hohen Fließmittelviskosität von *iso*-PrOH einen Überdruck zu vermeiden. In den Ansätzen 5 und 6 wurde zwar eine höhere chromatographische Auflösung erreicht, jedoch wurden die Parameter im Ansatz 4 aufgrund geringerer Laufzeit und damit einem reduzierten Elutionsmittelverbrauch für die präparative Trennung verwendet. Hierfür wurden sie mit einem präparativen Skalierungsfaktor $f_s = 21.2$ angepasst, der wie folgt bestimmt wurde, wobei d_{pr} der Durchmesser der präparativen HPLC-Säule, und d_{an} der Durchmesser der analytischen Säule ist:

$$f_s = \frac{d_{pr}^2}{d_{an}^2}$$

Die chromatographische Auflösung R_S wurde wie folgt bestimmt, wobei $w_{0.5}$ die Halbwertsbreite darstellt:

$$R_S = 1.18 * \frac{t_R(B) - t_R(A)}{w_{0.5}(A) + w_{0.5}(B)}$$

Ergebnisse und Diskussion

Tabelle 5: Analytische Methodenentwicklung zur Trennung der Enantiomere von (\pm) **6a**. Die chromatographische Trennung erfolgte mit Hilfe einer Polysaccharid-modifizierten HPLC-Säule.

| Ansatz | Elutionsmittel | Verhältnis | Flussrate [mL/min] | t_R (Signal A) [min] | t_R (Signal B) [min] | Δt_R [min] | R_s |
|--------|---|------------|--------------------|------------------------|------------------------|--------------------|-------|
| 1 | H ₂ O / CH ₃ OH | 1/9 | 1.0 | 7.3 | 7.7 | 0.4 | 0.3 |
| 2 | CH ₃ OH | | 1.0 | 7.4 | 7.8 | 0.4 | 0.9 |
| 3 | H ₂ O / <i>i</i> PrOH | 3/7 | 1.0 | 8.7 | 11.1 | 2.4 | 2.2 |
| 4 | CH ₃ OH / <i>i</i> PrOH + 0.1 % HCOOH | 2/8 | 0.7 | 6.2 | 8.1 | 1.9 | 3.2 |
| 5 | CH ₃ OH / <i>i</i> PrOH + 0.1 % HCOOH | 1/9 | 0.5 | 9.0 | 14.2 | 5.2 | 3.6 |
| 6 | CH ₃ OH / <i>i</i> PrOH + 0.1 % HCOOH | 1/9 | 0.7 | 6.3 | 9.7 | 3.4 | 3.4 |

Die Absolutkonfiguration der erfolgreich getrennten Enantiomere **A** und **B** wurde im Arbeitskreis Bringmann mit Hilfe der Circular dichroismus-Spektroskopie (CD) bestimmt. Hierbei wurden die quantenmechanisch berechnete und experimentell bestimmte CD-Spektren der Substanzen miteinander verglichen (Abbildung 17). Bei der Verbindung **A** handelte es sich um das *3R,4R*-Enantiomer und bei der Verbindung **B** um das *3S,4S*-Analogon. Die anschließende biologische Untersuchung zeigte erwartungsgemäß die Aktivität des *3R,4R*-Enantiomers an den MM-INA-6-Zellen mit einem EC₅₀-Wert von 1.5 μ M, während die *3S,4S*-Verbindung keine inhibitorische Aktivität bei EC₅₀ > 50 μ M zeigte (Abbildung 18).

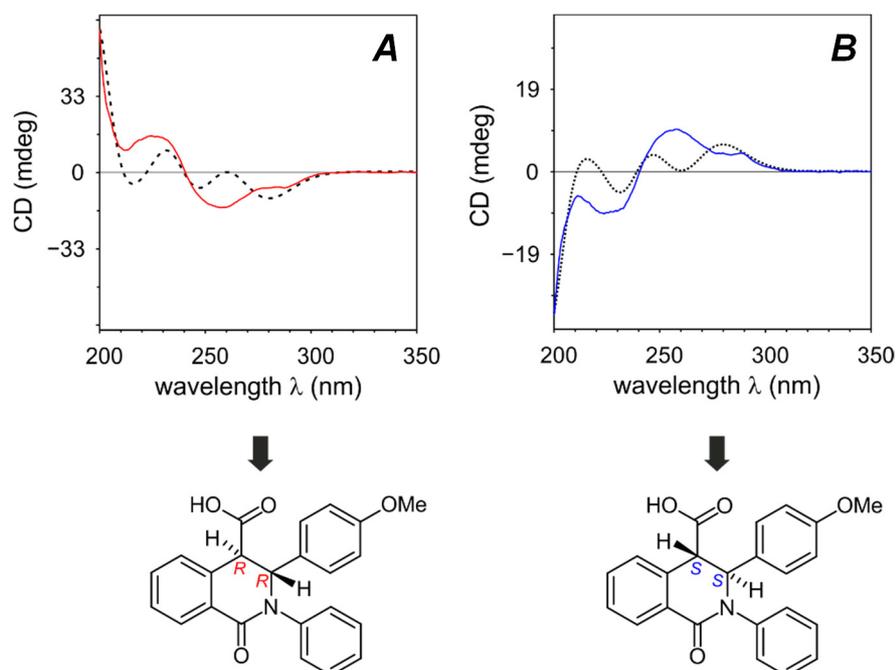


Abbildung 17: Die Absolutkonfiguration der Enantiomere von (\pm) **6a** wurde mittels CD-Spektroskopie bestimmt, indem die berechneten Spektren (schwarze Linie) mit den experimentell bestimmten Spektren (rote bzw. blaue Linie) verglichen wurden.

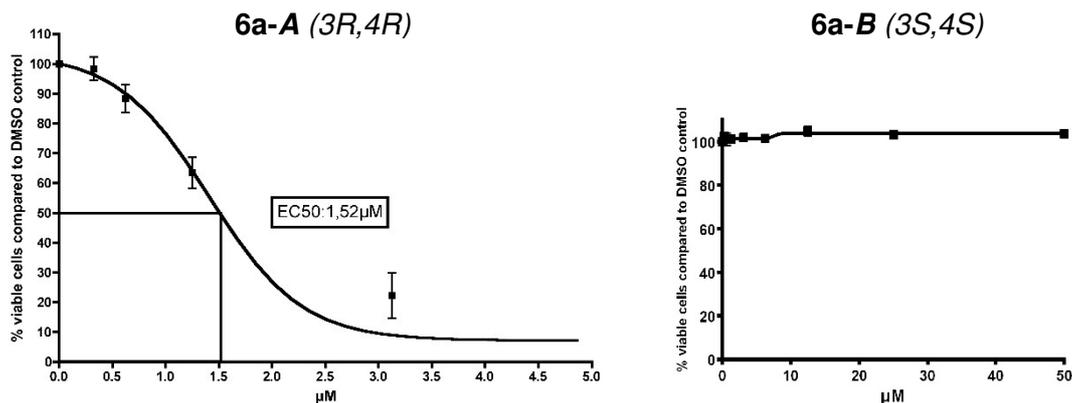
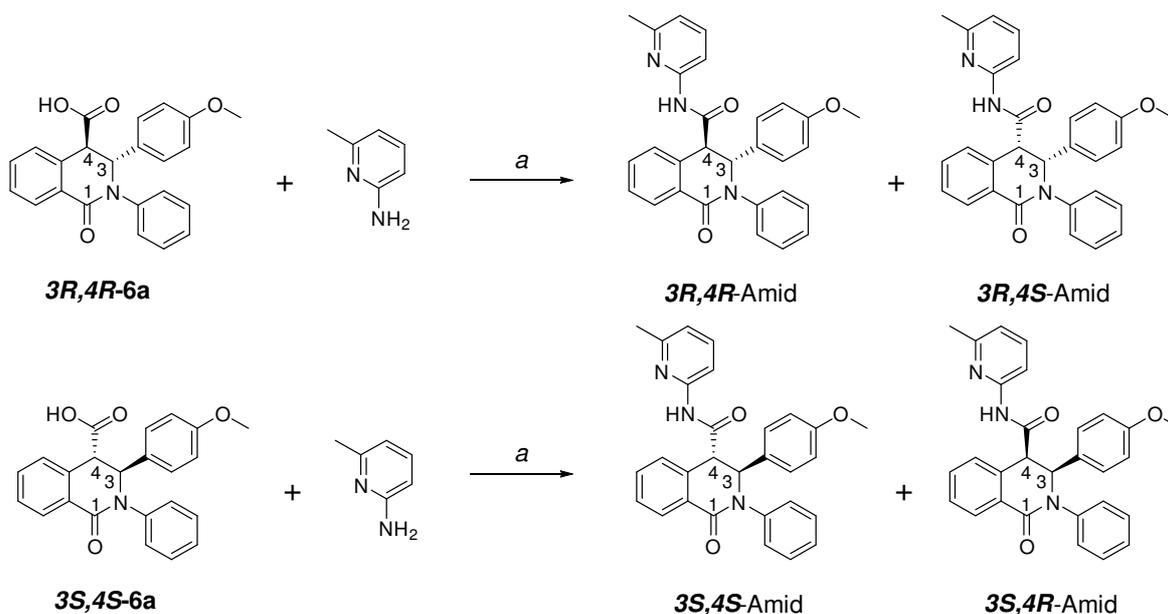


Abbildung 18: Die Untersuchung mittels des Viabilitäts-Assays bestätigte die Aktivität des 3R,4R-Enantiomers mit einem EC_{50} -Wert von 1.5 μM , während das 3S,4S-Analogon keine Aktivität bei $\text{EC}_{50} > 50 \mu\text{M}$ zeigte.

3.3 Synthese der enantiomerenreinen Isochinolinoncarbonsäureamide

Nach der erfolgreichen Trennung der *trans*-Carbonsäuren **3R,4R-6a** und **3S,4S-6a** wurde die Synthese zu den enantiomerenreinen Amidderivaten durchgeführt. Wie bereits beschrieben wurden die Säureverbindungen in Gegenwart von NEt_3 und 2,2,2-Trichlor-1,1-dimethylethylchlorformiat mit dem 2-Amino-6-methylpyridin umgesetzt (Tabelle 4). Nach der Isolierung und der Reinigung des Produktes wurde mittels $^1\text{H-NMR}$ -Analyse jedoch festgestellt, dass das Edukt während der Reaktion epimerisierte und jeweils ein *cis*-/*trans*-Produktgemisch, bezogen auf die Konfiguration zwischen H-3 und H-4, erhalten wurde (Tabelle 6).

Tabelle 6: Die enantiomerenreinen Carbonsäurederivate **3R,4R-6a** und **3S,4S-6a** epimerisierten während der Synthese zu den Amiden. ^a Reaktionsbedingungen: abs. CH_3CN , Argonatmosphäre, NEt_3 , 2,2,2-Trichlor-1,1-dimethylethylchlorformiat, 0 °C-RT, 36 h. ^b Das Verhältnis der Produkte wurde mittels $^1\text{H-NMR}$ bestimmt. ^c Die Ausbeute bezieht sich auf das Gesamtprodukt.



| Ansatz | Edukt | Produkt ^b | Ausbeute [%] ^c |
|--------|-------------------------------|--|---------------------------|
| 1 | 3<i>R</i>,4<i>R</i>-6a | 3 <i>R</i> ,4 <i>R</i> / 3 <i>R</i> ,4 <i>S</i> 1 / 0.03 | 60 |
| 2 | 3<i>S</i>,4<i>S</i>-6a | 3 <i>S</i> ,4 <i>S</i> / 3 <i>S</i> ,4 <i>R</i> 3 / 1 | 69 |

3.4 Isostere Substitution des aciden H-4*

Die Epimerisierung der enantiomerenreinen Carbonsäuren sollte durch eine Substitution des aciden Protons am Kohlenstoff C-4 verhindert werden.⁸¹ Hierfür hat sich Fluor als geeigneter Bioisoster in der medizinischen Chemie bewährt.⁸²

In Gegensatz zu der Tatsache, dass es kaum natürlich vorkommende fluorierte Verbindungen existieren, weist heutzutage fast ein Viertel der Wirkstoffe, die sich in der Entwicklungsphase befinden, mindestens ein Fluoratom auf.⁸²⁻⁸³ Einer der ersten fluorierten Wirkstoffe war 5-Fluoruracil (Abbildung 19),⁸⁴ welches seit den 1960ern bis heute erfolgreich als Zytostatikum eingesetzt wird. Seitdem wurden Fluorierungsmittel und -methoden kontinuierlich weiterentwickelt und ermöglichen die Herstellung von vielfältig substituierten Verbindungen unter milden Reaktionsbedingungen. Zusätzlich werden die physikochemischen Einflüsse von Fluorsubstituenten auf die Gesamteigenschaften von Substanzen immer besser verstanden und können gezielt genutzt werden. Zum einen wird Fluor oft als Isoster für Wasserstoff verwendet, wobei sein van der Waals-Radius eher dem vom Sauerstoff ähnelt (H: 1.20 Å, F: 1.47 Å, O: 1.52 Å). Durch Austausch eines Wasserstoffs gegen einen Fluorsubstituenten kann die metabolische Stabilität eines Wirkstoffs erhöht werden, weil die Oxidation beispielsweise durch Cytochrom P450 verhindert wird.⁸² Weiterhin kann die Bioverfügbarkeit eines Wirkstoffs erheblich beeinflusst werden, da die Lipophilie und pK_a-Werte durch Einführung eines Fluorrestes sich deutlich ändern. Allgemein lässt sich schlussfolgern, dass Monofluorierung oder Substitution durch eine Trifluormethylgruppe an gesättigten Alkylresten eines Moleküls zur Senkung der Lipophilie führt. Im Gegensatz dazu ruft die Fluorierung eines aromatischen Systems die Steigerung der Lipophilie hervor.^{80,82} Die Elektronegativität des Fluors hat einen erheblichen Einfluss auf die Azidität bzw. Basizität eines Moleküls. Beispielsweise unterscheiden sich die Säurekonstanten der Essigsäure (pK_a = 4.76) und des Trifluormethyl-Analogons (pK_a = 0.52) um das 17000-fache.^{80,82} Mit Hilfe der Fluor-Modifizierung der 3-Piperidinyllindolderivate konnte beispielsweise eine deutliche Senkung der Aminbasizität erreicht und dadurch die Bioverfügbarkeit erhöht werden.⁸²

* Die im Kapitel 3.4 beschriebenen Ergebnisse wurden in Zusammenarbeit mit Lisa Lechner im Rahmen ihrer Masterarbeit erzielt.⁸¹

Bis zur Entwicklung der modernen Methoden wurden Fluorierungen mit Fluorgas durchgeführt, was aufgrund der hohen Reaktivität des stärksten oxidierenden Elements schwierig durchzuführen war und selten selektiv verlief. Heutzutage werden die Fluorierungsreagenzien nach den nukleophilen und elektrophilen Eigenschaften unterschieden. Ein großer Fortschritt wurde mit der Einführung kristalliner, unter Laborbedingungen stabiler Reagenzien wie z.B. *N*-Fluorbisphenylsulfonimid (NFSI)⁸⁵ oder Selectfluor (Abbildung 19) errungen. Die *N*-F-Bindung ist hierbei so polarisiert, dass das Fluoratom eine negative Partialladung trägt. Zeitgleich zeigen die modernen Fluorierungsmethoden Toleranz gegenüber zahlreichen funktionellen Gruppen und können selektiv angewendet werden.⁸³

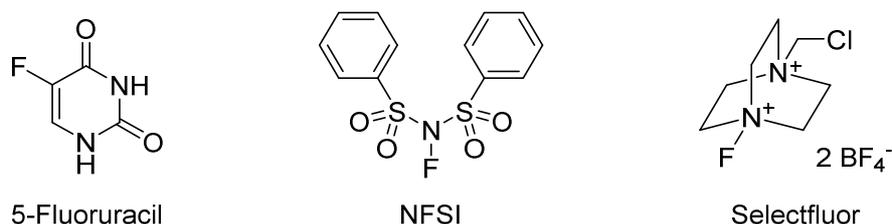
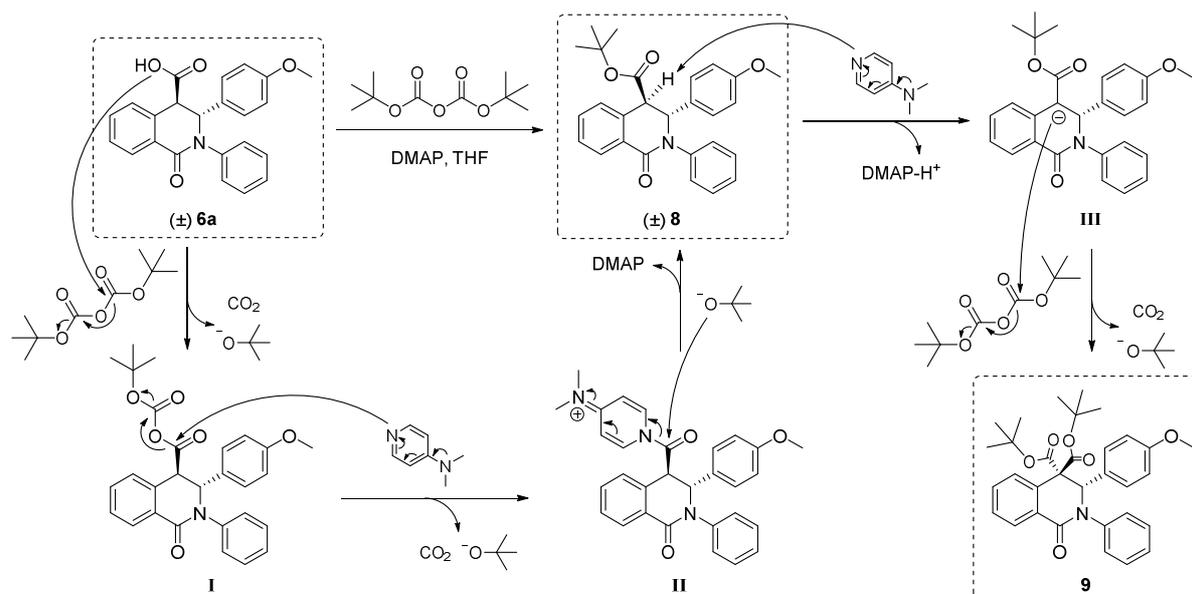


Abbildung 19: 5-Fluoruracil gehört zu den ersten fluorierten Wirkstoffen. NFSI (*N*-Fluorbisphenylsulfonimid) und Selectfluor gehören zu den bekanntesten elektrophilen Fluorierungsmitteln.

3.4.1 Schützung der Carbonsäurefunktion

Die bioisostere Substitution des aciden Protons an dem Kohlenstoff C-4 wurde an der Leitstruktur (\pm) **6a** durchgeführt. Zu Anfang wurde die Carbonsäure erfolgreich mit Hilfe von Di-*tert*-butyldicarbonat und 4-(Dimethylamino)pyridin (DMAP) zum *tert*-Butylester (\pm) **8** umgesetzt,⁸⁶ um eine mögliche Decarboxylierung im weiteren Synthesevorgehen zu vermeiden (Schema 3). Hierbei greift die OH-Gruppe der Carboxylgruppe zuerst das Di-*tert*-Butyldicarbonat unter Abspaltung von CO₂ und des *tert*-Butanolats an und bildet ein gemischtes Anhydrid I. Im nächsten Schritt greift der Katalysator DMAP am Carboxylkohlenstoff an und bildet die aktivierte Zwischenstufe II, die sogleich mit *tert*-Butanolat zur *tert*-Butylesterverbindung (\pm) **8** weiter reagiert. Die ersten Syntheseansätze führten zur Bildung eines Nebenproduktes **9** (Tabelle 7, Ansätze 1-3). Dieses wurde vermutlich dadurch gebildet, dass DMAP zusätzlich das Proton der Verbindung (\pm) **8** abstrahierte und der negativ geladene Kohlenstoff C-4 ein weiteres Di-*tert*-Butyldicarbonat nukleophil angriff. Die Steigerung der Ausbeute des Hauptproduktes (\pm) **8** sowie Eliminierung des Nebenproduktes **9** wurde erfolgreich durch Optimierung der Reaktionsbedingungen erreicht (Tabelle 7, Ansatz 4). Hierfür wurde die Menge an Di-*tert*-butyldicarbonat unter 1 equiv. reduziert, DMAP katalytisch (0.1 equiv.) hinzugegeben und die Reaktionsmischung durch die Zugabe an H₂O gequentscht (Aufarbeitung *b*).

Ergebnisse und Diskussion



Schema 3: Postulierter Reaktionsmechanismus zur Synthese des tert-Butylesters (\pm) **8** und des Nebenproduktes **9** ausgehend von der Leitstruktur (\pm) **6a**. Schema adaptiert von L. Lechner.⁸¹

Tabelle 7: Reaktionsbedingungen zur Synthese von tert-Butylesterverbindung (\pm) **8**. Alle Reaktionen wurden unter Argonschutzgas in abs. THF durchgeführt. Aufarbeitung: **a:** THF direkt in vacuo entfernt, Rohprodukt direkt mittels MPLC gereinigt; **b:** Quenchen der Reaktionslösung durch Zugabe von H_2O , Extraktion, Reinigung mittels MPLC.

| Ansatz | Equiv. Boc_2O | Equiv. DMAP | Reaktionsbedingungen | Aufarbeitung | Ausbeute 8 / 9 [%] |
|--------|-------------------------------|-------------|----------------------|--------------|----------------------------------|
| 1 | 1.4 | 0.6 | 5.5 h, RT | a | 37 / 47 |
| 2 | 1.4 | 0.1 | 2 h, RT | a | 28 / 40 |
| 3 | 1.4 | 0.1 | 3 h, RT | b | 37 / 34 |
| 4 | 0.9 | 0.1 | 24 h, RT | b | 55 / --- |

3.4.2 Elektrophile Fluorierung des Kohlenstoffs C-4

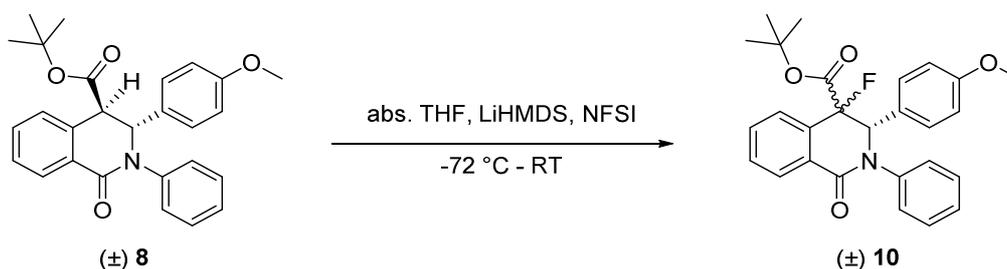
Zur Fluorierung der Verbindung (\pm) **8** wurde das Reagenz NFSI (Abbildung 19) gewählt, weil es sich um einen stabilen Feststoff handelt, der unter milden Reaktionsbedingungen eingesetzt werden kann.⁸⁷ Die Reaktionsbedingungen wurden anhand der bekannten Methoden von Differding et al.⁸⁷ und Davis et al.⁸⁸ kombiniert und optimiert.⁸¹

Der anfängliche Ansatz 1 (Tabelle 8) wurde nach VanVliet et al.⁸⁹ durchgeführt, indem (\pm) **8** erst in abs. THF gelöst und auf $-72\text{ }^\circ\text{C}$ gekühlt wurde. Nach der Zugabe von LiHMDS-Lösung (0.3 M in THF) und NFSI-Lösung (0.4 M in THF) wurde das Reaktionsgemisch erst langsam auf $0\text{ }^\circ\text{C}$ erwärmt und zum Schluss 2 h bei RT gerührt. Die Untersuchung mittels LC-MS zeigte keinen Umsatz. In den darauffolgenden Syntheseansätzen (Reaktionsbedingung **b**, **c**) wurde die Base unverdünnt (1 M in THF) und das Fluorierungsmittel NFSI als Feststoff direkt hinzugegeben, sodass das Produkt (\pm) **10** mit einer Ausbeute von 40 % (Ansatz 2) isoliert wurde. Die Ansätze 3 und 4 wurden parallel durchgeführt, wobei für

Ergebnisse und Diskussion

den Ansatz 3 reines *trans*-Edukt und für den Ansatz 4 eine Mischung der diastereomeren Edukte verwendet wurde, um die Stereoselektivität der Reaktion zu evaluieren. Die Untersuchung der isolierten Produkte beider Ansätze mittels ¹H-NMR zeigte, dass es sich um die gleiche Verbindung handelt und der Reaktionsverlauf somit stereospezifisch verlief. Die Ausbeute konnte deutlich auf 62 % gesteigert werden, indem frisch über ein Trocknungsmittel destilliertes Lösungsmittel THF direkt eingesetzt wurde (Ansatz 5).

Tabelle 8: Optimierung der Reaktionsbedingungen der elektrophilen Fluorierung zum Produkt (±) **10**.
 Reaktionsbedingungen: **a:** abs. THF, Schutzgasatmosphäre, LiHMDS (0.3 M in THF), NFSI-Lösung (0.4 M in THF), -72 °C - RT, 3 h⁸⁹; **b:** abs. THF, Schutzgasatmosphäre, LiHMDS (1 M in THF), NFSI als Feststoff, -72 °C - RT, 16 h; **c:** wie **b**, THF frisch destilliert. **d:** Das Verhältnis der Diastereomere wurde mittels ¹H-NMR bestimmt.



| Ansatz | Edukt | Equiv. LiHMDS | Equiv. NFSI | Reaktionsbedingungen | Ausbeute (±) 10 [%] |
|--------|---|---------------|-------------|----------------------|----------------------------|
| 1 | <i>trans</i> - 8 | 1.05 | 1.08 | <i>a</i> | - |
| 2 | <i>trans</i> - 8 | 2.7 | 2.9 | <i>b</i> | 40 |
| 3 | <i>trans</i> - 8 | 1.4 | 1.4 | <i>b</i> | 27 |
| 4 | <i>trans</i> -/ <i>cis</i> - 8 ^d 1 / 0.5 | 1.4 | 1.4 | <i>b</i> | 34 |
| 5 | <i>trans</i> -/ <i>cis</i> - 8 ^d 1 / 0.1 | 1.2 | 1.4 | <i>c</i> | 62 |

Ergebnisse und Diskussion

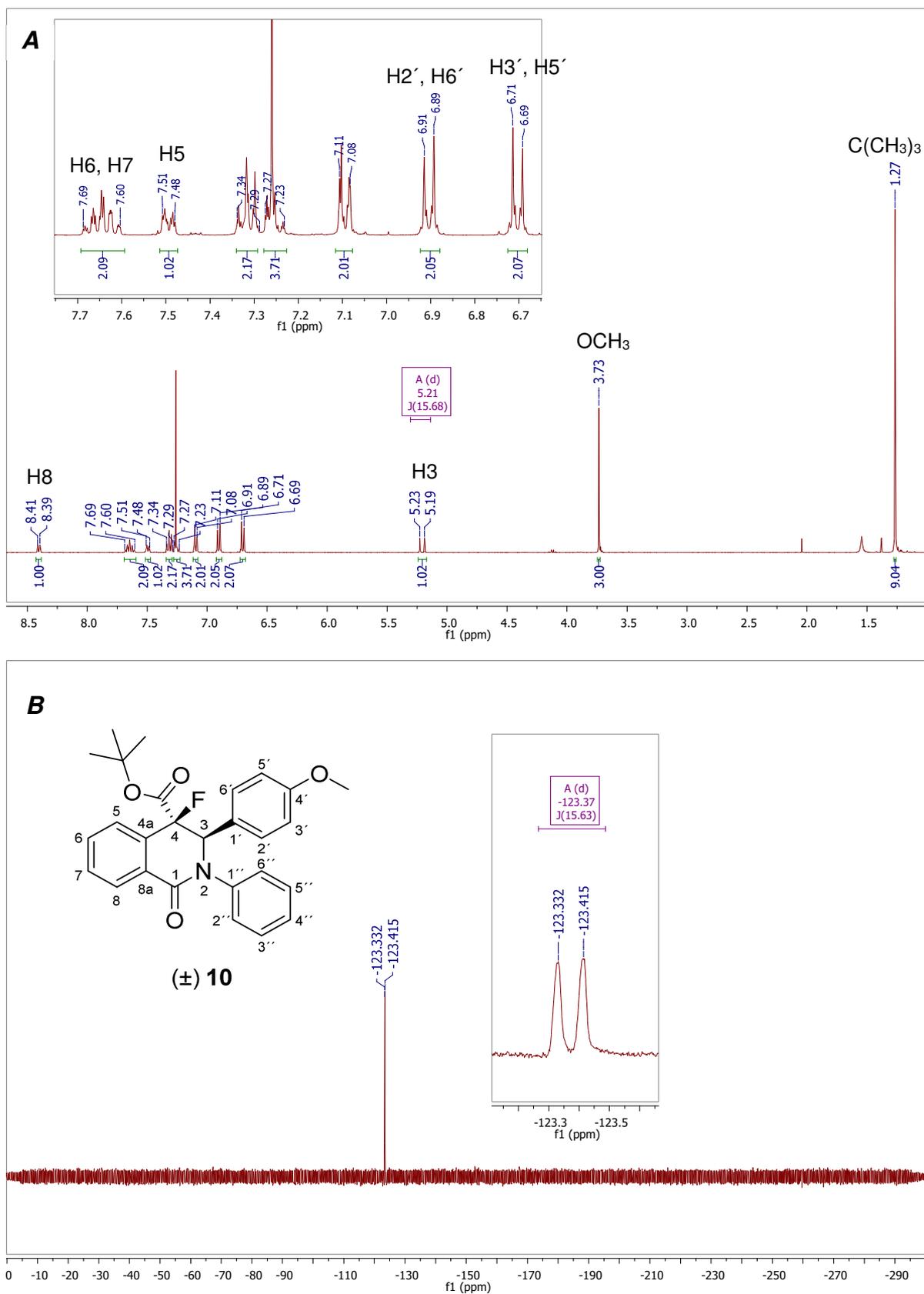


Abbildung 20: A: ^1H -NMR-Spektrum der fluorierten Verbindung (\pm) **10**. B: ^1H -gekoppeltes ^{19}F -NMR-Spektrum der Verbindung (\pm) **10**. Beide Spektren wurden in CDCl_3 vermessen.

Zusätzlich wurden ^{19}F -NMR-Spektren des Produktes (\pm) **10** vermessen. Durch die 3J -Kopplung des H-3 mit dem benachbarten Fluor-Atom zeigt das Proton im ^1H -NMR-Spektrum eine Aufspaltung des Signals mit einer F-H-Kopplungskonstante von 15.7 Hz (Abbildung 20A). Die gleiche Kopplung wurde erwartungsgemäß mittels ^1H -gekoppelten ^{19}F -NMR-Spektrum gefunden (Abbildung 20B).

3.4.3 Entschützung des *tert*-Butylesters

Um den isosteren Einfluss des Fluorsubstituenten auf die physikochemischen Eigenschaften und die inhibitorische Aktivität im direkten Vergleich zu der Leitstruktur (\pm) **6a** zu evaluieren, wurde der *tert*-Butylester im nächsten Schritt gespalten und die freie Carbonsäure erhalten. Hierzu wurden unterschiedliche Methoden getestet (Tabelle 9).⁸¹

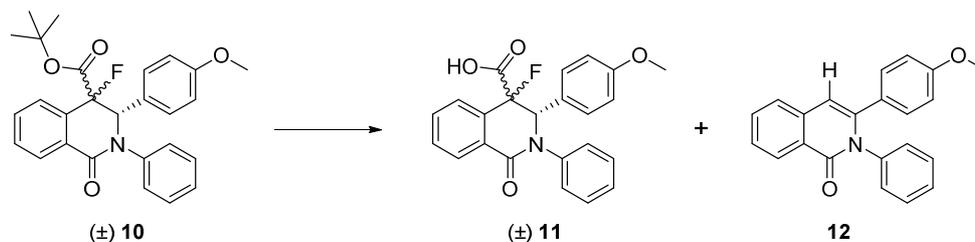
Der erste Ansatz zeigt die gängigste Methode zur Spaltung von Säureestern, indem die Trifluoressigsäure (TFA) im Überschuss hinzugegeben und das Gemisch bei RT gerührt wurde (Tabelle 9).⁹⁰ In diesem Fall kam es nicht zu Bildung des gewünschten Produktes (\pm) **11**, jedoch wurde ausschließlich das Produkt **12** isoliert. Der Einsatz von TFA und Et_3SiH soll nach Douglas et al.⁹¹ zu gesteigerten Ausbeuten und geringeren Reaktionszeiten führen. Triethylsilan wird hierbei durch TFA aktiviert und fängt durch Abspaltung eines Hydrids das *tert*-Butylkation ab. Zwar wurde nach dieser Methode das Produkt (\pm) **11** erhalten, jedoch entstand erneut zusätzlich die Verbindung **12** (Ansatz 2). Der Einsatz von wässriger Salzsäure (Ansatz 3) führte zu keiner Produktbildung. Li et al.⁹² beschrieb eine milde Reaktionsdurchführung in Gegenwart von wässriger Phosphorsäure zur Abspaltung von *tert*-Butylcarbamaten, -estern und -ethern. Im Ansatz 4 wurden fünf Äquivalente an H_3PO_4 eingesetzt und 4 d bei 50 °C gerührt. Die Ausbeute der freien Carbonsäure (\pm) **11** konnte allerdings nicht gesteigert werden. Die Substanz **12** wurde hingegen in einer Ausbeute von 69 % erhalten.

Die Analyse des Nebenproduktes **12** mittels NMR-Spektroskopie zeigte in erster Linie, dass diese Verbindung ein Isoquinolinongrundgerüst aufwies (siehe Kapitel 10.2.2). Im Vergleich zur Ausgangssubstanz (\pm) **10** bzw. zum gewünschten Produkt (\pm) **11** fehlte jedoch das Signal der Carbonylgruppe im ^{13}C -NMR-Spektrum. Ebenso wurde keine Aufspaltung der Kohlenstoffsignale aufgrund der Kopplung zu Fluor beobachtet. Zugleich zeigte das ^1H -NMR-Spektrum der neuen Substanz **12** ein scharfes Signal bei 7.15 ppm, was auf ein Proton in einer elektronenreichen Umgebung hindeutet. Der Massenunterschied zwischen (\pm) **11** und **12** betrug 63,8 g/mol, was in diesem Fall der Masse einer Carbonylgruppe (COOH) und eines Fluoratoms entspricht. Mithilfe dieser Beobachtungen wurde ein postulierter Reaktionsmechanismus aufgestellt, der zur Entstehung des Eliminierungsproduktes **12** führen kann (Schema 4).⁸¹ Möglicherweise findet nach einer erfolgten Abspaltung der *tert*-Butylesters die Decarboxylierung statt. Die Reaktion wird zwar in 85%iger Phosphorsäure durchgeführt, jedoch wird der pK_a -Wert von (\pm) **11** durch den Fluorsubstituenten in der direkten Nachbarschaft zur Carboxylgruppe stark verringert sein (siehe Kapitel 3.4). Zusätzlich ist das

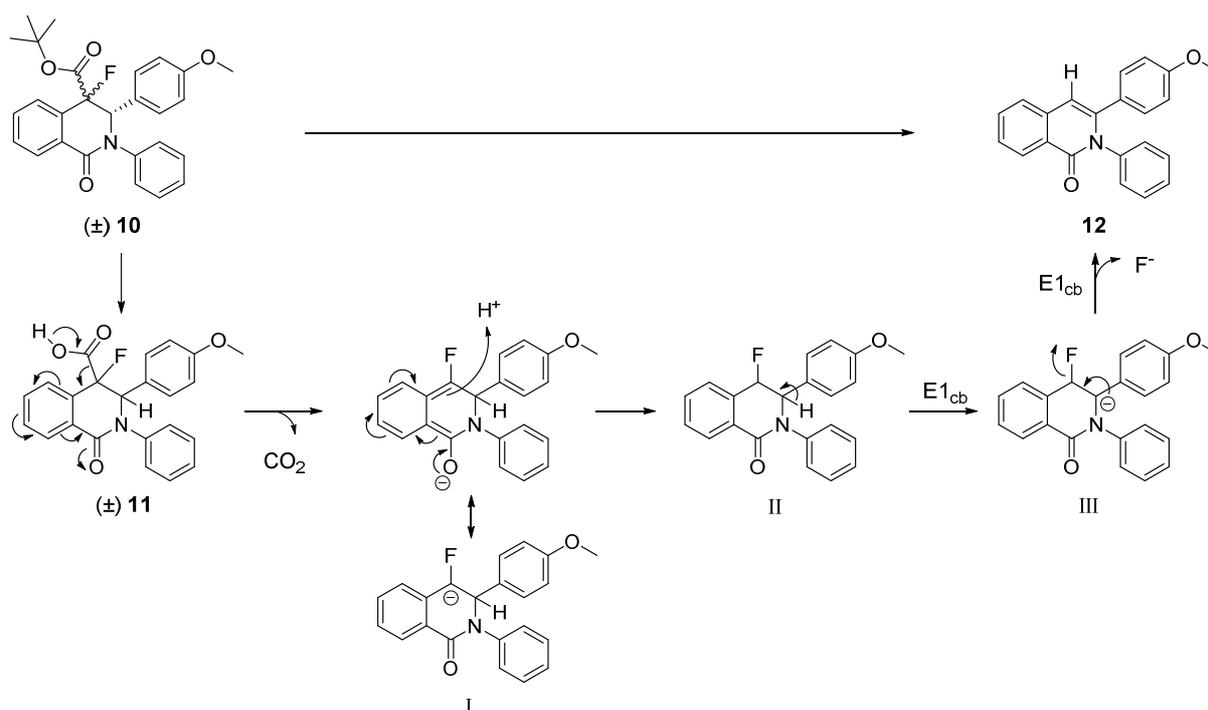
Ergebnisse und Diskussion

gebildete Carbanion I durch das aromatische System mesomeriestabilisiert. Aufgrund des negativen induktiven Effekts des Fluorsubstituenten ist die Azidität des Protons am Kohlenstoff C-3 vermutlich erhöht und es kann leicht abstrahiert werden (II). Durch den Einfluss des mesomeren Effekts des 4-Methoxyphenylrestes kann es nun zur Eliminierung des Fluorsubstituenten, gefolgt einem E1_{cb}-Reaktionsmechanismus, kommen, was zu der Vergrößerung des delokalisierten II-Elektronensystems führt.

Tabelle 9: Evaluation der Reaktionsbedingungen zur Spaltung des tert-Butylesters (\pm **10** zu der freien Säure (\pm **11**). Neben dem gewünschten Produkt wurde das Eliminierungsprodukt **12** gebildet.



| Ansatz | Reaktionsbedingungen | Ausbeute (\pm) 11 [%] | Ausbeute 12 [%] |
|--------|---|----------------------------------|------------------------|
| 1 | TFA (37 equiv.), CH ₂ Cl ₂ , 7 h, RT | - | 28 |
| 2 | TFA (13 equiv.), Et ₃ SiH (2.5 equiv.), CH ₂ Cl ₂ , 23 h, RT | 25 | 29 |
| 3 | aq. HCl (150 equiv.), CHCl ₃ /CH ₃ CN, 3 d, RT | - | - |
| 4 | H ₃ PO ₄ (85 % w/w, 5 equiv.), CH ₃ CN, 4 d, 50 °C | 23 | 69 |

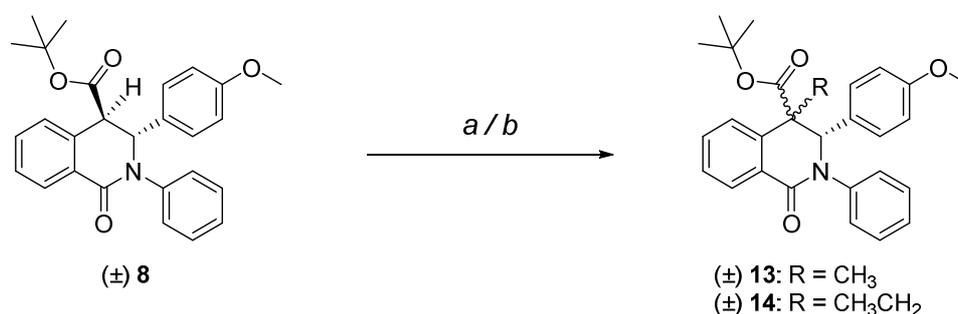


Schema 4: Postulierter Eliminierungsmechanismus zur Bildung des Nebenproduktes **12**. Schema adaptiert von L. Lechner.⁸¹

3.4.4 Alkylierung des Kohlenstoffs C-4

Für weitere Untersuchungen der Struktur-Wirkungs-Beziehungen wurde der Kohlenstoff C-4 der Leitstruktur (\pm) **6a** methyliert und ethyliert.⁸¹ Die Verbindung *trans*-(\pm) **8** fungierte als Ausgangssubstanz, die in Gegenwart von LiHMDS und der jeweiligen Alkyljodide, die reaktiver als analoge Bromide sind, zu den Verbindungen (\pm) **13** und (\pm) **14** erfolgreich umgesetzt wurden (Tabelle 10).⁹³

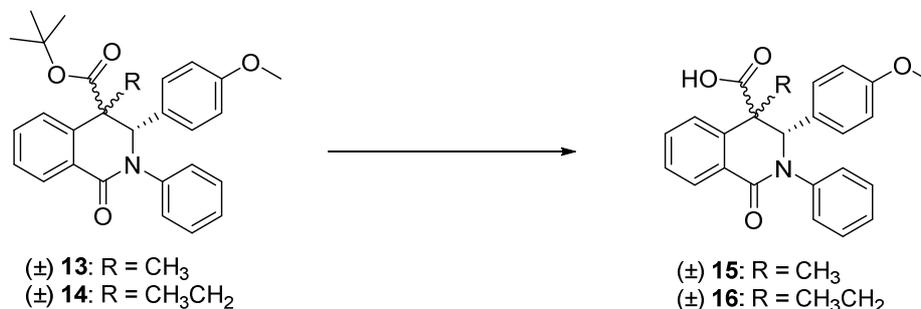
Tabelle 10: Reaktionsbedingungen zur Herstellung der methylierten Verbindung (\pm) **13** und der ethylierten Verbindung (\pm) **14**. ^a abs. THF, Schutzgasatmosphäre, 1 M LiHMDS-Lösung, CH₃I, -72 °C-RT, 24 h; ^b abs. THF, Schutzgasatmosphäre, 1 M LiHMDS-Lösung, CH₃CH₂I, -72 °C-RT, 24 h, ^c Die Ausbeuteangabe bezieht sich auf das Rohprodukt, welches ohne zusätzliche Reinigung weiter umgesetzt wurde.



| Edukt | Equiv. LiHMDS | Equiv. RI | Ausbeute [%] |
|---|---------------|---------------------------------------|-------------------------------------|
| <i>trans</i> -(\pm) 8 ^a | 1.2 | CH ₃ I 1.6 | (\pm) 13 59 ^c |
| <i>trans</i> -(\pm) 8 ^b | 1.2 | CH ₃ CH ₂ I 1.6 | (\pm) 14 34 |

Die Entschützung der jeweiligen tert-Butylester (\pm) **13** und (\pm) **14** erfolgte gemäß der zuvor beschriebenen Methode,⁹² indem das jeweilige Derivat in Gegenwart von 85%iger H₃PO₄ bei 50 °C gerührt wurde (Tabelle 11).

Tabelle 11: Reaktionsbedingungen zur Entschützung der alkylierten Verbindungen (\pm) **13** und (\pm) **14**. Die Methode wurde zuvor anhand der Substanz (\pm) **11** optimiert (Tabelle 9). ^aDie Ausbeute bezieht sich auf zwei Syntheseschritte.



| Edukt | Reaktionsbedingungen | Ausbeute [%] |
|---------------------|---|-------------------------------------|
| (\pm) 13 | H ₃ PO ₄ (85 % w/w), 4 d, 50 °C | (\pm) 15 31 ^a |
| (\pm) 14 | H ₃ PO ₄ (85 % w/w), 5 d, 50 °C | (\pm) 16 98 |

3.4.5 Bestimmung der Absolutkonformation

Im Kapitel 3.4.2 wurde bereits beschrieben, dass die Fluorierungsreaktion stereospezifisch verlief und mittels $^1\text{H-NMR}$ die Entstehung einer Substanzspezies, vermutlich eines Enantiomergemisches, detektiert wurde. Aufgrund einer nicht vorhandenen Referenz in Form des anderen Isomers war es anhand der im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum gemessenen 3J -Kopplungskonstante von 14.0 Hz der fluorierten Verbindung (\pm) **11** nicht möglich, die Absolutkonformation zu bestimmen. Jedoch gelang es, eine Röntgenstrukturanalyse durchzuführen, nachdem geeignete Kristalle des Racemats von (\pm) **11** durch Verdampfungskristallisation bei RT aus CH_3OH erhalten und von K.Radacki aus dem Arbeitskreis Braunschweig vermessen wurden.⁹⁴ Die Messparameter können dem experimentellen Teil entnommen werden (Kapitel 10).

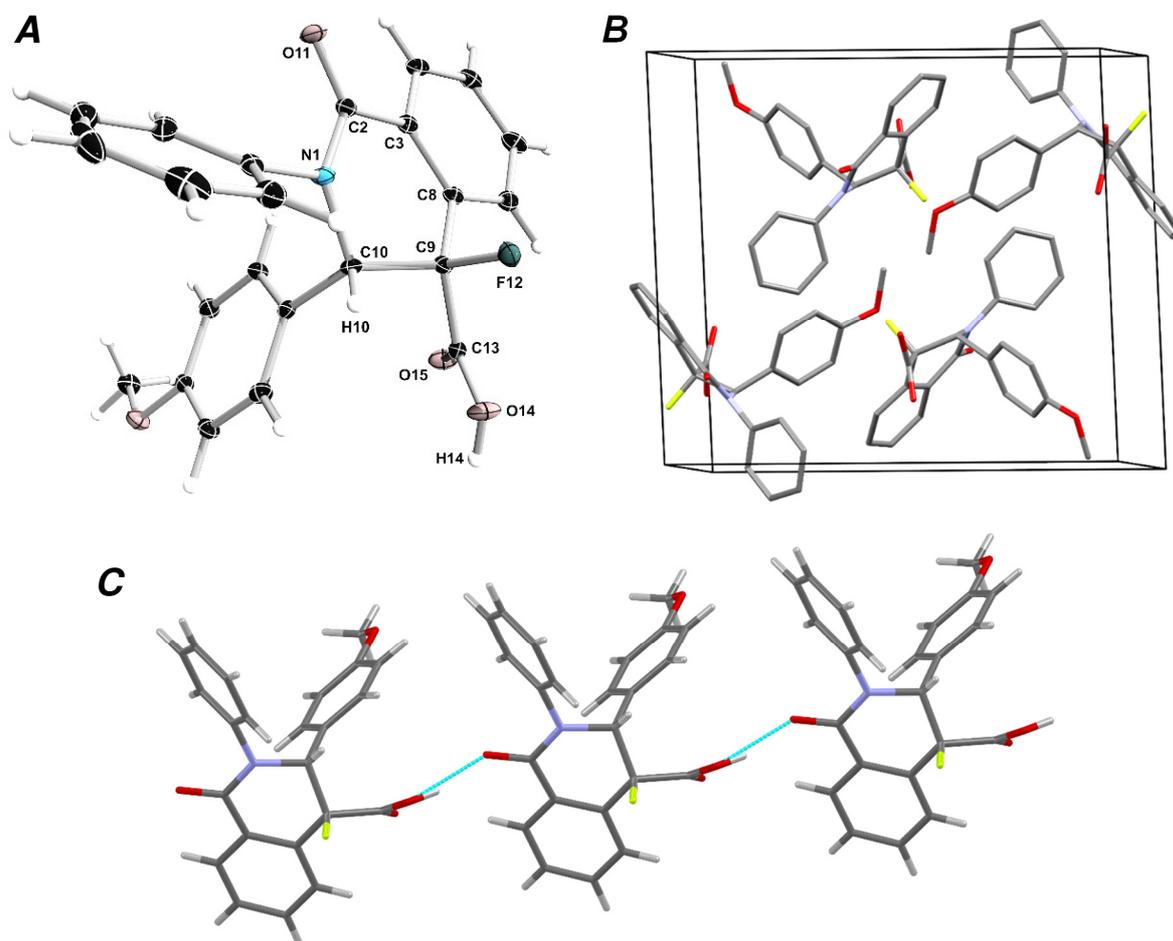


Abbildung 21: **A:** Die Darstellung zeigt die Röntgenkristallstruktur des 3R,4S-Enantiomers des fluorierten Isochinolinoderivats (\pm) **11** (Kohlenstoff schwarz, Wasserstoff weiß, Sauerstoff rot, Stickstoff türkisfarben, Fluor grün, Atombindung grau). Die ellipsoide Darstellung aller Atome wird mit 50%iger Delokalisionswahrscheinlichkeit angezeigt. **B:** Jeweils zwei 3R,4S- und 3S,4R-Enantiomere bilden eine Elementarzelle mit der Raumgruppe $P2_1/c$. **C:** Die Moleküle interagieren über eine Wasserstoffbrücke zwischen O11 und OH14. Die Wasserstoffbrückenbindung ist in türkisfarben angezeigt. Die Abbildung ist adaptiert von Lehmann et al.⁹⁴

Die Röntgenstrukturanalyse zeigte, dass es sich bei der neu synthetisierten Verbindung (\pm) **11** ausschließlich um das *cis*-Isomer handelt. Abbildung 21A zeigt das *3R,4S*-Enantiomer. Die Elementarzelle besteht aus jeweils zwei *3R,4S*- und zwei *3S,4R*-Enantiomere (Abbildung 21B). Die Moleküle interagieren über eine Wasserstoffbrücke zwischen O11 und OH14, sodass sich eine Molekülkette bildet (Abbildung 21C).

Das ethylierte Derivat (\pm) **16** wurde ebenfalls mittels Röntgenstrukturanalyse untersucht, nachdem die racemische Verbindung durch Verdampfungskristallisation bei RT aus einem Lösemittelgemisch aus Petrolether und Ethylacetat (7:3) mit Ameisensäure als Additiv (0.1 %) in Form von farblosen Nadeln kristallisierte. Die Messparameter können dem experimentellen Teil entnommen werden (Kapitel 10). Auch hier zeigte sich, dass die neu synthetisierte ethylsubstituierte Verbindung eine *cis*-Konformation bezogen auf die Carboxyl- und Phenylgruppe (Abbildung 22A) aufwies. Die Elementarzelle dieser Verbindung besteht auf jeweils einem *3R,4S*- und einem *3S,4R*-Enantiomer (Abbildung 22B). Eine Wasserstoffbrückeninteraktion zwischen O17 und OH20 führt wieder zur Ausbildung einer Kette wie in Abbildung 22C abgebildet ist.

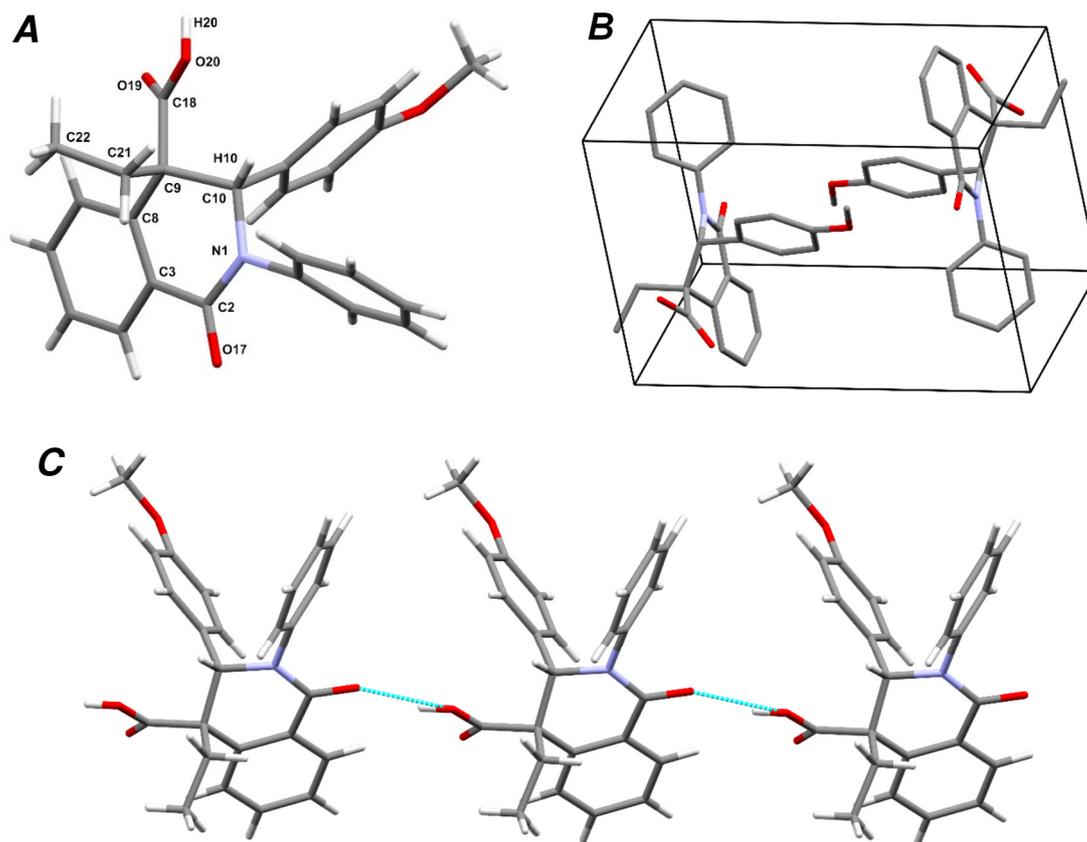


Abbildung 22: **A:** Die Darstellung zeigt die Röntgenkristallstruktur des *3R,4S*-Enantiomers des ethylierten Isochinolinonderivats (\pm) **16** (Kohlenstoff grau, Wasserstoff weiß, Sauerstoff rot, Stickstoff fliederfarben, Atombindung grau). **B:** Jeweils ein *3R,4S*- und ein *3S,4R*-Enantiomer bilden eine Elementarzelle mit der Raumgruppe $P\bar{1}$. **C:** Die Moleküle interagieren über eine Wasserstoffbrücke zwischen O17 und OH20, und formen dadurch eine Molekülkette. Die Wasserstoffbrückenbindung ist in türkisfarben gezeigt.

Die methylierte Verbindung (\pm) **15** konnte leider nicht in notwendiger Qualität kristallisiert werden. Jedoch wird hier ebenso davon ausgegangen, dass die Substanz eine *cis*-Konformation aufweist. Cushman et al.⁷⁷ hat bereits in den 1970ern beobachtet, dass die *trans*-4-Carboxy-3,4-dihydroisochinolin-1(2*H*)-one die thermodynamisch stabileren Produkte darstellten, sodass die *cis*-Isomere gezielt in die *trans*-Verbindungen umgewandelt werden können, solange das acide Proton am Kohlenstoff C-4 vorhanden ist. Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte Substitution (F-, CH₃-, CH₃CH₂-) fand bei tiefen Temperaturen von -72 °C statt und ist irreversibel, sodass sich ein thermodynamisches Gleichgewicht nicht einstellen kann und man von einer kinetisch kontrollierten Reaktion ausgehen kann.⁸¹

3.4.6 Löslichkeitsbestimmung der Derivate **11**, **15**, **16**

Aus der vorhergehenden Arbeit ist bereits bekannt, dass vor allem Amidderivate der Tetrahydroisochinolinone schwer löslich sind.⁵⁷ Um den Einfluss der neu eingeführten Substituenten auf die Löslichkeitseigenschaften zu evaluieren, wurden die Sättigungskonzentrationen von (\pm) **11**, (\pm) **15** und (\pm) **16** mit der Leitsubstanz (\pm) **6a** mittels UV-metrischer Messung verglichen.⁸¹

Die Versuchsbedingungen wurden den Viabilitäts-Zellassay-Bedingungen angepasst, indem die zu vermessenen Substanzen im Zellmedium gelöst wurden. Hierfür wird standardmäßig RPMI-1640-Medium (Sigma Aldrich) verwendet, welches auf einem Hydrogencarbonat-Puffer basiert und durch folgende Komponenten erweitert wird: 10 % Fetales Bovines Serum, 100 U/mL Penicillin, 100 µg/mL Streptomycin, 2 mM L-Glutamin und 1 mM Natrium-Pyruvat. Für die Untersuchungen mittels des Viabilitäts-Zellassays werden die Substanzen in DMSO vorgelöst und anschließend mit dem Zellmedium Verdünnungsreihen (10-100 mM) hergestellt, sodass der DMSO-Gehalt max. 10 % beträgt. Aufgrund der hohen Eigenabsorption von DMSO (330 nm)⁹⁵ wurden die Stammlösungen der zu vermessenden Substanzen **6a** (1 mg/ml), **11**, **15** und **16** (jeweils 0.5 mg/mL) in CH₃OH (Eigenabsorption = 240 nm)⁹⁵ hergestellt und anschließend mit Hilfe des Zellmediums Konzentrationsreihen hergestellt, sodass die Endkonzentrationen zwischen 5 µg/mL und 100 µg/mL lagen. Die Extinktion der Proben wurde mit der Wellenlänge des Absorptionsmaximums der jeweiligen Substanz vermessen. Für das Lambert-Beersche Gesetz besteht bei gleichbleibender Schichtdicke der Küvette und des Extinktionskoeffizientes zwischen der Konzentration und Extinktion ein linearer Zusammenhang. Mit Hilfe der Kalibriergeraden gelang es, die maximale Löslichkeit der jeweiligen Substanz zu bestimmen. Als ein Beispiel ist die Kalibriergerade der Substanz (\pm) **11** in der Abbildung 23 gezeigt. Die weiteren Messdaten können dem Anhang entnommen werden.

Ergebnisse und Diskussion

$$\log \frac{I}{I_0} = \varepsilon \cdot c \cdot d_k = E$$

Mit I = Intensität des eingestrahnten Lichts, I_0 = Intensität des transmittierten Lichts, ε = dekadischer Extinktionskoeffizient, c = Konzentration der Substanzlösung, d_k = Schichtdicke der Küvette, E = Extinktion.

Die maximale Löslichkeit der neu synthetisierten Derivate wurde bestimmt, indem eine gesättigte Lösung in dem Gemisch aus Zellmedium und CH_3OH (10 %) hergestellt wurde. Anschließend wurde der Überstand entnommen, bis zur linearen Lambert-Beer-Abhängigkeit verdünnt und UV-metrisch vermessen. Die Sättigungskonzentrationen wurden folglich mit Hilfe der zugehörigen Kalibriergeraden ermittelt und sind der Tabelle 12 zu entnehmen.

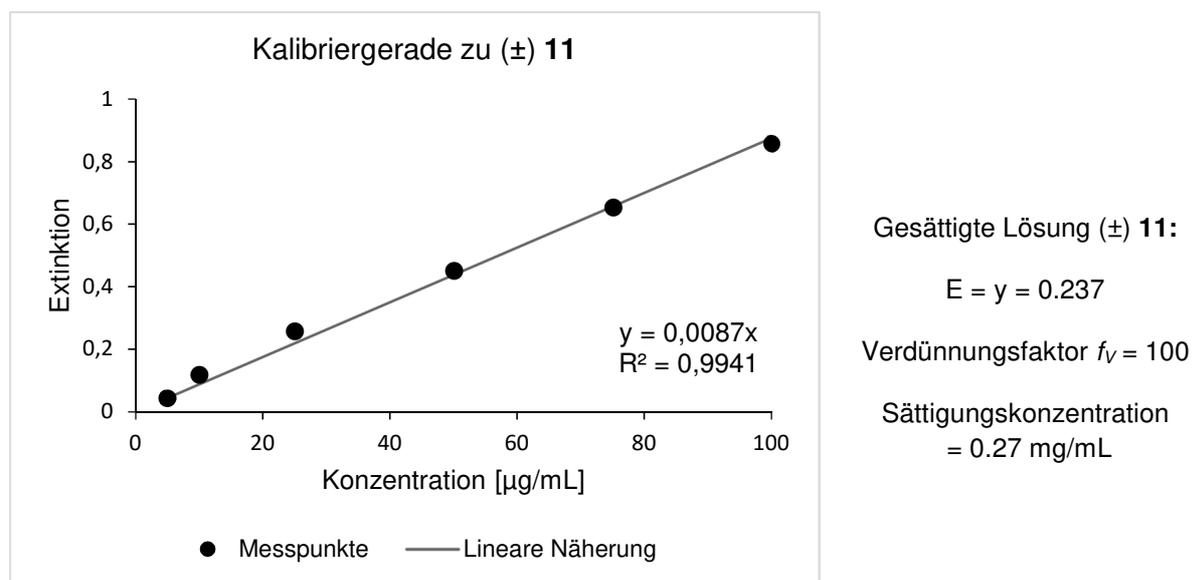


Abbildung 23: Kalibriergerade der Verbindung (±) 11 und die ermittelte Sättigungskonzentration.

Tabelle 12: UV-metrisch bestimmte Sättigungskonzentrationen der neu C-4-substituierten Derivate 11, 15 und 16, und der Leitstruktur 6a.

| Verbindung | Sättigungskonzentration [mg/mL] | Verbindung | Sättigungskonzentration [mg/mL] |
|------------|---------------------------------|------------|---------------------------------|
| (±) 6a | 8.48 | (±) 15 | 2.15 |
| (±) 11 | 0.27 | (±) 16 | 2.07 |

Die alkylierten Derivate (±) 15 und (±) 16 wiesen im Zellmedium im Vergleich zu der Leitsubstanz (±) 6a eine geringere Löslichkeit um einen Faktor von ca. 10 auf (Tabelle 12). Trotz der zuvor beschriebenen Einflüsseffekte von Fluorsubstituenten (Kapitel 3.4) sank die Sättigungskonzentration der fluorierten Verbindung (±) 11 im Vergleich zu (±) 6a um ca. das 30-Fache, und um ca. das 4-Fache im Vergleich zu den alkylierten Derivaten. Daraus kann man schlussfolgern, dass eine Substitution des aciden Protons am Kohlenstoff C-4 zwar eine Epimerisierung verhindert, jedoch die physikochemischen Eigenschaften dieser Substanzklasse wie z.B. Löslichkeit unvorteilhaft beeinflusst werden.

3.4.7 Biologische Evaluierung der Derivate 11, 15, 16

Die Untersuchung mittels Viabilitäts-Zellassay an MM-INA-6-Zellen zeigte, dass die Isochinolinonderivate **11**, **15** und **16** nicht aktiv waren, da für alle Substanzen kein inhibitorischer Effekt detektiert wurde (EC_{50} -Wert $> 100 \mu\text{M}$). Diese Befunde decken sich mit der Erkenntnis, dass *cis*-Isochinolinone (*3R,4S* und *3S,4R*) an MM-Zellen nicht aktiv sind. Gleichzeitig kann an dieser Stelle keine weitere Aussage bzgl. des inhibitorischen Auswirkung von unterschiedlichen Substituenten an der Position C-4 im Vergleich zum Proton getroffen werden, da im Rahmen dieser Arbeit die Synthese von *trans*-C-4-substituierten Derivate nicht gelang.

3.5 Synthese eines TMAO-Hybrides zur Proteinkristallisation

Die Aufklärung der Proteinkristallstruktur des bovinen HSC70 (Abbildung 24A) durch C. Grimm zeigte, dass in der Nähe der vorhergesagten Interface-Oberfläche zwischen der NBD und der SBD Trimethylaminoxid (TMAO) gebunden war (Abbildung 24B, C). Basierend darauf entstand die Idee zur Synthese eines TMAO-Tetrahydroisochinolinonhybrides (Abbildung 24D), wobei die Derivatisierung sich an einem der besten Inhibitor der Substanzbibliothek (**2c**, Abbildung 10) orientieren sollte.

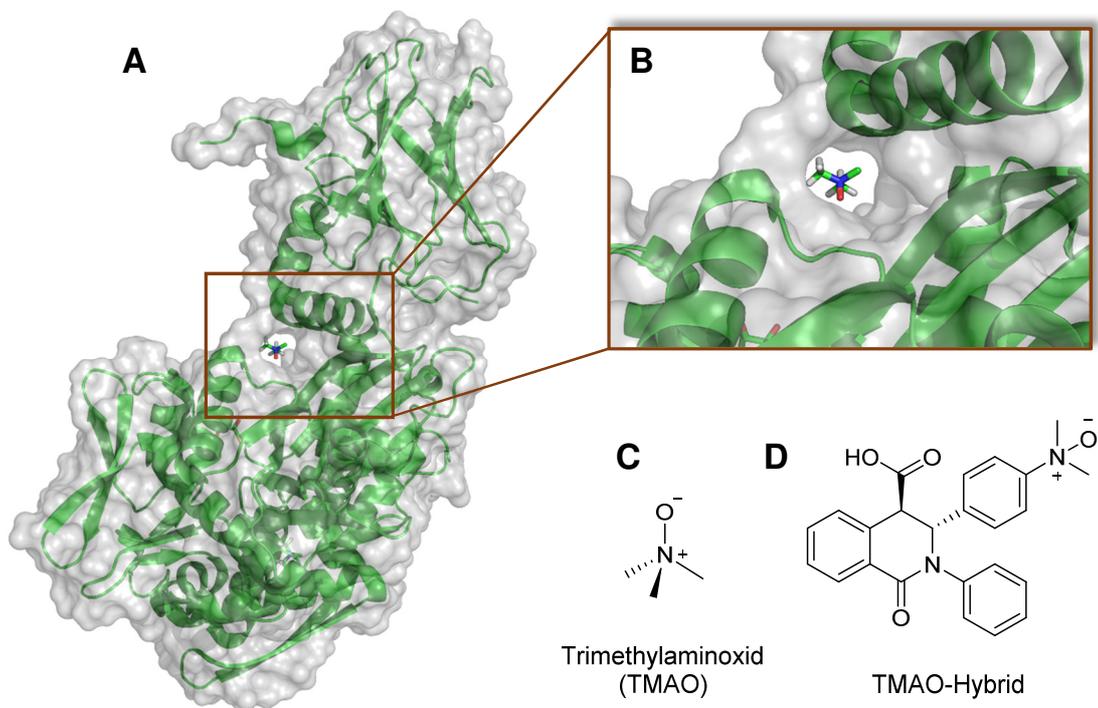
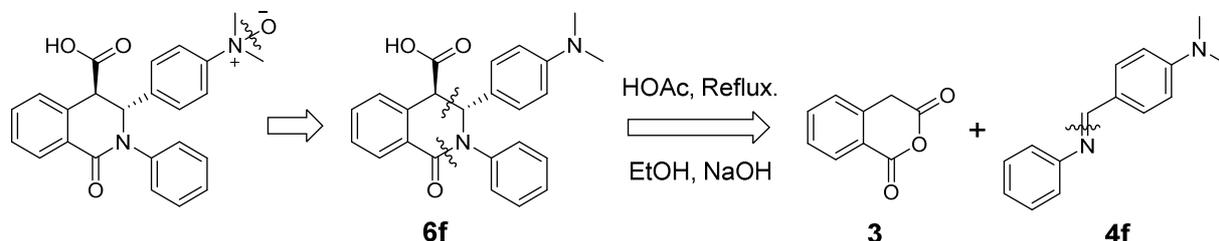


Abbildung 24: **A:** Proteinkristallstruktur des bovinen HSC70 (Proteindatenbank, PDB-Kennzahl 4FL9). **B:** Die Strukturaufklärung zeigte, dass ein TMAO-Molekül in der Interface-Oberfläche zwischen NBD und SBD gebunden ist. **C:** Die Struktur des TMAO-Moleküls. **D:** Die Struktur eines TMAO-Hybrides.

Ergebnisse und Diskussion

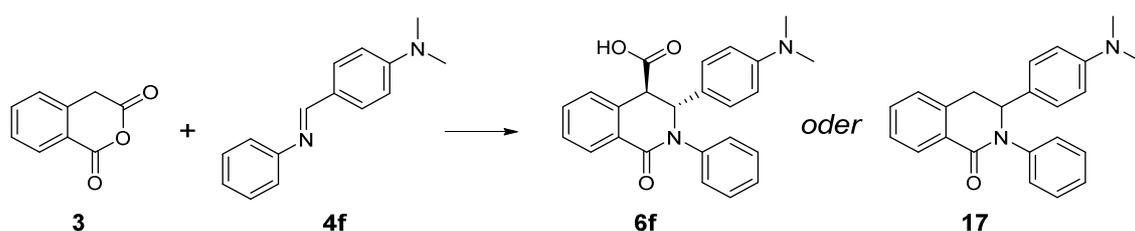
Die retrosynthetische Betrachtung der Herstellung des TMAO-Tetrahydroisochinolinons legt nahe, die Synthese nach den bereits beschriebenen Reaktionsbedingungen ausgehend von dem Anhydrid **3** und dem Imin **4f** durchzuführen und die Oxidation des Stickstoffs im letzten Schritt durchzuführen (Schema 5).



Schema 5: Retrosynthetische Betrachtung der Herstellung des TMAO-Derivats ausgehend von der Tetrahydroisochinolinonsäure **6f**, die aus dem Homophthalsäureanhydrid **3** und dem Iminderivat **4f** nach bereits bekannten Reaktionsbedingungen synthetisiert werden soll.

Zu Beginn der Synthesereihe wurden das Säureanhydrid **3** und das Iminderivat **4f** in konz. Essigsäure bei 130 °C für 4 h unter Rückfluss gerührt und überraschenderweise kein Produkt erhalten (Tabelle 13, Ansatz 1). Auch die TiCl_4 -vermittelte Reaktion nach Vara et al.⁷⁵ (Ansatz 2) zeigte keinen Erfolg. Nach einem wiederholten Ansatz in Essigsäure (Ansatz 3) wurde ein gelber kristalliner Feststoff mit 12 % Ausbeute isoliert, der mit Hilfe der gängigen analytischen Methoden (NMR, LC-MS) als das Decarboxylierungsprodukt **17** identifiziert wurde. Die Reduktion der Menge des Imins auf 1.3 Äquivalente und der Reaktionszeit von 15 h auf 2 h führten zur geringfügigen Steigerung der Ausbeute von **17** auf 31 %, wobei allerdings keine Bildung der gewünschten Verbindung **6f** beobachtet wurde.

Tabelle 13: Reaktionsbedingungen zur Herstellung des Tetrahydroisochinolinonderivats **6f**. Neben der gewohnten Kondensation von Anhydrid **3** und eines Imins **4f** in konz. Essigsäure unter Rückfluss, wurden die Synthese in Gegenwart von TiCl_4 und DIPEA, aber auch die Reaktion in ionischer Flüssigkeit $[\text{bmim}]\text{BF}_4$ getestet.



| Ansatz | Equiv. 3 | Equiv. 4f | Reaktionsbedingungen | Ausbeute 6f [%] | Ausbeute 17 [%] |
|--------|-----------------|------------------|---|------------------------|------------------------|
| 1 | 1.0 | 2.0 | Konz. HOAc (0.2 M), 130 °C, 4 h | - | - |
| 2 | 1.0 | 2.0 | TiCl_4 , DIPEA, CH_2Cl_2 (0.1 M), 0 °C-RT, 1 h | - | - |
| 3 | 1.0 | 1.5 | Konz. HOAc (0.1 M), 140 °C, 15 h | - | 12 |
| 4 | 1.0 | 1.3 | Konz. HOAc (0.2 M), 140 °C, 2 h | - | 31 |
| 5 | 1.0 | 1.3 | $[\text{bmim}]\text{BF}_4$ (0.4 M), RT, 7 d | 13 | - |

Ergebnisse und Diskussion

| | | | | | |
|---|-----|-----|---|---|---|
| 6 | 1.2 | 1.0 | [bmim]BF ₄ (0.3 M), RT, 18 h | - | - |
| 7 | 1.0 | 1.3 | [bmim]BF ₄ (0.3 M), RT, 24 h; H ₂ O, NaOH, 45 min | 6 | - |

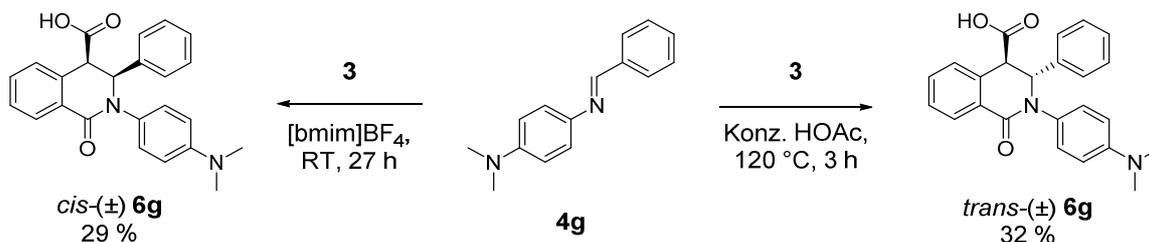
Yadav und Kollegen untersuchten ionische Flüssigkeiten (IF) als milde Alternative zu konventionellen Reaktionsmedien anhand der Synthese der Isochinolinonderivate.⁷⁹ IF wie 1-Butyl-3-methylimidazoliumtetrafluorborat ([bmim]BF₄) bieten viele Vorteile gegenüber den gängigen Reaktionslösungen wie z.B. CH₃OH, THF oder CHCl₃, da sie leicht in der Handhabung, thermisch stabil, nicht flüchtig und wiederverwendbar sind. Weiterhin wird berichtet, dass gebildete Produkte sich oft nicht in der ionischen Phase lösen und durch etherische Extraktion leicht isolierbar sind. Ausgehend von einem Aldehyd, einem Imin und dem Homophthalsäureanhydrid haben Yadav et al.⁷⁹ erfolgreich eine Reihe von *cis*-Isochinolinoncarbonsäuren in Ausbeuten von bis zu 90 % hergestellt. Die Ansätze 5-7 (Tabelle 13) zeigen die Reaktionsergebnisse mit [bmim]BF₄ als Reaktionsmedium. Nachdem das Imin **4f** und das Anhydrid **3** in der IF für sieben Tage bei RT gerührt wurden, wurde das gewünschte *trans*-Produkt nach der Extraktion mit Et₂O und der chromatographischen Reinigung in einer Ausbeute von 13 % isoliert. Im Ansatz 6 wurde **3** in einem leichten Überschuss eingesetzt, wobei die Reaktionszeit 18 h betrug. Hierbei wurde die Bildung der angestrebten Verbindung nicht beobachtet. Im weiteren Ansatz reagierten die Edukte erst in der IF bei RT und wurden durch Extraktion mit Et₂O und säulenchromatographische Reinigung isoliert. Nach der anschließenden basischen Behandlung mit NaOH-Lösung wurde das Produkt zusätzlich mittels präparativer HPLC-Methode gereinigt, sodass es mit einer Ausbeute von 6 % erhalten wurde.

Zusammenfassend kann man schlussfolgern, dass die Kondensation des Anhydrids **3** und diverser Iminderivate **4a-e** und **4g-j**, mit Ausnahme von **4f**, zur Bildung der 3,4-Dihydroisochinolinoncarbonsäuren in konz. HOAc führte. Im Fall von **3** und **4f** wurde das Decarboxylierungsprodukt **17** isoliert, welches jedoch nicht bei sonstigen Derivatsynthesen isoliert wurde. Beim Einsatz der IF [bmim]BF₄ konnte das gewünschte Produkt **6f** in geringen Ausbeuten von 6-13 % erhalten werden, wobei es in diesem Fall nicht zur Bildung von **17** kam.[†]

Um die Ursache der Eliminierung bzw. die geringe Ausbeute des Derivats **6f** zu untersuchen, wurde die Reaktion ausgehend von **4g** und **3** unter zwei unterschiedlichen Reaktionsbedingungen durchgeführt (Schema 6). Die Herstellung der Substanz gelang sowohl in konz. Essigsäure als auch in der IF, auch wenn der Reaktionsablauf nicht stereospezifisch war und beide Ausbeuten von ca. 30 % gering ausfielen. Weiterhin wurden die pK_a-Werte der Iminderivate **4f** und **4g** mittels der Titrierapparatur Sirius T3 (Arbeitskreis Meinel) bestimmt

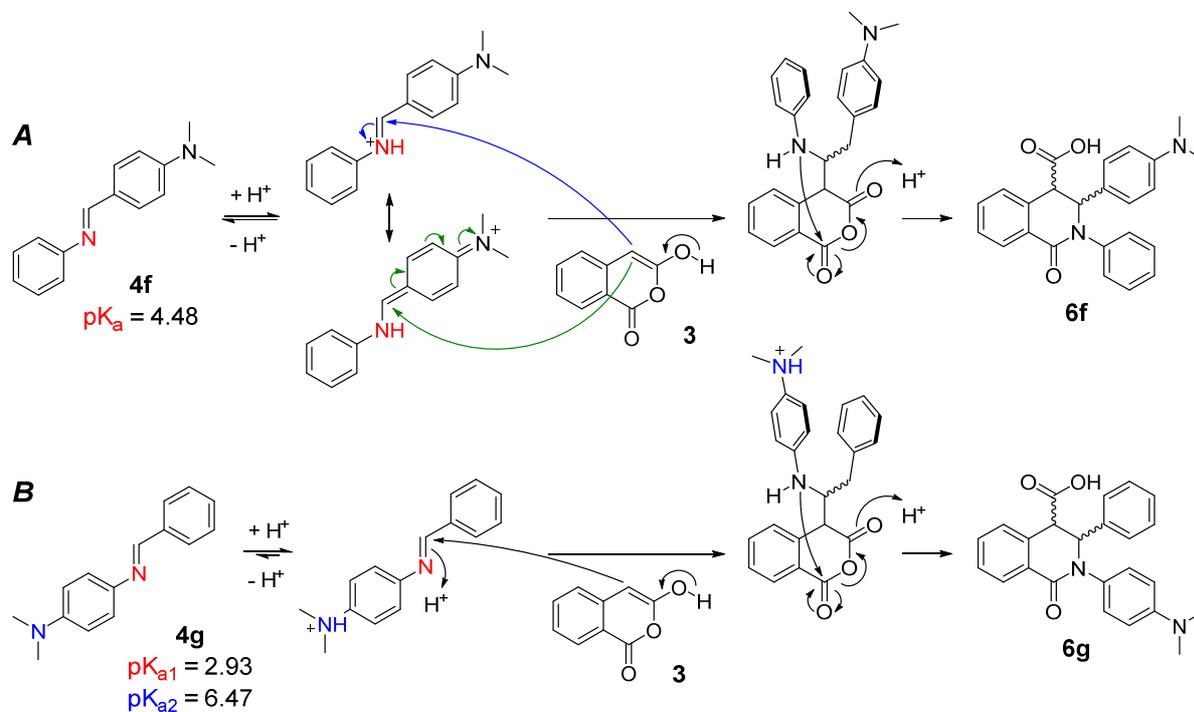
[†] Die Evaluierung der Reaktionsbedingungen erfolgte in Zusammenarbeit mit Florian Geyer im Rahmen eines Forschungspraktikums.

Schema 7), um den Einfluss der Basizität der Stickstoffatome auf den Reaktionsablauf abzuschätzen.



Schema 6: Synthese von (\pm) **6g** gelang sowohl in konz. Essigsäure als auch in der ionischen Flüssigkeit, wobei der Reaktionsablauf nicht stereoselektiv und mit geringen Ausbeuten verlief.

Das Imin **4f** liegt in der konzentrierten Essigsäure ($\text{pK}_a = 4.76$) im Gleichgewicht mit der protonierten Form vor (Schema 7A), die zugleich mesomeriestabilisiert ist. Beide Mesomeriestrukturen stellen einen passenden elektrophilen Reaktionspartner für die enolische Form des Anhydrids **3** dar. Das Imin **4g** wird in der konzentrierteren Essigsäure an dem phenolischen Stickstoff protoniert und ist nicht mesomeriestabilisiert (Schema 7B). Sobald die Knüpfung der C-C-Bindung abläuft, kann der Stickstoff beider Zwischenstufen nukleophil am Carbonylkohlenstoff angreifen, sodass der neue Ringschluss stattfinden kann. Die theoretische Überlegung zeigt, dass der Dimethylaminsubstituent die Reaktion nicht hindert bzw. sogar begünstigt. Die experimentellen Ergebnisse stimmen jedoch nicht damit überein, da die Bildung von (\pm) **6f** in Essigsäure als Reaktionsmedium überhaupt nicht (Tabelle 13, Ansatz 1-4) und von (\pm) **6g** in einer geringen Ausbeute von 32 % (Schema 6) beobachtet wurde.



Schema 7: Theoretische Überlegung der möglichen Reaktionsmechanismen der jeweiligen Iminderivate **4f** (A) und **4g** (B) mit der enolischen Form des Homophthalsäureanhydrids **3** in konzentrierter Essigsäure als Reaktionsmedium. Die pK_a -Werte der Iminverbindungen wurden mit Hilfe der Titrationsapparatur Sirius T3 (Arbeitskreis Meinel) bestimmt.

Bei der Cyclisierungsreaktion von **3** und **4f** im sauren Milieu wurde ausschließlich das Produkt **17** isoliert (Tabelle 13, Ansatz 3,4). Decarboxylierung von Tetrahydroisochinolinonen ist zwar literaturbekannt, jedoch wurden die Substanzen hierbei für mindestens 30 min über 200 °C erhitzt.⁷⁷ Grundsätzlich ist die Decarboxylierung der Isochinolinonsäuren (Schema 8) in einem sauren Milieu wie Essigsäure vorstellbar. Jedoch wurde die Entstehung der analogen Nebenprodukte zur Verbindung **17** bei allen anderen Säurederivaten (\pm) **6a-e** und (\pm) **6g-j** nicht beobachtet, sodass es in diesem Fall um einen Faktor während der Reaktion handeln muss, der die Decarboxylierung zusätzlich begünstigt. Zum einen kann eine *intramolekulare* Abstraktion des Protons durch den räumlich benachbarten Stickstoff angenommen werden. Eine nähere Betrachtung der Kristallstruktur des strukturell ähnlichen *cis*-Analogons (\pm) **11** legt nahe, dass mit der Entfernung von 5.6 Å bzw. 6.5 Å zwischen der Carboxylgruppe und dem phenolischen Substituenten (hier OCH₃-Gruppe) eine *intramolekulare* Reaktion unwahrscheinlich ist (Abbildung 25).

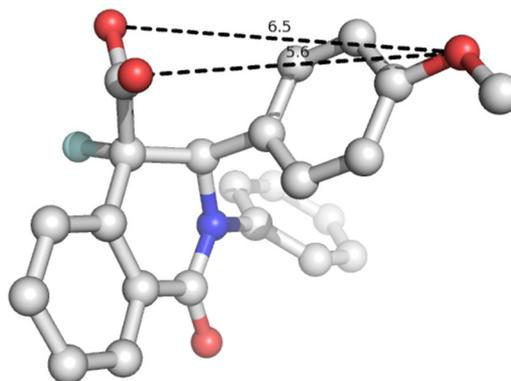
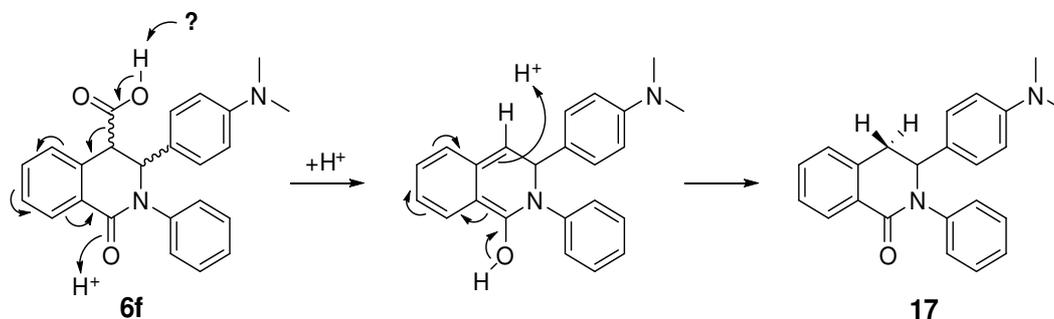


Abbildung 25: Die Kristallstruktur des Derivates (\pm) **11** zeigt die Entfernung zwischen der Carboxylgruppe und dem phenolischen Substituenten (hier OCH₃-Gruppe).

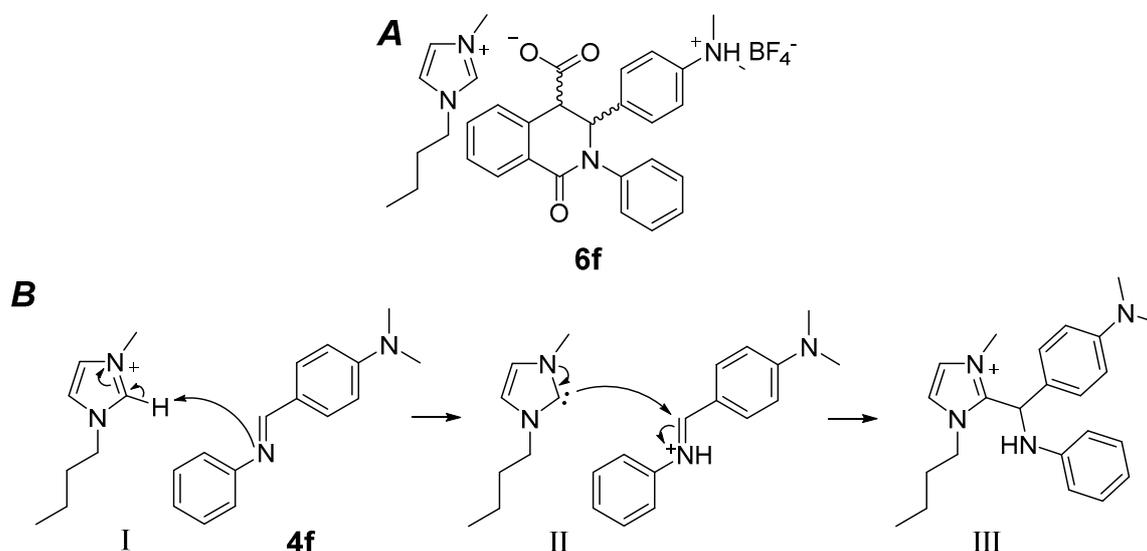


Schema 8: Der vorgeschlagene Reaktionsmechanismus der Decarboxylierung der Verbindung (\pm) **6f**, die zur Entstehung des Nebenproduktes **17** führt.

Neben der *intramolekularen* Deprotonierung ist ein *intermolekularer* Einfluss des basischen Stickstoffs auf ein anderes Molekül möglich. Außerdem wird das Imin **4f** für die Reaktion in einem leichten Überschuss zugesetzt (Tabelle 13, Ansatz 3, 4) und stellt damit eine weitere basische Komponente im Reaktionsmedium dar. Gegen diese Überlegung spricht die gelungene Synthese der Verbindung (\pm) **6g** in konzentrierter Essigsäure. Die Ausbeute von 32 % fiel zwar gering aus (Schema 6), jedoch wurde die Bildung des Decarboxylierungsproduktes nicht beobachtet.

Die Synthese der gewünschten Substanz (\pm) **6f** ebenso wie der Vergleichsverbindung (\pm) **6g** gelang unter der Anwendung der IF [bmim]BF₄ als Reaktionsmedium. Zuzüglich wurde die Entstehung des Nebenproduktes **17** in beiden Fällen nicht beobachtet (Tabelle 13, Ansatz 5-7; Schema 6). Eine denkbare Erklärung hierfür wäre die Stabilisierung der zwitterionischen Spezies der Verbindung (\pm) **6f** durch das Anion der IF, sodass die Decarboxylierung nicht begünstigt wird (Schema 9A).

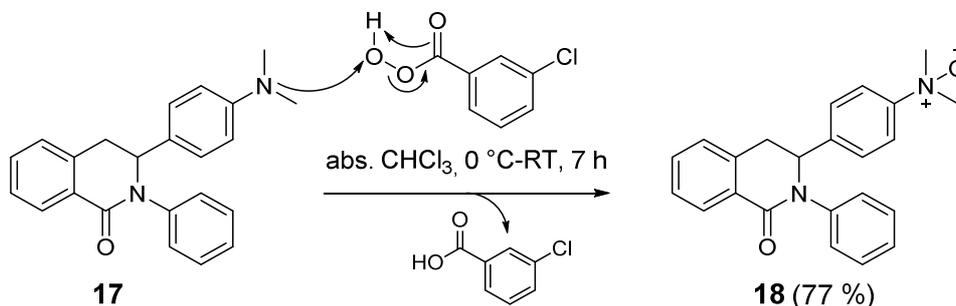
Der Einsatz der IF anstelle der konventionellen Reagenzlösungen bietet viele Vorteile, jedoch darf nicht außer Acht gelassen werden, dass die Salzionen ebenfalls Reaktionskomponenten darstellen.⁹⁶ Der pK_a-Wert des aciden Protons an dem Kohlenstoff C-2 des Imidazoliumkations variiert, abhängig von den Alkylresten, zwischen 16.1 und 24.0.⁹⁶ In Anwesenheit einer Base kann dieses Proton leicht abstrahiert werden, sodass das Imidazoliumkation an der Reaktion als ein Nukleophil partizipieren kann. Im Schema 9B ist ein möglicher Reaktionsverlauf des Imidazols und der Verbindung **4f** dargestellt. Nachdem der basische Stickstoff das Imidazoliumkation deprotoniert (I), kann das Carben das Imin nukleophil angreifen (II), sodass eine neue Kationverbindung entsteht (III). Durch diesen Vorgang wäre die Iminkomponente der Reaktion mit dem Anhydrid **3** entzogen, was eine plausible Erklärung der niedrigen Ausbeuten der Verbindungen (\pm) **6f** (6-13 %, Tabelle 13) und (\pm) **6g** (29 %, Schema 6) sein könnte.



Schema 9: **A:** Die Ionen der ionischen Flüssigkeit können das Zwitterion der Verbindung **6f** stabilisieren, sodass die Decarboxylierung nicht stattfindet. **B:** Das Imidazoliumkation kann mit dem Imin **4f** eine Reaktion eingehen, sodass das Imin der Cyclisierungsreaktion mit **3** entzogen wird.

Trotz der misslungenen Synthese des angestrebten Carbonsäurederivats (\pm) **6f**, wurde die Umsetzung zu einem TMAO-Derivat mit der Verbindung **17** fortgesetzt. Zur Oxidation von sekundären bzw. tertiären Aminen eignen sich beispielsweise Wasserstoffperoxid oder *m*-Chlorperbenzoesäure (*m*-CPBA), wobei H₂O₂ langsam reagiert und zu niedrigen Produktausbeuten führt.⁹⁷ Die Umsetzung von **17** mit *m*-CPBA führte zur Bildung des TMAO-

Hybrids **18** in einer Ausbeute von 77 %, indem *m*-CPBA im Überschuss (2 equiv.) bei 0 °C zum gelösten Edukt **17** zugegeben wurde und das Gemisch für 7 h bei RT gerührt wurde (Schema 7).



Schema 7: Reaktionsmechanismus zur Synthese des TMAO-Hybrides **18**.

3.5.1 Biologische Evaluierung des TMAO-Hybrides

Anhand der biologischen Untersuchung an den MM-INA-6-Zellen wurde festgestellt, dass das neue decarboxylierte Derivat **17** ($EC_{50} = 0.58 \mu\text{M}$) eine höhere Aktivität als die Leitstruktur AH073t (**2c**, $EC_{50} = 1.30 \mu\text{M}$) aufwies. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass die Carboxylgruppe für die Aktivität nicht essentiell ist und die Substanzen möglicherweise mit dem Isochinolinon-Grundgerüst an das Target bindet. Im Vergleich zu der synthetischen Vorstufe **17** wurde für das oxidierte Derivat **18** ein niedrigerer EC_{50} -Wert von $2.00 \mu\text{M}$ bestimmt. Da das Molekül **18** aufgrund der intermolekularen Ladung stark polarisiert ist, ist es möglich, dass die Bioverfügbarkeit im Vergleich zu **17** verringert ist und verminderte messbare Aktivität am Ganzzellmodell detektiert wurde.

Die TMAO-Verbindung **18**, aber auch andere neu hergestellte Carbonsäure- (**6c**, **6d**, **6e**) und Carbonsäureamidderivate (**7b**, **7d**) wurden für die Proteincokristallisation mit HSP70 (C. Plank, C. Grimm) verwendet, jedoch gibt es nach dem momentanen Stand keine weiteren Erkenntnisse über mögliche Bindungsmechanismen der Substanzen an das Targetprotein HSP70.

3.6 Entwicklung eines Radioaktivliganden für den Szintillationsnähennachweis

Der Szintillationsnähennachweis (*eng.* *Scintillation proximity assay*, *SPA*) bietet eine weitere Möglichkeit, Bindungsstudien der Isochinolinon-Derivate durchzuführen.⁹⁸ SPA wird heutzutage als Hochdurchsatztechnologie in der Wirkstoffforschung genutzt, um biologische Protein/Ligand- aber auch Protein/Protein-Interaktionen zu untersuchen. Ebenso erlaubt SPA, kinetische Bindungsprofile von Liganden an beispielsweise Rezeptoren zu erstellen.⁹⁹ Die Durchführung eines Szintillationsnähennachweises ist einfach, da alle Testkomponenten zusammen vermengt und vermessen werden, und dabei keine weiteren Schritte wie z.B.

Proteinfiltration notwendig sind. Die Methode basiert auf der Beobachtung, dass ein emittiertes β -Partikel eines Radioisotops (z.B. ^{125}I) eine limitierte Distanz in einem wässrigen Milieu zurücklegt. Dieses β -Partikel kann detektiert werden, indem es mit einem Szintillator interagiert und diesen zur Emission von Licht anregt.^{98,100} Zuerst wird das zu untersuchende Target (z.B. ein Protein, Rezeptor, Antigen) an eine polyvinyltoluolbasierende SPA-Matrix (ca. 5 μm große Polymerkugeln) gebunden. Wenn ein radioisotopenmarkierter Ligand hinzugegeben wird und nicht an das potentielle Target bindet, wird das ausgestrahlte β -Partikel vom umgebenden Medium abgefangen und nicht detektiert (Abbildung 26A). Sobald ein Radioligand an das Target bindet, befindet es sich in der unmittelbaren Nähe zum Szintillator, welcher von dem ausgestrahlten β -Partikel angeregt wird und daraufhin das emittierte Licht detektiert werden kann (Abbildung 26B).

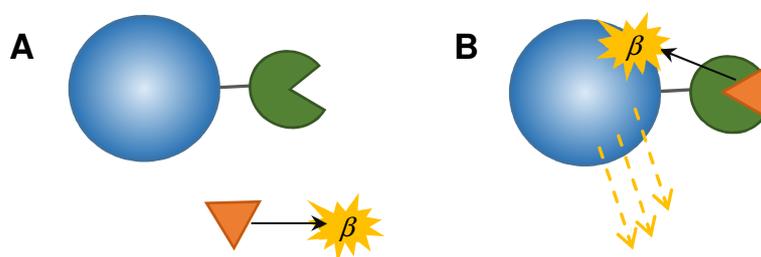
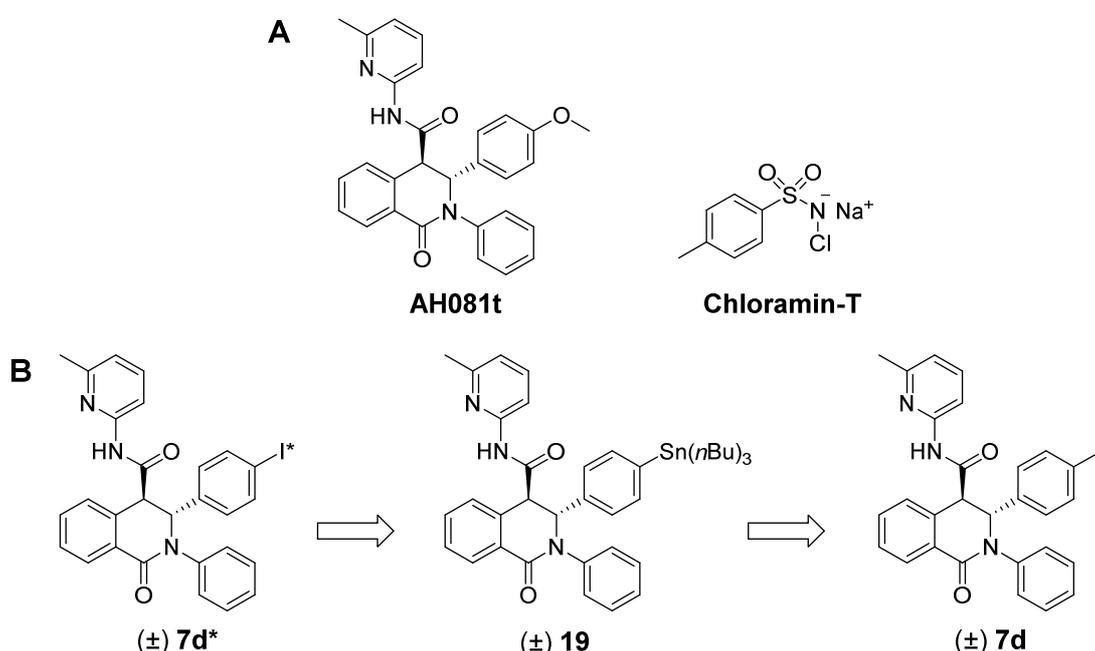


Abbildung 26: Schematische Darstellung eines Szintillationsnähennachweises. **A:** Das Target (grün) wird an eine polyvinyltoluolbasierende Matrix (blau) gebunden. Der nicht gebundene radioisotopenmarkierte Ligand (orange) strahlt das β -Partikel (gelb) aus, welches im wässrigen Medium zerstreut wird. **B:** Der gebundene Ligand (orange) bindet an das Target (grün) und strahlt das β -Partikel (gelb) aus, welches das Szintillatormaterial (blau) anregt und dadurch Licht emittiert und anschließend detektiert wird (gelbe Pfeile). Abbildung adaptiert von N. D. Cook.⁹⁸

Zur Herstellung radioaktivmarkierter Substanzen eignen sich Halogenide wie ^{18}F oder ^{124}I als Radionuklid. Das meist benutzte Radionuklid für die Positronen-Emissions-Tomographie (PET) ist ^{18}F , welches sich aufgrund seiner Halbwertszeit von $t_{1/2} = 110 \text{ h}$ für die *In-vivo*-Untersuchungen eignet. Für langwierigere Analysen ist ^{124}I mit einer Halbwertszeit von $t_{1/2} = 4.2 \text{ d}$ hingegen besser geeignet.¹⁰¹ Grundsätzlich orientiert sich die Herstellung eines Radioliganden an den gängigen synthetischen Methoden, wobei Reaktionsdauer und Aufarbeitungsmethoden an den radioaktiven Zerfall angepasst werden müssen. Die Radioiodierung gliedert sich generell in nukleophile und elektrophile Substitutionen.¹⁰¹ Nukleophile Austauschreaktion eines radioaktiven Halogenids kann je nach der Abgangsgruppe sowohl an aliphatischen als auch an aromatischen Verbindungsresten stattfinden, wobei die aromatischen Substitutionen wesentlich langsamer verlaufen. In diesem Fall sind elektrophile Methoden geeignet, die die leichte *In-situ*-Oxidierbarkeit von Iod zu I^+ durch Oxidationsmittel wie Chloramin-T (Schema 8) nutzen.¹⁰² Als aktivierte Vorstufe für eine Radioiodierung haben sich Metallorganyle mit Metallen der IV-Hauptgruppe (Si, Ge, Sn) etabliert.¹⁰³ Einer der aktivsten HSP70-Inhibitoren AH081t ($\text{EC}_{50} = 0.40 \mu\text{M}$) fungierte als

Leitstruktur für die Methodenentwicklung zur Herstellung eines radioaktivmarkierten Liganden (\pm) **7d***, wobei ein Iodsubstituent anstelle der Methoxygruppe eingeführt wurde (Schema 8).

Die Verbindung (\pm) **7d** wurde ausgehend von dem iodierten Carbonsäurederivat (\pm) **6d** und 2-Amino-6-picolin hergestellt (Kapitel 3.1.3). Trialkylzinn-modifizierte Verbindungen (Vgl. (\pm) **19**, Schema 8) sind vielseitig einsetzbare Ausgangssubstanzen, da sie eine große Vielzahl an ungeschützten funktionellen Gruppen tolerieren und somit in zahlreichen elektrophilen Substitutionsreaktionen eingesetzt werden können. Pickett et al. untersuchten die Umsetzung von Zinnorganyleen bei RT in Gegenwart eines Pd-Katalysators und einer Base, die keine Schutzgasatmosphäre und trockene Lösungsmittel bedarf.¹⁰⁴ Die optimierten Reaktionsbedingungen können der Tabelle 14 entnommen werden.

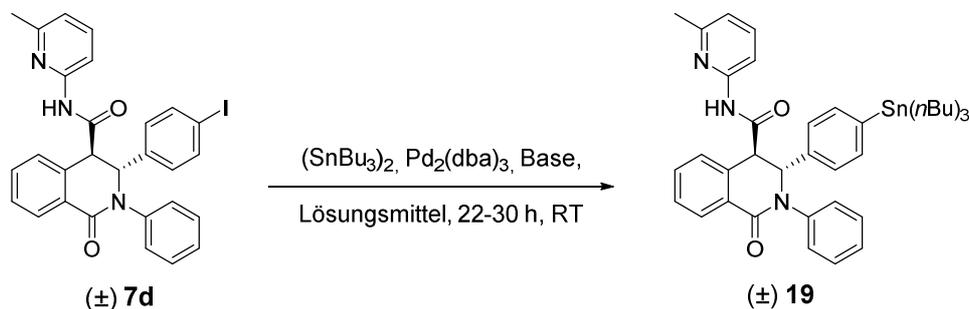


Schema 8: **A:** Struktur der Leitsubstanz AH081t für die Radioiodierung und von Chloramin-T. **B:** Der Radioligand (\pm) **7d*** sollte ausgehend von der iodierten Verbindung (\pm) **7d** über eine aktivierte Zinnverbindung (\pm) **19** hergestellt werden.

In der Arbeit von Pickett et al.¹⁰⁴ wurde beschrieben, dass $\text{Pd}_2(\text{dba})_3$ sich als Katalysator für die Alkylzinnsubstitution von iodierten Aromaten am besten bewährt hat, sodass hier diese Reaktionskomponente konstant gehalten wurde. Als erstes wurde das Zinnorganyl und die Base DIPEA im Überschuss zugegeben und die Reaktion in *iso*-PrOH umgesetzt, wobei das gewünschte Produkt (\pm) **19** mit 19 % Ausbeute isoliert wurde (Tabelle 14, Ansatz 1). Der Ansatz mit einer sterisch anspruchsvolleren Base DBU, aber auch eine erhöhte Menge des Katalysators brachten keine Verbesserung (Ansätze 2-3). Aufgrund der schlechter Löslichkeit des Eduktes (\pm) **7d** wurde im nächsten Ansatz das Lösungsmittel DMF (10 %) zum Reaktionsgemisch zugesetzt, sodass die Zinnverbindung (\pm) **19** in einer Ausbeute von 36 % erhalten wurde (Ansatz 4). Nachdem die Reaktion komplett in DMF durchgeführt wurde, war es möglich die Ausbeute auf 45 % zu erhöhen (Ansatz 5).

Ergebnisse und Diskussion

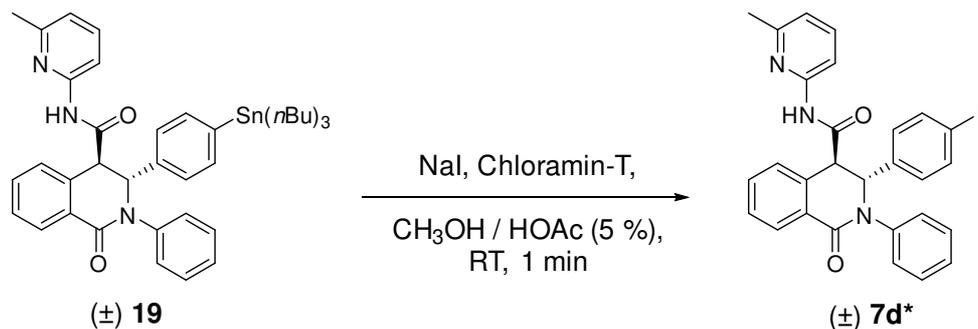
Tabelle 14: Reaktionsbedingungen zur Herstellung der Trialkylzinn-modifizierte Verbindung (\pm) **19** ausgehend von der iodierten Verbindung (\pm) **7d** in Gegenwart von Tributylzinn, Pd-Katalysator und einer Base. Die Reaktionen verliefen bei RT und benötigten keine Schutzgasatmosphäre oder trockene Lösungsmittel. ^a Die Ausbeute bezieht sich auf das isolierte Rohprodukt.



| Ansatz | Equiv. (\pm) 7d | Equiv. (SnBu_3) ₂ | Equiv. $\text{Pd}_2(\text{dba})_3$ | Equiv. Base | Lösungsmittel | Ausbeute (\pm) 19 [%] |
|--------|----------------------------|---|------------------------------------|-------------|---------------------------|----------------------------------|
| 1 | 1.0 | 1.5 | 0.025 | 2.5 DIPEA | <i>i</i> PrOH | 19 |
| 2 | 1.0 | 1.1 | 0.025 | 2.5 DBU | <i>i</i> PrOH | 16 |
| 3 | 1.0 | 1.1 | 0.050 | 2.5 DIPEA | <i>i</i> PrOH | 13 ^a |
| 4 | 1.0 | 1.6 | 0.025 | 2.5 DIPEA | <i>i</i> PrOH/DMF (1/0.1) | 36 |
| 5 | 1.0 | 1.6 | 0.050 | 2.5 DIPEA | DMF | 45 |

Im Rahmen dieser Arbeit wurde nicht mit radioaktiven Substanzen wie [¹²⁴I]NaI gearbeitet, sondern die Methode unter den Normalbedingungen mit NaI-Salz evaluiert (Schema 9). Im Fall einer tatsächlichen Radioaktivmarkierung müssen die Apparaturen den geringen Reaktionsmaßstäben angepasst und die Sicherheitsvorkehrungen beachtet werden, indem beispielsweise mit verbleiten Reaktionsgefäßen gearbeitet wird.¹⁰⁴ Hunter und Greenwood beschrieben bereits Ende der 1960er eine Methode zur Radioiodierung unter der Anwendung von Chloramin-T (Schema 8), die bis heute erfolgreich angewendet wird.¹⁰² Die Zinnverbindung (\pm) **19** wurde zuerst in CH₃OH mit 5 % HOAc gelöst und mit NaI (1.0 equiv.) versetzt. Anschließend wurde das Oxidationsmittel Chloramin-T (2.5 equiv.), gelöst in CH₃OH, schnell hinzugegeben, sodass die Reaktionslösung sich sofort braun verfärbte und die Färbung anschließend nach 10 sec verschwand.¹⁰⁴ Schließlich wurde die Reaktion durch Zugabe von Natriumdisulfit gestoppt und auf Reaktionsfortschritt untersucht.

Ergebnisse und Diskussion



Schema 9: Reaktionsschema zur iodierten Verbindung **(±) 7d*** ausgehend von der Trialkylzinnverbindung **(±) 19**. Im Fall einer tatsächlichen radioaktiven Markierung wird [¹²⁴I]NaI-Salz verwendet.

Die Reaktionskontrolle mittels HPLC (Methode **F**, Kapitel 10) zeigte, dass bereits zum Zeitpunkt „0“ (direkt nach der Zugabe des Oxidationsmittels) die vollständige Umsetzung der Zinnverbindung in die iodierte Form stattgefunden hatte. In **Abbildung 27** werden die Chromatogramme der iodierten Verbindung **(±) 7d**, der aktivierten Zinnverbindung **(±) 19** und der Reaktionskontrolle von **(±) 7d*** (direkt nach der Zugabe von Chloramin-T) verglichen. Da die Retentionszeiten der Substanzen **(±) 7d** ($t_R = 6.7$ min) und **(±) 19** ($t_R = 14.6$ min) sich deutlich voneinander unterschieden, konnte das Signal im Chromatogramm der Reaktionskontrolle ($t_R = 6.8$ min) erfolgreich der zu erwarteten Verbindung **(±) 7d*** zugeordnet werden.

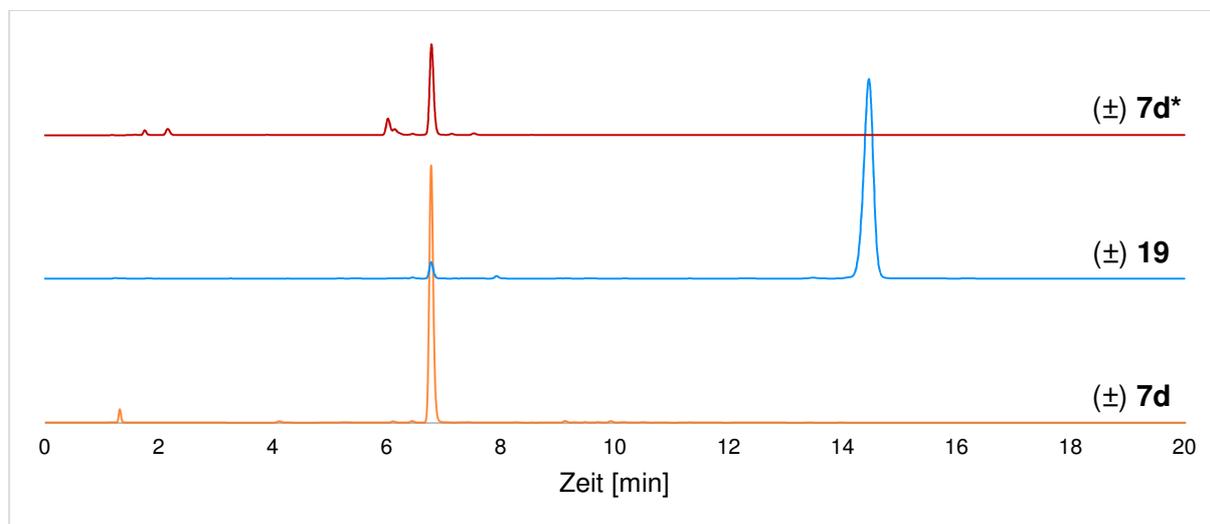
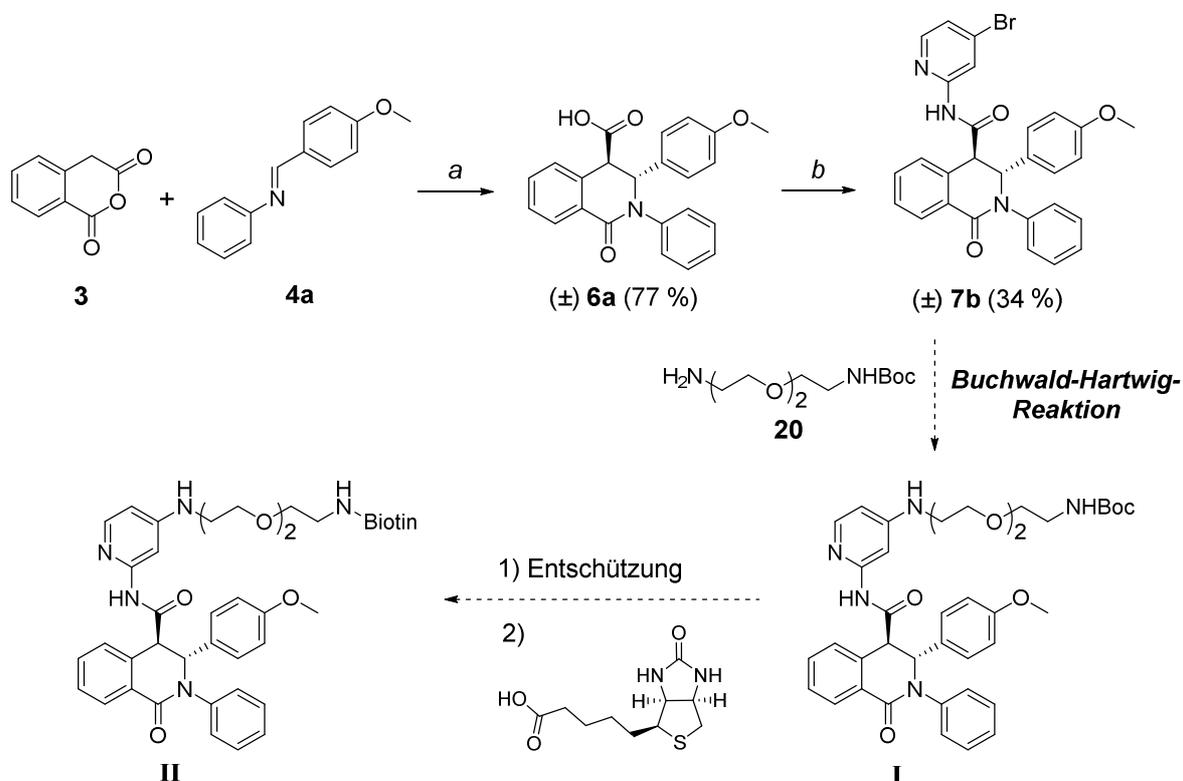


Abbildung 27: Der Vergleich der Chromatogramme von der iodierten Verbindung **(±) 7d**, der Zinnverbindung **(±) 19** und der Reaktionskontrolle der oxidativen Iodierung **(±) 7d*** zum Zeitpunkt „0“ zeigt die erfolgreiche Umsetzung zum gewünschten Radioliganden.

3.7 Liganden für die Affinitätschromatographie

Durch die Kooperation innerhalb der Klinischen Forschergruppe (CRU 216) mit Prof. Schlosser war es möglich, die Interaktionen zwischen den potentiellen HSP70-Inhibitoren und dem Target mittels Affinitätschromatographie und damit gekoppelter nanoLC-MS/MS-Analyse zu untersuchen. Affinitätschromatographie ist dabei eine etablierte Methode zur Reinigung von Proteinen und deren Komplexen, aber auch zur Untersuchung von Ligand-/Proteininteraktionen.¹⁰⁵⁻¹⁰⁶ Es war geplant, die aktivsten Derivate der Tetrahydroisochinolinon-Bibliothek kovalent an (+)-Biotin zu knüpfen und den immobilisierten Liganden mit dem MM-INA-6-Zelllysat zu inkubieren. Die daran gebundenen Proteine sollten mittels einer Streptavidinmatrix eluiert, mit SDS-Page getrennt und anschließend charakterisiert werden.



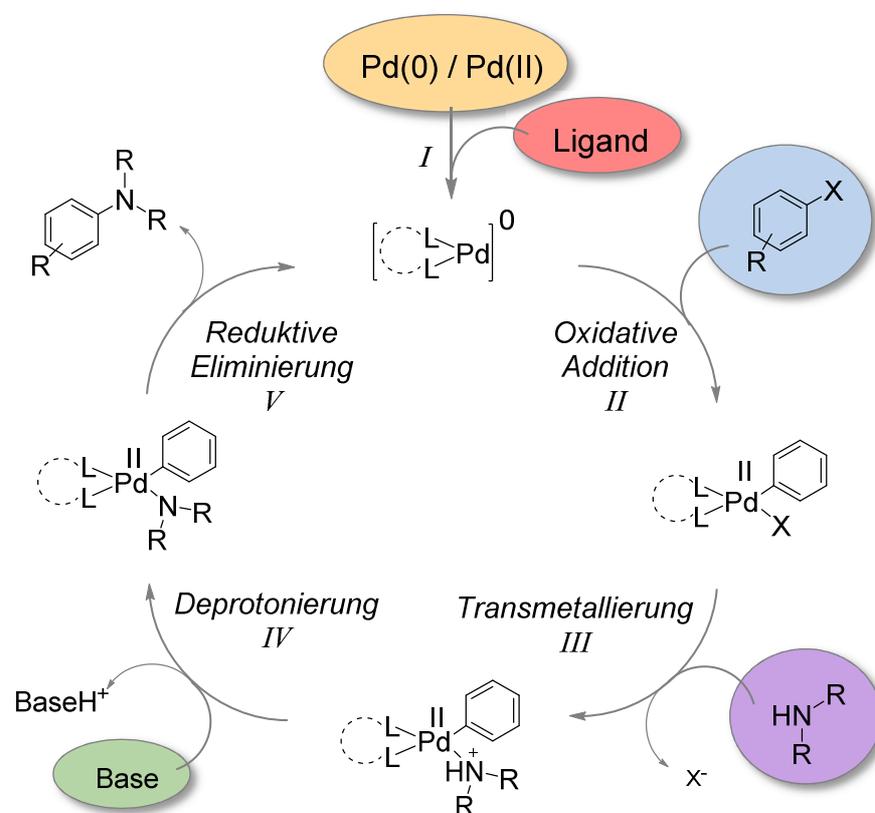
Schema 10: Reaktionsschema zur Herstellung eines Biotin-markierten Liganden für die Untersuchung der Bindung an das HSP70 mittels Affinitätschromatographie. Die Synthese des Amidderivates (\pm) **7b** ist im Kapitel 3.1.3 beschrieben (**a**: konz. HOAc, 140 °C, 15 h; EtOH, 8 M NaOH-Lösung, RT, 1.5 h. **b**: abs. CH₂Cl₂, EDC·HCl, HOBT, Amin, RT, 24 h). Eine aromatische Aminierung kann mittels der Buchwald-Hartwig-Reaktion durchgeführt werden. Der mit Linker versehene Ligand **I** kann schließlich mittels einer Amidkopplung biotinyliert werden.

In Anlehnung an die Leitstruktur AH081t (Schema 8A) wurde die Verbindung (\pm) **7b** ausgehend von der 3,4-Dihydroisochinolin-1(2H)-on-carbonsäure (\pm) **6a** hergestellt. Das synthetische Vorgehen hierzu ist im Kapitel 3.1.3 beschrieben. Anhand des berechneten Bindungsmodus (Arbeitskreis Sotriffer) sollte die Modifikation des Liganden in erster Linie am Amidsubstituenten stattfinden, wobei das hydrophile 2,2'-(Ethylenedioxy)-diethylamin **20** als ein Linker zwischen dem Liganden und dem Biotin fungieren sollte. Die Pd-katalysierte

C-N-Kreuzkupplungsreaktionen nach Buchwald-Hartwig ermöglicht anschließend eine Aminierung von halogenierten Aromaten in sehr guten Ausbeuten.¹⁰⁷ Die Reaktion mit Biotin ist über eine Amidkopplung realisierbar (Schema 10).

3.7.1 Beschreibung der Buchwald-Hartwig-Kreuzkupplung

Die Pd-katalysierte Buchwald-Hartwig-Reaktion hat in den letzten Jahrzehnten erheblich zur Steigerung der synthetischen Effizienz und Substanzvielfalt beigetragen. Die Schlüsselkomponenten der Reaktion wie die Pd-Quelle, die Katalysatorliganden, die Base und das Lösungsmittel, aber auch deren Zusammenspiel, wurden bisher in zahlreichen wissenschaftlichen Arbeiten untersucht und weiterentwickelt.¹⁰⁷⁻¹¹⁷ Der allgemeine Reaktionszyklus der Aminierung ist im Schema 11 dargestellt. Nachdem die Palladiumspezies von dem Liganden aktiviert wird (Schema 11, I), findet die oxidative Addition z.B. des halogenierten Aromaten statt (II). Anschließend findet die Transmetallierung (III) statt, indem sich die Aminverbindung an den Komplex anlagert. Im nächsten Schritt abstrahiert eine Base das Aminproton (IV), sodass darauf folgend die reduktive Eliminierung (V) abläuft und die C-N-Knüpfung stattfindet. Der Katalysatorkomplex wird sogleich freigesetzt und kann den nächsten Zyklus durchlaufen.¹⁰⁷



Schema 11: Allgemeiner Reaktionszyklus der Pd-katalysierten C-N-Kreuzkupplung nach Buchwald-Hartwig. Die unterschiedlichen Komponenten des Reaktionszyklus sind farblich unterlegt.

Für die erfolgreiche Umsetzung der Kreuzkupplung ist die Anwesenheit einer Pd(0)-Spezies (Schema 11, gelb) erforderlich. Hierfür kann direkt ein stabiler Komplex wie beispielsweise $\text{Pd}_2(\text{dba})_3$ eingesetzt werden. Durch die Koordination zwischen den Benzylidenacetatresten und dem Metall kann dessen Aktivität jedoch gemindert sein, sodass vorheriges Erhitzen des Katalysators in Anwesenheit eines Liganden und der Base vor der Addition der Halogenverbindung vorteilhaft sein kann.¹¹⁸ Eine weitere Möglichkeit bietet der Einsatz von Pd(II)-Salzen wie $\text{Pd}(\text{OAc})_2$. In diesem Fall muss das Kation jedoch erst zu Pd(0) reduziert werden, bevor es in dem Reaktionszyklus partizipieren kann. Dies kann durch Zugabe von tertiären Aminen wie NEt_3 gewährleistet werden, wobei Phosphinliganden in Anwesenheit von Wasser im Reaktionsmedium ebenfalls zur Reduktion von Pd(II) führen können.¹⁰⁸ Eine wirkungsvolle Alternative bieten intramolekular koordinierte Pd-Ligandkomplexe (Abbildung 28, links).

Einer der wichtigsten Einflussfaktoren des erfolgreichen Reaktionsverlaufs ist die Beschaffenheit des Phosphinligandes (Schema 11, rot), bei welchen es sich um stabile kristalline Feststoffe handelt, die in einer großen Vielzahl kommerziell verfügbar sind. Heutzutage finden die Liganden BrettPhos für primäre Amine und RuPhos für sekundäre Amine den meisten Einsatz (Abbildung 28).¹⁰⁷ Ansonsten wird empfohlen, die Liganden recht individuell auf die jeweiligen Substrate anzupassen, um den maximalen Umsatz zu erzielen.

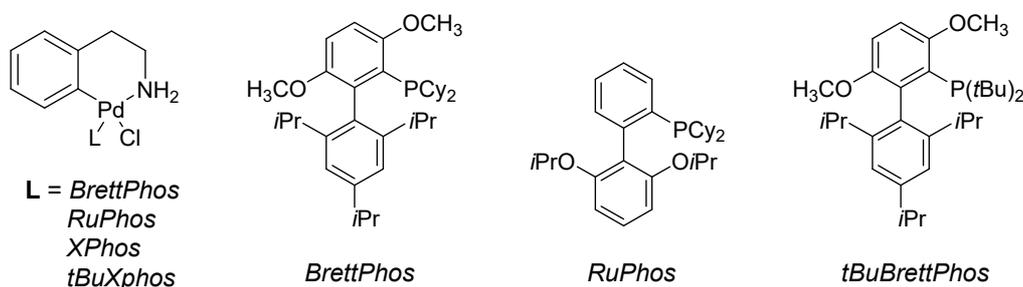


Abbildung 28: Strukturformeln von kommerziell erwerblichen intramolekularen Pd-Liganden (links) und von einigen Phosphinliganden.

Ursprüngliche Untersuchungen der C-N-Kreuzkupplungen fanden mit Hilfe von Halogenaromaten (Br, Cl, I) als den elektrophilen Part (Schema 11, blau) statt. Mittlerweile wird die Buchwald-Hartwig-Reaktion auf diverse Systeme ausgehend von aromatischen Mesylaten und Triflaten mit unterschiedlicher Ringgröße, auch Heterozyklen¹¹² und unabhängig von den vorhandenen freien funktionellen Gruppen (Carboxy-, Hydroxy-, Amid-, Hydrazid-, Estergruppen)¹¹³ angewendet. Ebenso vielseitig werden die nukleophilen Amine (Schema 11, lila) eingesetzt. Das Spektrum umfasst sowohl aromatische als auch aliphatische Substrate mit primären, sekundären, aber auch amidischen Amingruppen. Ammoniak und Dimethylamin können ebenso erfolgreich eingesetzt werden.¹¹⁴

Weitere Optimierungsfaktoren der Reaktion stellen das Lösungsmittel und die Base dar. Die am meisten verwendeten Reaktionsmedien sind Toluol und 1,4-Dioxan, wobei THF

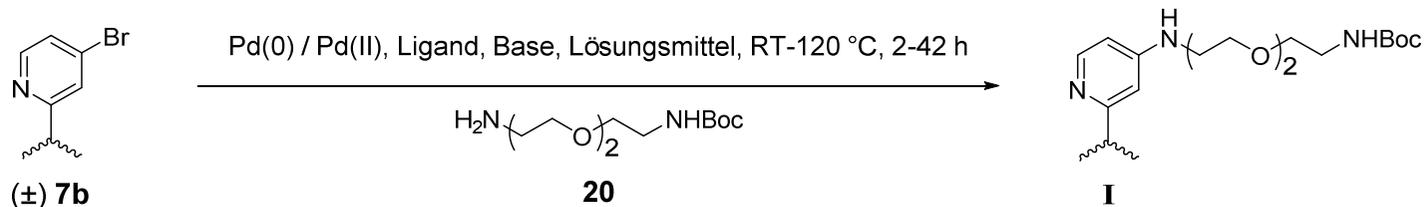
ebenfalls Einsatz findet. Protische Lösemittel wie *tert*-BuOH werden ebenso wie aprotisch polare DMSO und DMF erfolgreich angewendet.¹⁰⁷ Dallas und Gothelf haben gezeigt, dass die Abwesenheit von Wasser im Reaktionsmedium in manchen Fällen den Reaktionsfortschritt hindert und deswegen beabsichtigt zugesetzt wird.^{108,116} Weiterhin kann die Variation der Base (Schema 11, grün) zur erfolgreichen Synthesedurchführung beitragen. Eine Vielzahl an Arbeiten sind bekannt, die den Einsatz von sowohl starken organischen Basen wie LiHMDS und *tert*-BuOK, aber auch von schwächeren anorganischen Basen wie K₂CO₃ und K₃PO₄ beschrieben.^{107,109} Reaktionsdurchführung mittels Mikrowellenstrahlung sind ebenfalls literaturbekannt.¹¹⁷

3.7.2 Anwendung der Buchwald-Hartwig-Kreuzkupplung

Um ein optimales Synthesergebnis zu erhalten wurden für die Kupplung der Verbindung (\pm) **7b** mit dem Linker **20** (Schema 11) unterschiedliche Reaktionskomponenten variiert und evaluiert (Tabelle 15). Der Amidlinker **20** wurde in allen Versuchen in einem geringen Überschuss von 1.3-1.9 Equiv. bezogen auf das Edukt (\pm) **7b** eingesetzt. Die Mengenangaben anderer Komponenten in der Tabelle beziehen sich ebenfalls auf (\pm) **7b**. Bei allen Reaktionsansätzen wurde der Ligand *t*BuBrettPhos (Abbildung 28) eingesetzt. Alle Synthesen wurden unter Schutzgasatmosphäre und in vorgetrockneten Apparaturen (außer Ansätze 4-9, 11) durchgeführt. Der Reaktionsverlauf wurde jeweils mittels Dünnschichtchromatographie verfolgt.

Zu Beginn wurde eine Pd(II)-Spezies als Pd(OAc)₂ getestet (Ansätze 1-9, Tabelle 15). Die ersten zwei Synthesen zeigen die Verwendung von der organischen Base *tert*-BuOK in unterschiedlichen Reaktionsmedien THF und 1,4-Dioxan, wobei keine Produktbildung beobachtet wurde. Aufgrund des niedrigeren Siedepunktes von THF (Sdp. = 66 °C, Normaldruck)¹¹⁹ wurde im weiteren Optimierungsverlauf 1,4-Dioxan (Sdp. = 101 °C, Normaldruck)¹¹⁹ verwendet. Als nächstes wurde die Menge des Pd-Katalysators und des Liganden auf 10 mol% erhöht, jedoch keine Produktbildung festgestellt. Im weiteren Verlauf wurde die starke Base *tert*-BuOK, die mitunter zur Entstehung zahlreicher Nebenprodukte führen kann, gegen die mildere anorganische Base K₂CO₃ ausgetauscht, die größere Toleranz gegenüber funktionellen Gruppen zeigt (Ansätze 4-10).¹⁰⁷ Der Ansatz 4 zeigt den ersten Versuch mit K₂CO₃ als Base ohne Erfolg. Daraufhin wurde die Menge an Katalysator und Ligand auf jeweils 5.0 mol% erhöht, aber auch H₂O zum Reaktionsmedium zugesetzt¹⁰⁸ und das Gemisch zusätzlich entgast¹¹⁶ (Ansatz 5), sodass das gewünschte Rohprodukt mit 19 % Ausbeute isoliert und mittels ¹H-NMR bestätigt wurde. Eine Wiederholung dieser Reaktionsbedingungen, wobei der Ligand *t*BuBrettPhos in einem minimalen Überschuss zum Katalysator vorlag, brachte eine Steigerung der Ausbeute auf 39 % (Ansatz 6). Nachdem die

Tabelle 15: Übersicht über die Reaktionsbedingungen zur Durchführung der Buchwald-Hartwig-Kreuzkupplung. Der Linker **20** wurde in einem Überschuss von 1.3-1.9 Equiv. bezogen auf das Edukt (\pm) **7b** eingesetzt. Die angegebenen Mengen der weiteren Komponenten beziehen sich ebenfalls auf (\pm) **7b**. ^a Die Ausbeute bezieht sich auf das Rohprodukt, welches mit Hilfe der Extraktion mit Et₂O isoliert wurde.



| Ansatz | Katalysator | | Ligand | Base | | Lösungsmittel | | Kat-Aktivierung | Lösungsmittel entgasen | Rkt.-temperatur | Rkt.-zeit | Produkt [%] |
|--------|------------------------------------|------|--------|--------------------------------|--------|---------------|---------------------------|-----------------|------------------------|-----------------|-----------|-----------------|
| | | mol% | | | Equiv. | | H ₂ O (Equiv.) | | | | | |
| 1 | Pd(OAc) ₂ | 2.0 | 1.2 | <i>t</i> -BuOK | 2.0 | THF | - | - | - | 66 °C | 2 h | - |
| 2 | Pd(OAc) ₂ | 2.2 | 2.3 | <i>t</i> -BuOK | 2.2 | 1,4-Dioxan | - | - | - | 80 °C | 6 h | - |
| 3 | Pd(OAc) ₂ | 10.0 | 10.0 | <i>t</i> -BuOK | 2.2 | 1,4-Dioxan | - | - | - | 100 °C | 5 h | - |
| 4 | Pd(OAc) ₂ | 2.8 | 3.3 | K ₂ CO ₃ | 2.2 | 1,4-Dioxan | - | - | - | 100 °C | 5 h | - |
| 5 | Pd(OAc) ₂ | 5.0 | 5.0 | K ₂ CO ₃ | 2.1 | 1,4-Dioxan | 1.0 | - | <i>J</i> | 100 °C | 42 h | 19 ^a |
| 6 | Pd(OAc) ₂ | 4.6 | 5.0 | K ₂ CO ₃ | 2.0 | 1,4-Dioxan | 1.0 | - | <i>J</i> | 100 °C | 32 h | 39 ^a |
| 7 | Pd(OAc) ₂ | 11.0 | 9.0 | K ₂ CO ₃ | 10.0 | 1,4-Dioxan | 5.0 | - | <i>J</i> | 100 °C | 42 h | - |
| 8 | Pd(OAc) ₂ | 2.3 | 4.5 | K ₂ CO ₃ | 1.5 | 1,4-Dioxan | 5 mol% | <i>J</i> | - | RT | 22 h | - |
| 9 | Pd(OAc) ₂ | 2.3 | 4.5 | K ₂ CO ₃ | 1.6 | 1,4-Dioxan | 5 mol% | <i>J</i> | - | 100 °C | 22 h | - |
| 10 | Pd ₂ (dba) ₃ | 2.3 | 3.2 | K ₂ CO ₃ | 3.0 | 1,4-Dioxan | - | - | - | 100 °C | 22 h | - |
| 11 | Pd ₂ (dba) ₃ | 2.7 | 3.2 | K ₂ CO ₃ | 3.0 | 1,4-Dioxan | 5 mol% | - | - | 100 °C | 18 h | - |
| 12 | Pd ₂ (dba) ₃ | 5.0 | 5.0 | DBU | 3.0 | Toluol | - | - | <i>J</i> | 110 °C | 22 h | - |
| 13 | Pd ₂ (dba) ₃ | 2.7 | 5.4 | DBU | 2.5 | Toluol | - | - | <i>J</i> | 110 °C /MW | 6 h | - |

Menge an Pd(OAc)₂, des Liganden und des zugesetzten Wassers weiter erhöht wurde, wurde das gewünschte Produkt nicht mehr gebildet.

Fors et al. entwickelten ein Protokoll zur Aktivierung des Pd-Katalysators (1 mol%) in Gegenwart eines Liganden (3 mol%) und Wassers (4 mol%) in 1,4-Dioxan bei 80 °C innerhalb von einer Minute.¹⁰⁸ Dabei wurden diese Komponenten erst zusammen vermengt, aktiviert und anschließend zu der Lösung der Substrate und der Base hinzugegeben. Dieses Protokoll wurde in den Ansätzen 8 und 9 ebenso angewendet, wobei diese parallel bei RT und unter Hitzezufuhr abliefen. Beide Reaktionen zeigten keinen Umsatz zum gewünschten Produkt.

Die anschließenden Ansätze 10 und 11 zeigen den Einsatz eines Pd(0)-Katalysators in Form von Tri(dibenzylidenaceton)dipalladium (Pd₂(dba)₃). Die Umsetzung in 1,4-Dioxan sowohl in Abwesenheit als auch in Anwesenheit von H₂O führte nicht zur Bildung eines Produktes, wobei zu beachten ist, dass hier das Reaktionsgemisch nicht entgast wurde. Zuletzt wurde der Einsatz eines unpolaren Lösungsmittels Toluol (Sdp. = 111 °C, Normaldruck)¹¹⁹ und einer sterisch anspruchsvolleren organischen Base 1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en (DBU) sowohl konventionell unter Rückfluss¹⁰⁷ (Ansatz 12), als auch bei der Mikrowellenstrahlung¹¹⁷ (Ansatz 13) evaluiert. In beiden Fällen wurde die Bildung des Produktes nicht beobachtet.

Zusammenfassend betrachtet hat die Buchwald-Hartwig-Kreuzkupplung unter den zahlreichen Reaktionsansätzen nur in zwei Ansätzen zur Bildung des gewünschten Produktes geführt, indem Pd(II)-Spezies als Pd(OAc)₂, der Ligand *t*BuBrettPhos und K₂CO₃ als Base in 1,4-Dioxan mit zugesetztem Wasser und anschließender Entgasung des Reaktionsgemisches angewendet wurden. An dieser Stelle sei vermerkt, dass dieses Ergebnis im Anschluss nicht mehr reproduzierbar war. Rückblickend fällt auf, dass der Ligand *t*BuBrettPhos entweder äquimolar oder in einem geringen Überschuss im Vergleich zum Katalysator vorlag. Da der Ligand jedoch nicht nur als Komplexbildner, sondern auch zur Aktivierung des Metallkations notwendig sein kann, sind oft mehr als drei Äquivalente der Phosphinverbindung notwendig.¹⁰⁷ Mehrere Untersuchungen haben gezeigt, dass Wasser im Reaktionsmedium hilfreich für die Aktivierung des Katalysators ist, wohingegen Sauerstoff störend ist und die Lösungsmittel entgast und die Umsetzung unter Schutzgasatmosphäre ablaufen muss. Aufgrund der dargestellten Schwierigkeiten wurde eine alternative Synthesestrategie entwickelt.

3.7.3 Alternative Synthese der biotinylierten Liganden

Da die aromatische C-N-Kreuzkupplung nach Buchwald-Hartwig nicht zum erwünschten Zielmolekül (**I**, Abbildung 29) führte, wurde eine alternative Ligandstruktur (**II**, Abbildung 29) versucht zu synthetisieren, die sich lediglich durch die Abwesenheit des aromatischen Amidrestes unterscheidet. Da bis zu diesem Zeitpunkt die exakte Bindungsposition der 3,4-Dihydroisochinolinone am HSP70-Chaperon nicht bekannt war, wurde zusätzlich die Synthese eines weiteren biotinylierten Liganden (**III**, Abbildung 29) angestrebt, der den aromatischen Amidrest aufweist und die Knüpfung an den Linker an einem anderen Phenylrest erfolgen sollte.

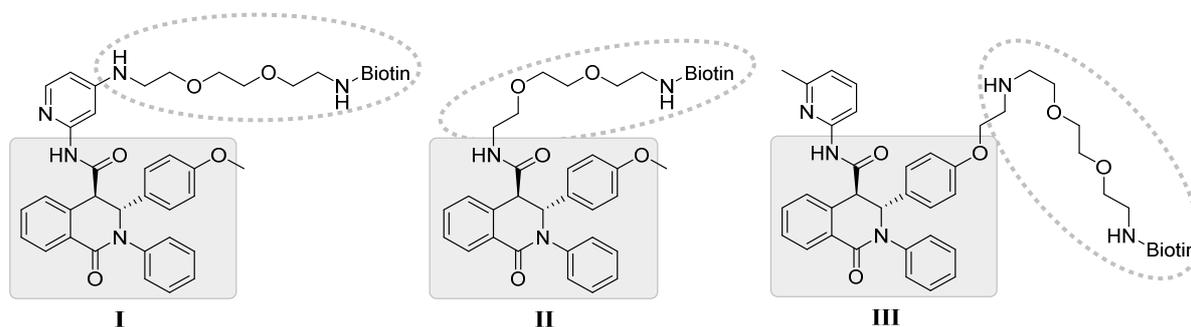
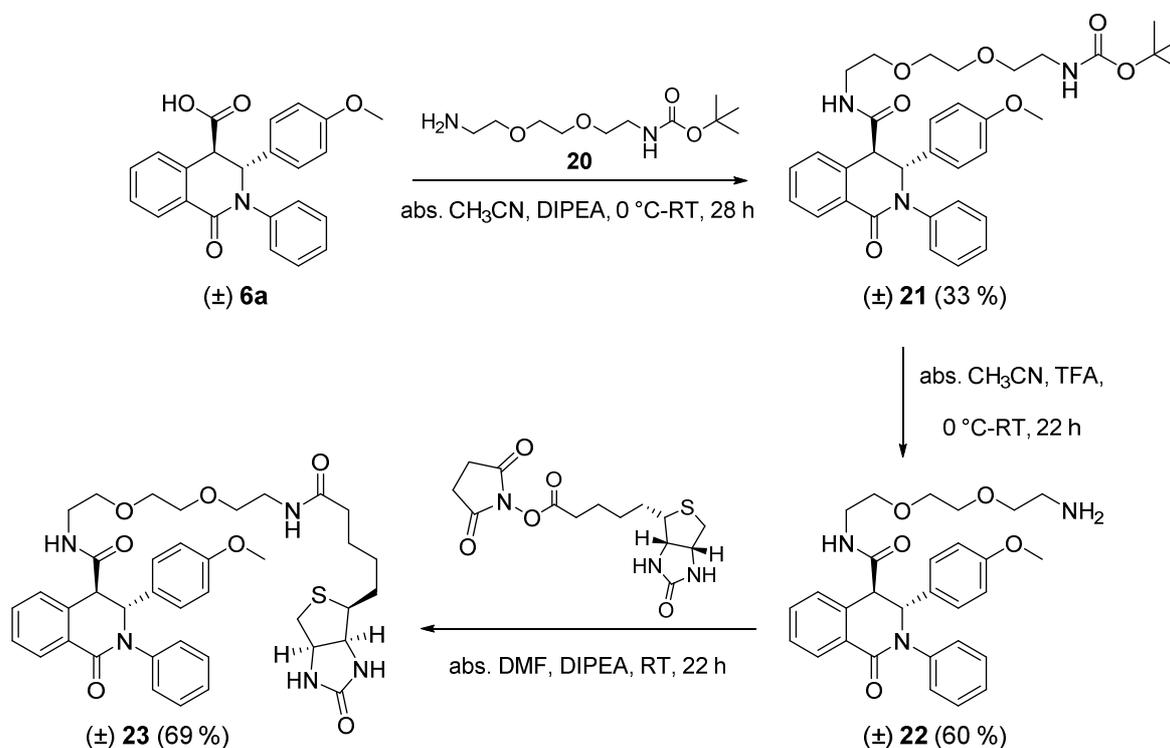
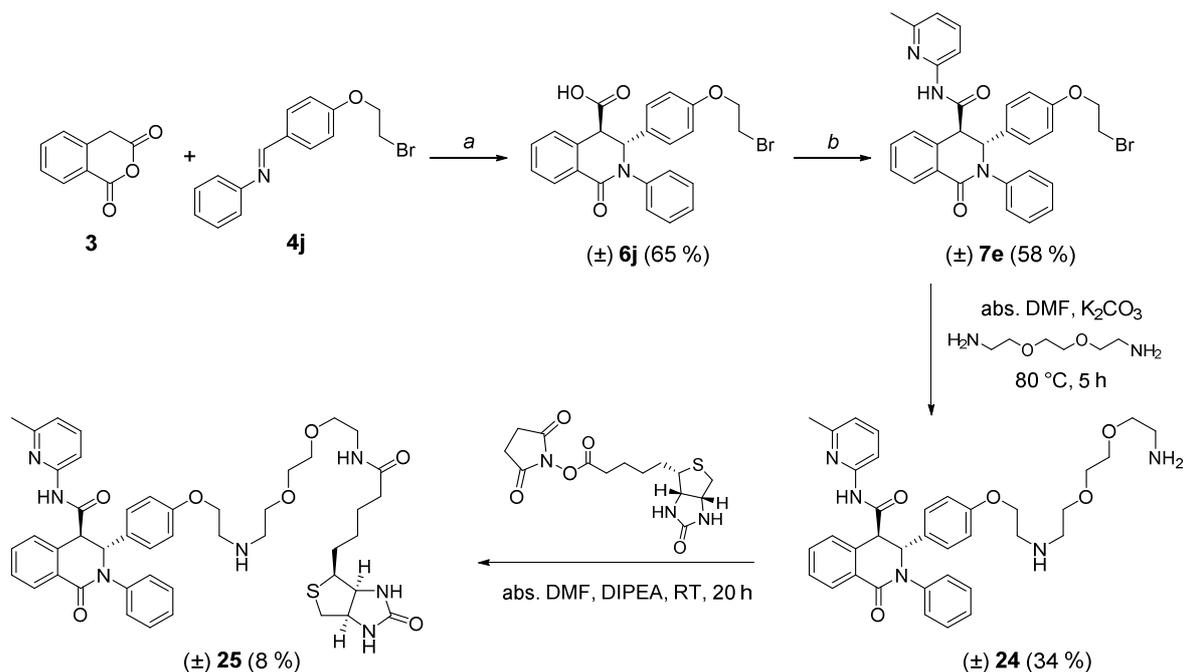


Abbildung 29: Die Synthese des biotinylierten Liganden **I** war nicht erfolgreich. Alternativ wurde die Struktur **II** angestrebt, die sich durch die Abwesenheit des aromatischen Amidrestes von **I** unterscheidet. Der weitere geplante Ligand **III** weist den aromatischen Amidrest auf und soll an einer anderen Position mit Linker verbunden werden.



Schema 13: Das Reaktionsschema zeigt die Synthese der ersten biotinylierten Verbindung (\pm) **23**. Ausgehend von der Leitstruktur (\pm) **6a** wurde erst der Boc-geschützte Linker **20** angebracht, sodass nach der Entschützung die Verbindung (\pm) **22** mit NHS-Biotin umgesetzt wurde, um den Liganden (\pm) **23** zu erhalten.

Das Schema 13 zeigt die Synthese des ersten biotinylierten Liganden (\pm) **23** (Vgl. II, Abbildung 29). Die Leitstruktur (\pm) **6a** wurde zuerst mit dem *tert*-Butyloxycarbonyl-geschützten (Boc-geschützt) Aminlinker **20** in Gegenwart von DIPEA umgesetzt, um die Verbindung (\pm) **21** mit 33 % Ausbeute zu erhalten. Die Abspaltung der Boc-Schutzgruppe gelang nach Zugabe von Trifluoressigsäure im Überschuss, sodass die freie Verbindung (\pm) **22** mit 60 % Ausbeute erhalten wurde. Die Isolierung von (\pm) **22** aus der Rohproduktmischung gelang mittels Umkehrphasen-MPLC, indem C18-modifizierte Kieselgelsäulen mit einem Elutionssystem aus H₂O/CH₃OH verwendet wurden. Zur Modifikation mit (+)-Biotin wurde der aktivierte *N*-Hydroxysuccinimidester (NHS-Biotin) verwendet. Aufgrund der geringen Löslichkeit von NHS-Biotin in gängigen Lösungsmitteln wurde die Reaktion im absoluten DMF durchgeführt, wobei das Biotin vorgelegt wurde und die Lösung von (\pm) **22** und DIPEA in DMF langsam unter Rühren hinzugegeben wurde. Nach der Reinigung des Rohproduktes mittels Umkehrphasen-MPLC wurde das gewünschte Endprodukt (\pm) **23** in einer Ausbeute von 69 % erhalten.



Schema 14: Reaktionsschema zeigt die Synthese des biotinylierten Liganden (\pm) **25**. Die freie Carbonsäure (\pm) **6j** wurde wie bereits beschrieben hergestellt (a: konz. HOAc, 120 °C, 3 h; EtOH, 8 M NaOH-Lösung, RT, 1 h). Die Synthese von (\pm) **7e** erfolgte mit Hilfe von 2-Amino-6-methylpyridin (b: abs. CH₃CN, DIPEA, 2,2,2-Trichlor-1,1-dimethylethylformiat, 0 °C-RT, 24 h). Die Verlängerung des Linkers zur Verbindung (\pm) **24** gelang in abs. DMF in Anwesenheit von K₂CO₃ bei 80 °C. Durch die Umsetzung mit dem aktivierten NHS-Biotin wurde der Ligand (\pm) **25** hergestellt.

Der biotinylierte Ligand (\pm) **25** (Vgl. III, Abbildung 29) wurde ausgehend von dem Carbonsäurederivat (\pm) **6j** aufgebaut (Schema 14), welches aus dem Anhydrid **3** und der Iminverbindung **4j** erhalten wurde. Die Säure (\pm) **6j** reagierte zum Amid (\pm) **7e**, der ein

strukturelles Analogon zur Amidleitstruktur AH081t (Schema 8) darstellt. Die Verlängerung des Linkers erfolgte nach einer S_N2 -Reaktion mit dem 2,2'-(Ethylendioxy)-diethylamin in Gegenwart von K_2CO_3 als Base, sodass (\pm) **24** mit 34 % Ausbeute erhalten wurde. Die Umsetzung mit dem aktivierten NHS-Biotinester erfolgte in abs. DMF und DIPEA. Das Rohprodukt wurde direkt mittels Umkehrphasen-MPLC mit H_2O und CH_3CN als Elutionssystem isoliert, wobei das reine Produkt (\pm) **25** in einer Ausbeute von 8 % isoliert wurde.

Bei der Analyse des Diastereomergemisches (\pm) **25** fiel eine Aufspaltung von Signalen im 1H -NMR-Spektrum auf, die im Verhältnis 1/1 vorlagen. In der Abbildung 30A sind einige deutliche Signaldoppelungen gezeigt. Mit Hilfe von 2D-NMR-Experimenten und der NMR-Spektren der Synthesestufen wurde festgestellt, dass es hierbei nicht um Aufspaltung durch 3J -Kopplungen handelt. Vielmehr deutet das Messergebnis auf eine diastereomerenabhängige Aufspaltung der Signale hin. Da die Diastereomere *3R,4R*-**25** und *3S,4S*-**25** jeweils fünf Stereozentren aufweisen (Abbildung 30B) unterscheidet sich die Protonenumgebung, was zu unterschiedlicher Signalverschiebung führt.

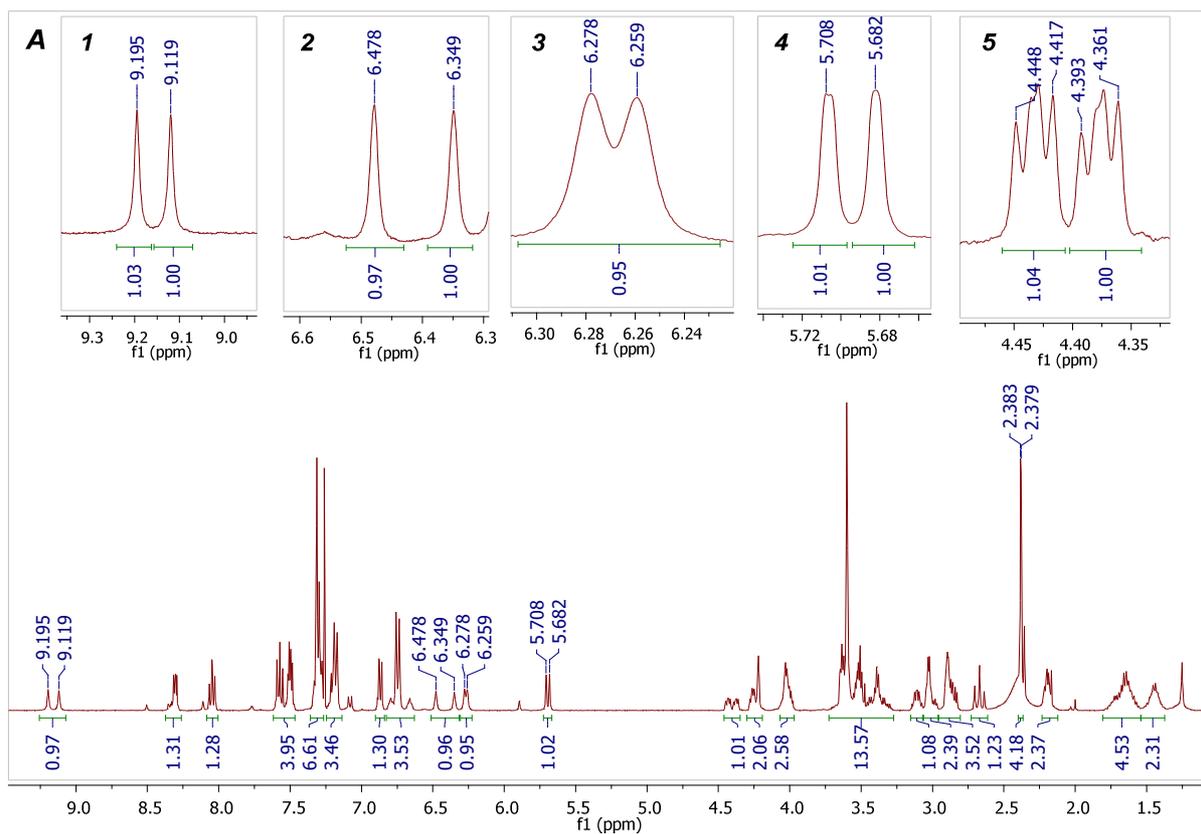


Abbildung 30: A: 1H -NMR-Spektrum der diastereomeren Verbindung (\pm) **25** zeigt eine Doppelung einiger beispielhafter Signale (1,2,3,4 und 5), die jeweils im Verhältnis 1/1 zueinanderstehen. Hierbei handelt es sich nicht um Aufspaltung durch 3J -Kopplungen, sondern um Signale von zwei unterschiedlichen Molekülspezies.

Ergebnisse und Diskussion

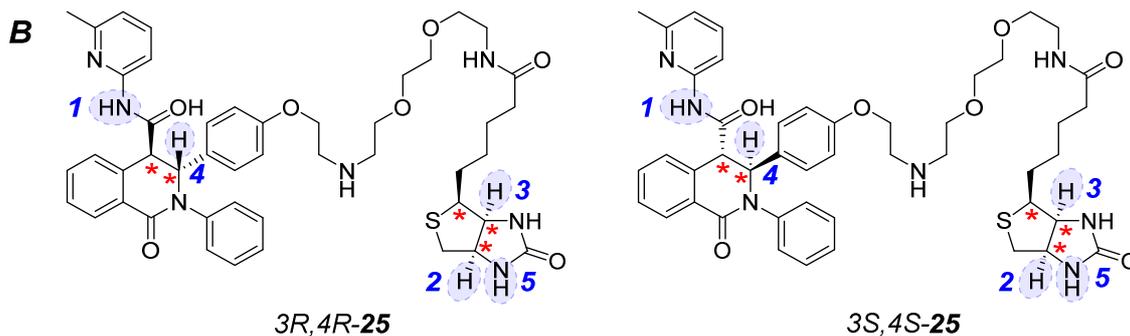


Abbildung 30: B: Die Diastereomere der Verbindung (\pm) **25**, die in einem Gemisch nebeneinander vorliegen, weisen jeweils fünf Stereozentren auf (rotes Sternchen), was zur unterschiedlichen Umgebung einzelner Protonen führt, die im $^1\text{H-NMR}$ als unterscheidbare Signale sichtbar sind (1,2,3,4 und 5).

3.7.4 Durchführung der Affinitätschromatographie

Die Affinitätschromatographie wurde in der Kooperation mit Proteomicsgruppe, Schlosser und Bach, durchgeführt. Die biotinylierten Liganden wurden zuerst auf Streptavidinbeads aufgebracht und diese mit dem MM-Zelllysat der INA-6-Zellen für 3 h bei 4 °C inkubiert (Abbildung 31). Anschließend wurden die gebundenen Proteine mit Hilfe von LDS-Puffer (Lithiumdodecylsulfat-Puffer) von der Trägermatrix eluiert und mit Trypsin verdaut. Durch die Analyse mittels quantitativer Massenspektrometrie und dem Vergleich mit der Negativkontrolle ohne geladene Liganden war es dann möglich, potentielle Bindungspartner der Substanzen aufzufinden.

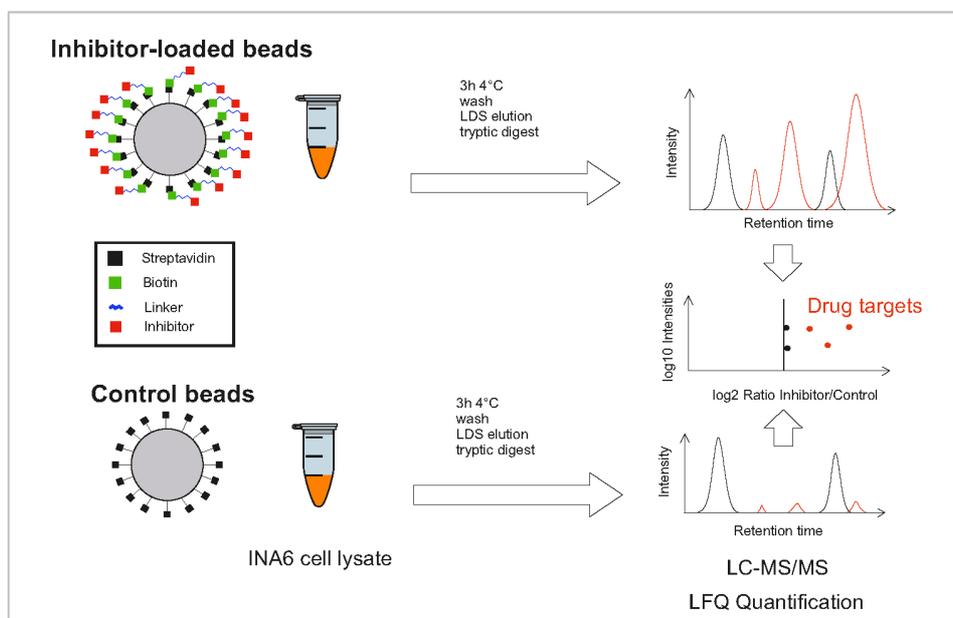


Abbildung 31: Ablauf eines Experimentes. Die biotinylierten Liganden werden auf die Streptavidinmatrix gebracht und mit dem MM-Zelllysat der INA-6-Zellen für 3 h bei 4 °C inkubiert. Die gebundenen Proteine werden mit LDS-Puffer eluiert, mit Trypsin verdaut und mittels nanoLC-MS/MS analysiert. Als Negativkontrolle fungieren Streptavidinbeads ohne geladene Liganden. Die Darstellung wurde dankeswerterweise von M. Bach und Prof. Schlosser zur Verfügung gestellt.

Ergebnisse und Diskussion

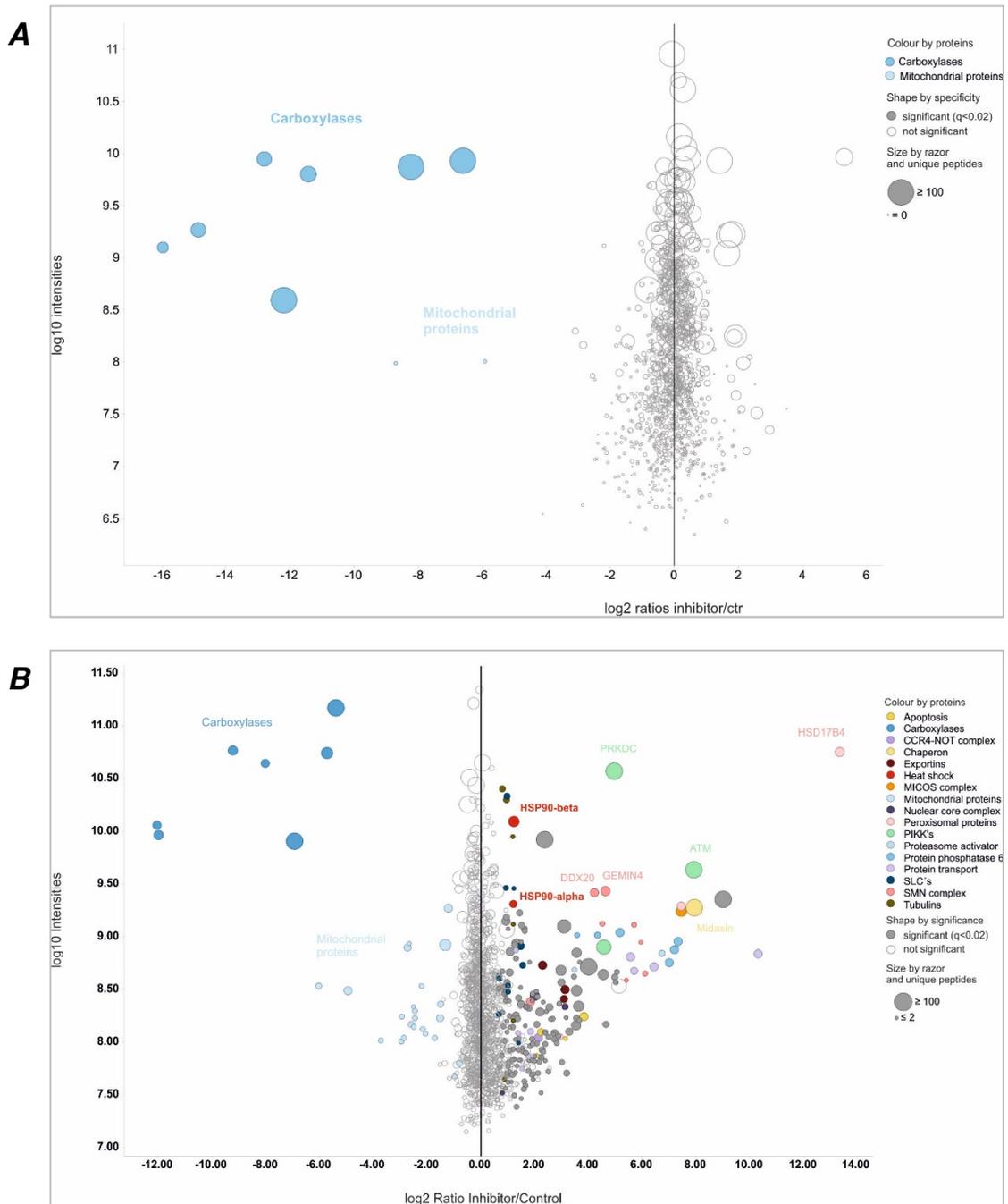


Abbildung 32: Die Abbildung zeigen die Ergebnisse der Analyse mittels Affinitätschromatographie und nanoLC-MS/MS mit den biotinylierten Liganden (\pm) **23** (**A**) und (\pm) **25** (**B**). Die signifikanten Treffer (nach der Verrechnung mit der Negativkontrolle) sind mit geschlossenen Kreisen dargestellt. Die Größe der Datenpunkte korreliert mit der Anzahl der identifizierten Peptide. Proteine desselben Komplexes, derselben Familie oder mit ähnlichen Funktionsweisen sind mit der gleichen Farbe gekennzeichnet. Carboxylasen werden spezifisch mit Streptavidin angereichert, da diese selbst das Biotin als eine prosthetische Gruppe aufweist. Die Abbildungen wurden dankenswerterweise von M.Bach und Prof.Schlosser zur Verfügung gestellt.

Das Ergebnis der Untersuchung mit dem Liganden (\pm) **23** ist in der Abbildung 32A dargestellt. Außer den Carboxylasen, die selbst Biotin als eine prosthetische Gruppe tragen und deswegen spezifisch angereichert werden, wurden nach den ersten Analysen keine Interaktionsproteine mit dem Isochinolinon-Liganden identifiziert. Im Gegensatz hierzu wurden mit dem Liganden (\pm) **25** nach dem aktuellen Erkenntnisstand einige Proteine des

Phosphatidylinositol-3-Kinase-Signalweges, das peroxisomale Protein HSD17B4, einige Vertreter des SMN-Komplexes, und vor allem die α - und β -Untereinheiten des Chaperons HSP90 signifikant angereichert (Abbildung 32B). Hierbei kann es sich entweder um direkte Interaktionspartner des Liganden, oder um Proteininteraktionspartner der Proteine handeln. Diese Resultate deuten in erster Linie darauf hin, dass weder (\pm) **23** noch (\pm) **25** das potentielle Target HSP70 gebunden haben. Diese ersten Analyseergebnisse dürfen jedoch nicht als ein Schlusslicht betrachtet werden. Da der exakte Bindungsmodus der potentiellen HSP70-Substanzen bisher nicht bekannt ist, wurde die Immobilisierung an zwei relativ leicht zugänglichen Positionen der 3,4-Dihydroisochinolin-1(2*H*)-on-Derivate durchgeführt, um (\pm) **23** und (\pm) **25** zu erhalten.

Der aliphatische Amidlinker der Verbindung (\pm) **23** und daran gebundenes Biotin kann möglicherweise die Interaktion zum potentiellen Target stören, denn bereits in der vorangehenden Arbeit von A.Hartung⁵⁷ wurde festgestellt, dass aliphatische Amidderivate wie AH089t (**2e**, Abbildung 10, Kapitel 1.2.1) geringere Aktivität als aromatische Analoga an INA-6-Zellen aufwiesen. Auffällig an diesen anfänglichen Untersuchungsergebnissen ist jedoch, dass mit dem Liganden (\pm) **23** überhaupt keine Proteine angereichert wurden. Da vielzählige, divers substituierte Carbonsäure- ((\pm) **6a,b,c,j**), Amid- ((\pm) **7a-d**) und decarboxylierte Derivate (**17,18**) (siehe Kapitel 3.1.2, 3.1.4 und 3.5.1) inhibierende Aktivität an den MM-INA-6-Zellen zeigten, was zumindest für die Relevanz des Isochinolinon-Grundgerüsts für die Interaktion zum Target spricht, wurden ebenso für (\pm) **23** Treffer nach der Auswertung der Affinitätschromatographie erwartet.

Im Gegensatz zu (\pm) **23** wurden anhand der ersten Analysen mit dem biotinylierten Ligand (\pm) **25** einige Proteine signifikant angereichert, wobei die angestrebten Vertreter der HSP70-Familie nicht identifiziert wurden. Es konnten jedoch einige Komponenten der Hitzeschutzantwort wie das Chaperon HSP90 oder die PI3-Kinasen DNA-PK und ATM bestimmt werden, deren Blockade zytotoxischen Einfluss auf die MM-Zellen hat.³³ Um detailliertere Schlussfolgerungen bzgl. der Interaktion zwischen den Isochinolinon-Derivaten und den Hitzeschockproteinen zu ziehen, müssen weitere Experimente mit weiteren Liganden durchgeführt werden.

3.8 Stabilitätsmessung von AH073tS

Das Racemat des Natriumsalzes AH073tS (Abbildung 33) wurde in der Vorgängerarbeit in einer *In-vivo*-Studie an einem MM-Mausmodell getestet.⁵⁷ Die Applikation des Wirkstoffes erfolgte im PBS-Puffer (pH = 7.4) in Anwesenheit des Hilfsstoffs Polyvinylpyrrolidon (1 % PVP) über einen Zeitraum von zehn Tagen.⁵⁷ Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Stabilität der Verbindung im Vehikel mittels Kapillarelektrophorese (*eng. capillary electrophoresis, CE*) untersucht.

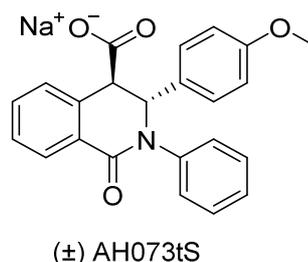


Abbildung 33: Die Strukturformel der Verbindung AH073tS, die in einer *In-vivo*-Studie an MM-Mäusen getestet wurde.⁵⁷

Entsprechend der Formulierung⁵⁷ der Applikationslösung von AH073tS wurden zwei Proben hergestellt, wobei eine unter Kühlung bei 4 °C und die andere unter Stressbedingungen bei 42 °C gelagert wurden. Die Vermessung der Proben mittels CE erfolgte im 24-h-Takt über einen Gesamtzeitraum von zehn Tagen, der sich an der Behandlungsdauer der Mäuse während der *In-vivo*-Testung orientierte. Eine Basislinientrennung von PVP und den zwei Enantiomeren gelang unter Verwendung eines Boratpuffers und Dimethyl- β -cyclodextrins als chirales Pufferadditiv (Abbildung 34). Dabei wurde zum Zeitpunkt „0“, d.h. direkt nach der Herstellung der Vehikelprobe, neben den zu erwartenden Komponenten (PVP und zwei Enantiomere) eine Verunreinigung bei einer Migrationszeit von $t = 8.6$ min detektiert (Tabelle 16).

Tabelle 16: Neben den zu erwarteten Komponenten der Applikationslösung (PVP und zwei Enantiomere von AH073tS) wurde zum Zeitpunkt „0“ eine Verunreinigung detektiert. Für die Beurteilung der elektrophoretischen Trennung wurde die Migrationszeit, das Signal-to-noise-Verhältnis (S/N) und die korrigierte Fläche der jeweiligen Signale betrachtet.

| Komponenten | Migrationszeit [min] | S/N-Verhältnis | Korrigierte Signalfläche [%] |
|----------------|----------------------|----------------|------------------------------|
| PVP | 5.9 | 2432.9 | 92.8 |
| Enantiomer 1 | 7.5 | 398.4 | 3.3 |
| Enantiomer 2 | 7.6 | 402.5 | 3.7 |
| Verunreinigung | 8.6 | 3.5 | 0.2 |

Ergebnisse und Diskussion

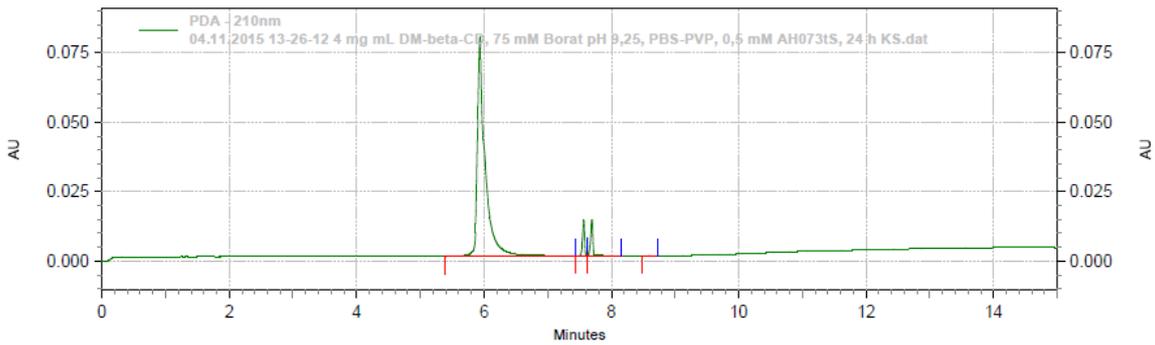


Abbildung 34: Das Elektropherogramm zeigt die Trennung von PVP und den zwei Enantiomeren der Verbindung AH073tS. Abgebildet ist beispielhaft das Elektropherogramm der Vehikelprobe nach 24 h Lagerzeit unter Kühlung bei 4 °C. Die Messparameter können dem experimentellen Teil entnommen werden.

Um eine mögliche Veränderung der Applikationslösung über die Behandlungsdauer zu beobachten, wurden die Änderungen der korrigierten Signalfäche für die jeweilige Komponente gegen die Zeit aufgetragen (Abbildung 35). Dabei wird ersichtlich, dass die Zusammensetzung sowohl in der gekühlten Probe als auch unter Stresskonditionen konstant bleibt.

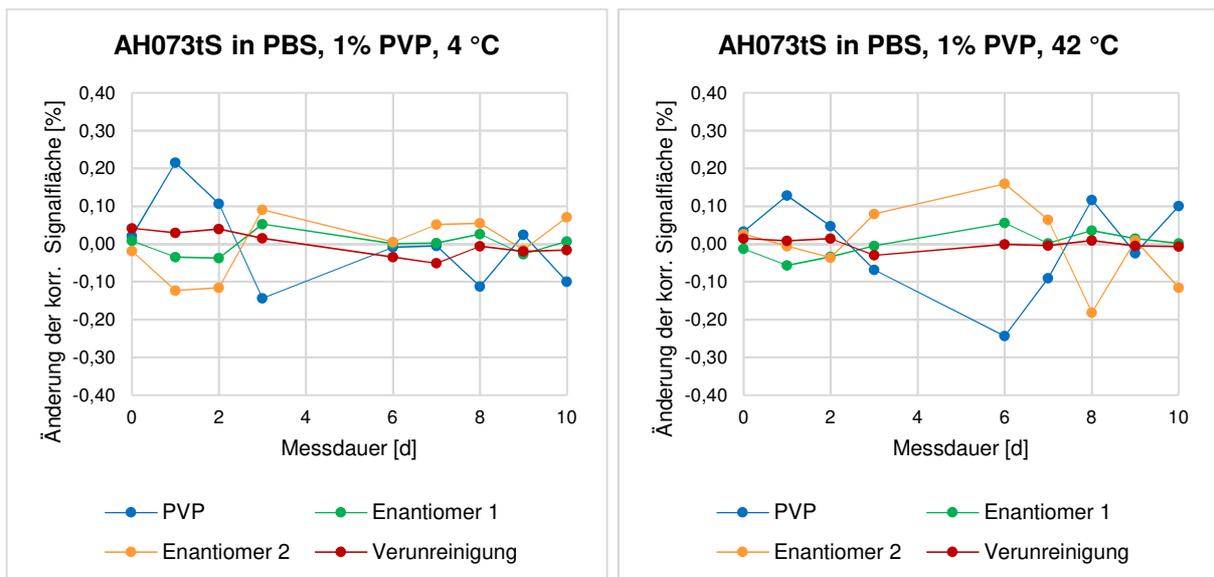


Abbildung 35: Die Diagramme zeigen die Änderung der korrigierten Signalfäche der jeweiligen detektierten Komponenten der Vehikelprobe über eine Messdauer von zehn Tagen.

Aufgrund des intensiven Signals des PVP ergab sich für die detektierte Verunreinigung ein geringes Signal-to-noise-Verhältnis von 3,5 (Tabelle 16). Weiterhin bestand die Möglichkeit, dass das PVP-Signal Signale weiterer Verunreinigungen überlagert. Folglich wurde eine zweite Messreihe von AH073tS in PBS-Puffer ohne Zusatz von PVP durchgeführt. Hier wurden zwei Proben (4 °C und 42 °C) über einen Zeitraum von 13 Tagen untersucht, wobei die Messungen in größeren Zeitabständen als 24 h erfolgten. Tatsächlich wurde hier eine weitere Verunreinigung bei einer Migrationszeit von $t = 5,8$ min detektiert, die durch das Signal von PVP zuvor verdeckt wurde (Tabelle 17). Die Graphiken in der Abbildung 36 zeigen

Ergebnisse und Diskussion

die Änderung der korrigierten Signalflächen im Laufe der Untersuchungsdauer von 13 Tagen, die nur geringfügig schwankt. Eine Tendenz der Zunahme der Verunreinigungen sowie Tendenz der Abnahme der Verbindung AH073tS ist nicht erkennbar. Diese Untersuchung lässt schlussfolgern, dass die Verbindung AH073tS sowohl in Gegenwart als auch Abwesenheit des Hilfsstoffes PVP über die Zeitdauer einer *In-vivo*-Untersuchung von bis zu 13 Tagen sogar unter dauerhafter Wärmezufuhr von 42 °C stabil ist.

Tabelle 17: Neben den zwei Enantiomeren wurden zwei Verunreinigungen in der Lösung von AH073tS in PBS ohne PVP detektiert.

| Komponenten | Migrationszeit [min] | S/N-Verhältnis | Korrigierte Signalfläche [%] |
|------------------|----------------------|----------------|------------------------------|
| Verunreinigung 1 | 5.8 | 11.7 | 3.9 |
| Enantiomer 1 | 7.5 | 276.4 | 43.0 |
| Enantiomer 2 | 7.6 | 278.9 | 49.1 |
| Verunreinigung 2 | 9.3 | 2.58 | 4.0 |

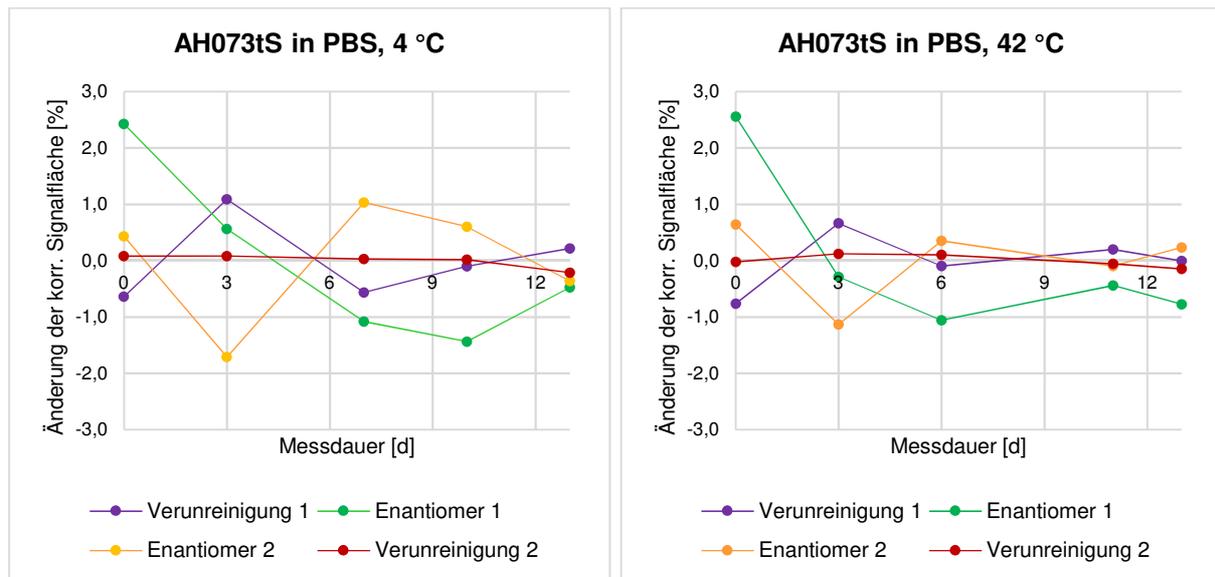


Abbildung 36: Die Diagramme zeigen die Änderung der korrigierten Signalfläche der jeweiligen detektierten Komponenten der Verbindung AH073tS in PBS ohne PVP als Zusatz.

4 Entwicklung der HSF1-Inhibitoren

4.1 Erweiterung der Substanzbibliothek

In der vorangehenden Arbeit von A.Hartung wurde in Anlehnung an die HFS1-aktive Verbindung NZ28 eine Reihe von Verbindungen *via* Ugi-Heck-Reaktion hergestellt, um das Tetrahydroisochinolin-Gerüst als eine Leitstruktur zu evaluieren.⁵⁷ In der Abbildung 37 ist die Retrosynthese des Derivats **26** gezeigt. Die biologische Untersuchung hat gezeigt, dass nicht die cyclischen Endstufen, sondern die Zwischenprodukte wie **27** eine inhibitorische Aktivität gegenüber MM-Zellen aufwiesen.

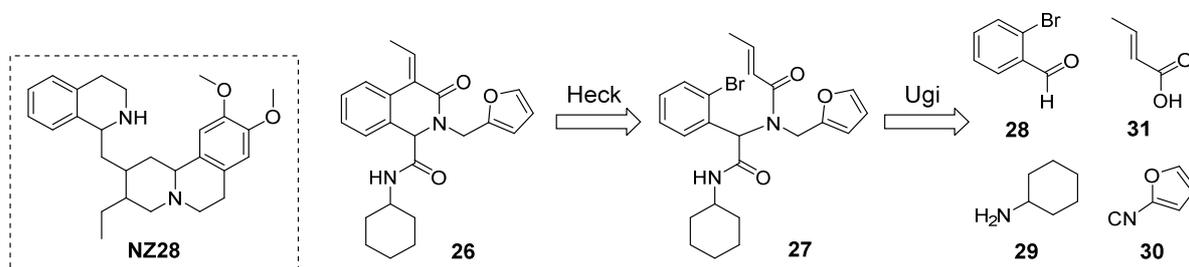
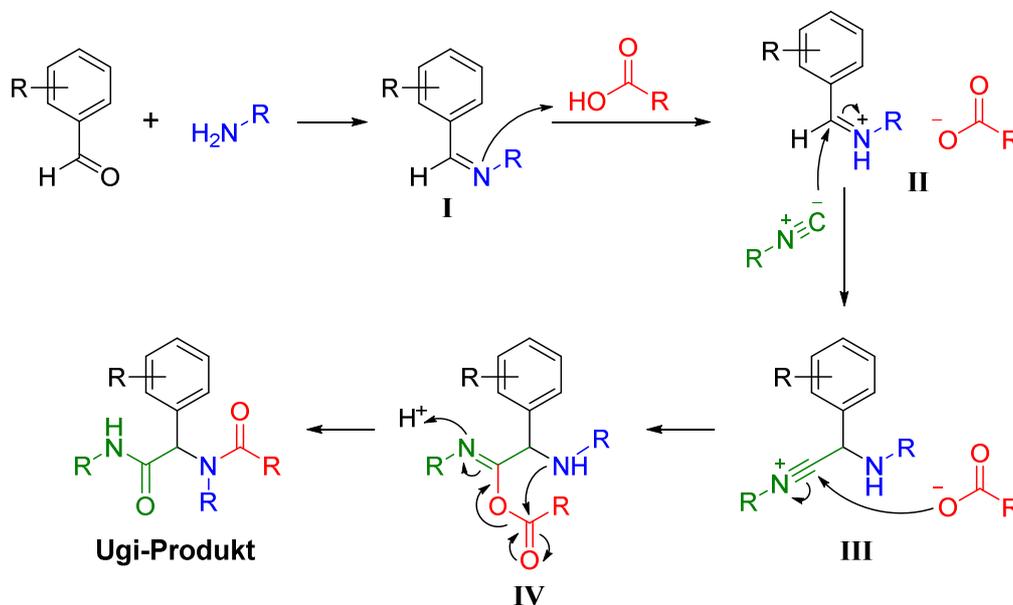


Abbildung 37: In Anlehnung an NZ28 hat A. Hartung eine Reihe an Tetrahydroisochinolinderivaten wie z.B. die Verbindung **26** *via* Ugi-Heck-Reaktion hergestellt, die keine Aktivität gegenüber MM-Zellen zeigten. Allerdings wurde mit den Zwischenstufen wie **27** die HSF1-abhängige HSP70-Expression detektiert.⁵⁷

Die Ugi-Multikomponentenreaktion ermöglicht einen Zugang zu einer großen Substanzvielfalt in nur einem Syntheseschritt, indem ein Aldehyd (**28**), ein Amin (**29**), ein Isocyanid (**30**), und eine Carbonsäure (**31**) miteinander reagieren.¹²⁰⁻¹²¹ Dabei läuft die Reaktion der Komponenten nicht gleichzeitig ab, sondern folgt einem schrittweisen Ablauf (Schema 15). Zuerst kondensieren Aldehyd und Aminverbindung zu einer Schiffschen Base **I**. Diese wird als Nächstes von der Säurekomponente protoniert und somit aktiviert (**II**), sodass ein Isocyanid das Iminiumion nukleophil angreifen kann. Nachdem ein Säureanion den elektrophilen Kohlenstoff bindet, bildet sich zuerst das Zwischenprodukt **IV**, welches sich schlussendlich zu dem Ugi-Produkt umlagert.¹²¹ So gelang es Hartung, eine Bibliothek von verschiedenen substituierten α -Acylaminocarboxamiden, mit ((\pm) **37a-m**) und ohne α,β -gesättigte ((\pm) **38a,b**) Carbonyleinheit, aufzubauen.⁵⁷ Die Evaluierung dieser Bibliothek im Arbeitskreis Chatterjee hat gezeigt, dass die Verbindungen sowohl mit als auch ohne Michael-System biologisch aktiv waren. Aus diesem Grund wurden im Rahmen dieser Arbeit weitere gesättigte Substanzderivate (\pm) **38c-g** hergestellt (Tabelle 18). Hierfür wurden zuerst das jeweilige Aldehyd **32** und das Amin **33** in CH_3OH bei RT gerührt. Die Konzentrationen aller Reagenzien lagen dabei zwischen 0.9 und 1.1 M, da gezeigt wurde, dass mit höheren Konzentrationen der Umsatz der Ugi-Reaktion gesteigert werden kann.¹²¹ Die entsprechenden Carbonsäurekomponenten 3-Phenylpropionsäure bzw. 3-(4-Hydroxyphenyl)-propionsäure und

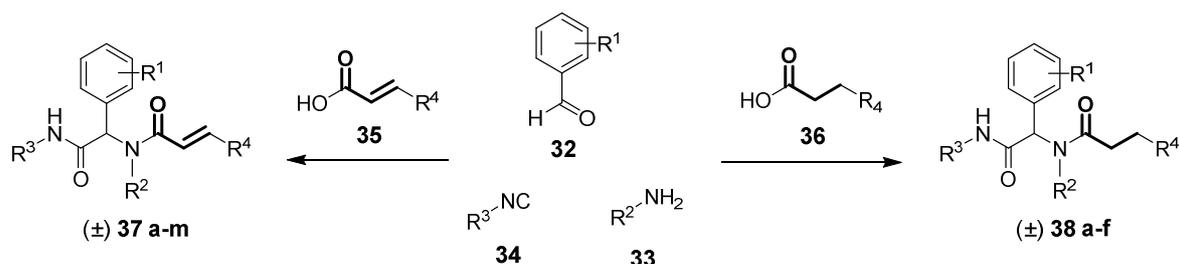
Ergebnisse und Diskussion

das Benzylisocyanid wurden anschließend in einem leichten Überschuss von 1.2-1.3 Equiv. hinzugegeben und das Reaktionsgemisch bei RT gerührt. Das Produkt (\pm) **38c** präzipitierte und wurde nach der Filtration erhalten, während die Verbindungen (\pm) **38d-g** nach der Reinigung mittels Säulenchromatographie (Normalphase) in Ausbeuten von bis zu 80% isoliert werden konnten.



Schema 15: Der Mechanismus zeigt die Reaktionssequenz der Ugi-Multikomponentenreaktion, indem ein Aldehyd, ein Amin, ein Isocyanid und eine Carbonsäure zum einem Ugi-Produkt reagieren.

Tabelle 18: Es wurde eine Substanzbibliothek an α -Acylaminocarboxamiden mit (\pm) **37a-m** und ohne (\pm) **38a-f** α,β -gesättigte Carbonylgruppe ausgehend von einem aromatischen Aldehyd (**32**), einem Amin (**33**), einem Isocyanid (**34**) und einer ungesättigten (**35**) bzw. gesättigten (**36**) Carbonsäure in einem Syntheseschritt aufgebaut.
^a Die Derivate **37a-m** und **38a,b** wurden von A. Hartung hergestellt.⁵⁷



| Produkt | R ¹ | R ² | R ³ | R ⁴ | [%] |
|----------------------------------|----------------|-------------------|-----------------|----------------|-----|
| (\pm) 37a^a | 2-Br | Me | Bn | Ph | 77 |
| (\pm) 37b^a | 2-Br | <i>c</i> -Propyl | Bn | Ph | 57 |
| (\pm) 37c^a | 2-Br | Bn | Bn | Ph | 75 |
| (\pm) 37d^a | 2-Br | 4-MeO-Bn | Bn | 4-MeO-Ph | 60 |
| (\pm) 37e^a | 2-Br | <i>n</i> -Propyl | <i>c</i> -Hexyl | 4-MeO-Ph | 72 |
| (\pm) 37f^a | 2-Br | Furan-2-yl-methyl | <i>c</i> -Hexyl | Me | 81 |

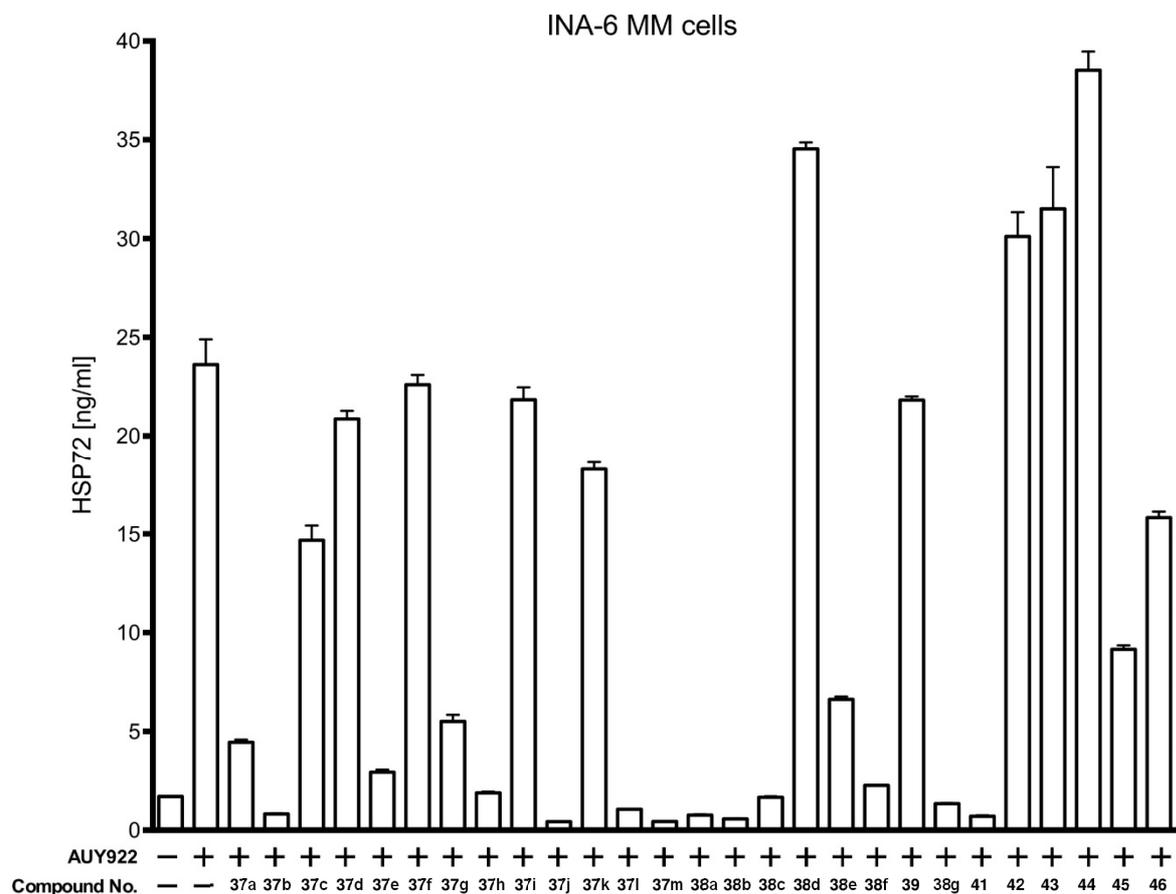


Abbildung 39: Die quantitative ELISA-Analyse zeigt den Expressionslevel an HSP72 nach der Behandlung mit den zu testenden Substanzen (\pm) **37a-m**, (\pm) **38a-g** und **39-45** und anschließender Inkubation mit dem HSP90-Inhibitor NVP-AU922. β -Actin fungierte als Ladekontrolle. Die Abbildung wurde adaptiert von Bach et al.¹²²

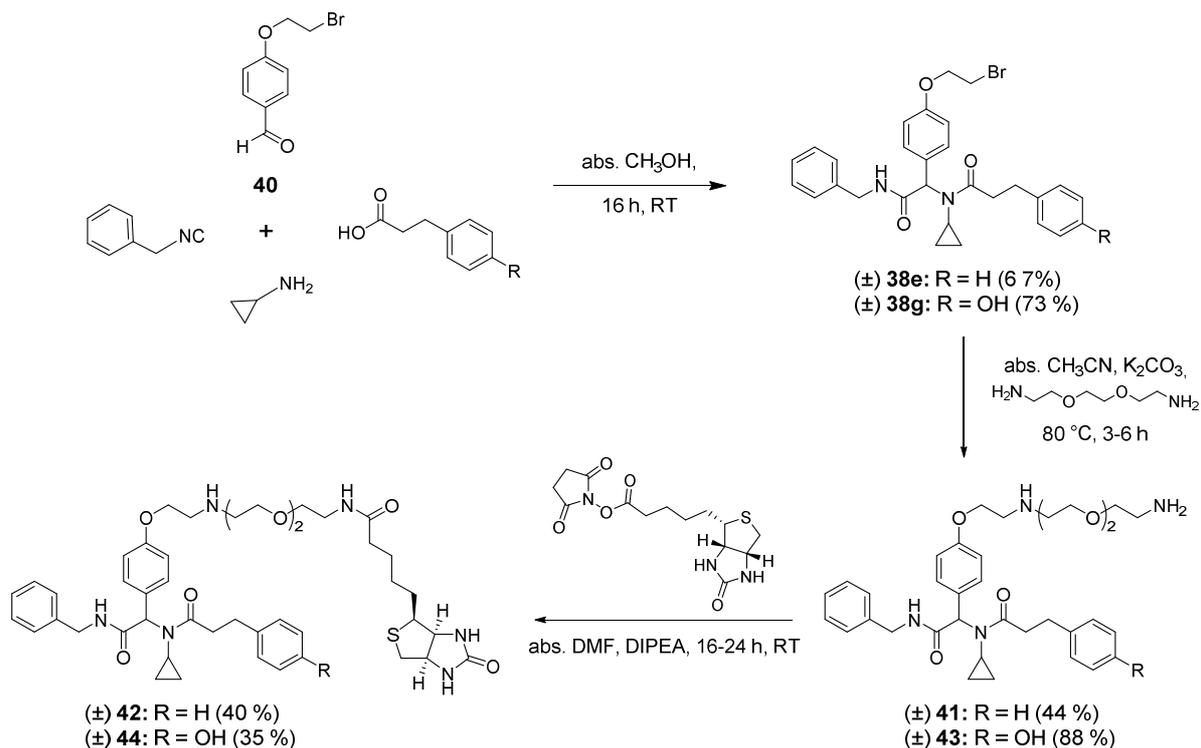
Die Aktivität der Verbindungen (\pm) **37a-m** und (\pm) **38a, b** wurde bereits in der Arbeit von A. Hartung diskutiert.⁵⁷ Grundsätzlich kann man schlussfolgern, dass die inhibitorische Aktivität der neuartigen α -Acylaminocarboxamide nicht auf das Michael-System zurückzuführen ist, da sowohl die bereits bekannten Verbindungen (\pm) **38a, b** als auch die neuen Derivate (\pm) **38c, f, g** ohne die α,β -ungesättigte Carbonylgruppe hohe Aktivität gegenüber den INA-6-Zellen zeigten (Abbildung 38, 39). Die neu synthetisierte Substanz (\pm) **38c** stellt das gesättigte strukturelle Analogon zu (\pm) **38a** mit dem Bromsubstituenten in dem *para*-Position des Restes R¹ dar und weist ähnliche inhibitorische Aktivität auf. Die Einführung einer OH-Gruppe anstelle des Brom führte zum Verlust der Aktivität des Derivates (\pm) **38d**, was darauf hindeutet, dass ein Wasserstoffbrückendonator an dieser Position die Bindung an das Target stört. Eine Substitution der phenolischen OH-Gruppe von (\pm) **38e** mit einem kurzen Bromlinker wirkte sich wiederum positiv auf die Aktivität aus. Die Verbindung (\pm) **38f** ist das strukturelle Analogon von (\pm) **38c** und unterscheidet sich durch eine phenolische OH-Gruppe am Rest R⁴. Da die beiden Substanzen vergleichbare Hemmung zeigen, ist dieser Substituent für die biologische Aktivität nicht essentiell. Allerdings führte die Vergrößerung des Moleküls um eine Brombutoxyeinheit ((\pm) **39**) zur Senkung der inhibitorischen Aktivität. Schlussendlich gehört der Inhibitor (\pm) **38g**

zu den aktivsten α -Acylaminocarboxamiden und stellt eine strukturelle Mischung aus einem Wasserstoffbrückenakzeptor R¹ in der *para*-Position (Vgl. **38e**) und einer phenolischen OH-Gruppe R⁴ in der *para*-Position (Vgl. **38f**) dar.

4.2 Liganden für die Affinitätschromatographie

4.2.1 Synthese der biotinylierten Liganden

Die Derivate der neuartigen α -Acylaminocarboxamide beeinflussen die HSF1-abhängige HSP72-Expression. Aufgrund der indirekten Aktivitätsdetektion und mehrstufiger Signaltransduktion zum HSF1 z.B. über den PI3K/Akt-Signalweg (Abbildung 11, Kapitel 1.2.2) ist die Klärung des Aktions- bzw. Bindungsortes dieser Substanzen erschwert, sodass das Target bisher nicht bestimmt werden konnte. Durch die Kooperation mit der Proteomicsgruppe von Schlosser war es jedoch möglich, eine Affinitätschromatographie gekoppelt mit der nanoLC-MS/MS-Analyse durchzuführen, wofür drei biotinylierte Liganden hergestellt wurden.



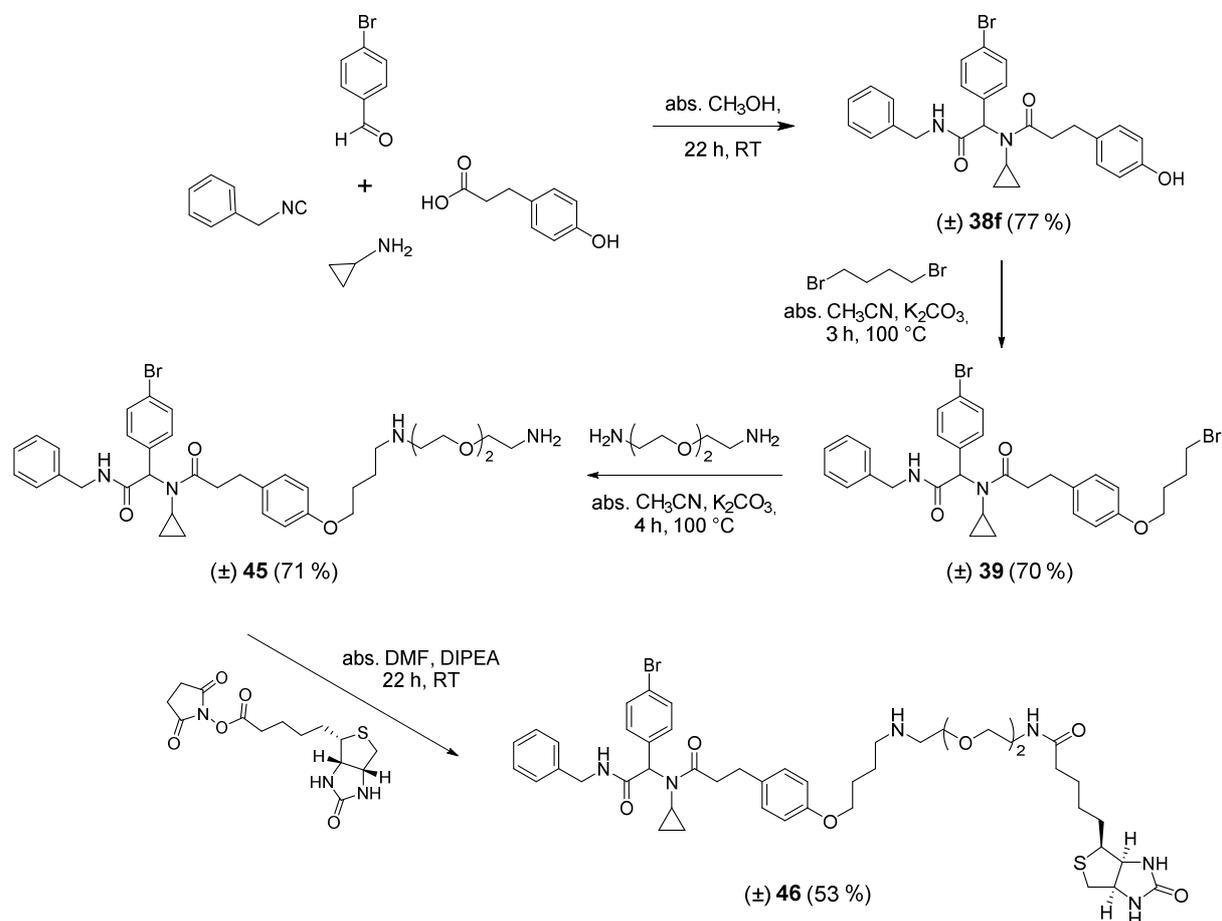
Schema 16: Syntheseroute der biotinylierten HSF1-Liganden (\pm) **42** und (\pm) **44**, die für die Affinitätschromatographie verwendet wurden.

Aufgrund der dargelegten Problematik bei der Durchführung der Buchwald-Hartwig-Kreuzkupplung (siehe Kapitel 3.7.2) wurde die Herstellung der HSF1-Liganden für die Affinitätschromatographie in Anlehnung an die Methodik aus dem Kapitel 3.7.3 bewerkstelligt. Ausgehend von dem Aldehyd **40**, dem Cyclopropylamin, dem Benzylisocyanid und der 3-Phenylpropionsäure bzw. 3-(4-Hydroxyphenyl)-propionsäure wurden die Verbindungen

Ergebnisse und Diskussion

(±) **38e** bzw. (±) **38g** mit einem kurzen Bromethoxy-Linker synthetisiert (Schema 16). Im nächsten Schritt wurde über eine S_N2-Reaktion in Gegenwart von K₂CO₃ ein hydrophiler Aminlinker eingeführt, um die Derivate (±) **41** und (±) **43** nach säulenchromatographischer Reinigung zu erhalten. Diese wurden anschließend mit dem aktivierten NHS-Biotinester umgesetzt, die Rohprodukte mittels Umkehrphasen-MPLC gereinigt und die biotinmarkierten Liganden (±) **42** und (±) **44** erhalten.

Ein weiterer biotinylierter Ligand wurde ausgehend von der Verbindung (±) **38f** hergestellt, die zuerst mit einem Brombutoxy-Linker substituiert und anschließend zum Derivat (±) **45** in Gegenwart von K₂CO₃ und 2,2'-(Ethyldioxy)diethylamin umgesetzt wurde (Schema 17). Nach der Reaktion von (±) **45** mit NHS-Biotin wurde schlussendlich (±) **46** erhalten.



Schema 17: Syntheseroute des biotinylierten HSF1-Liganden (±) **46**, der für die Affinitätschromatographie verwendet wurde.

Die Liganden **42**, **44**, **46** und deren Vorstufen **41**, **43** und **45** wurden ebenso wie die nicht immobilisierten Inhibitoren auf die biologische Aktivität mittels Westernblot und ELISA untersucht (Abbildung 38, 39). Aufgrund der Größe dieser Verbindungen, einer Molekülmasse von bis zu 940 g/mol und vieler hydrophiler Reste kann der Transport der Substanzen (passiv oder aktiv) in das Zellcytosol gehindert sein, was die geringe bzw. nicht vorhandene

inhibitorische Aktivität von **42-46** erklären kann. Eine Ausnahme stellt das Derivat **41** dar und weist eine vergleichbare Aktivität wie die freien Verbindungen (\pm) **37m** oder (\pm) **38a, b** auf.

4.2.2 Durchführung der Affinitätschromatographie

Der Ablauf der Analyse mittels Affinitätschromatographie und nanoLC-MS/MS wurde bereits im Kapitel 3.7.4 erläutert (Abbildung 31). Das Ergebnis der Untersuchung des Liganden (\pm) **44** ist in der Graphik 40A dargestellt.¹²² Insgesamt wurden 68 Proteine mit Hilfe des biotinylierten Liganden angereichert und identifiziert. Dabei handelt es sich sowohl um direkte Interaktionspartner der Substanz als auch um Proteininteraktionspartner der Proteine, wobei die exakte Unterscheidung dieser aus dem generierten Datensatz nicht möglich ist.¹²² Zu den spezifisch angereicherten Proteinsubgruppen gehören beispielsweise der MICOS-Komplex, der die Mitochondrienmorphologie und den Proteintransport reguliert.¹²³ Weiterhin wurden die Untereinheiten des CCR4-NOT-Komplexes identifiziert, welches unter anderem in die zelluläre Antwort des DNA-Schadens (*eng. DNA damage response*) involviert ist.¹²⁴ Eine weitere sehr interessante Proteingruppe stellen die Kinasen des Phosphatidylinositol-Signalwegs dar. Dabei wurden explizit vier Kinasen, nämlich die DNA-PK (PRKDC), ATM, ATR und mTOR, identifiziert. Die ersten drei Kinasen sind in die Antwort des DNA-Schadens involviert,¹²⁵ während mTOR das Zellwachstum, die Proteinsynthese und die Autophagie reguliert.¹²⁶⁻¹²⁷ An dieser Stelle soll die DNA-PK hervorgehoben werden, da dieses Protein mit HSF1 interagiert¹²⁸ und die HSF1-abhängige Hochregulation der HSP70-Expression beeinflusst.¹²⁹

Eine weiterführende Untersuchung der Domänen der angereicherten Proteine hat ergeben, dass ein Teil die sogenannte Armadillo-Domäne tragen,¹²² die eine essentielle Rolle für die Interaktion zwischen Proteinen spielt.¹³⁰ Diese Domäne variiert zwar von Protein zu Protein, weist jedoch eine hochkonservierte Bindungstasche auf.¹³¹ Diese Befunde unterstützen die Theorie, dass die neuartigen α -Acylaminocarboxamide möglicherweise an die Armadillo-Domäne von z.B. der PI3-Kinasen binden und somit den HSF1 indirekt beeinflussen.

Ergebnisse und Diskussion

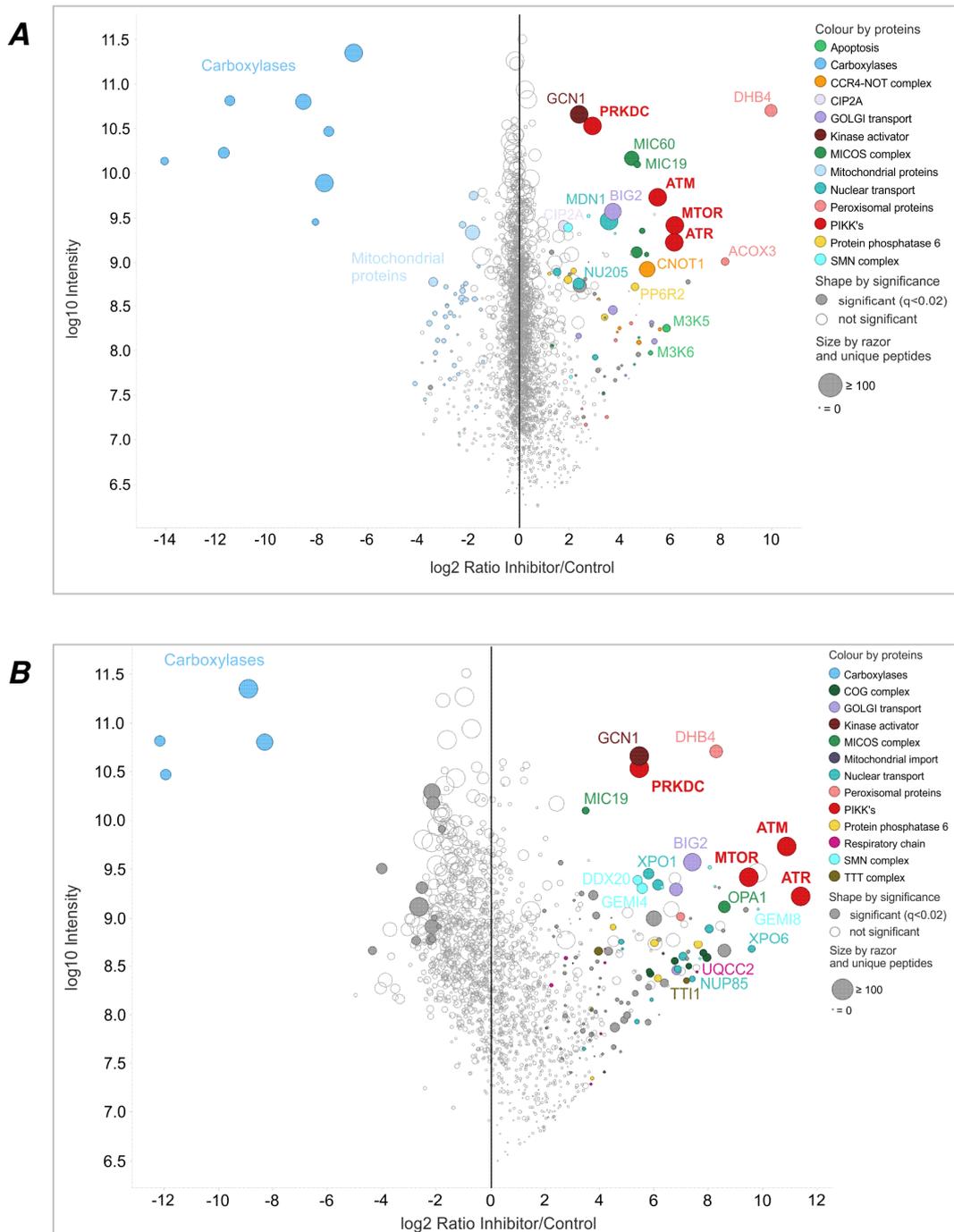


Abbildung 40: Die Abbildungen zeigen die Proteine, die mit der Verbindung (\pm) **44** (**A**) und (\pm) **46** (**B**) angereichert wurden. Die signifikanten Treffer (nach der Verrechnung mit der Negativkontrolle) sind mit geschlossenen Kreisen dargestellt. Die Größe der Datenpunkte korreliert mit der Anzahl der identifizierten Peptide. Proteine desselben Komplexes, derselben Familie oder mit ähnlichen Funktionsweisen sind mit der gleichen Farbe gekennzeichnet. Carboxylasen werden spezifisch mit Streptavidin angereichert, da diese selbst das Biotin als eine prosthetische Gruppe aufweist. Die Abbildungen sind von Bach et al. adaptiert.¹²²

Das Ergebnis des Experiments mit dem biotinylierten Liganden (\pm) **46** stimmt zu einem großen Teil mit dem Resultat von (\pm) **44** überein (Abbildung 40B). Der deutliche Unterschied wurde erst ersichtlich, nachdem die signifikanten Treffer beider Untersuchungen gegeneinander aufgetragen wurden (Abbildung 41B).¹²² Während auf der Diagonalen die übereinstimmenden Bindungstreffer lokalisiert sind, wurden die Proteine des CCR4-NOT-

Ergebnisse und Diskussion

Komplexes ausschließlich von (\pm) **44** und die Proteine des COG-Komplexes ausschließlich von (\pm) **46** gebunden. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass beide Liganden die PI3-Kinasen DNA-PK, ATR, ATM und mTOR binden und die Position des Linkers diese Interaktion nicht stört. Dies wiederum kann bedeuten, dass die Kernstruktur der immobilisierten Liganden (Abbildung 41A, rot) in die Bindungswechselwirkung mit den Kinasen involviert sein muss. Die Substitution der α -Acylaminocarboxamide mit dem Biotinrest beeinträchtigte jedoch die Interaktion mit den Proteinen des CCR4-NOT-Komplexes bzw. des COG-Komplexes. Aus der Analyse lässt sich schlussfolgern, dass für die Bindung an die CCR4-NOT-Proteine möglicherweise der Bereich des Cyclopropylrestes und des 3-Propionsäureamides von (\pm) **44** (Abbildung 41A, orange) verantwortlich ist. Wohingegen der Bereich des halogenierten Aromaten und des Benzylamides von (\pm) **46** die Bindungswechselwirkung mit den COG-Proteinen eingeht (Abbildung 41A, grün).

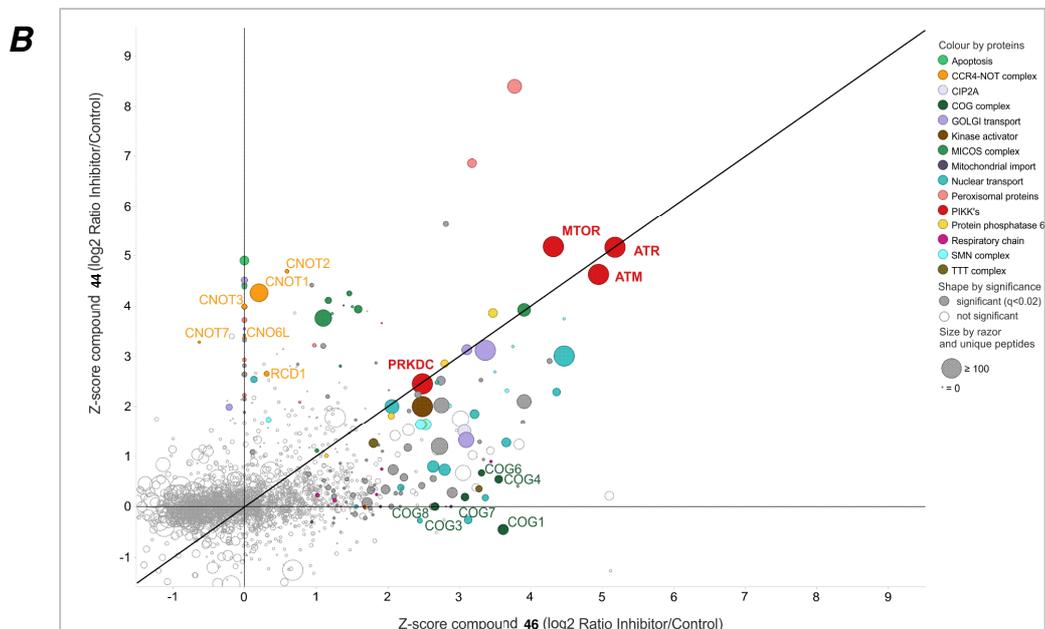
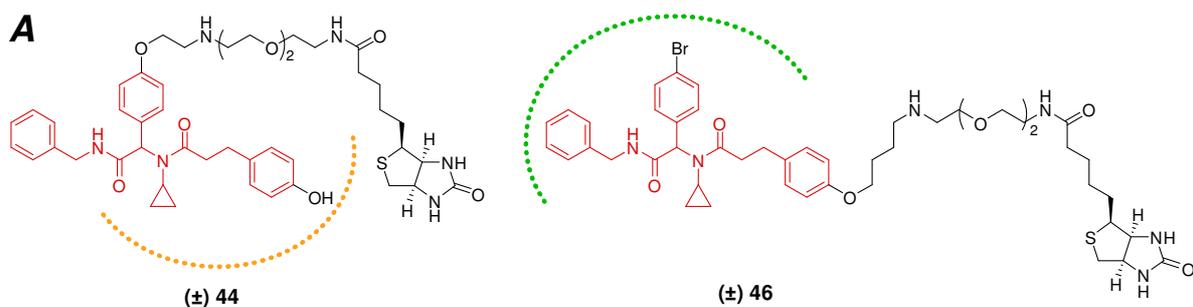


Abbildung 41: Vergleich der Ergebnisse der Experimente von (\pm) **44** und (\pm) **46**. Die signifikanten Treffer sind mit geschlossenen Kreisen dargestellt. Die Größe der Datenpunkte korreliert mit der Anzahl der identifizierten Peptide. Proteine desselben Komplexes, derselben Familie oder mit ähnlichen Funktionsweisen sind mit der gleichen Farbe gekennzeichnet. Die übereinstimmenden Treffer sind auf der Diagonalen dargestellt, während die spezifisch angereicherten Bindungsproteine jeweils auf den Achsen platziert sind. Die Abbildung ist von Bach et al. adaptiert.¹²²

5 NCI-Screening

Das amerikanische nationale Krebsinstitut (*eng. US National Cancer Institute, NCI*) hat Ende der 1980er eine Screening-Plattform etabliert, der eine *In-vitro*-Testung von Substanzen an diversen humanen Tumorzelllinien im Hochdurchsatzformat ermöglicht.¹³² Seither wurden viele Optimierungsschritte des Assays durchgeführt, sodass heutzutage bis zu 3000 Verbindungen synthetischen oder natürlichen Ursprungs pro Jahr auf ihre zytostatische Wirkung untersucht werden. Hierbei liegt der Schwerpunkt des Screenings auf der Identifizierung krankheitsspezifischer bzw. subtypspezifischer Wirkung der Substanzen.¹³³ Aus diesem Grund enthält der Test 60 unterschiedliche Tumorzelllinien, die in der Regel in folgende neun Subgruppen unterteilt werden: Leukämie-, Melanom-, Lungenkrebs-, Darm-, Hirn-, Ovarial-, Brust-, Prostata- und Nierenzellen.¹³³⁻¹³⁴ Die komplette Liste der momentan verwendeten Zelllinien sind der Tabelle 19 zu entnehmen.

Seit 2007 werden eingehende und vorselektierte Substanzen erst anhand einer einmaligen Konzentration von 10 μM („one dose“) an dem kompletten Bestand der 60 Zelllinien getestet. Diejenigen Substanzen, die vordefinierte Selektionskriterien an einer Mindestanzahl von Zelllinien erfüllen, werden mit fünf weiteren Konzentrationen im Bereich zwischen 10 μM und 100 μM auf dem gesamten Zellbestand auf ihre zytostatische Aktivität untersucht. Die Selektionskriterien werden anhand der jahrelangen Screeningergebnisse festgelegt.¹³⁵

Die humanen Tumorzellen werden 24 h vor der Testung im RPMI 1640-Medium, der 5 % Bovinserum und 2 mM L-Glutamin enthält, angeimpft und bis zur Behandlung mit den Substanzen bei 37 °C, 5 % CO₂ und 100 % Luftfeuchtigkeit gelagert. Anschließend werden die zu testenden Verbindungen (vorgelöst in DMSO/Glycerin 9/1, verdünnt mit dem Zellmedium) zugegeben und bei denselben Bedingungen inkubiert. Die Einwirkung wird durch die Zugabe von Trichloressigsäure nach 48 h unterbrochen und die fixierten Zellen gewaschen. Das Auslesen des Assays erfolgt mittels der Sulforhoadin-B-Färbung und Absorptionsmessung bei 515 nm.¹³⁵

Tabelle 19: Übersicht über die momentan eingesetzten humanen Tumorkrebszelllinien, die für die In-vitro-Testung am NCI verwendet werden.¹³⁴

| Name der Zelllinie | Subgruppe | Name der Zelllinie | Subgruppe | Name der Zelllinie | Subgruppe |
|--------------------|---------------------|--------------------|-----------|------------------------|-----------|
| CCRF-CEM | Leukemia | SF-268 | CNS | 786-0 | Renal |
| HL-60(TB) | Leukemia | SF-295 | CNS | A498 | Renal |
| K-562 | Leukemia | SF-539 | CNS | ACHN | Renal |
| MOLT-4 | Leukemia | SNB-19 | CNS | CAKI-1 | Renal |
| RPMI-8226 | Leukemia | SNB-75 | CNS | RXF 393 | Renal |
| SR | Leukemia | U251 | CNS | SN12C | Renal |
| A549/ATCC | Non-Small Cell Lung | LOX IMVI | Melanoma | TK-10 | Renal |
| EKVX | Non-Small Cell Lung | MALME-3M | Melanoma | UO-31 | Renal |
| HOP-62 | Non-Small Cell Lung | M14 | Melanoma | PC-3 | Prostate |
| HOP-92 | Non-Small Cell Lung | MDA-MB-435 | Melanoma | DU-145 | Prostate |
| NCI-H226 | Non-Small Cell Lung | SK-MEL-2 | Melanoma | MCF7 | Breast |
| NCI-H23 | Non-Small Cell Lung | SK-MEL-28 | Melanoma | MDA-MB-231/ATCC | Breast |
| NCI-H322M | Non-Small Cell Lung | SK-MEL-5 | Melanoma | MDA-MB-468 | Breast |
| NCI-H460 | Non-Small Cell Lung | UACC-257 | Melanoma | HS 578T | Breast |
| NCI-H522 | Non-Small Cell Lung | UACC-62 | Melanoma | MDA-N | Breast |
| COLO 205 | Colon | IGR-OV1 | Ovarian | BT-549 | Breast |
| HCC-2998 | Colon | OVCAR-3 | Ovarian | T-47D | Breast |
| HCT-116 | Colon | OVCAR-4 | Ovarian | | |
| HCT-15 | Colon | OVCAR-5 | Ovarian | | |
| HT29 | Colon | OVCAR-8 | Ovarian | | |
| KM12 | Colon | NCI/ADR-RES | Ovarian | | |
| SW-620 | Colon | SK-OV-3 | Ovarian | | |

Ergebnisse und Diskussion

Die Beurteilung der zytotoxischen Wirkung erfolgt mit Hilfe des „Mean graph“ und ist am Beispiel der einmaligen Konzentration von 10 µM der Substanz AH073t gezeigt (Abbildung 42).

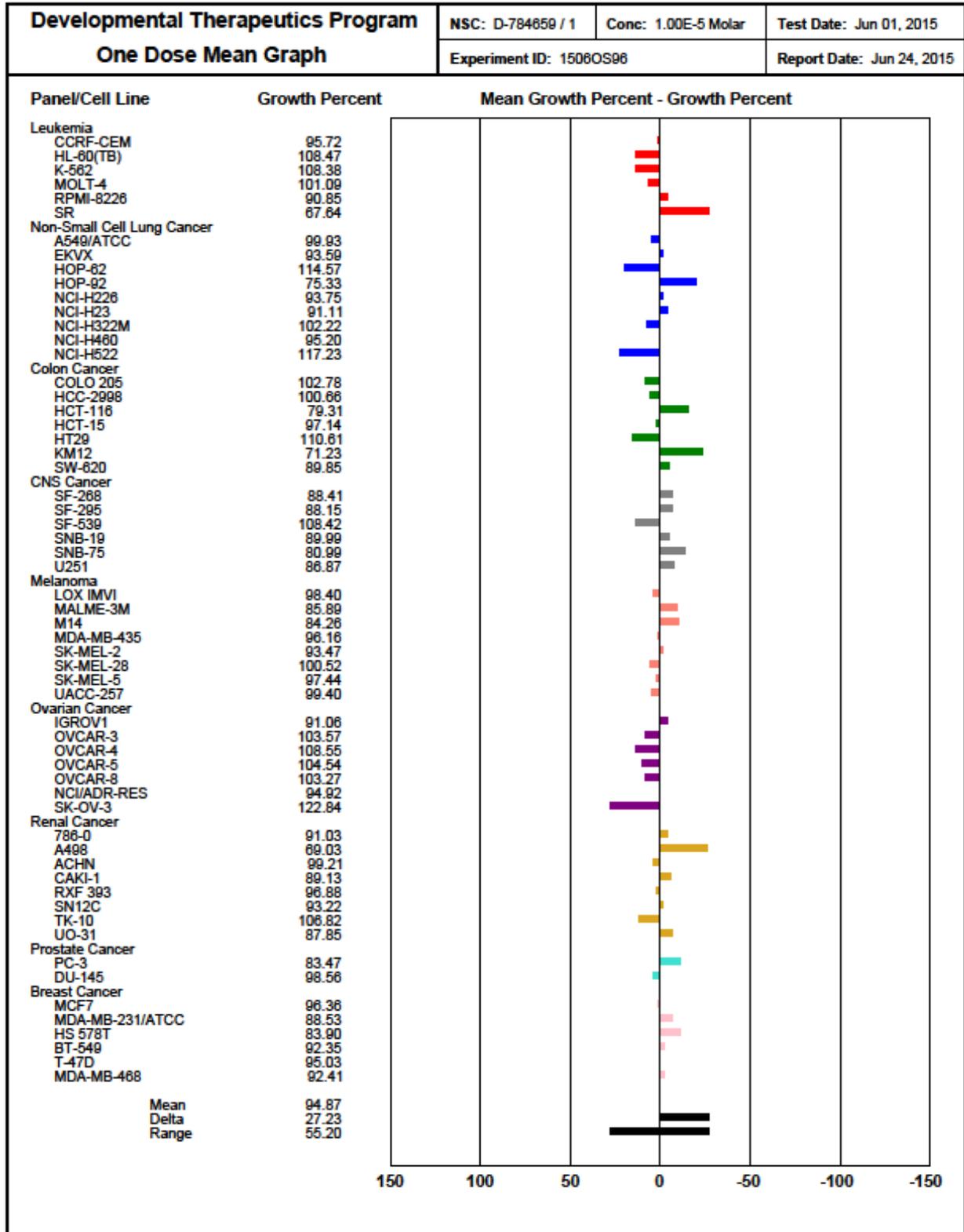


Abbildung 42: Das „Mean Graph“ zeigt das Testergebnis der Substanz AH073t anhand der einmaligen Konzentration von 10 µM.

Ergebnisse und Diskussion

Die Aktivität einer Substanz wird als relatives Wachstum (*engl. growth percent*) im Vergleich zu einer Negativkontrolle und bezogen auf die Anzahl der Zellen zum Zeitpunkt „0“ betrachtet. Dadurch ist es möglich, sowohl die Inhibition (Werte zwischen 0 und 100, Abbildung 42) als auch die letale Wirkweise (Werte < 0, Abbildung 42) der getesteten Verbindungen zu detektieren. Der Mittelwert „0“ stellt die zytotoxische Aktivität aller jemals gemessener Substanzen dar. Die Werte rechts (< 0) deuten auf die größere Empfindlichkeit der Zelllinien auf die Verbindung im Vergleich zum Mittelwert. Demgegenüber zeigen die Werte links von der Linie „0“ (0-100) die inhibitorische Wirkung an.¹³⁵ Ein Wert von 100 bedeutet, dass keine Inhibition vorliegt. Ein Wert von 40 bedeutet, dass 60 % des Zellwachstums inhibiert wurden. Bei einem Wert von 0 liegt kein Nettowachstum vor und bei -100 sind alle Zellen gestorben.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden insgesamt 40 Verbindungen aus der Substanzbibliothek der Tetrahydroisochinolinon- und der α -Acylaminocarboxamid-Derivate der NCI-Analyse unterzogen. Davon wurden 33 Verbindungen zur Testung mit einmaliger Konzentration von 10 μ M zugelassen und an den 60 humanen Tumorzelllinien auf die zytotoxische Wirkung untersucht (Tabelle 20).

Tabelle 20: Substanzübersicht der am NCI getesteten Verbindungen, die der Substanzbibliothek von A. Hartung (a) und dieser Arbeit (b) entnommen wurden.

| Substanzbezeichnung | NCI-Nummer | Substanzbezeichnung | NCI-Nummer |
|--|------------|--|------------|
| AH068c^a | D-784654/1 | AH068t^a | D-784655/1 |
| AH071t^a | D-784656/1 | AH078t^a | D-784663/1 |
| AH072c^a | D-784657/1 | AH072t^a | D-784658/1 |
| AH073t^a | D-784659/1 | AH075t^a | D-784660/1 |
| AH076t^a | D-784661/1 | AH077t^a | D-784662/1 |
| AH081t^a | D-785236/1 | AH082t^a | D-785237/1 |
| AH083t^a | D-785238/1 | AH094t^a | D-785241/1 |
| AH090c^a | D-785239/1 | AH090t^a | D-785240/1 |
| AH095t^a | D-785242/1 | AH099t^a | D-785243/1 |
| AH100t^a | D-785244/1 | AH101t^a | D-785245/1 |
| AH104t^a | D-785565/1 | AH107t^a | D-785566/1 |
| AH109t^a | D-785567/1 | AH122t^a | D-785568/1 |
| AH123t^a | D-785569/1 | | |
| (\pm) 7b^b (AH313) | D-788177/1 | (\pm) 6d^b (AH316) | D-788178/1 |
| (\pm) 38c^b (AH367) | D-788185/1 | (\pm) 38d^b (AH382) | D-788180/1 |
| (\pm) 38e^b (AH389) | D-788181/1 | (\pm) 38f^b (AH404) | D-788183/1 |
| (\pm) 38g^b (AH425) | D-788184/1 | (\pm) 17^b (AH455) | D-788179/1 |

Ergebnisse und Diskussion

Alle eingereichten Verbindungen (Tabelle 20) wurden nach der anfänglichen Analyse mit der einmaligen Konzentration von 10 μM aus dem fortführenden Screening aussortiert und nicht weiter untersucht. Insgesamt betrachtet bewegte sich die zytotoxische Aktivität der Verbindungen um den Mittelwert aller Testergebnisse. Einige einzelne Substanzen zeigten jedoch ausgeprägte Wirkung gegenüber einzelnen Zellliniengruppen (Abbildung 43). Die Verbindung AH083t zeigte erhöhte letale Aktivität gegenüber den Leukämie- und den Darmkrebszellen. Ebenso wirkte AH083t inhibierend auf die Lungen-, Melanom- und einige Ovarialzelllinien. Das Derivat AH100t wirkte letal auf die Leukämie- und Darmkrebszellen und inhibierte einige Zelllinien des zentralen Nervensystems. AH122t zeigte ausgeprägte letale Wirkung auf allen Darmkrebszelllinien ebenso wie AH316. Die „Mean Graph“-Datenblätter dieser Substanzen können dem Anhang entnommen werden.

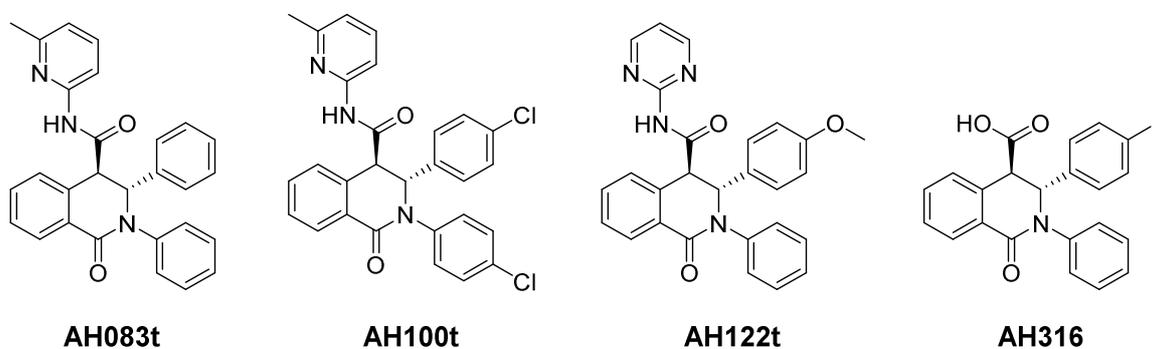
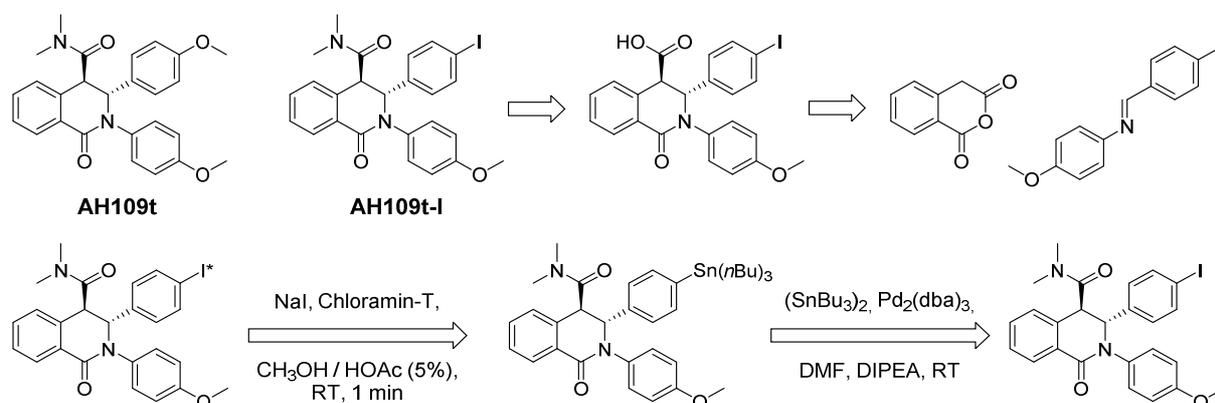


Abbildung 43: Vier Beispiele von getesteten Verbindungen, die ausgeprägte zytotoxische Wirkung gegenüber einzelnen Zellliniengruppen zeigten.

6 Ausblick

6.1 Radioaktivliganden für den Szintillationsnähennachweis

Zur Untersuchung der Bindungsposition der Tetrahydroisochinolinon-Derivate wurde der Szintillationsnähennachweis (SPA) in Erwägung gezogen (siehe Kapitel 1.6). Hierzu wurde eine synthetische Methode zur Herstellung von radioaktivmarkierten Liganden am Beispiel der Verbindung (\pm) **7d** entwickelt. Parallel zu diesem potentiell aktiven HSP70-Radioliganden sollte ebenso ein biologisch nicht aktiver Radioinhibitor als Negativkontrolle für SPA hergestellt und untersucht werden. Anhand der entwickelten Methodik kann beispielsweise die Verbindung AH109t ($EC_{50} > 100 \mu M$) aus der Substanzbibliothek zu einem aktivierten Alkylzinnerivat modifiziert und radioaktiv markiert werden (Schema 18).



Schema 18: Eine retrosynthetische Betrachtung der Herstellung eines nicht aktiven HSP70-Inhibitors als eine Negativkontrolle für die SPA-Analyse am Beispiel von AH109t ($EC_{50} > 100 \mu M$).

6.2 Liganden für die Affinitätschromatographie

6.2.1 HSP70-Liganden

Zur Evaluierung der Interaktion der Tetrahydroisochinolinon-Verbindungen mit dem Chaperon HSP70 wurden Affinitätschromatographieexperimente durchgeführt. Hierfür wurden zwei biotinylierte Liganden (\pm) **23** und (\pm) **25** (siehe Kapitel 3.7.3) hergestellt. Für aussagekräftigere Ergebnisse müssen Experimente mit modifizierten Liganden durchgeführt werden, die den Biotinlinker an weiteren Molekülresten aufweisen (Abbildung 44, Pfeile). Ebenso ist Länge und Beschaffenheit der Linker zwischen dem Inhibitor und dem Biotin ein Ansatz, der variiert und untersucht werden kann.

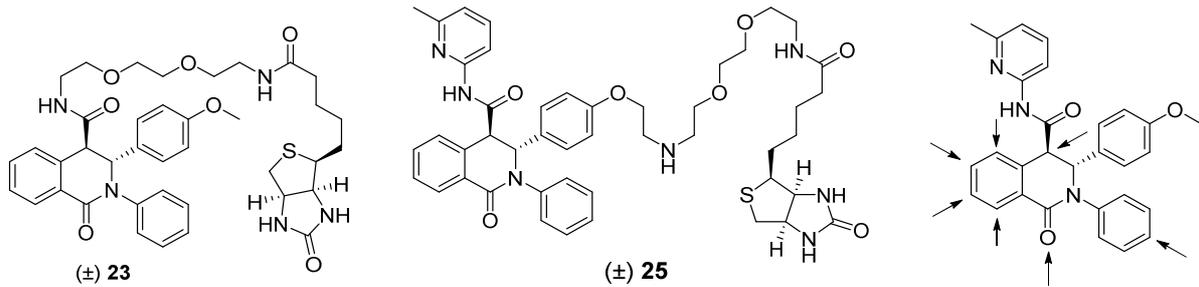


Abbildung 44: Strukturen der hergestellten biotinylierten Liganden **(±) 23** und **(±) 25**. Eine weitere Struktur zeigt, an welchen Stellen der Tetrahydroisochinolinone (Pfeile) weitere Modifikationen durchgeführt werden können, um weitere Liganden zu generieren.

6.2.2 HSF1-Liganden

Die Affinitätschromatographie gekoppelt mit der nanoLC-MS/MS-Analyse wurde ebenfalls am HSF1 mit Hilfe der zwei hergestellten biotinylierten Liganden **(±) 44** und **(±) 46** durchgeführt (siehe Kapitel 4.2.1). Besonders aufgrund der deutlichen Unterschiede in der Proteinanreicherung zwischen den beiden Liganden (Abbildung 39, Kapitel 4.2.2) sollten weitere Modifikationen an den Verbindungen durchgeführt werden, um die Interaktionspartner einzuschränken und mögliche Schlüsse zur Struktur-Wirkungs-Beziehungen zu ziehen. Im Fall der Verbindung **(±) 44** kann die Derivatisierung im Bereich des Cyclopropylrestes und des 3-Propionsäureamides vorgenommen werden. Für den Linker **(±) 46** können der halogenierte Aromat und das Benzylamid substituiert werden (Abbildung 45, grau).

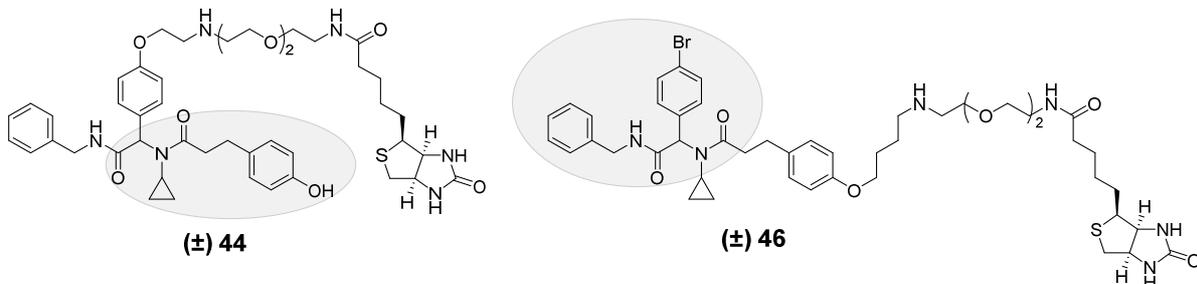


Abbildung 45: Strukturformeln der biotinylierten Liganden **(±) 44** und **(±) 46** für die Untersuchung mittels Affinitätschromatographie. Die grauen Ovale zeigen die Bereiche der Moleküle, die in weiteren Arbeiten derivatisiert werden können, um die Interaktionen zu den angereicherten Proteinen genauer zu untersuchen.

7 Zusammenfassung

Krebs gehört zu einem der zentralen Leiden der 21. Jahrhunderts und ist in den einkommensstarken Ländern die zweithäufigste Todesursache. Die Erkrankung Multiples Myelom (MM) gehört mit 1.3 % aller Krebserkrankungen zwar zu den seltenen Formen, verläuft jedoch meist tödlich und zeichnet sich durch eine unkontrollierte Entartung der monoklonaler Plasmazellen im Knochenmark aus. Da maligne Zellen dauerhaft internen und externen Stressfaktoren ausgesetzt sind und auf die Hitzeschutzantwort angewiesen sind, stellen die Komponenten des Hitzeschocksystems wie z.B. Chaperone HSP70 und HSP90 bzw. der Hitzeschockfaktor HSF1 ein attraktives therapeutisches Ziel dar. Nachweislich führt die Inhibition des Chaperons HSP90 zur HSF1-vermittelten Hochregulation des Proteins HSP70, sodass die Hitzeschutzantwort der zytotoxischen Aktivität der Inhibitoren entgegenwirkt und die Therapieerfolgschancen mindert.

Die vorliegende Doktorarbeit, die im Rahmen der Klinischen Forschergruppe 216 (CRU216) ausgearbeitet wurde, befasste sich einerseits mit der Erweiterung der bereits vorhandenen Substanzbibliotheken sowohl zur Inhibition des Proteins HSP70 als auch des Transkriptionsfaktors HSF1. Hierdurch sollten detailliertere Struktur-Wirkungs-Bezeugungen evaluiert werden. Weiterhin wurden die kooperierenden Arbeitsgruppen des Forschungsprojektes durch die Entwicklung und Herstellung von Substanzen unterstützt, um mit Hilfe vielseitiger Methoden die exakten Wirkmechanismen beider Verbindungsklassen zu verstehen und aufzuklären.

7.1 Inhibitoren des Chaperons HSP70

Die bereits bestehende Substanzbibliothek der 3,4-Dihydroisochinolin-1(2*H*)-on-Derivate aus der vorangehenden Arbeit wurde erfolgreich um neue Carbonsäure- ((±) **6a-j**) und Carbonsäureamidverbindungen ((±) **7b-e**) erweitert. Durch die Substitution phenolischer Seitengruppen der Isoquinolinone gelang es, Säurederivate herzustellen, die eine höhere Zytotoxizität auf den INA-6-Zellen als die Leitstruktur AH073t aufwiesen. Dabei handelt es sich um die monobromierte Verbindung (±) **6c** ($EC_{50} = 0.17 \mu\text{M}$) oder das Derivat mit einem kurzem Bromoethoxylinker (±) **6j** ($EC_{50} = 0.18 \mu\text{M}$). Parallel hierzu wurde festgestellt, dass die Substitution aromatischer Seitengruppen durch aliphatische Reste ((±) **6h-i**) zum kompletten Aktivitätsverlust führte. Durch die fortführende Umsetzung zu den Amiden gelang die Herstellung des Derivates (±) **7c** ($EC_{50} = 0.47 \mu\text{M}$), welches eine ähnliche Aktivität im Vergleich zu der Struktur AH122t ((±) **7a**) zeigte. Weiterhin wurde Verbindung (±) **7d** identifiziert, die eine

sechsfach höhere Zytotoxizität von 34.8 nM im Vergleich zu der Leitstruktur (\pm) **7a** ($EC_{50} = 200$ nM) aufwies.

Die Trennung der *trans*-Enantiomere der Leitstruktur AH073t wurde erfolgreich mit Hilfe einer chiralen chromatographischen Methode durchgeführt und die Absolutkonfiguration mit Hilfe der Circular dichroismus-Spektroskopie (Arbeitskreis Bringmann) bestimmt. Durch die biologische Untersuchung an den MM-INA-6-Zellen (Arbeitskreis Chatterjee) wurde die enantiospezifische Aktivität des *3R,4R*-Enantiomers bestätigt, wohingegen das *3S,4S*-Isomer hingegen nicht aktiv war. Die angestrebte Amidierung zu enantiomerenreinen Substanzen führte gegen die Erwartung zu einem Diastereomerenmisch, da aufgrund des aciden Protons am Kohlenstoff C-4 die Carbonsäuren im Laufe der Synthese epimerisierten.

Um die Epimerisierung an der aciden Position zu vermeiden, wurden neuartige Isochinolinoncarbonsäure-Derivate hergestellt, die erstmalig an dem Kohlenstoff C-4 substituiert wurden. Mit Hilfe einer Schutzgruppentechnik wurden in drei Syntheseschritten erfolgreich drei neue Derivate, nämlich eine fluoridierte (\pm) **11**), methylierte (\pm) **15**) und ethylierte Verbindung (\pm) **16**), erhalten. Die Bestimmung der Absolutkonfiguration der fluoridierten und ethylierten Spezies gelang durch die Röntgenstrukturanalyse der Einkristalle (Arbeitskreis Braunschweig). Dabei wurde festgestellt, dass die Alkylierungsreaktion stereospezifisch verliefen und ausschließlich *cis*-Derivate erhalten wurden. Die biologische Untersuchung dieser Substanzen bestätigte die Konfiguration, da alle drei Verbindungen keine Aktivität auf MM-INA-6-Zellen zeigten ($EC_{50} > 100$ μ M). Weiterhin wurde mit Hilfe einer UV-metrischen Messung die Sättigungskonzentration der neuen Derivate untersucht. Hierbei wurde festgestellt, dass die Substitution am Kohlenstoff C-4 zur Senkung der Löslichkeit geführt hat.

Anhand der Proteinkristallstruktur des bHSC70 (C.Grimm) wurde ein TMAO-Molekül in der Nähe der der Interface-Oberfläche identifiziert. Basierend auf diesem Ergebnis wurde eine Methode zur Herstellung eines TMAO-Isochinolinonhybrides entwickelt, welches sich an der Leitstruktur AH073t orientierte. Während der Synthesesequenz ist es zu der Decarboxylierung des angestrebten 3,4-Dihydroisochinolin-1(2*H*)-on-Derivates gekommen, wodurch das neue Derivat **17** erhalten wurde. Nachdem die Reaktionsbedingungen variiert und die gewünschte Verbindung nicht erhalten wurde, wurde **17** im darauffolgenden Syntheseschritt erfolgreich zum TMAO-Hybrid **18** umgesetzt.

Der Szintillationsnähennachweis (SPA) ist eine etablierte Methode, um mit Hilfe von radioaktivmarkierten Liganden Bindungsstudien im Hochdurchsatzformat durchzuführen und hier die Bindungsposition der Isochinolinon-Derivate zu untersuchen. Die Substanz AH122t diente hierbei als Leitstruktur zur Entwicklung einer Methode zur Radioaktivmarkierung der potentiellen HSP70-Inhibitoren, sodass die aktivierte Stanylverbindung (\pm) **19** erhalten wurde. Diese Verbindung konnte in der Gegenwart von Chloramin-T und des NaI-Salzes innerhalb von

wenigen Sekunden zum Radioliganden (\pm) **7d*** umgesetzt werden. Die Herstellung des Radioliganden wurde mittels einer entwickelten HPLC-Methode analysiert und validiert.

Eine weitere Möglichkeit zur Evaluieren der potentiellen Bindungspartner der hergestellten Isochinolinon-Verbindungen bietet die Affinitätschromatographie gekoppelt mit der proteomischen Analyse mittels quantitativer Massenspektrometrie (Arbeitskreis Schlosser). Es gelang die Herstellung der Biotin-markierter Liganden (\pm) **23**, der sich an der Leitstruktur AH073t orientierte, und (\pm) **25**, der sich an AH081t orientierte. Die ersten Analysen mittels Affinitätschromatographie zeigten, dass mit dem Liganden (\pm) **23** überraschenderweise keine Proteine signifikant angereichert wurden, während mit dem Liganden (\pm) **25** zwar keine HSP70-Proteine angereichert, aber einige Komponenten der Hitzeschutzantwort wie die Phosphatidylinositol-Kinasen DNA-PK und ATM, und die Untereinheiten des Chaperons HSP90 identifiziert werden konnten.

7.2 Inhibitoren des Transkriptionsfaktors HSF1

Die bereits bestehende Substanzbibliothek der α -Acylaminocarboxamide wurde erfolgreich mit Hilfe der Ugi-Multikomponentenreaktion um die Derivate (\pm) **38c-g** erweitert. Die Evaluierung der biologischen Aktivität erfolgte semiquantitativ mittels Westernblot und quantitativ mittels ELISA-Assay (Arbeitskreis Chatterjee), wobei die Beurteilung indirekt anhand des HSF1-vermittelten Regulationslevels des Chaperons HSP72 erfolgte. Hierbei wurden neue Verbindungen (\pm) **38c** und (\pm) **38g** mit dem α,β -gesättigten Carbonylsystem identifiziert, die eine vergleichbare inhibitorische Aktivität wie die bereits bekannten ungesättigten Derivaten (\pm) **37l** oder (\pm) **37m** zeigten, was darauf hinweist, dass die inhibitorische Aktivität der α -Acylaminocarboxamide nicht von der kovalenten Bindung des Michael-Systems verursacht wird.

Um das Target der α -Acylaminocarboxamide zu evaluieren, wurde auch hier die Durchführung der Affinitätschromatographie gekoppelt mit der Analyse mittels der quantitativer Massenspektrometrie angestrebt (Arbeitskreis Schlosser). In Anlehnung an die Synthesemethodik für die HSP70-Liganden wurden hierfür die Biotin-markierten Liganden (\pm) **42**, (\pm) **44** und (\pm) **46** erfolgreich hergestellt, die sich durch die Position des Biotinlinkers unterscheiden.

Die proteomische Untersuchung wurde erfolgreich mit den Liganden (\pm) **44** und (\pm) **46** durchgeführt und es wurden 68 Proteine signifikant angereichert. Viele dieser Proteine tragen die sogenannte Armadillo-Domäne, die eine wichtige Rolle in der Protein-Protein-Interaktion spielt und eine hochkonservierte Bindungstasche aufweist. Unter den angereicherten Proteinen befanden sich mitunter der MICOS-Komplex, der CCR4-NOT-Komplex und die Kinasen des Phosphatidylinositol-Signalwegs. Von den letzteren konnten explizit die Kinasen

Zusammenfassung

DNA-PK, ATM, ATR und mTOR identifiziert werden, die möglicherweise die HSF1-regulierte HSP70-Expression beeinflussen. Weiterhin wurde festgestellt, dass die Position des Linkers die Bindung an zwei unterschiedliche Proteingruppen beeinflusst. Während der Ligand (\pm) **44** ausschließlich mit den Proteinen des CCR4-NOT-Komplexes interagiert, wurden für den Liganden (\pm) **46** die Komponenten des COG-Komplexes identifiziert.

8 Summary

Cancer is one of the emerging diseases of the current century and leads to every second death in the high-income countries. Multiple Myeloma (MM) is characterised by clonal proliferation of malignant plasma cells in the bone marrow. MM causes only about 1.3 % of all cancer cases but remains incurable due to resistance and huge relapse numbers. The heat shock response helps cells to deal with situation of stress and provides protection from cell death. Especially malignant cells must cope numerous internal and external stress factors and rely on proteins of the heat shock response as the chaperones HSP70/HSP90 but also the transcription factor HSF1. To date, it was already demonstrated that the pharmacological inhibition of the protein HSP90 leads to the HSF1-dependent upregulation of HSP70 causing resistance against agents.

The current thesis, which was realised within the Clinical Research Unit 216 (CRU216), proposed the enlargement of the established substance libraries of both targets HSP70 and HSF1 to intensify the investigation of the structure-activity relationships. Furthermore, the collaborating research groups within the CRU216 were supported by development of numerous compounds and realisation of diverse analytical methods for research of the interaction of new compounds and the potential targets HSP70 and HSF1.

8.1 Inhibitors of the chaperon HSP70

The substance library of 3,4-dihydroisoquinolin-1(2*H*)-one derivatives, which was established in the previous work, was successfully expanded with new carboxylic acid derivatives (\pm) **6a-j** and amide derivatives (\pm) **7b-e**. The substitution of the phenolic moieties enabled the synthesis of agents with higher activity towards INA-6-cell as the lead compound AH073t (Chatterjee group). The brominated derivative (\pm) **6c** and the derivative with a short bromoethoxy linker (\pm) **6j** showed similar EC_{50} values of 0.17 μ M and 0.18 μ M, respectively. Concurrently, the replacement of the aromatic residues with aliphatic moieties (\pm) **6h-i** led to complete abrogation of the biological activity. In conclusion, the aromatic molecule residues are essential for the interaction of the inhibitors to the potential target. Among the new amide derivatives, the compound (\pm) **7c** showed similar inhibitory activity as the lead compound AH122t (\pm) **7a** from the previous work. Furthermore, it was possible to identify the derivative (\pm) **7d** with the EC_{50} value of 34.8 nM which was six times more active than the lead compound A122t (EC_{50} = 200 nM).

The enantiomers of the racemic lead compound AH073t were successfully separated by means of a chiral chromatographical method. The configuration of the enantiomers was

Summary

determined by circular dichroism spectroscopy (Bringmann group). The investigation of the biological activity on INA-6-cells determined that the *3R,4R*-isomer is the eutomer whereas the *3S,4S*-enantiomer did not show any inhibitory activity (Chatterjee group). Unfortunately, the following amide synthesis led to the epimerisation due to the acidic proton at the carbon C-4 so that the isolation of enantiomeric pure amide compounds could not be achieved.

As next, the acidic position of the 3,4-dihydroisoquinolinones was substituted to prevent the epimerisation. It was possible to establish three novel derivatives (\pm) **11** (fluorinated), (\pm) **15** (methylated) and (\pm) **16** (ethylated) in three synthesis steps. The analysis of the steric configuration of the compound (\pm) **11** and (\pm) **16** was achieved by X-ray crystallography. Additionally, the alkylation reactions were found to be stereospecific leading to formation of pure *cis*-isomers. The investigation of the biological activity on INA-6-cells confirmed these results as all three compounds were not active ($EC_{50} > 100 \mu\text{M}$). Furthermore, the saturation concentration of the novel substances was analysed UV-metric and it was observed that the substitution on the carbon C-4 led to decreased solubility.

The protein crystal structure of the bovine HSC70 (C.Grimm) showed that a TMAO molecule was bound next to the identified interface domain. Based on this result, a method for synthesis of a TMAO-isoquinolinone hybrid was developed. During the synthesis, unexpected decarboxylation of the planned isoquinolinone carboxylic acid occurred so that the novel compound **17** was isolated. As changed reaction conditions did not lead to the formation of the desired product, **17** was successfully oxidised to the TMAO-derivative **18**.

Scintillation proximity assay (SPA) is a radioisotopic assay technique that allows fast performance of binding studies and could support the evaluation of the binding target of the 3,4-dihydroisoquinolinones. A synthesis method for a radiolabelled ligand was successfully developed using the iodised analogue of the lead compound AH122t. The synthesis of the activated trialkylstannane (\pm) **19** was accomplished, which was radiolabelled within seconds by the reaction with Chloramine-T and NaI to obtain the radioligand (\pm) **7d***. The formation of the radioligand was controlled by a developed HPLC method.

A further method for the identification of the drug target is affinity chromatography in combination with quantitative mass spectrometry (Schlosser group). A synthesis route was developed and two affinity ligands (\pm) **23** and (\pm) **25**, which differ by the position of the Biotinlinker, were obtained. The initial experiments indicated that surprisingly no proteins were captured by means of the ligand (\pm) **23**. The ligand (\pm) **25** enabled the capturing and identification of some significantly enriched heat shock response proteins as the PI3-kinases DNA-PK and ATM, and the subunits of the heat shock protein HSP90. However, HSP70 could not be determined as a target of (\pm) **25**.

8.2 Inhibitors of the transcription factor HSF1

The established library of the α -acyl aminocarboxamides from the previous work was successfully enlarged by usage of the Ugi four component reaction and the derivatives (\pm) **38c-g** were obtained. The semi-quantitative Western blot analysis and quantitative ELISA-analysis were used as complementary readouts for the HSF1-dependent upregulation of HSP72 in the MM-INA-6 cell model (Chatterjee group). The α,β -saturated carbonyl compounds (\pm) **38c** and (\pm) **38g** showed similar inhibitory activity as known derivatives with α,β -unsaturated carbonyl moiety, e.g. (\pm) **37l** or (\pm) **37m** indicating that the Michael system and the related covalent binding to the target are unlikely.

For the identification of the target of the α -acyl aminocarboxamides affinity capturing experiment connected to quantitative mass spectrometry was performed (Schlosser group). The established synthesis method for preparation of biotinylated ligands was successfully applied to obtain three ligands (\pm) **42**, (\pm) **44** and (\pm) **46**. The derivatives (\pm) **42** und (\pm) **44** differ by a phenolic hydroxyl group and are linked at the same position to Biotin. The ligand (\pm) **46** was immobilised at a different molecule moiety to evaluate the binding effects to the target.

The proteomic investigation with the ligands (\pm) **44** and (\pm) **46** allowed the identification of 68 significantly enriched proteins. Several captured proteins contain the so-called armadillo domain which is important for protein-protein interactions and exposes a highly conserved binding pocket. The significantly enriched proteins of both ligands were the MICOS-complex, the CCR4-NOT-complex and the kinases of the phosphatidylinositol-3-kinases signalling pathway, especially the kinases DNA-PK, ATM, ATR and mTOR. Further investigation of (\pm) **44** and (\pm) **46** revealed that the position of the linker affected the capturing results. While the ligand (\pm) **44** exclusively captured the proteins of the CCR4-NOT-complex, the proteins of the COG-complex only bound by the compound (\pm) **46**.

9 Experimenteller Teil

9.1 Allgemeine Angaben zu verwendeten Apparaturen und Methoden

Kernresonanzspektroskopie (eng. nuclear magnetic resonance, NMR):

^1H (400.132 MHz) und ^{13}C (100.613 MHz) NMR-Spektren wurden bei 300 K an einem Bruker AV 400 NMR-Spektrometer (Bruker Biospin, Bremen Deutschland) aufgenommen. Die Messung der ^{19}F (188.091 Hz) NMR-Spektren erfolgte an einem Bruker Advance 200 Hz Spektrometer (Bruker Biospin, Bremen, Deutschland) bei 298 K. Die chemische Verschiebung δ ist in ppm angegeben und wurde auf deuterierte Lösungsmittel als interner Standard referenziert¹³⁶ (CDCl_3 : ^1H 7.26 ppm, ^{13}C 77.16 ppm; DMSO-d_6 : ^1H 2.50 ppm, ^{13}C 39.52 ppm; CD_3OD : ^1H 3.31 ppm, ^{13}C 49.00 ppm). Im Fall von ^{19}F -Messung wurde auf das externe Signal von CFCl_3 (0 ppm) referenziert. Die Kopplungskonstante J ist in Hz angegeben und die Signalmultiplizitäten wurden wie folgt abgekürzt: s (Singulett), d (Dublett), t (Triplet), dd (Dublett von Dublett), ddt (Dublett von Dublett von Triplet), dq (Dublett von Quartett), m (Multiplet). Die Zuordnung der Protonen- und Kohlenstoffsignale von unbekanntem Substanzen erfolgte unter Verwendung von 2D-NMR Experimenten ($^1\text{H}, ^1\text{H}$ COSY, $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ HSQC und $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ HMBC) und mit Hilfe von MestReNova (Version 6.0.2-5475).

Reinheitssbestimmung mittels qNMR:¹³⁷

Die Reinheit der Endsubstanzen, die sich in gängigen HPLC geeigneten Lösungsmitteln (CH_3OH , CH_3CN) nicht lösen, wurde mittels quantitativem NMR bestimmt und ist für die jeweiligen Substanzen explizit angegeben (Methode **A**). 4.00 mg von der zu bestimmenden Substanz und 4.00 mg von einem internen Standard (IS) (Maleinsäure oder 1,2,4,5-Tetrachlor-3-nitrobenzen) wurden in 700 μL DMSO-d_6 gelöst und sogleich mit einer quantitativen ^1H -NMR-Messmethode vermessen (90° Puls, Relaxationszeit 60 sec). Nach einer manuellen Phasen- und automatischen Basislinienkorrektur wurden passende Signale der zu bestimmenden Substanz und des IS integriert und in die folgende Formel zur Reinheitsbestimmung eingesetzt:

$$P_X = \left(\frac{A_X}{A_{IS}}\right) \times \left(\frac{N_{IS}}{N_X}\right) \times \left(\frac{m_{IS}}{m_X}\right) \times \left(\frac{M_X}{M_{IS}}\right) \times P_{IS}$$

wobei P_X die zu bestimmende Reinheit und P_{IS} die Reinheit des internen Standards sind. A_X/A_{IS} stehen für die integrierten Flächen der ausgewählten Signale, N_X/N_{IS} für die Anzahl der integrierten Protonen, m_X/m_{IS} kennzeichnen die abgewogene Menge der jeweiligen Substanz in mg, und M_X/M_{IS} ist die molare Masse in g/mol.

Chromatographische Trennmethode:

Für die Dünnschichtchromatographie (DC) wurden kieselgelbeschichtete Aluminiumplatten ALUGRAM® Xtra SIL G/UV₂₅₄ (Partikelgröße 5-17 µm, Schichtdicke 200 µm) und C18-kieselgelbeschichtete Aluminiumplatten ALUGRAM® RP-18W/UV₂₅₄ (Partikelgröße 2-10 µm, Schichtdicke 150 µm) verwendet. Die Detektion erfolgte durch Fluoreszenzlösung bei 254 nm und durch Anwendung von Anfärbereagenzien Ninhydrin-Lösung (0.05 M in EtOH), Kaliumpermanganat-Lösung (10 % (w/v) in 0.2 M H₂SO₄) und Ekkert's Reagenz (1.5 % (w/v) *p*-Anisaldehyd, 1.5 % (w/v) konzentrierte H₂SO₄, 15 % (w/v) Eisessig in EtOH).

Zur klassischen Aufreinigung wurde Schwerkräftenäulenchromatographie durchgeführt. Als Säulenfüllmaterial wurde Kieselgel mit einer Korngröße von 63-200 µm (Merck, Darmstadt, Deutschland) verwendet. Die hierfür verwendeten Lösungsmittel wurden kommerziell erworben und vor der Verwendung destillierend gereinigt.

Flash-Chromatographie (*eng. medium pressure liquid chromatography, MPLC*) wurde an einem puriFlash®430 System (Interchim, Montluçon, Frankreich) durchgeführt. Dabei wurden vorgepackte Säulen (Interchim, Montluçon, Frankreich) mit Kieselgelfüllung (Partikelgröße 30 µm oder 50 µm) für Normalphasen- oder mit C18-Kieselgelfüllung (Partikelgröße 15 µm) für Umkehrphasenmodus verwendet. Die Detektion erfolgte mittels eines UV-Detektors und eines Lichtstreuendetektors (*eng. Evaporative Light Scattering Detektor, ELSD*).

Analytische Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) wurde an einem Agilent HPLC-Modularsystem (1100 Series) bestehend aus einem Vakuumentgaser, einer Binärpumpe, einem Probenwechsler und einem Photodiodenarray-Detektor (Agilent Technologies, Böblingen, Deutschland) durchgeführt.

Reinheitsbestimmung: Die Reinheit der Endsubstanzen wurde chromatographisch (Methode **B/C**) bestimmt und ist für die jeweilige Substanz einzeln angegeben.

| | | | |
|-------------------|------------|---|-----------|
| Methode B: | Anlage | Shimadzu HPLC Modularsystem | |
| | Säule | Phenomenex Synergi 4µm Fusion-RP, 150 x 4.6 mm | |
| | Eluenten | H ₂ O + 0.1 % HCOOH (A) / CH ₃ OH + 0.1 % HCOOH (B) | |
| | Elution | 0-8 min | 5-100 % B |
| | | 8-12 min | 100 % B |
| | | 12-16 min | 100-5 % B |
| | | 16-18 min | 5 % B |
| | Flussrate | 1 mL/min | |
| | Detektion | 254 nm | |
| | Temperatur | RT | |

Experimenteller Part

| | | |
|--------------------|------------|---|
| Methode C : | Anlage | Agilent HPLC-Modularsystem (1100 Series) |
| | Säule | Zobrax Eclipse XDB-C18 5µm, 150 x 4.6 mm |
| | Eluenten | H ₂ O + 0.1 % HCOOH (A) / CH ₃ OH + 0.1 % HCOOH (B) |
| | Elution | 0-8 min 5-100 % B 8-12 min 100 % B 12-16 min 100-5 % B 16-18 min 5 % B |
| | Flussrate | 1 mL/min |
| | Detektion | 254 nm |
| | Temperatur | RT |

Präparative Auftrennung: Die Reinigung des Endproduktes **6f** erfolgte mit Hilfe eines Agilent HPLC-Modularsystems (1100 Series) ausgestattet mit zwei präparativen Pumpen, einem Multiwellenlängendetektor und einem Fraktionssammler (Agilent Technologies, Böblingen, Deutschland):

| | | |
|--------------------|------------|---|
| Methode D : | Anlage | Agilent HPLC-Modularsystems (1100 Series), <i>präparativ</i> |
| | Säule | Zobrax Eclipse XDB-C18 5µm, 150 x 21.2 mm |
| | Eluenten | H ₂ O + 0.1 % HCOOH (A) / CH ₃ OH + 0.1 % HCOOH (B) |
| | Elution | 50 % B |
| | Laufzeit | 20 min |
| | Flussrate | 21 mL/min |
| | Detektion | 254 nm |
| | Temperatur | RT |

Chirale Auftrennung: Die Enantiomere **6a-A** und **6a-B** wurden unter Anwendung einer chiralen HPLC-Säule chromatographisch getrennt:

| | | |
|--------------------|------------|--|
| Methode E : | Anlage | Agilent HPLC-Modularsystems (1100 Series), <i>analytisch</i> |
| | Säule | Phenomenex Lux Cellulose-1 5µm, 250 x 4.6 mm |
| | Eluenten | CH ₃ OH + 0.1 % HCOOH (A) / <i>i</i> PrOH + 0.1 % HCOOH (B) |
| | Elution | 80 % B |
| | Laufzeit | 12 min |
| | Flussrate | 0.7 mL/min |
| | Detektion | 254 nm |
| | Temperatur | RT |

Experimenteller Part

| | |
|------------|--|
| Anlage | Agilent HPLC-Modularsystems (1100 Series), <i>präparativ</i> |
| Säule | Phenomenex Lux Cellulose-1 5 μ m, 250 x 21.2 mm |
| Eluenten | CH ₃ OH + 0.1 % HCOOH (A) / <i>i</i> PrOH + 0.1 % HCOOH (B) |
| Elution | 80 % B |
| Laufzeit | 12 min |
| Flussrate | 14.9 mL/min |
| Detektion | 254 nm |
| Temperatur | RT |

Untersuchung zur Radioligandensynthese: Der Fortschritt der oxidativen Radioiodierung der Substanz (\pm) **19** wurde mittels einer HPLC-Methode verfolgt:

| | | |
|--------------------|------------|--|
| Methode F : | Anlage | Agilent HPLC-Modularsystems (1100 Series), <i>analytisch</i> |
| | Säule | Zobrax Eclipse XDB-C18 5 μ m, 150 x 21.2 mm |
| | Eluenten | H ₂ O (A) / CH ₃ CN (B) |
| | Elution | 0-7 min 50-100 % B 7-20min 100 % B |
| | Flussrate | 1 mL/min |
| | Detektion | 254 nm |
| | Temperatur | RT |

Infrarotspektroskopie:

Die Aufnahme der Infrarotspektren (IR) erfolgte an einem JASCO-FT/IR-6100-Spektrometer (Jasco, Gross-Umstadt, Deutschland). Die Spektren von Reinsubstanzen wurden mit Hilfe einer Diamant-ATR-Einheit aufgenommen, wobei die Wellenzahl $\tilde{\nu}$ in cm⁻¹ angegeben ist.

Schmelzpunktbestimmung:

Die Schmelzpunkte der Endsubstanzen wurden an einem Melting point meter MPM-H2 (Schorpp Gerätetechnik, Überlingen, Germany) gemessen und sind nicht korrigiert.

Massenspektrometrie:

Massenspektrometrische Analysen wurden an einer LC/MSD Ionenfalle (Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland) verbunden mit einem Agilent 1100 Modularsystem (Methode **C**) und an einem Single Quadrupole Massenspektrometer gekoppelt mit einem Shimadzu HPLC Modularsystem (Shimadzu Deutschland, Duisburg, Deutschland) (Methode **B**) durchgeführt.

Kapillarelektrophorese (eng. capillary electrophoresis, CE):

Die Stabilitätsuntersuchung von *AH073tS* erfolgte mit Hilfe von Beckman P/ACE System MDQ (Beckman Coulter, Fullerton, USA), welches mit einem Diodenarray-Detektor ausgestattet ist. Die effektive Länge der fused-silica-Kapillare (BGB Analytik, Schloßböckelheim, Deutschland) betrug 50,0 cm bei einer Gesamtlänge von 60,2 cm.

Stabilitätsuntersuchung mittels CE: Die zu untersuchenden Enantiomere der Substanz *AH073tS* wurden bei einer Spannung von 25,0 kV getrennt und bei 210 nm detektiert. Der Elektrophoresenpuffer enthielt 4 mg/mL Dimethyl- β -cyclodextrin (DM- β -CD) und 75 mM $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ bei einem pH von 9.25. Vor jeder Auftrennung erfolgte eine Waschsequenz der Kapillare 1 min mit H_2O , 3 min mit 0.1 M NaOH-Lösung, 1 min mit H_2O und zuletzt 3 min mit Puffer. Jeder Schritt wurde mit einem Druck von 30 psi durchgeführt. Nach einer anschließenden Injektion der Probe bei einem Druck von 0.5 psi über 5 sec erfolgte die Auftrennung innerhalb von 15 min.

Circulardichroismusspektroskopie (CD):

Die CD-Spektren von **6a-A** und **6a-B** wurden an einem J-715-Spectropolarimeter (Jasco, Gross-Umstadt, Deutschland) mit einer Bandbreite von 1 nm und Scangeschwindigkeit von 200 nm/min aufgenommen. Die differentiellen Absorptionskoeffizienten ($\Delta\epsilon$ in cm^2/mol) wurden in dem Wellenlängenbereich von 200 bis 350 nm aufgenommen.

Polarimetrie:

Der Drehwinkel (α_g) von **6a-A** und **6a-B** wurde an einem MCP 200 Polarimeter (Anton Paar, Graz, Österreich) in CHCl_3 bei 589 nm vermessen. Die Messtemperatur betrug 23 °C und die Länge der Küvette 10 cm (l_K). Die Konzentration (c_S) der vermessenen Substanzen ist jeweils in g/mL angegeben. Der spezifische Drehwert $[\alpha]_D^{23}$ wurde wie folgt berechnet:

$$[\alpha]_D^{23} = \frac{\alpha_g}{c_S * l_K} [^\circ \text{ mL dm}^{-1} \text{ g}^{-1}]$$

Röntgenbeugungsanalyse:

Die Vermessung der Einkristalle von (\pm) **11** und (\pm) **16** wurden an einem BRUKER D8 QUEST Diffraktometer, ausgestattet mit einem CMOS-Sensor, mit monochromatischer Mo $_{K\alpha}$ -Strahlung vermessen.

Struktur- und Ortsparameter der Röntgenbeugungsanalyse von (\pm) **11**:

| | |
|---|--|
| Summenformel | C ₂₃ H ₁₈ FNO ₄ |
| CCDC-Nummer | 1535140 |
| Molekulargewicht [g*mol ⁻¹] | 391.39 |
| Messtemperatur [K] | 100(2) |
| Kristallabmessungen [mm ³] | 0.276x0.204x0.18 |
| Form und Farbe | Farbloser Block |
| Strahlung, λ [Å] | Mo $_{K\alpha}$ |
| Kristallsystem | Monoklin |
| Raumgruppe | <i>P</i> 2 ₁ / <i>c</i> |
| <i>a</i> [Å] | 8.4849(11) |
| <i>b</i> [Å] | 15.407(3) |
| <i>c</i> [Å] | 14.157(2) |
| α (°), β (°), γ (°) | 90, 102.598(16), 90 |
| <i>V</i> [Å ³] | 1806.1(5) |
| <i>Z</i> | 4 |
| Berechnete Kristalldichte [g*cm ⁻³] | 1.439 |
| Absorptionskoeffizient [mm ⁻¹] | 0.106 |
| F(000) | 816 |
| Unabhängige Reflexe [$2\theta \leq 52.742^\circ$] | 3697 |
| Parameter | 264 |
| R-Werte | $R_I = 0.0331$ $wR^2 = 0.0807$ |

Experimenteller Part

Struktur- und Ortsparameter der Röntgenbeugungsanalyse von (\pm) **16**:

| | |
|---|-----------------------------------|
| Summenformel | $C_{25}H_{23}NO_4$ |
| CCDC-Nummer | Nicht veröffentlicht |
| Molekulargewicht [$g \cdot mol^{-1}$] | 401.43 |
| Messtemperatur [K] | 100(2) |
| Kristallabmessungen [mm^3] | 0.615x0.074x0.026 |
| Form und Farbe | Farblose Nadeln |
| Strahlung, λ [\AA] | $Mo_{K\alpha}$ |
| Kristallsystem | triklin |
| Raumgruppe | $P \bar{1}$ |
| a [\AA] | 8.697(3) |
| b [\AA] | 10.287(3) |
| c [\AA] | 13.872(6) |
| $\alpha(^{\circ})$, $\beta(^{\circ})$, $\gamma(^{\circ})$ | 80.76(3), 78.26(19), 73.133(11) |
| V [\AA^3] | 1156.0(7) |
| Z | 2 |
| Berechnete Kristalldichte [$g \cdot cm^{-3}$] | 1.153 |
| Absorptionskoeffizient [mm^{-1}] | 0.078 |
| F(000) | 424 |
| Unabhängige Reflexe [$2\theta \leq 52.742^{\circ}$] | 5737 |
| Parameter | 273 |
| R-Werte | $R_1 = 0.0697$ $wR^2 = 0.1616$ |

UV-metrische Löslichkeitsbestimmung:

Die Löslichkeit von (\pm) **6a**, (\pm) **11**, (\pm) **15** und (\pm) **16** wurde UV-metrisch mit Hilfe eines UVmini-1240 UV/Vis-Spektrometers (Shimadzu, Duisburg, Deutschland) bestimmt. Zur Messung wurde eine Präzisionsküvette aus optischem Spezialglas mit einer Schichtdicke von 10.0 mm (Hellma, Müllheim, Deutschland) verwendet.

Die Stammlösungen von (\pm) **6a** (1 mg/mL in CH₃OH) und (\pm) **11**, (\pm) **15** und (\pm) **16** (jeweils 0.5 mg/mL in CH₃OH) wurden mit dem Zellmedium RPMI-1640 (Sigma Aldrich, München, Deutschland) verdünnt und UV-metrisch unter der Berücksichtigung der jeweiligen Wellenlänge des Absorptionsmaximums vermessen. Die Konzentrationen der Verdünnungsreihe lagen zwischen 5 µg/mL und 100 µg/mL. Die gesättigten Substanzlösungen wurden im Zellmedium RPMI-1640 mit CH₃OH (10 %) hergestellt, zentrifugiert und der Überstand anschließend vermessen. Die jeweilige maximale Löslichkeit wurde mit Hilfe der Verdünnungsreihe ermittelt.

Chemikalien

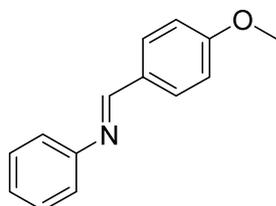
Für die chromatographischen Anwendungen (HPLC, Umkehrphasen-MPLC) wurde deionisiertes Wasser benutzt, welches mittels einer Milli-Q[®] Anlage (Merck, Darmstadt, Deutschland) gereinigt wurde. CH₃OH (CHROMASOLV[®], HPLC grade), CH₃CN (CHROMASOLV[®] Plus, HPLC grade) und 2-PrOH (CHROMASOLV[®], LC-MS grade) wurden von Sigma-Aldrich Chemie (München, Deutschland) bezogen.

Sonstige Chemikalien wurden von Sigma-Aldrich Chemie (München, Deutschland) oder VWR International (Darmstadt, Deutschland) bezogen und ohne weitere Reinigung eingesetzt.

9.2 Synthetische Methoden

9.2.1 Synthesen der Imin-Derivate

N-(4-Methoxybenzyliden)anilin, **4a** (AH070)



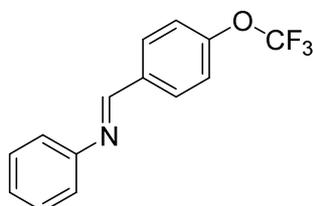
C₁₄H₁₃NO
211.26 g/mol

4-Methoxybenzaldehyd (5.00 mL, 41.1 mmol) und Anilin (3.75 mL, 41.1 mmol) wurden in EtOH (10 mL) für 16 h bei RT gerührt. Der entstandene Niederschlag wurde abfiltriert, mit kaltem EtOH (5 mL) gewaschen, sodass ein farbloser kristalliner Feststoff (8.16 g, 38.6 mmol, 94 %) erhalten wurde.

Smp.: 61-62 °C.

Die gemessenen physikalischen und spektroskopischen Daten stimmen mit den Angaben in der Literatur¹³⁸ überein. Ausbeute laut Literatur 79 %, **Smp.:** 55-56 °C.

N-(4-Trifluoromethoxybenzyliden)anilin, **4b** (AH418)



C₁₄H₁₀F₃NO
265.24 g/mol

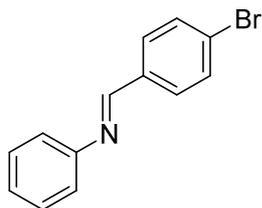
4-Trifluoromethoxybenzaldehyd (1.50 g, 7.90 mmol) und Anilin (0.72 mL, 7.89 mmol) wurden in EtOH (8 mL) für 4 h bei RT gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt, das erhaltene Rohprodukt mit kaltem EtOH (20 mL) gewaschen und ein gelber kristalliner Feststoff (2.03 g, 7.65 mmol, 97 %) isoliert.

¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ 8.46 (s, 1H), 7.86-7.3 (m, 2H), 7.33-7.29 (m, 2H), 7.22-7.20 (m, 2H), 7.17-7.11 (m, 3H).

¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz): δ 158.5, 151.7, 151.4 (q, *J*_{CF}=1.8 Hz), 134.8, 130.4, 129.3, 126.4, 121.0, 120.9, 120.5 (q, *J*_{CF}=258.1 Hz).

Smp.: 37-38 °C.

N-(4-Bromobenzyliden)anilin, **4c** (AHFG05)



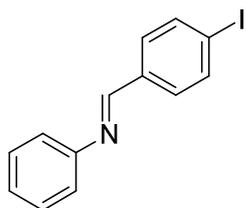
$C_{13}H_{10}BrN$
260.13 g/mol

4-Bromobenzaldehyd (3.50 g, 19.0 mmol) und Anilin (2.59 mL, 28.5 mmol) wurden in EtOH (5 mL) für 18 h bei RT gerührt. Der entstandene Niederschlag wurde abfiltriert, mit kaltem CH_3OH (20 mL) gewaschen und als farbloser Feststoff (2.97 g, 11.4 mmol, 60 %) erhalten.

Smp.: 74-75 °C.

Die gemessenen physikalischen und spektroskopischen Daten stimmen mit den Angaben in der Literatur¹³⁹ überein. Ausbeute laut Literatur 93 %, Smp.:¹⁴⁰ 72-73 °C.

N-(4-Iodobenzyliden)anilin, **4d** (AH302)



$C_{13}H_{10}IN$
307.13 g/mol

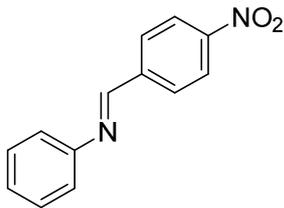
4-Iodobenzaldehyd (200 mg, 0.86 mmol) und Anilin (86.0 μ L, 0.94 mmol) wurden in CH_3OH (1 mL) für 2 h bei RT gerührt. Anschließend wurde das entstandene Präzipitat filtriert und mit kaltem CH_3OH (3 mL) gewaschen, sodass ein farbloser kristalliner Feststoff (256 mg, 0.83 mmol, 97 %) erhalten wurde.

¹H NMR ($CDCl_3$, 400 MHz): δ 8.39 (s, 1H), 7.85-7.81 (m, 2H), 7.65-7.62 (m, 2H), 7.42-7.38 (m, 2H), 7.27-7.20 (m, 3H).

¹³C NMR ($CDCl_3$, 100 MHz): δ 159.2, 151.7, 138.1, 135.8, 130.3, 129.3, 126.3, 120.9, 98.3.

Smp.: 91-92 °C (Lit.:¹⁴¹ 90-91 °C).

N-(4-Nitrobenzyliden)anilin, **4e** (AH422)



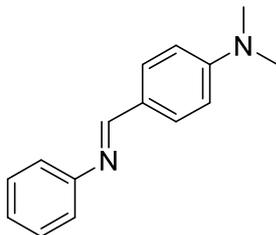
$C_{13}H_{10}N_2O_2$
226.24 g/mol

4-Nitrobenzaldehyd (10.0 g, 66.1 mmol) und Anilin (6.04 mL, 66.1 mmol) wurden in EtOH (40 mL) für 16 h bei RT gerührt. Anschließend wurde der Niederschlag abfiltriert, mit kaltem EtOH (20 mL) gewaschen und als gelber kristalliner Feststoff (11.6 g, 51.3 mmol, 77 %) erhalten.

Smp.: 91-92 °C.

Die gemessenen physikalischen und spektroskopischen Daten stimmen mit den Angaben in der Literatur¹³⁸ überein. Ausbeute laut Literatur 95 %, Smp.:¹⁴¹ 92-93 °C.

N-(4-Dimethylaminobenzyliden)anilin, **4f** (AH329)

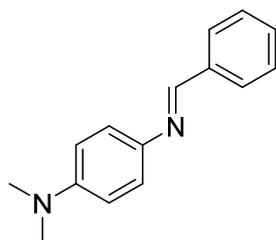


$C_{15}H_{16}N_2$
224.31 g/mol

4-Dimethylaminobenzaldehyd (10.0 g, 67.0 mmol) und Anilin (6.10 mL, 66.8 mmol) wurden in EtOH (30 mL) für 48 h bei RT gerührt. Anschließend wurde der entstandene Niederschlag abfiltriert, mit kaltem EtOH (12 mL) gewaschen, sodass ein gelber kristalliner Feststoff (12.5 g, 55.7 mmol, 83 %) erhalten wurde.

Smp.: 101-102 °C.

Die gemessenen physikalischen und spektroskopischen Daten stimmen mit den Angaben in der Literatur¹⁴² überein. Ausbeute laut Literatur 87 %, Smp.:¹⁴³ 116-117 °C.

N-Benzyliden-(4-Dimethylamino)anilin, **4g** (AH479)

$C_{15}H_{16}N_2$
224.31 g/mol

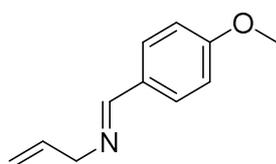
Benzaldehyd (952 μ L, 9.41 mmol) und (4-Dimethylamino)-anilin (1.28 g, 9.40 mmol) wurden in EtOH (10 mL) für 30 min bei RT gerührt. Anschließend wurde der Niederschlag abfiltriert, in Et₂O (40 mL) gelöst und mit H₂O (30 mL) gewaschen. Die organische Phase wurde über Na₂SO₄ getrocknet und *in vacuo* eingeeengt, sodass ein gelber kristalliner Feststoff (1.73 g, 7.71 mmol, 82 %) erhalten wurde.

¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ 8.55 (s, 1H), 7.92-7.90 (m, 2H), 7.48-7.46 (m, 3H), 7.32-7.28 (m, 2H), 6.81-6.77 (m, 2H), 3.01 (s, 6H).

¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz): δ 156.1, 49.7, 141.1, 137.0, 130.6, 128.8, 128.4, 122.4, 113.0, 40.9.

Smp.: 99-100 °C.

Ausbeute laut Literatur¹⁴⁴ 83 %, Smp.:¹⁴³ 100-101 °C.

N-(4-Methoxybenzyliden)-allylamin, **4h** (AH354)

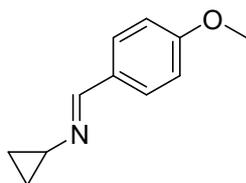
$C_{11}H_{13}NO$
175.23 g/mol

4-Methoxybenzaldehyd (14.5 mL, 118 mmol) und Allylamin (10.8 mL, 143 mmol) wurden in EtOH (10 mL) für 24 h bei RT gerührt. Nachdem das Reaktionsgemisch *in vacuo* eingeeengt wurde, wurde das Rohprodukt in Et₂O (20 mL) gelöst und mit gesättigter NH₄Cl-Lösung (40 mL) gewaschen. Die organische Phase wurde über Na₂SO₄ getrocknet und *in vacuo* vom Lösungsmittel befreit, sodass ein orangenes Öl (19.4 g, 111 mmol, 93 %) erhalten wurde.

¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ 8.21 (s, 1H), 7.71-7.67 (m, 2H), 6.93-6.90 (m, 2H), 6.06 (ddt, $J=5.7, 10.2, 17.1$ Hz, 1H), 5.22 (dq, $J=1.7, 17.1$ Hz, 1H), 5.14 (dq, $J=1.7, 10.2$ Hz, 1H), 4.21 (dq, $J=1.5, 5.6$ Hz, 2H), 3.82 (s, 3H).

¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz): δ 161.7, 161.3, 136.2, 129.7, 129.2, 115.9, 114.0, 63.5, 55.3.

N-(4-Methoxybenzyliden)-cyclopropylamin, **4i** (AHLL03)



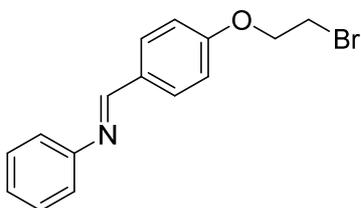
C₁₁H₁₃NO
175.23 g/mol

4-Methoxybenzaldehyd (890 μ L, 7.32 mmol) und Cyclopropylamin (660 μ L, 9.55 mmol) wurden in EtOH (7.5 mL) für 22 h bei RT gerührt. Nachdem das Reaktionsgemisch *in vacuo* eingengt wurde, wurde das Rohprodukt in Et₂O (20 mL) gelöst und mit H₂O (90 mL) gewaschen. Die organische Phase wurde über Na₂SO₄ getrocknet und *in vacuo* vom Lösungsmittel befreit, sodass ein gelbes Öl (1.15 g, 6.56 mmol, 89 %) erhalten wurde.

¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ 8.38 (s, 1H), 7.63-7.60 (m, 2H), 6.91-6.89 (m, 2H), 3.83 (s, 3H), 3.01-2.96 (m, 1H), 0.96-0.92 (m, 2H), 0.90-0.86 (m, 2H).

¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz): δ 161.3, 157.9, 129.7, 129.1, 114.0, 55.4, 41.9, 8.6.

N-(4-(2-Bromoethoxy)benzyliden)anilin, **4j** (AH461)



C₁₅H₁₄BrNO
304.19 g/mol

40 (28.0 g, 122 mmol) und Anilin (11.2 mL, 122 mmol) wurden in EtOH (150 mL) für 24 h bei RT gerührt. Der entstandene Niederschlag wurde abfiltriert und mit kaltem EtOH (20 mL) gewaschen, sodass ein farbloser kristalliner Feststoff (34.7 g, 114 mmol, 94 %) erhalten wurde.

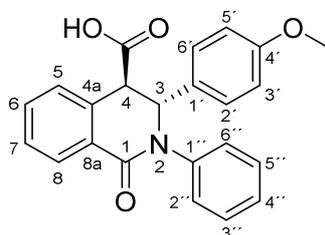
¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ 8.39 (s, 1H), 7.88-7.85 (m, 2H), 7.41-7.37 (m, 2H), 7.22-7.20 (m, 3H), 7.01-6.99 (m, 2H), 4.35 (t, *J*=6.2 Hz, 2H), 3.66 (t, *J*=6.2 Hz, 2H).

¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz): δ 160.7, 159.5, 152.3, 130.7, 130.0, 129.2, 125.7, 120.9, 114.9, 67.9, 28.8.

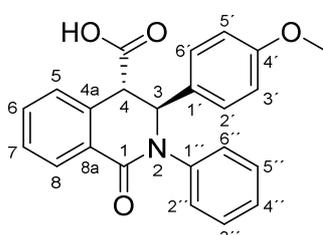
Smp.: 89-90 °C.

9.2.2 Synthesen der Tetrahydroisochinolinon-4-carbonsäure-Derivate

trans-3-(4-Methoxyphenyl)-1-oxo-2-phenyl-1,2,3,4-tetrahydroisochinolin-4-carbonsäure, (\pm) **6a** (AH203)



AH203-A (*R,R*)



AH203-B (*S,S*)

$C_{23}H_{19}NO_4$
373.41 g/mol

Homophthalsäureanhydrid (1.00 g, 6.20 mmol) und Imin **4a** (1.96 g, 9.30 mmol) wurden in konz. HOAc (50 mL) für 15 h bei 140 °C in einem verschließbaren Zentrifugenrohr gerührt.¹⁴⁵ Nachdem HOAc direkt *in vacuo* entfernt wurde, wurde die Rohmischung in EtOH (30 mL) aufgenommen und mit 8 M NaOH-Lösung (2.0 mL) versetzt. Die Mischung wurde 1.5 h bei RT gerührt, dann mit 1 M HCl-Lösung auf pH < 5 gebracht, mit CH₂Cl₂ (30 mL) verdünnt und mit H₂O (20 mL) gewaschen. Die organische Phase wurde abgetrennt, über Na₂SO₄ getrocknet und *in vacuo* von Lösungsmittel befreit. Der erhaltene Feststoff wurde säulenchromatographisch (CHCl₃/EtOH/HCOOH 10/0.3/0.1) gereinigt, sodass das Racemat als ein farbloser Feststoff (1.79 g, 4.79 mmol, 77 %) isoliert wurde. Die Enantiomere **6a-A** (*3R,4R*) und **6a-B** (*3S,4S*) wurden mit Hilfe einer chiralen chromatographischen Methode (Methode **E**) getrennt.

¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ 8.27-8.22 (m, 1H, H₈), 7.49-7.44 (m, 2H), 7.27-7.16 (m, 6H), 7.05-7.01 (m, 2H, H_{2'}, H_{6'}), 6.75-6.72 (m, 2H, H_{3'}, H_{5'}), 5.52 (s, 1H, H₃), 3.97 (d, $J=1.4$ Hz, 1H, H₄), 3.72 (s, 3H, CH₃).

¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz): δ 174.5 (COOH), 163.7 (C₁), 159.4 (C_{4'}), 142.2 (C_{1''}), 132.7, 132.2, 130.9 (C_{1'}), 129.6, 129.5, 129.1, 128.8, 128.6, 127.7 (2C, C_{2'}, C_{6'}), 127.3, 126.9, 114.3 (2C, C_{3'}, C_{5'}), 64.4 (C₃), 55.3 (CH₃), 51.6 (C₄).

IR $\tilde{\nu}$ 1723, 1602, 1510, 1491, 1462, 1247, 1172, 1027, 828, 730, 693, 628 cm⁻¹.

ESI-MS: m/z 374.2 [M+H⁺].

Smp.: 170-171 °C (Racemat).

Reinheit: > 98 % (Methode **C**).

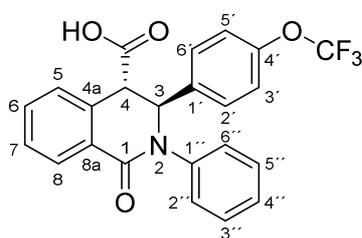
R_f: 0.28 (CHCl₃/EtOH/HCOOH 10/0.3/0.1, DC_{SIL}).

t_R: **6a-A**: 6.21 min; **6a-B**: 7.87 min (Methode **E**).

$[\alpha]_D^{23}$: **6a-A** (*3R,4R*): + 35.3° [mL dm⁻¹ g⁻¹] (5.66·10⁻³ g/mL in CHCl₃).

6a-B (*3S,4S*): - 33.5° [mL dm⁻¹ g⁻¹] (5.67·10⁻³ g/mL in CHCl₃).

trans-3-(4-Trifluoromethoxyphenyl)-1-oxo-2-phenyl-1,2,3,4-tetrahydroisochinolin-4-carbonsäure, (±) **6b** (AH417)



C₂₃H₁₆F₃NO₄
427.38 g/mol

Homophthalsäureanhydrid (896 mg, 5.52 mmol) und Imin **4b** (1.76 g, 6.63 mmol) wurden in konz. HOAc (55 mL) für 4 h bei 120 °C in einem verschließbaren Zentrifugenrohr gerührt.¹⁴⁵ Anschließend wurde die Reaktionsmischung mit 8 M NaOH-Lösung neutralisiert und mit CH₂Cl₂ (300 mL) extrahiert, über Na₂SO₄ getrocknet und *in vacuo* eingeeengt. Das erhaltene Rohprodukt wurde säulenchromatographisch (CHCl₃/EtOH/HCOOH 10/0.3/0.1) gereinigt. Anschließend wurde der isolierte Feststoff erneut in EtOH (15 mL) gelöst und mit 8 M NaOH-Lösung (0.5 mL) versetzt. Die Mischung wurde 20 h bei RT gerührt, dann mit 1 M HCl-Lösung auf pH < 5 gebracht, mit CHCl₃ (120 mL) verdünnt und mit H₂O (100 mL) gewaschen. Die organische Phase wurde abgetrennt, über Na₂SO₄ getrocknet und *in vacuo* von Lösungsmittel befreit, sodass ein farbloser Feststoff (1.53 g, 3.58 mmol, 65 %) erhalten wurden.

¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ 8.23-8.21 (m, 1H, H8), 7.49-7.42 (m, 2H), 7.27-7.06 (m, 10H), 5.60 (s, 1H, H3), 3.94 (d, *J*=1.2 Hz, 1H, H4).

¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz): δ 173.4 (COOH), 163.9 (C1), 148.9 (q, *J*_{CF}=1.5 Hz, C4'), 141.8 (C1''), 137.6 (C1'), 133.0, 129.2, 129.0 (2C), 128.9, 128.6, 128.0, 127.0, 121.2 (2C), 120.4 (q, *J*_{CF}=257.7 Hz, CF₃), 120.3, 64.3 (C3), 51.3 (C4).

IR $\tilde{\nu}$ 1716, 1596, 1508, 1491, 1464, 1249, 1205, 1153, 1017, 692 cm⁻¹.

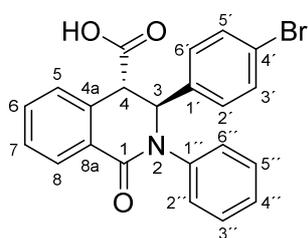
ESI-MS: *m/z* 428.2 [M+H⁺].

Smp.: 94-95 °C.

Reinheit: > 92 % (Methode C).

R_f: 0.27 (CHCl₃/EtOH/HCOOH 10/0.3/0.1, DC_{SIL}).

trans-3-(4-Bromophenyl)-1-oxo-2-phenyl-1,2,3,4-tetrahydroisochinolin-4-carbonsäure, (\pm) **6c**
(AHFG06)



$C_{22}H_{16}BrNO_3$
422.28 g/mol

Homophthalsäureanhydrid (0.50 g, 3.10 mmol) und **4c** (0.80 g, 3.10 mmol) wurden in konz. HOAc (15 mL) in einem verschließbaren Zentrifugenrohr für 3 h bei 120 °C gerührt. Anschließend wurde Essigsäure *in vacuo* entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch ($CH_2Cl_2/EtOH/HCOOH$ 10/0.3/0.1) gereinigt. Das erhaltene gelbliche Produkt wurde erneut in EtOH (10 mL) gelöst und für 2 h mit 8 M NaOH-Lösung (2.0 mL) gerührt. Nachdem die Lösung mit 1 M HCl-Lösung auf pH < 5 gebracht wurde, wurde sie mit CH_2Cl_2 (50 mL) extrahiert, die organische Phase über Na_2SO_4 getrocknet und *in vacuo* eingengt. Das erhaltene Rohprodukt wurde erneut säulenchromatographisch ($CHCl_3/EtOH/HCOOH$ 10/0.3/0.1) gereinigt, sodass ein farbloser Feststoff (727 mg, 1.72 mmol, 55 %) isoliert wurde.

1H NMR ($CDCl_3$, 400 MHz): δ 8.00 (dd, $J=1.4, 7.5$ Hz, 1H, H8), 7.51-7.23 (m, 10 H), 7.19-7.17 (m, 2H, H2', H6'), 5.69 (s, 1H, H3), 4.24 (d, $J=1.4$ Hz, H4).

^{13}C NMR ($CDCl_3$, 100 MHz): δ 171.8 (COOH), 162.4 (C1), 142.1 (C1''), 138.7 (C1'), 133.6, 132.4, 131.4, 129.6, 128.9, 128.8 (2C, C2', C6'), 128.5, 128.1, 127.4 (C8), 126.6, 126.3, 120.7 (C4'), 63.6 (C3), 50.8 (C4).

IR $\tilde{\nu}$ 3287, 2901, 1728, 1600, 1488, 1464, 1400, 1337, 1224, 1170, 1007, 821, 731, 615 cm^{-1} .

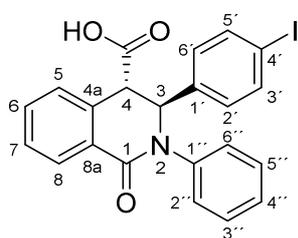
ESI-MS: m/z 422.5 $[M+H^+]$.

Smp.: 236-237 °C.

Reinheit: > 97 % (Methode **C**).

R_f: 0.25 ($CH_2Cl_2/EtOH/HCOOH$ 10/0.3/0.1, DC_{SIL}).

trans-3-(4-Iodophenyl)-1-oxo-2-phenyl-1,2,3,4-tetrahydroisochinolin-4-carbonsäure, (\pm) **6d**
(AH316)



$C_{22}H_{16}INO_3$
469.28 g/mol

Homophthalsäureanhydrid (105 mg, 0.65 mmol) und **4d** (200 mg, 0.65 mmol) wurden in konz. HOAc (5.0 mL) in einem verschließbaren Zentrifugenrohr für 2 h bei 120 °C gerührt. Anschließend wurde Essigsäure *in vacuo* entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch ($CHCl_3/EtOH/HCOOH$ 10/0.3/0.1) gereinigt. Das erhaltene gelbe Öl wurde in EtOH (4.0 mL) gelöst und für 16 h mit 8 M NaOH-Lösung (0.12 mL) gerührt. Nachdem das Gemisch mit 1 M HCl-Lösung auf pH < 5 gebracht wurde, wurde es mit $CHCl_3$ (50 mL) extrahiert, die organische Phase über Na_2SO_4 getrocknet und *in vacuo* eingeeengt, sodass ein farbloser Feststoff (169 mg, 0.36 mmol, 55 %) erhalten wurde.

1H NMR ($CDCl_3$, 400 MHz): δ 8.19-8.17 (m, 1H, H8), 7.53 (d, $J=8.4$ Hz, 2H, H3', H5'), 7.43-7.41 (m, 2H), 7.24-7.13 (m, 6H), 6.85 (d, $J=8.3$ Hz, 2H, H2', H6'), 5.51 (s, 1H, H3), 3.89 (s, 1H, H4).

^{13}C NMR ($CDCl_3$, 100 MHz): δ 173.6 (COOH), 163.9 (C1), 141.9 (C1''), 138.8 (C1'), 138.0 (2C, C3', C5'), 132.9, 132.2, 129.6, 129.2 (2C), 128.9, 128.6 (2C, C2', C6'), 128.4, 127.5, 126.9, 93.8 (C4'), 64.6 (C3), 51.5 (C4).

IR $\tilde{\nu}$ 1724, 1624, 1485, 1391, 1231, 1159, 1003, 732, 693 cm^{-1} .

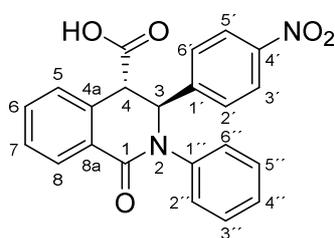
ESI-MS: m/z 470.0 [$M+H^+$].

Smp.: 165-167 °C.

Reinheit: > 94 % (Methode C).

R_f: 0.25 (PE/EtOAc/HCOOH 3/3/0.1, DC_{SiL}).

trans-3-(4-Nitrophenyl)-1-oxo-2-phenyl-1,2,3,4-tetrahydroisochinolin-4-carbonsäure, (\pm) **6e**
(AH423)



$C_{22}H_{16}N_2O_5$
388.38 g/mol

Homophthalsäureanhydrid (200 mg, 1.23 mmol) und **4e** (417 mg, 1.84 mmol) wurden in konz. HOAc (10 mL) für 34 h bei 140 °C in einem verschließbaren Zentrifugenrohr gerührt. Anschließend wurde die Essigsäure *in vacuo* entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch (CHCl₃/EtOH/HCOOH 10/0.3/0.1) gereinigt. Der erhaltene orangene Feststoff wurde in EtOH (10 mL) aufgenommen und für 16 h mit 8 M NaOH-Lösung (0.20 mL) gerührt. Nachdem das Gemisch mit 1 M HCl-Lösung auf pH < 5 gebracht wurde, wurde es mit CH₂Cl₂ (50 mL) extrahiert, die organische Phase über Na₂SO₄ getrocknet und *in vacuo* eingengt, sodass ein orangener Feststoff (338 mg, 0.87 mmol, 70 %) erhalten wurde.

¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ 8.24-8.20 (m, 1H, H8), 8.09-8.08 (m, 2H, H3', H5'), 7.50-7.46 (m, 2H, H6, H7), 7.33-7.31 (m, 2H, H2', H6'), 7.28-7.14 (m, 6H), 5.71 (s, 1H, H3), 3.96 (s, 1H, H4).

¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz): δ 173.3 (COOH), 163.9 (C1), 147.8 (C4'), 146.1 (C1'), 141.5 (C1''), 133.2, 131.6, 129.7, 129.4, 129.2, 128.9, 128.8 (C8), 127.8 (2C, C2', C6'), 127.6, 126.8, 124.2 (2C, C3', C5'), 64.4 (C3), 51.1 (C4).

IR $\tilde{\nu}$ 2914, 1722, 1598, 1517, 1490, 1344, 1229, 1158, 859, 732, 693 cm⁻¹.

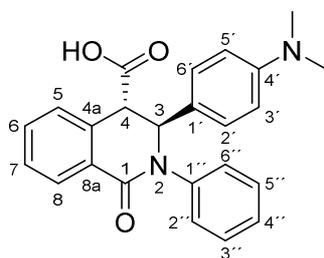
ESI-MS: m/z 389.2 [M+H⁺].

Smp.: 142-144 °C.

Reinheit: > 89 % (Methode **C**).

R_f: 0.43 (CHCl₃/EtOH/HCOOH 10/0.3/0.1, DC_{SIL}).

trans-3-(4-(Dimethylamino)phenyl)-1-oxo-2-phenyl-1,2,3,4-tetrahydroisochinolin-4-carbonsäure, (±) **6f** (AHFG19)



$C_{24}H_{22}N_2O_3$
386.45 g/mol

Homophthalsäureanhydrid (270 mg, 1.64 mmol) und **4f** (500 mg, 2.13 mmol) wurden in [bmim]BF₄ (8.0 mL) gelöst und 24 h bei RT gerührt. Anschließend wurde das dunkelrote Reaktionsgemisch mit Et₂O (140 mL) extrahiert und die etherische Phase *in vacuo* eingeeengt. Das Rohgemisch wurde danach mit H₂O (10 mL) verdünnt, mit 8 M NaOH-Lösung (200 µL) versetzt und 45 min bei RT gerührt. Nachdem die wässrige Lösung mit 1 M HCl-Lösung auf pH < 5 gebracht wurde, wurde sie erneut mit Et₂O (80 mL) extrahiert, die organische Phase über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt. Das erhaltene Rohprodukt wurde mittels präparativer HPLC-Auftrennung (Methode **D**, t_R = 9.5 min) isoliert, sodass ein gelber Feststoff (39.0 mg, 0.10 mmol, 6 %) erhalten wurde.

¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ 8.22-8.20 (m, 1H, H₈), 7.44-7.41 (m, 3H), 7.28-7.15 (m, 5H), 6.96-6.93 (m, 2H, H_{2'}, H_{6'}), 6.55-6.53 (m, 2H, H_{3'}, H_{5'}), 5.47 (s, 1H, H₃), 3.97 (s, 1H, H₄), 2.86 (s, 6H, N(CH₃)₂).

¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz): δ 175.1(COOH), 163.8 (C₁), 150.1 (C_{4'}), 142.4 (C_{1''}), 132.7, 132.5, 129.7, 129.6, 129.1, 128.6 (C₈), 128.5, 127.4 (2C, C_{2'}, C_{6'}), 127.1, 126.9, 126.5 (C_{1'}), 112.6 (2C, C_{3'}, C_{5'}), 64.7 (C₃), 51.9 (C₄), 40.5 (2C, N(CH₃)₂).

IR $\tilde{\nu}$ 3036, 2895, 1697, 1650, 1614, 1524, 1491, 1461, 1406, 1331, 1230, 1162, 1061, 944, 904, 807, 761, 728, 694 cm⁻¹.

ESI-MS: *m/z* 387.2 [M+H⁺].

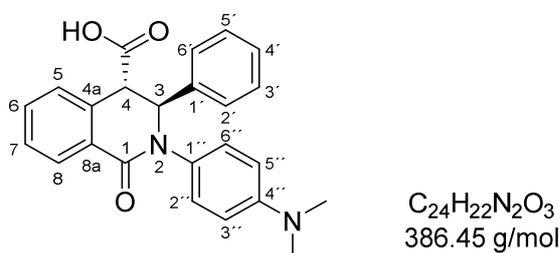
Smp.: 190-192 °C.

Reinheit: > 80 % (Methode **A**).

R_f: 0.33 (CDCl₃/EtOH 10/1, DC_{SIL}).

Experimenteller Part

trans-2-(4-(Dimethylamino)phenyl)-1-oxo-3-phenyl-1,2,3,4-tetrahydroisochinolin-4-carbonsäure, (±) **6g** (AHLL04)



Homophthalsäureanhydrid (270 mg, 1.64 mmol) und **4g** (500 mg, 2.13 mmol) wurden in konz. HOAc (8.2 mL) für 3 h bei 120 °C in einem verschließbaren Zentrifugenrohr erhitzt. Die abgekühlte Reaktionslösung wurde mit H₂O (10 mL) verdünnt, mit 8 M NaOH-Lösung auf neutralen pH-Wert gebracht und mit CHCl₃ (80 mL) extrahiert. Die organische Phase wurde über Na₂SO₄ getrocknet und *in vacuo* eingeeengt, sodass ein Präzipitat entstand. Dieses wurde abfiltriert, sodass ein hell gelber Feststoff (0.20 mg, 0.52 mmol, 32 %) erhalten wurde.

¹H NMR (DMSO-d₆, 400 MHz): δ 8.00-7.97 (m, 1H, H8), 7.47-7.40 (m, 2H), 7.27-7.12 (m, 8H), 6.69-6.67 (m, 2H, H3'', H5''), 5.60 (s, 1H, H3), 4.20 (d, *J*=1.2 Hz, 1H, H4), 2.85 (s, 6H, N(CH₃)₂).

¹³C NMR (DMSO-d₆, 100 MHz): δ 172.1 (COOH), 162.6 (C1), 148.9 (C4'), 139.4 (C1'), 133.7, 132.0, 131.2 (C1''), 129.6, 129.4, 128.5, 127.9, 127.3 (C8), 127.2, 127.0 (2C, C2'', C6''), 126.2, 112.1 (2C, C3'', C5''), 64.7 (C3), 51.1 (C4), 40.1 (2C, N(CH₃)₂).

IR $\tilde{\nu}$ 2913, 1714, 1608, 1573, 1518, 1462, 1352, 1226, 1165, 1063, 905, 808, 722, 670 cm⁻¹.

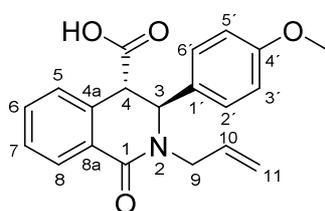
ESI-MS: *m/z* 387.3 [M+H⁺].

Smp.: Zersetzung ab 232 °C

Reinheit: > 90 % (Methode **C**).

R_f: 0.82 (CHCl₃/EtOH/HCOOH 10/0.3/0.1, DC_{SIL}).

trans-2-Allyl-3-(4-methoxyphenyl)-1-oxo-1,2,3,4-tetrahydroisochinolin-4-carbonsäure, (±) **6h**
(AHLLO8)



$C_{20}H_{19}NO_4$
337.38 g/mol

Homophthalsäureanhydrid (710 mg, 4.39 mmol) und **4h** (1.00 g, 5.71 mmol) wurden in konz. HOAc (22 mL) für 5 h bei 120 °C in einem verschließbaren Zentrifugenrohr gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde mit H₂O (20 mL) verdünnt, mit 8 M NaOH-Lösung neutralisiert und mit CHCl₃ (80 mL) extrahiert. Die organische Phase wurde über Na₂SO₄ getrocknet und *in vacuo* eingengt. Das erhaltene Rohprodukt wurde erst säulenchromatographisch (CHCl₃/EtOH/HCOOH 10/0.3/0.1) und danach mittels Umkehrphasen-MPLC (H₂O + 0.1 % HCOOH / CH₃CN + 0.1 % HCOOH 95/5 → 10/90) gereinigt, sodass ein farbloser Feststoff (921 mg, 2.73 mmol, 62 %) isoliert wurde.

¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ 8.21-8.16 (m, 1H, H8), 7.45-7.39 (m, 2H, H6, H7), 7.15-7.11 (m, 1H, H5), 6.96-6.93 (m, 2H, H2', H6'), 6.75-6.72 (m, 2H, H3', H5'), 5.83-5.73 (m, 1H, H10), 5.21-5.12 (m, 3H, H3, H11), 4.84 (ddt, *J*=1.5, 4.9, 14.9 Hz, 1H, H9), 3.91 (d, *J*=1.4 Hz, 1H, H4), 3.72 (s, 3H, OCH₃), 3.40 (dd, *J*=7.9, 14.9 Hz, 1H, H9).

¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz): δ 174.9 (COOH), 163.6 (C1), 159.4 (C4'), 133.0 (C10), 132.3, 131.8, 130.4 (C1'), 129.4 (C5), 129.2, 128.8, 128.3 (H8), 127.6 (2C, C2', C6'), 118.7 (C11), 114.3 (2C, C3', C5'), 59.6 (C3), 55.3 (OCH₃), 51.2 (C4), 48.6 (C9).

IR $\tilde{\nu}$ 2927, 1725, 1617, 1572, 1510, 1470, 1413, 1246, 1173, 1028, 924, 829, 738, 702 cm⁻¹.

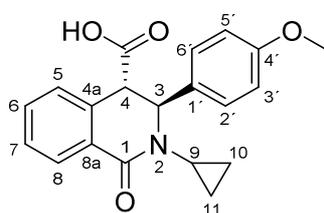
ESI-MS: *m/z* 338.3 [M+H⁺].

Smp.: 69-70 °C.

Reinheit: > 98 % (Methode C).

R_f: 0.57 (CHCl₃/EtOH/HCOOH 10/0.3/0.1, DC_{SIL}).

trans-2-Cyclopropyl-3-(4-methoxyphenyl)-1-oxo-1,2,3,4-tetrahydroisochinolin-4-carbonsäure,
(±) **6i** (AHLLO7)



C₂₀H₁₉NO₄
337.38 g/mol

Homophthalsäureanhydrid (0.71 g, 4.39 mmol) und **4i** (1.00 g, 5.71 mmol) wurden in konz. HOAc (22 mL) für 4 h bei 120 °C in einem verschließbaren Zentrifugenrohr gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde mit H₂O (20 mL) verdünnt, mit 8 M NaOH-Lösung neutralisiert und mit CHCl₃ (80 mL) extrahiert. Die organische Phase wurde über Na₂SO₄ getrocknet und *in vacuo* eingengt. Das erhaltene Rohprodukt wurde säulenchromatographisch (CHCl₃/EtOH/HCOOH 10/0.3/0.1) gereinigt. Das erhaltene gelbe Produkt wurde erneut in CHCl₃ (2.0 mL) gelöst und in Gegenwart von 8 M NaOH-Lösung (2.3 mL) für 22 h bei RT gerührt. Das Gemisch wurde mit 1 M HCl-Lösung auf pH < 5 gebracht, mit CHCl₃ (40 mL) extrahiert, die organische Phase über Na₂SO₄ getrocknet und *in vacuo* von Lösungsmittel befreit. Das so erhaltene Produkt wurde mittels Umkehrphasen-MPLC (H₂O + 0.1 % HCOOH / CH₃CN + 0.1 % HCOOH 95/5 → 10/90) gereinigt, sodass ein farbloser Feststoff (889 mg, 2.64 mmol, 60 %) erhalten wurde.

¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ 8.19-8.15 (m, 1H, H8), 7.42-7.37 (m, 2H, H6, H7), 7.17-7.13 (m, 1H, H5), 7.00-6.96 (m, 2H, H2', H6'), 6.76-6.72 (m, 2H, H3', H5'), 5.28 (s, 1H, H3), 3.91 (d, J=1.4 Hz, 1H, H4), 3.71 (s, 3H, OCH₃), 2.79-2.73 (m, 1H, H9), 0.99-0.90 (m, 1H, H10), 0.84-0.76 (m, 2H, H10, H11), 0.73-0.64 (m, 2H, H11).

¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz): δ 174.8 (COOH), 165.7 (C1), 159.2 (C4'), 132.4, 131.7, 131.0 (C1'), 129.6 (C5), 129.4, 128.6, 128.1 (C8), 127.3 (2C, C2', C6'), 114.3 (2C, C3', C5'), 61.8 (C3), 55.3 (OCH₃), 51.4 (C4), 30.2 (C9), 8.5 (C10), 6.0 (C11).

IR $\tilde{\nu}$ 2929, 1722, 1619, 1510, 1464, 1438, 1246, 1173, 1027, 825, 729, 700, 629, 618 cm⁻¹.

ESI-MS: *m/z* 338.2 [M+H⁺].

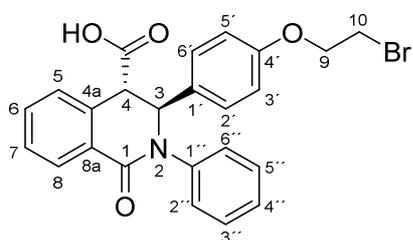
Smp.: 89-91 °C.

Reinheit: > 95 % (Methode C).

R_f: 0.50 (CHCl₃/EtOH/HCOOH 10/0.3/0.1, DC_{SIL}).

Experimenteller Part

trans-3-(4-(2-Bromoethoxy)phenyl)-1-oxo-2-phenyl-1,2,3,4-tetrahydroisochinolin-4-carbonsäure, (±) **6j** (AH463)



$C_{24}H_{20}BrNO_4$
466.33 g/mol

Homophthalsäureanhydrid (443 mg, 2.73 mmol) und **4j** (997 mg, 3.29 mmol) wurden in konz. HOAc (25 mL) für 3 h bei 120 °C in einem verschließbaren Zentrifugenrohr gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch (CHCl₃/EtOH/HCOOH 10/0.3/0.1) gereinigt. Der erhaltene gelbe Feststoff wurde erneut in EtOH (40 mL) gelöst und für 1 h mit 8 M NaOH-Lösung (2.0 mL) gerührt. Nachdem das Gemisch mit 1 M HCl-Lösung auf pH < 5 gebracht wurde, wurde es mit CHCl₃ (120 mL) extrahiert, über Na₂SO₄ getrocknet und *in vacuo* von Lösungsmittel befreit, sodass ein farbloser Feststoff (825 mg, 1.77 mmol, 65 %) erhalten wurde.

¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ 8.25-8.21 (m, 1H, H8), 7.48-7.43 (m, 2H), 7.28-7.23 (m, 4H), 7.22-7.16 (m, 2H), 7.05-7.01 (m, 2H, H2', H6'), 6.76-6.72 (m, 2H, H3', H5'), 5.52 (s, 1H, H3), 4.19 (t, *J*=6.2 Hz, 2H, H9), 3.96 (d, *J*=1.4 Hz, 1H, H4), 3.57 (t, *J*=6.2 Hz, 2H, H10).

¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz): δ 174.4 (COOH), 163.7 (C1), 157.9 (C4'), 142.1 (C1''), 132.7, 132.2, 131.7 (C1'), 129.6 (C8), 129.4, 129.1, 128.9, 128.6, 127.9 (2C, C2', C6'), 127.3, 126.9, 115.0 (2C, C3', C5'), 67.9 (C9), 64.3 (C3), 51.6 (C4), 29.0 (C10).

IR $\tilde{\nu}$ 1724, 1623, 1509, 1411, 1336, 1242, 1172, 1072, 1011, 827, 731, 693, 620 cm⁻¹.

ESI-MS: *m/z* 467.2 [M+H⁺].

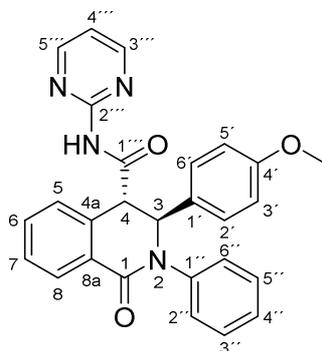
Smp.: 128-129 °C.

Reinheit: > 97 % (Methode **C**).

R_f: 0.42 (CHCl₃/EtOH/HCOOH 10/0.3/0.1, DC_{SIL}).

Experimenteller Part

trans-3-(4-Methoxyphenyl)-1-oxo-2-phenyl-N-(pyrimidin-2-yl)-1,2,3,4-tetrahydroisochinolin-4-carbonsäureamin, (±) **7a** (AH122t)⁵⁷



C₂₇H₂₂N₄O₃
450.50 g/mol

Das Racemat **6a** (256 mg, 0.69 mmol) wurde in abs. CH₃CN (10 mL) unter Argonatmosphäre gelöst und auf 0 °C gekühlt. Nach Zugabe von NEt₃ (127 µL, 0.75 mmol) wurde die Mischung 15 min bei 0 °C gerührt. Anschließend wurde 2,2,2-Trichlor-1,1-dimethylethylformiat (244 mg, 1.02 mmol) hinzugegeben und weitere 25 min gerührt. Nach Zugabe von 2-Aminopyrimidin (130 mg, 1.37 mmol) wurde das Reaktionsgemisch 20 min bei 0 °C und 16 h bei RT gerührt, wobei ein Niederschlag entstand. Dieser wurde abfiltriert und mit kaltem CH₃CN (7 mL) gewaschen, sodass ein farbloser Feststoff (70.0 mg, 0.16 mmol, 23%) erhalten wurde.

¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ 8.61 (d, J=4.8 Hz, 2H, H3'', H5''), 8.37-8.33 (m, 1H, H8), 8.04 (s, 1H, NH), 7.58-7.54 (m, 2H), 7.37-7.26 (m, 5H), 7.22-7.18 (m, 1H), 7.11-7.09 (m, 2H, H2', H6'), 7.04 (t, J=4.8 Hz, 1H, H4''), 6.76-6.72 (m, 2H, H3', H5'), 5.91 (s, 1H, H3), 4.30 (s, 1H, H4), 3.72 (s, 3H, CH₃).

¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz): δ 168.1 (C1'''), 163.1 (C1), 159.2 (C4'), 158.5 (2C, C3''', C5'''), 157.0 (C2'''), 142.0 (C1''), 133.4, 132.4, 131.0 (C1'), 130.5, 129.7 (C8), 129.6, 129.1, 128.9, 127.7 (2C, C2', C6'), 127.1, 127.0, 117.3 (C4''), 114.2 (2C, C3', C5'), 64.6 (C3), 55.3 (CH₃), 54.6 (C4).

IR $\tilde{\nu}$ 1714, 1629, 1576, 1513, 1433, 1411, 1248, 1180, 1033, 723, 598, 632 cm⁻¹.

ESI-MS: *m/z* 451.2 [M+H⁺].

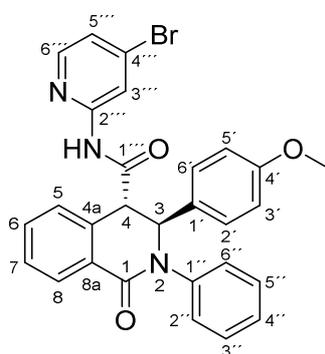
Smp.: 276.9 °C (DSC).

Reinheit: > 99% (Methode C).

R_f: 0.23 (PE/EtOAc 1/1, DC_{SIL}).

Experimenteller Part

trans-*N*-(4-Bromopyridin-2-yl)-3-(4-methoxyphenyl)-1-oxo-2-phenyl-1,2,3,4-tetrahydroisochinolin-4-carbonsäureamid, (\pm) **7b** (AH313)



$C_{28}H_{22}BrN_3O_3$
528.41 g/mol

Das Racemat **6a** (397 mg, 1.06 mmol) wurde in abs. CH_2Cl_2 (30 mL) unter Argonatmosphäre gelöst und auf 0 °C gekühlt. Nach Zugabe von EDC·HCl (430 mg, 2.24 mmol) und HOBt (72.0 mg, 0.53 mmol) wurde die Mischung 20 min bei 0 °C gerührt. Anschließend wurde 2-Amino-4-brompyridin (278 mg, 1.61 mmol) zu dem Reaktionsgemisch hinzugegeben, 15 min bei 0 °C und weitere 24 h bei RT gerührt. Die Lösung wurde *in vacuo* eingeeengt und das Rohprodukt aus CH_2Cl_2 umkristallisiert, sodass ein farbloser kristalliner Feststoff (192 mg, 0.36 mmol, 34 %) erhalten wurde.

1H NMR ($CDCl_3$, 400 MHz): δ 8.54 (d, $J=1.6$ Hz, 1H, H3''), 8.37-8.33 (m, 1H, H8), 8.00 (d, $J=5.3$ Hz, 1H, H6''), 7.82 (s, 1H, NH), 7.60-7.56 (m, 2H), 7.36-7.22 (m, 6H), 7.21 (dd, $J=1.7$, 5.3 zHz, 1H, H5''), 7.09-7.06 (m, 2H, H2', H6'), 6.76-6.72 (m, 2H, H3', H5'), 5.92 (d, $J=1.5$ Hz, 1H, H3), 4.03 (d, $J=1.7$ Hz, 1H, H4), 3.71 (s, 3H, OCH_3).

^{13}C NMR ($CDCl_3$, 100 MHz): δ 168.6 (C1''), 163.0 (C1), 159.3 (C4'), 151.3 (C2''), 148.5 (C6''), 141.9 (C1'), 134.7 (C4''), 133.6, 132.1, 130.9 (C1'), 130.2, 129.9, 129.8, 129.2 (C5''), 129.0, 127.7 (2C, C2', C6'), 127.2, 126.8, 123.9, 117.2 (C3''), 114.3 (2C, C3', C5'), 64.7 (C3), 55.3 (OCH_3), 54.9 (C4).

IR $\tilde{\nu}$ 2923, 1697, 1635, 1562, 1511, 1391, 1245, 1157, 1031, 817, 682 cm^{-1} .

ESI-MS: m/z 528.4 [$M+H^+$].

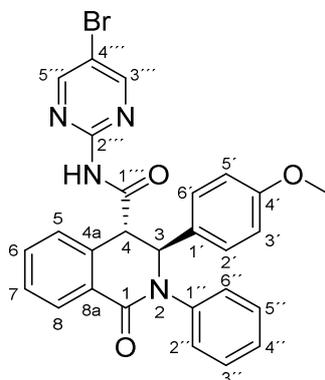
Smp.: 281-282 °C.

Reinheit: > 96 % (Methode **C**).

R_f: 0.33 (PE/EtOAc/HCOOH 3/3/0.1, DC_{SIL}).

Experimenteller Part

trans-*N*-(5-Bromopyrimidin-2-yl)-3-(4-methoxyphenyl)-1-oxo-2-phenyl-1,2,3,4-tetrahydroisochinolin-4-carbonsäureamid, (\pm) **7c** (AH448)



$C_{27}H_{21}BrN_4O_3$
529.39 g/mol

Das Racemat **6a** (150 mg, 0.40 mmol) wurde in abs. CH_3CN (4.0 mL) unter Argonatmosphäre gelöst und auf 0 °C gekühlt. Anschließend wurden DIPEA (68.0 μ L, 0.40 mmol) und 2,2,2-Trichlor-1,1-dimethylethylformiat (144 mg, 0.60 mmol) hinzugegeben und weitere 30 min bei 0 °C gerührt. Nach Zugabe von 2-Amino-4-brompyrimidin (137 mg, 0.80 mmol) wurde das Gemisch 2 d bei RT gerührt. Danach wurde die Reaktionslösung *in vacuo* eingeeengt und das erhaltene Rohprodukt mittels MPLC (PE/EtOAc 4/1 \rightarrow 1/2) gereinigt, sodass ein farbloser Feststoff (92.0 mg, 0.17 mmol, 43 %) isoliert wurde.

1H NMR ($CDCl_3$, 400 MHz): δ 8.61 (s, 2H, H3'', H5''), 8.38-8.34 (m, 1H, H8), 7.96 (s, 1H, NH), 7.60-7.56 (m, 2H), 7.36-7.27 (m, 5H), 7.23-7.19 (m, 1H), 7.10-7.07 (m, 2H, H2', H6'), 6.76-6.72 (m, 2H, H3', H5'), 5.90 (s, 1H, H3), 4.22 (s, 1H, H4), 3.72 (s, 3H, OCH_3).

^{13}C NMR ($CDCl_3$, 100 MHz): δ 167.8 (C1''), 163.0 (C1), 159.3 (C4'), 159.0 (2C, C3'', C5''), 155.3 (C2''), 141.8 (C1'), 133.5, 132.2, 130.8 (C1'), 130.4, 129.8 (2C), 129.1, 128.9, 127.7 (2C, C2', C6'), 127.2, 127.0, 114.6 (C4''), 114.2 (2C, C3', C5'), 64.6 (C3), 55.3 (OCH_3), 54.8 (C4).

IR $\tilde{\nu}$ 3243, 1716, 1633, 1576, 1495, 1412, 1334, 1252, 1140, 1112, 1024, 724, 697 cm^{-1} .

ESI-MS: m/z 529.7 [$M+H^+$].

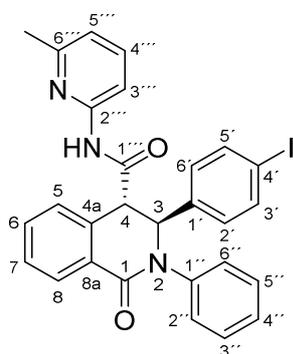
Smp.: 248-250 °C.

Reinheit: > 98 % (Methode **C**).

R_f: 0.16 (PE/EtOAc 1/1, DC_{SIL}).

Experimenteller Part

trans-3-(4-Iodophenyl)-*N*-(6-methylpyridin-2-yl)-1-oxo-2-phenyl-1,2,3,4-tetrahydroisochinolin-4-carbonsäureamid, (\pm) **7d** (AHLL13)



$C_{28}H_{22}IN_3O_2$
559.41 g/mol

Isochinolinonsäure **6d** (660 mg, 1.40 mmol) wurde in abs. CH_3CN (7.0 mL) unter Argonatmosphäre gelöst und auf 0 °C gekühlt. Anschließend wurde DIPEA (240 μ L, 1.41 mmol) und 2,2,2-Trichlor-1,1-dimethylethylformiat (670 mg, 2.80 mmol) hinzugegeben und weitere 30 min bei 0 °C gerührt. Nach Zugabe von 2-Amino-6-methylpyridin (300 mg, 2.80 mmol) wurde die Reaktionsmischung 6 h bei RT gerührt. Der entstandene Niederschlag wurde abfiltriert und mit kaltem CH_3CN (10 mL) gewaschen, sodass ein farbloser Feststoff (340 mg, 0.61 mmol, 44 %) erhalten wurde.

1H NMR ($CDCl_3$, 400 MHz): δ 8.35-8.32 (m, 1H, H8), 8.07 (d, $J=8.2$ Hz, 1H, H3''), 7.64-7.54 (m, 5H), 7.35-7.30 (m, 5H), 7.24-7.21 (m, 1H), 6.97-6.94 (m, 2H, H2', H6'), 6.91 (d, $J=7.5$ Hz, 1H, H5''), 5.93 (s, 1H, H3), 4.01 (d, $J=1.5$ Hz, 1H, H4), 2.38 (s, 3H, CH_3).

^{13}C NMR ($CDCl_3$, 100 MHz): δ 168.1 (C1'''), 163.1 (C1), 156.5 (C6'''), 150.0 (C2'''), 141.9 (C1''), 139.0 (C1'), 138.0 (2C, C3', C5'), 133.7 (C4'''), 131.7, 130.0, 129.9 (C8), 129.6, 129.3 (2C), 129.1, 128.4 (2C, C2', C6'), 126.6, 126.6, 120.1 (C5'''), 111.1 (C3'''), 93.5 (C4'), 64.8 (C3), 54.5 (C4), 23.6 (CH_3).

IR $\tilde{\nu}$ 3198, 1687, 1640, 1575, 1538, 1449, 1426, 1391, 1300, 1232, 1173, 1070, 1004, 789, 734, 720, 690 cm^{-1} .

ESI-MS: m/z 560.0 [$M+H^+$].

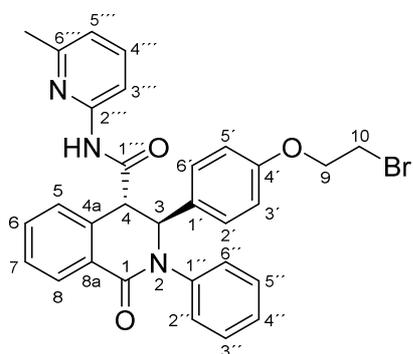
Smp.: Zersetzung ab 280 °C.

Reinheit: > 84 % (Methode **A**).

R_f: 0.30 (PE/EtOAc/HCOOH 3/3/0.1, DC_{SIL}).

Experimenteller Part

trans-3-(4-(2-Bromoethoxy)phenyl)-*N*-(6-methylpyridin-2-yl)-1-oxo-2-phenyl-1,2,3,4-tetrahydroisochinolin-4-carbonsäureamid, (\pm) **7e** (AH468)



$C_{30}H_{26}BrN_3O_3$
556.46 g/mol

Isochinolinonsäure **6j** (420 mg, 0.90 mmol) wurde in abs. CH_3CN (5.0 mL) unter Argonatmosphäre gelöst und auf 0 °C gekühlt. Anschließend wurden DIPEA (153 μ L, 0.90 mmol) und 2,2,2-Trichlor-1,1-dimethylethylformiat (433 mg, 1.80 mmol) hinzugegeben und 20 min bei 0 °C gerührt. Nach Zugabe von 2-Amino-6-methylpyridin (194 mg, 1.80 mmol) wurde das Gemisch 24 h bei RT gerührt. Der entstandene Niederschlag wurde abfiltriert und mit kaltem CH_3CN (20 mL) gewaschen, sodass ein farbloser Feststoff (289 mg, 0.52 mmol, 58 %) erhalten wurde.

1H NMR (DMSO- d_6 , 400 MHz): δ 11.0 (s, 1H, NH), 8.04-8.02 (m, 1H, H8), 7.87 (d, $J=8.2$ Hz, 1H, H3''), 7.66 (t, $J=7.8$ Hz, 1H, H4''), 7.50-7.19 (m, 10H), 6.98 (d, $J=7.4$ Hz, 1H, H5''), 6.87-6.85 (m, 2H, H3', H5'), 5.51 (s, 1H, H3), 4.46 (s, 1H, H4), 4.24 (t, $J=5.4$ Hz, 2H, H9), 3.74 (t, $J=5.4$ Hz, 2H, H10), 2.42 (s, 3H, CH_3).

^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 100 MHz): δ 169.8 (C1'''), 162.7 (C1), 157.1 (C4'), 156.6 (C6'''), 151.1 (C2'''), 142.7 (C1'), 138.6 (C4''), 134.2, 132.3 (2C), 130.1, 128.7, 128.2, 128.0, 127.6 (C8), 127.5, 126.3, 118.9 (C5'''), 114.4 (2C, C3', C5'), 110.5 (C3'''), 67.6 (C9), 64.2 (C3), 51.4 (C4), 31.4 (C10), 23.5 (CH_3).

IR $\tilde{\nu}$ 1688, 1637, 1580, 1509, 1454, 1248, 1172, 1153, 1072, 1010, 835, 787, 700 cm^{-1} .

ESI-MS: kann wegen schlechter Löslichkeit in gängigen Lösungsmitteln nicht ermittelt werden.

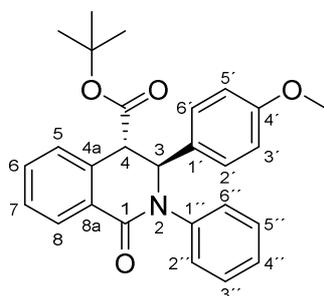
Smp.: 263-264 °C.

Reinheit: > 90 % (Methode **A**).

R_f: 0.48 (EtOAc/ $CHCl_3$ 1/1, DC_{SIL}).

Experimenteller Part

trans-3-(4-Methoxyphenyl)-1-oxo-2-phenyl-1,2,3,4-tetrahydroisochinolin-4-carbonsäure-tert-butylester, (\pm) **8** (AHLLM03)



$C_{27}H_{27}NO_4$
429.52 g/mol

Das Racemat **6a** (2.50 g, 6.70 mmol) wurde in abs. THF (70 mL) gelöst und mit Di-*tert*-butyldicarbonat (1.38 mL, 6.00 mmol) und 4-(Dimethylamino)-pyridin (81.5 mg, 0.67 mmol) versetzt. Die Reaktionsmischung wurde für 24 h bei RT gerührt. Anschließend wurde diese mit H₂O (100 mL) versetzt und für 2 h bei RT weiter gerührt. Die Lösung wurde mit CHCl₃ (190 mL) extrahiert, die abgetrennte organische Phase zusätzlich mit H₂O (240 mL) gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet und *in vacuo* eingeeengt. Das erhaltene Rohprodukt wurde mittels MPLC (PE/EtOAc 1/0 → 0/1) gereinigt, sodass ein farbloser Feststoff (1.59 g, 3.70 mmol, 55 %) erhalten wurde.

¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ 8.25-8.21 (m, 1H, H₈), 7.45-7.41 (m, 2H, H₆, H₇), 7.33-7.32 (m, 4H), 7.24-7.19 (m, 1H), 7.17-7.15 (m, 1H, H₅), 7.08-7.05 (m, 2H, H_{2'}, H_{6'}), 6.75-6.71 (m, 2H, H_{3'}, H_{5'}), 5.54 (d, $J=1.4$ Hz, 1H, H₃), 3.89 (d, $J=1.7$ Hz, 1H, H₄), 3.71 (s, 3H, OCH₃), 1.38 (s, 9H, CO₂C(CH₃)₃).

¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz): δ 169.9 (CO₂C(CH₃)₃), 163.5 (C₁), 159.2 (C_{4'}), 142.6 (C_{1''}), 133.4, 132.3, 131.6 (C_{1'}), 129.6, 129.4, 129.0, 128.4 (C₈), 128.3, 127.7 (2C, C_{2'}, C_{6'}), 126.9, 126.6, 114.2 (2C, C_{3'}, C_{5'}), 82.5 (CO₂C(CH₃)₃), 64.7 (C₄), 55.3 (OCH₃), 53.2 (C₃), 28.0 (CO₂C(CH₃)₃).

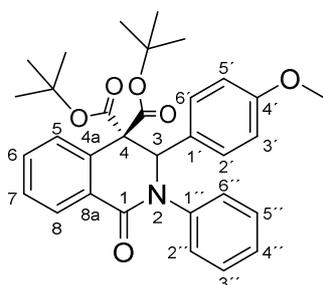
IR $\tilde{\nu}$ 2975, 1730, 1661, 1510, 1399, 1300, 1244, 1139, 1028, 826 cm⁻¹.

ESI-MS: m/z 430.1 [M+H⁺].

Smp.: 148-149 °C.

R_f: 0.54 (PE/EtOAc 2/1, DC_{SIL}).

3-(4-Methoxyphenyl)-1-oxo-2-phenyl-2,3-dihydroisochinolin-4,4-bis(carbonsäure-tert-butylester), **9** (AHLLM03.2)



C₃₂H₃₅NO₆
529.63 g/mol

Das Racemat **6a** (1.40 g, 3.75 mmol) wurde unter Argonatmosphäre in abs. THF (40 mL) gelöst und mit Di-*tert*-butyldicarbonat (1.21 mL, 5.26 mmol) und 4-(Dimethylamino)-pyridin (275 mg, 2.25 mmol) versetzt. Die Reaktionsmischung wurde für 5.5 h bei RT gerührt. Nachdem das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt wurde, wurde das Rohprodukt mittels Umkehrphasen-MPLC (H₂O/CH₃CN 5/95 → 0/100) gereinigt, sodass ein farbloser Feststoff (926 mg, 1.75 mmol, 47 %) isoliert wurde.

¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ 8.30-8.27 (m, 1H, H8), 7.83-7.81 (m, 1H, H5), 7.59 (td, *J*=1.6, 7.7 Hz, 1H, H6), 7.51 (td, *J*=1.3, 7.6 Hz, 1H, H7), 7.35-7.31 (m, 2Hk), 7.29-7.26 (m, 1H), 7.25-7.21 (m, 2H), 6.90-6.86 (m, 2H, H2', H6'), 6.66-6.63 (m, 2H, H3', H5'), 5.49 (s, 1H, H3), 3.71 (s, 3H, OCH₃), 1.38 (s, 9H, CO₂C(CH₃)₃), 1.28 (s, 9H, CO₂C(CH₃)₃).

¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz): δ 167.2 (CO₂C(CH₃)₃), 165.9 (C1), 161.9 (CO₂C(CH₃)₃), 159.9 (C4'), 142.1 (C1''), 133.1, 131.8 (C6), 131.4 (C5), 130.1 (2C, C2', C6'), 129.2 (C1'), 129.1, 129.0, 128.5 (C7), 128.3 (C8), 128.1, 127.5, 113.7 (2C, C3', C5'), 83.3 (CO₂C(CH₃)₃), 82.8 (CO₂C(CH₃)₃), 67.0 (C3), 63.0 (C4), 55.2 (OCH₃), 27.7 (6C, CO₂C(CH₃)₃).

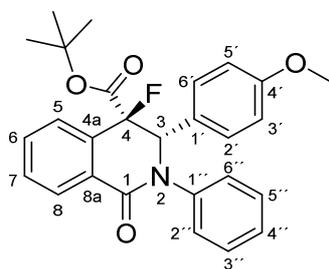
IR $\tilde{\nu}$ 2977, 1730, 1655, 1512, 1457, 1368, 1243, 1135, 1029 cm⁻¹.

ESI-MS: *m/z* 530.1 [M+H⁺].

Smp.: 86-87 °C.

R_f: 0.57 (PE/EtOAc 2/1, DC_{SIL}).

cis-4-Fluor-3-(4-methoxyphenyl)-1-oxo-2-phenyl-1,2,3,4-tetrahydroisochinolin-4-carbonsäure-tert-butylester, (\pm) **10** (AHLLM04)



$C_{27}H_{26}FNO_4$
447.51 g/mol

Die Substanz **8** (500 mg, 1.16 mmol) wurde unter Inertatmosphäre in abs. THF (38 mL) gelöst und auf $-72\text{ }^{\circ}\text{C}$ gekühlt. Nach der Zugabe von 1 M Lithium-bis(trimethylsilyl)amid-Lösung (1.39 mL, 1.39 mmol) wurde das Gemisch 1 h bei $-72\text{ }^{\circ}\text{C}$ gerührt und anschließend mit *N*-Fluorobenzensulfonimid (511 mg, 1.62 mmol) versetzt, sodass die Lösung weitere 30 min unter Kühlung und 42 h bei RT rühren konnte. Die Reaktionslösung wurde mit H_2O (10 mL) gequenchet und mit CHCl_3 (75 mL) extrahiert. Die organische Phase wurde zusätzlich mit H_2O (120 mL) gewaschen, über Na_2SO_4 getrocknet und *in vacuo* eingeeengt. Das Rohprodukt wurde mittels MPLC (PE/EtOAc 1/0 \rightarrow 0/1) gereinigt, sodass ein farbloser Feststoff (320 mg, 0.72 mmol, 62 %) isoliert wurde.

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz): δ 8.41-8.39 (m, 1H, H8), 7.69-7.60 (m, 2H, H6, H7), 7.51-7.48 (m, 1H, H5), 7.34-7.29 (m, 2H), 7.27-7.23 (m, 1H), 7.11-7.07 (m, 2H), 6.92-6.88 (m, 2H, H2', H6'), 6.72-6.68 (m, 2H, H3', H5'), 5.21 (d, $J=15.7\text{ Hz}$, 1H, H3), 3.73 (s, 3H, OCH_3), 1.26 (s, 9H, $\text{CO}_2\text{C}(\text{CH}_3)_3$).

$^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3 , 100 MHz): δ 165.8 (d, $J_{\text{CF}}=26.8\text{ Hz}$, $\text{CO}_2\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 162.0 (d, $J_{\text{CF}}=1.3\text{ Hz}$, C1), 160.1 (C4'), 141.3 (C1''), 132.6 (d, $J_{\text{CF}}=2.9\text{ Hz}$, C6), 132.3, 130.9 (d, $J_{\text{CF}}=3.9\text{ Hz}$, C7), 130.3 (d, $J_{\text{CF}}=3.2\text{ Hz}$, C8a), 130.1 (2C, C2', C6'), 129.3, 129.2 (d, $J_{\text{CF}}=2.7\text{ Hz}$, C8), 128.4 (d, $J_{\text{CF}}=3.5\text{ Hz}$, C5), 127.8, 127.7, 126.9 (d, $J_{\text{CF}}=8.9\text{ Hz}$, C1'), 114.1 (2C, C3', C5'), 92.5 (d, $J_{\text{CF}}=189.9\text{ Hz}$, C4), 84.4 ($\text{CO}_2\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 70.9 (d, $J_{\text{CF}}=28.3\text{ Hz}$, C3), 55.3 (OCH_3), 27.8 ($\text{CO}_2\text{C}(\text{CH}_3)_3$).

$^{19}\text{F NMR}$ (CDCl_3 , 188 MHz): δ -123.4 (CF).

IR $\tilde{\nu}$ 2929, 1737, 1664, 1513, 1458, 1416, 1306, 1250, 1156, 1031 cm^{-1} .

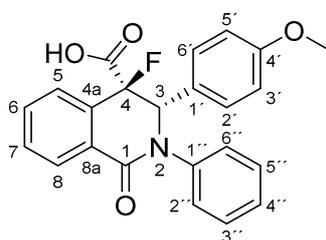
ESI-MS: m/z 448.1 [$\text{M}+\text{H}^+$].

Smp.: 179-180 $^{\circ}\text{C}$.

R_f: 0.50 (PE/EtOAc 2/1, DC_{SIL}).

Experimenteller Part

cis-4-Fluor-3-(4-methoxyphenyl)-1-oxo-2-phenyl-1,2,3,4-tetrahydroisochinolin-4-carbonsäure, (\pm) **11** (AHLLM10)



$C_{23}H_{18}FNO_4$
391.40 g/mol

Die Substanz **10** (68.5 mg, 0.14 mmol) wurde in CH_3CN (1.2 mL) gelöst und mit H_3PO_4 (85 % w/w, 86.5 μL , 1.28 mmol) versetzt. Die Reaktionslösung wurde 3 h bei RT, 1 h bei 40 °C und 4 d bei 50 °C gerührt und anschließend mit $CHCl_3$ (40 mL) extrahiert. Die vereinten organischen Phasen wurden über Na_2SO_4 getrocknet, *in vacuo* eingeeengt und mittels MPLC (EtOAc \rightarrow EtOAc + 0.1 % HCOOH) isoliert, sodass ein farbloser Feststoff (21.3 mg, 54.0 mmol, 36 %) erhalten wurde.

1H NMR (DMSO- d_6 , 400 MHz): δ 8.22-8.17 (m, 1H, H8), 7.75-7.70 (m, 2H, H6, H7), 7.59-7.55 (m, 1H, H5), 7.34-7.31 (m, 2H), 7.24-7.20 (m, 1H), 7.13-7.10 (m, 2H), 7.00-6.69 (m, 2H, H2', H6'), 6.77-6.74 (m, 2H, H3', H5'), 5.53 (d, $J=14.0$ Hz, 1H, H3), 3.66 (s, 3H, OCH₃).

^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 100 MHz): δ 167.6 (d, $J_{CF}=26.6$ Hz, COOH), 161.6 (C1), 159.2 (C4'), 140.8 (C1''), 132.9 (d, $J_{CF}=1.5$ Hz, C7), 132.5 (d, $J_{CF}=19.3$ Hz, C4a), 130.7 (d, $J_{CF}=3.0$ Hz, C6), 129.7, 129.2 (d, $J_{CF}=3.6$ Hz, C8a), 128.8, 128.3 (C8), 127.5, 127.4 (C5), 127.0, 125.9 (d, $J_{CF}=6.6$ Hz, C1'), 113.7 (2C, C3', C5'), 92.6 (d, $J_{CF}=188.0$ Hz, C4), 68.7 (d, $J_{CF}=28.1$ Hz, C3), 55.0 (OCH₃).

^{19}F NMR (CD₃OD, 188 MHz): δ -130.0 (CF).

IR $\tilde{\nu}$ 2834, 2594, 1737, 1617, 1511, 1464, 1281, 1219, 1036 cm^{-1} .

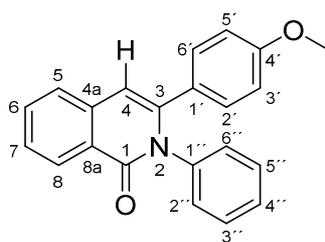
ESI-MS: m/z 392.0 [M+H⁺].

Smp.: 188-189 °C.

Reinheit: > 93 % (Methode **A**).

R_f: 0.12 (PE/EtOAc + 0.1 % HCOOH 2/1, DC_{SIL}).

3-(4-Methoxyphenyl)-2-phenylisoquinolin-1(2H)-one, **12** (AHL10.2)



$C_{22}H_{17}NO_2$
327.38 g/mol

Die Versuchsdurchführung entspricht der Vorschrift zur Synthese von **11**, da **12** als ein Nebenprodukt isoliert wurde.

12 wurde als ein farbloser Feststoff (37.7 mg, 113 μ mol, 69 %) isoliert.

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz): δ 8.59-8.56 (m, 1H, H8), 7.67-7.48 (m, 7H), 7.45-7.40 (m, 1H), 7.39-7.35 (m, 2H, H2', H6'), 7.15 (s, 1H, H4), 7.02-6.99 (m, 2H, H3', H5'), 3.87 (s, 3H, OCH_3).

$^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3 , 100 MHz): δ 161.7 (C1), 159.4 (C4'), 141.5 (C1''), 136.9 (C4a), 132.6 (C6), 131.2 (2C, C2', C6'), 131.0 (C4), 129.4 (2C), 128.8 (C8), 128.5 (C1'), 128.2, 127.3 (C7), 127.0 (2C), 126.5, 125.0 (C5), 119.4 (C3), 114.2 (2C, C3', C5'), 55.5 (OCH_3).

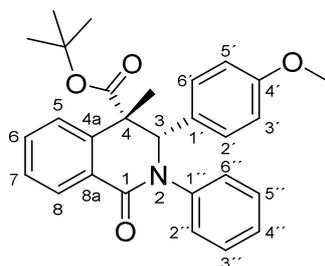
IR $\tilde{\nu}$ 2915, 1654, 1509, 1239, 1174, 1028, 769, 693 cm^{-1} .

ESI-MS: m/z 328.2 [$\text{M}+\text{H}^+$].

Smp.: 63-64 $^\circ\text{C}$.

R_f: 0.56 (PE/EtOAc 2/1, DC_{SIL}).

cis-3-(4-Methoxyphenyl)-4-methyl-1-oxo-2-phenyl-1,2,3,4-tetrahydroisochinolin-4-carbonsäure-tert-butylester, (\pm) **13** (AHL10.8)



$C_{28}H_{29}NO_4$
443.54 g/mol

Die Substanz **8** (250 mg, 0.58 mmol) unter Inertgas in abs. THF gelöst und auf -72 $^\circ\text{C}$ gekühlt. Nach der Zugabe von 1 M Lithium-bis(trimethylsilyl)amid-Lösung (0.70 mL, 0.70 mmol) wurde die Lösung weitere 30 min unter Kühlung gerührt und anschließend mit CH_3I (58.2 μL , 0.93 mmol) versetzt. Nachdem die Lösung 22 h bei RT rührte, wurde sie mit 25 %iger NH_3 -Lösung (10 mL) und H_2O (30 mL) gequenchet. Danach wurde das Reaktionsgemisch mit CHCl_3 (75 mL) extrahiert, die organische Phase über Na_2SO_4 getrocknet und *in vacuo* eingengt. Das Rohprodukt (206 mg) wurde ohne weitere Aufreinigung umgesetzt.

Experimenteller Part

¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ 8.30-8.28 (m, 1H, H8), 7.59-7.52 (m, 2H, H6, H7), 7.47-7.43 (m, 1H, H5), 7.35-7.30 (m, 2H), 7.28-7.24 (m, 1H), 7.06-7.03 (m, 2H), 6.90-6.86 (m, 2H), 6.67-6.63 (m, 2H), 4.77 (s, 1H, H3), 3.72 (s, 3H, OCH₃), 1.94 (s, 3H, CH₃), 1.18 (s, 9H, CO₂C(CH₃)₃).

¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz): δ 171.1 (C=O), 162.9 (C1), 159.7 (C4'), 142.3 (C1''), 140.7, 132.3, 130.5 (C1'), 129.9 (2C, C2', C6'), 129.3, 128.9, 128.5, 128.3, 127.6, 127.5, 127.4, 113.7 (2C, C3', C5'), 82.2 (CO₂C(CH₃)₃), 72.6 (C3), 55.3 (OCH₃), 52.6 (C4), 29.7 (CH₃), 27.8 (CO₂C(CH₃)₃).

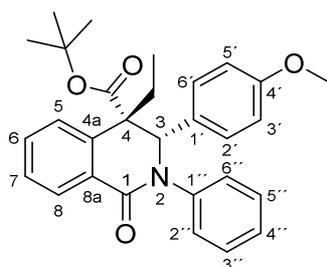
IR $\tilde{\nu}$ 2930, 1731, 1654, 1509, 1456, 1414, 1243, 1177, 1030, 694 cm⁻¹.

ESI-MS: *m/z* 444.1 [M+H⁺].

Smp.: 137-138 °C.

R_f: 0.56 (PE/EtOAc 2/1, DC_{SIL}).

cis-3-4-Ethyl-(4-methoxyphenyl)-1-oxo-2-phenyl-1,2,3,4-tetrahydroisochinolin-4-carbonsäure-tert-butylester, (±) **14** (AHL12)



C₂₉H₃₁NO₄
457.57 g/mol

Die Substanz **8** (500 mg, 1.16 mmol) wurde unter Inertgas in abs. THF (12 mL) gelöst und auf -72 °C gekühlt. Nach der Zugabe von 1 M Lithium-bis(trimethylsilyl)amid-Lösung (1.40 mL, 1.40 mmol) wurde die Reaktionslösung weitere 30 min unter Kühlung gerührt und dann mit CH₃CH₂I (149 µL, 1.86 mmol) tropfenweise versetzt. Nach einer Gesamtreaktionszeit von 24 h bei RT wurde das Gemisch erst mit H₂O (25 mL) gequenchet und anschließend mit CHCl₃ (75 mL) extrahiert. Die organische Phase wurde über Na₂SO₄ getrocknet und *in vacuo* eingengt. Das erhaltene Rohprodukt wurde mittels MPLC (PE/EtOAc 1/0 → 0/1) gereinigt, sodass ein farbloser Feststoff (180 mg, 0.39 mmol, 34 %) erhalten wurde.

¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ 8.30 (dd, *J*=1.4, 7.7 Hz, 1H, H8) 7.79 (dd, *J*=0.9, 7.9 Hz, 1H, H5), 7.54 (dt, *J*=1.6, 7.7 Hz, 1H, H6), 7.47 (dt, *J*=1.3, 7.5 Hz, 1H, H7), 7.36-7.32 (m, 2H), 7.29-7.25 (m, 1H), 7.07-7.04 (m, 2H), 6.86-6.83 (m, 2H, H2', H6'), 6.65-6.61 (m, 2H, H3', H5'), 4.81 (s, 1H, H3), 3.71 (s, 3H, OCH₃), 2.55-2.47 (m, 1H, CH₂CH₃), 2.37-2.28 (m, 1H, CH₂CH₃), 1.24 (s, 9H, CO₂C(CH₃)₃), 0.88 (t, *J*=7.4 Hz, 3H, CH₂CH₃).

¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz): δ 170.1 (C=O), 162.8 (C1), 159.7 (C4'), 142.3 (C1''), 137.6, 131.2, 130.3, 130.2, 129.9 (2C, C2', C6'), 129.3, 129.0, 128.9, 127.5 (2C), 127.4, 113.6

Experimenteller Part

(2C, C3', C5'), 82.1 (CO₂C(CH₃)₃), 72.8 (C3), 56.7 (C4), 55.3 (OCH₃), 34.7 (CH₂CH₃), 27.8 (CO₂C(CH₃)₃), 9.5 (CH₂CH₃).

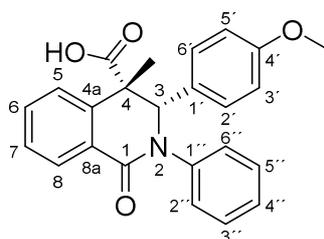
IR $\tilde{\nu}$ 2973, 2935, 1731, 1653, 1511, 1459, 1415, 1245, 1151 cm⁻¹.

ESI-MS: m/z 458.1 [M+H⁺].

Smp.: 174-175 °C.

R_f: 0.60 (PE/EtOAc 2/1, DC_{SIL}).

cis-3-(4-Methoxyphenyl)-4-methyl-1-oxo-2-phenyl-1,2,3,4-tetrahydroisochinolin-4-carbonsäure, (±) **15** (AHL11)



C₂₄H₂₁NO₄
387.44 g/mol

Die Substanz **13** (206 mg) wurde in CH₂Cl₂ (3.0 mL) in einem verschließbaren Zentrifugenrohr gelöst und nach Zugabe von H₃PO₄ (85 % w/w, 265 μ L, 2.30 mmol) wurde das Reaktionsgemisch 4 d bei 50 °C gerührt. Danach wurde die Lösung mit H₂O (20 mL) verdünnt und mit CHCl₃ (60 mL) extrahiert. Die organische Phase wurde über Na₂SO₄ getrocknet und *in vacuo* eingengt. Das Rohprodukt wurde mittels MPLC (PE/EtOAc + 0.1 % HCOOH 1/0 \rightarrow 0/1) gereinigt, sodass ein farbloser Feststoff (69.0 mg, 0.18 mmol, 31 % über zwei Reaktionsstufen) isoliert wurde.

¹H NMR (DMSO-d₆, 400 MHz): δ 12.94 (s, 1H, COOH), 8.11-8.09 (m, 1H, H8), 7.64-7.62 (m, 1H, H5), 7.60-7.56 (m, 1H, H6), 7.50-7.46 (m, 1H, H7), 7.36-7.32 (m, 2H), 7.26-7.22 (m, 1H), 7.13-7.11 (m, 2H), 6.92-6.89 (m, 2H, H2', H6'), 6.75-6.71 (m, 2H, H3', H5'), 4.98 (s, 1H, H3), 3.65 (s, 3H, OCH₃), 1.85 (s, 3H, CH₃).

¹³C NMR (DMSO-d₆, 100 MHz): δ 172.7 (COOH), 162.0 (C1), 158.8 (C4'), 142.0 (C1''), 140.1 (C4a), 132.2, 129.7 (C1'), 129.1 (2C, C2', C6'), 128.8, 128.3, 128.1, 127.8, 127.3, 127.1, 126.8, 113.5 (2C, C3', C5'), 70.9 (C3), 54.9 (OCH₃), 51.7 (C4), 28.4 (CH₃).

IR $\tilde{\nu}$ 3068, 2934, 1708, 1626, 1512, 1460, 1249, 1177, 1032, 754 cm⁻¹.

ESI-MS: m/z 388.0 [M+H⁺].

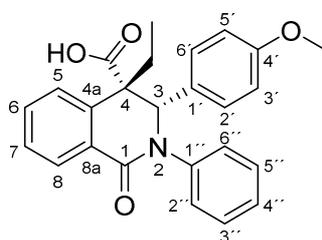
Smp.: 89-90 °C.

Reinheit: > 96 % (Methode C).

R_f: 0.27 (PE/EtOAc + 0.1 % HCOOH 2/1, DC_{SIL}).

Experimenteller Part

cis-3-4-Ethyl-(4-methoxyphenyl)-1-oxo-2-phenyl-1,2,3,4-tetrahydroisochinolin-4-carbonsäure,
(±) **16** (AHLLM13)



$C_{25}H_{23}NO_4$
401.46 g/mol

Die Substanz **14** (100 mg, 0.22 mmol) wurde in CH_2Cl_2 (1.5 mL) in einem verschließbaren Zentrifugenrohr gelöst und nach Zugabe von H_3PO_4 (85 % w/w, 127 μ L, 1.10 mmol) 4 d bei 50 °C gerührt. Nachdem das Reaktionsgemisch mit H_2O (20 mL) verdünnt wurde, wurde es mit $CHCl_3$ (60 mL) extrahiert. Die organische Phase wurde über Na_2SO_4 getrocknet und *in vacuo* eingengt. Das Rohprodukt wurde mittels MPLC (PE/EtOAc + 0.1 % $HCOOH$ 1/0 \rightarrow 0/1) gereinigt, sodass ein farbloser Feststoff (86.8 mg, 216 μ mol, 98 %) erhalten wurde.

1H NMR (DMSO- d_6 , 400 MHz): δ 13.09 (s, 1H, COOH), 8.12 (dd, $J=1.4, 7.7$ Hz, 1H, H8), 7.75 (dd, $J=0.8, 7.8$ Hz, 1H, H5), 7.58 (dt, $J=1.6, 7.6$ Hz, 1H, H6), 7.50 (dt, $J=1.2, 7.5$ Hz, 1H, H7), 7.38-7.34 (m, 2H), 7.29-7.24 (m, 1H), 7.14-7.11 (m, 2H), 6.89-6.85 (m, 2H, H2', H6'), 6.74-6.70 (m, 2H, H3', H5'), 4.98 (s, 1H, H3), 3.65 (s, 3H, OCH₃), 2.59-2.52 (m, 1H, CH₂CH₃), 2.17-2.08 (m, 1H, CH₂CH₃), 0.80 (t, $J=7.3$ Hz, 3H, CH₂CH₃).

^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 100 MHz): δ 171.1 (COOH), 161.9 (C1), 158.9 (C4'), 142.1 (C1''), 137.2, 131.2, 130.1, 129.7 (C1'), 129.0 (2C, C2', C6'), 128.5, 128.0 (C8), 127.3, 126.9, 126.8 (2C), 113.6 (2C, C3', C5'), 71.3 (C3), 56.4 (C4), 54.9 (OCH₃), 33.8 (CH₂CH₃), 9.4 (CH₂CH₃).

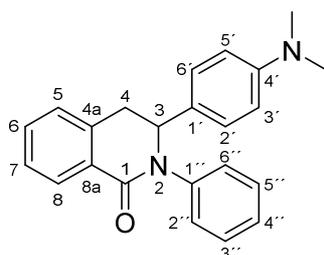
IR $\tilde{\nu}$ 2965, 1725, 1615, 1572, 1513, 1463, 1439, 1307, 1248, 1181, 1028 cm^{-1} .

ESI-MS: m/z 402.0 [M+H⁺].

Smp.: 225-226 °C.

Reinheit: > 92 % (Methode A).

R_f: 0.29 (PE/EtOAc + 0.1 % $HCOOH$ 2/1, DC_{SIL}).

trans-3-(4-(Dimethylamino)phenyl)-2-phenyl-3,4-dihydroisochinolin-1(2H)-one, **17** (AH455)

$C_{23}H_{22}N_2O$
342.44 g/mol

Homophthalsäureanhydrid (1.13 g, 6.97 mmol) und **4f** (2.04 g, 9.09 mmol) wurden in konz. HOAc (30 mL) für 2 h bei 140 °C in einem verschließbaren Zentrifugenrohr erhitzt. Nachdem das Lösungsmittel direkt *in vacuo* entfernt wurde, wurde das Rohgemisch säulenchromatographisch (CHCl₃/EtOH/HCOOH 10/0.3/0.1) gereinigt. Die isolierte Fraktion wurde aus CH₃OH (2.0 mL) umkristallisiert, sodass ein gelber kristalliner Feststoff (755 mg, 2.20 mmol, 31 %) erhalten wurde.

¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ 8.19-8.17 (m, 1H, H₈), 7.37-7.24 (m, 6H), 7.18-7.14 (m, 1H), 7.05-7.03 (m, 1H, H₅), 6.99-6.95 (m, 2H, H_{2'}, H_{6'}), 6.54-6.51 (m, 2H, H_{3'}, H_{5'}), 5.09 (dd, *J*=2.6, 6.1 Hz, 1H, H₃), 3.80 (dd, *J*=6.2, 15.6 Hz, 1H, H₄), 3.08 (dd, *J*=2.6, 15.7 Hz, 1H, H₄), 2.84 (s, 6H, N(CH₃)₂).

¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz): δ 164.4 (C₁), 149.8 (C_{4'}), 142.9 (C_{1''}), 136.0 (C_{1'}), 132.2, 130.0, 128.8, 128.3 (C₈), 128.1, 127.8, 127.4 (2C, C_{2'}, C_{6'}), 127.2, 126.4, 126.3, 112.4 (2C, C_{3'}, C_{5'}), 63.0 (C₃), 40.4 (2C, N(CH₃)₂), 36.9 (C₄).

IR $\tilde{\nu}$ 3061, 2804, 1645, 1616, 1522, 1404, 1271, 1200, 1153, 1067, 812, 739, 696 cm⁻¹.

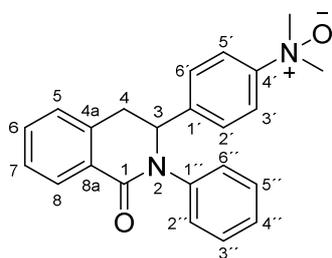
ESI-MS: *m/z* 343.2 [M+H⁺].

Smp.: 161-162 °C.

Reinheit: > 95 % (Methode **A**).

R_f: 0.86 (CHCl₃/CH₃OH 5/1, DC_{SIL}).

trans-*N,N*-dimethyl-*N*-oxid-4-(1-oxo-2-phenyl-1,2,3,4-tetrahydroisochinolin-3-yl)anilin, **18**
(AH458)



$C_{23}H_{22}N_2O_2$
358.44 g/mol

3,4-Dihydroisochinolinon **17** (100 mg, 0.29 mmol) wurde in abs. $CHCl_3$ gelöst und auf 0 °C gekühlt. *m*-CPBA (108 mg, 0.63 mmol) wurde hinzugegeben und das Gemisch erst 30 min bei 0 °C und dann 7 h bei RT gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde *in vacuo* eingeeengt und mittels MPLC ($CHCl_3/CH_3OH$ 8/2) gereinigt. Das isolierte Öl wurde erneut in CH_3OH (1 mL) aufgenommen und mit Et_2O (14 mL) überschichtet. Das entstandene Präzipitat (80.0 mg, 0.22 mmol, 76 %) wurde abfiltriert und unter Schutzgas bei -20 °C gelagert.

1H NMR ($CDCl_3$, 400 MHz): δ 8.21-8.18 (m, 1H, H8), 7.83-7.79 (m, 2H, H3', H5'), 7.42-7.20 (m, 9H), 7.06-7.04 (m, 1H, H5), 5.28 (dd, $J=2.4, 6.2$ Hz, 1H, H3), 3.91 (dd, $J=6.3, 15.7$ Hz, 1H, H4), 3.12 (dd, $J=2.5, 15.8$ Hz, 1H, H4), 3.51 (s, 3H, CH_3), 3.50 (s, 3H, CH_3).

^{13}C NMR ($CDCl_3$, 100 MHz): δ 164.3 (C1), 153.8 (C4'), 142.4 (C1''), 141.9 (C1'), 135.0, 132.7, 129.7, 129.1, 128.5 (C8), 127.8 (C5), 127.7 (2C, C2', C6'), 127.4, 126.8, 126.1, 120.4 (2C, C3', C5'), 63.3 (CH_3), 63.2 (CH_3), 62.8 (C3), 36.6 (C4).

IR $\tilde{\nu}$ 3037, 1648, 1602, 1492, 1460, 1397, 1234, 1156, 971, 740, 693 cm^{-1} .

ESI-MS: m/z 359.7 [$M+H^+$].

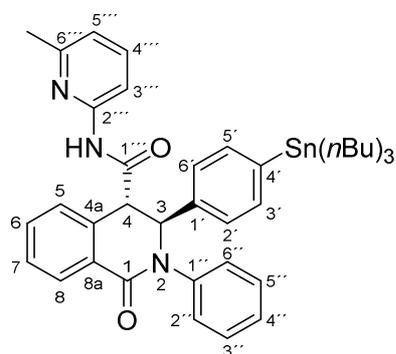
Smp.: 89-90 °C.

Reinheit: > 99 % (Methode **C**).

R_f: 0.30 ($CHCl_3/CH_3OH$ 5/1, DC_{SIL}).

Experimenteller Part

trans-*N*-(6-Methylpyridin-2-yl)-1-oxo-2-phenyl-3-(4-(tri-*n*-butylstannyl)phenyl)-1,2,3,4-tetrahydroisochinolin-4-carbonsäureamid, (\pm) **19** (AHL12)



$C_{40}H_{49}N_3O_2Sn$
722.56 g/mol

Zu der Lösung von **7d** (80.0 mg, 0.14 mmol) in abs. DMF (13 mL) wurde $Pd_2(dba)_3$ (6.54 mg, 7.20 mmol) und anschließend DIPEA (60.8 μ L, 0.37 mmol) zugegeben. Nach der Zugabe von $(SnBu_3)_2$ (120 μ L, 0.21 mmol) wurde das Reaktionsgemisch weitere 29 h bei RT gerührt. Nachdem das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt wurde, wurde das Rohprodukt mittel MPLC (PE/EtOAc 5/1 \rightarrow 1/1) gereinigt, sodass ein farbloses Öl (46.0 mg, 63.7 μ L, 45 %) isoliert wurde.

1H NMR ($CDCl_3$, 400 MHz): δ 8.38-8.33 (m, 1H, H8), 8.05 (d, $J=8.2$ Hz, 1H, H3'''), 7.61-7.55 (m, 4H), 7.36-7.27 (m, 6H), 7.23-7.19 (m, 1H), 7.14-7.10 (m, 2H, H2', H6'), 6.88 (d, $J=7.4$ Hz, 1H, H5'''), 5.96 (s, 1H, H3), 4.06 (d, $J=1.6$ Hz, 1H, H4), 2.35 (s, 3H, CH₃), 1.52-1.44 (m, 6H), 1.31-1.25 (m, 6H), 1.01-0.90 (m, 6H), 0.86-0.83 (m, 9H).

^{13}C NMR ($CDCl_3$, 100 MHz): δ 168.4 (C1'''), 163.2 (C1), 157.2 (C6'''), 149.9 (C2'''), 142.1 (C4'), 141.9 (C1'), 138.8 (C1''), 138.6, 136.8 (2C, C3', C5'), 133.4 (C4'''), 132.4, 130.3, 129.6 (2C), 129.2, 129.1, 127.1, 126.9, 125.9 (2C, C2', C6'), 120.0 (C5'''), 110.8 (C3'''), 65.3 (C3), 54.8 (C4), 29.1 (CH₂), 27.4 (CH₂), 24.0 (C6'''-CH₃), 13.7 (CH₃), 9.6 (CH₂).

IR $\tilde{\nu}$ 3269, 2921, 1686, 1577, 1527, 1451, 1388, 1294, 1232, 1154, 10470, 788, 692 cm^{-1} .

ESI-MS: m/z 724.5 [M+H⁺].

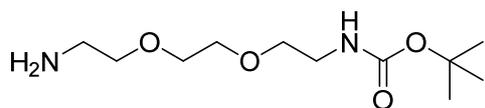
Smp.: 160-161 $^{\circ}C$

Reinheit: > 96 % (Methode **C**).

R_f: 0.35 (PE/EtOAc 2/1, DC_{SIL}).

Experimenteller Part

tert-Butyl (2-(2-(2-aminoethoxy)ethoxy)ethyl)carbamate, **20** (AH362)¹⁴⁶



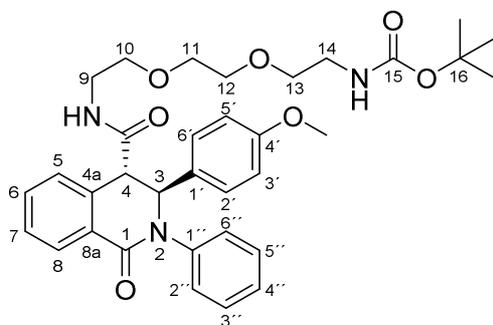
C₁₁H₂₄N₂O₄
248.32 g/mol

2,2'-(Ethyldioxy)diethylamin (9.90 mL, 67.5 mmol) wurde in abs. CH₂Cl₂ (45 mL) unter Argonatmosphäre gelöst und auf 0 °C gekühlt. Das im abs. CH₂Cl₂ (15 mL) gelöste Di-*tert*-butyldicarbonat (3.00 g, 13.7 mmol) wurde langsam hinzuge tropft und das Reaktionsgemisch weitere 20 min bei 0 °C und 18 h bei RT gerührt. Nachdem das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt wurde, wurde das Gemisch mit H₂O (20 mL) verdünnt und mit CH₂Cl₂ (100 mL) extrahiert. Die organische Phase wurde abgetrennt, über Na₂SO₄ getrocknet und *in vacuo* eingeeengt, sodass ein orangenes Öl (2.97 mg, 11.9 mmol, 87 %) erhalten wurde.

¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ 3.62-3.59 (m, 4H), 3.55-3.49 (m, 4H), 3.32-3.28 (m, 2H), 2.88-2.85 (m, 2H), 1.43 (s, 9H).

¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz): δ 156.1, 79.2, 73.6, 70.3 (2C), 41.9, 40.4 (2C), 28.5.

trans-*tert*-Butyl-(2-(2-(2-((3*S*,4*S*)-3-(4-methoxyphenyl)-1-oxo-2-phenyl-1,2,3,4-tetrahydroisochinolin-4-carboxamido)ethoxy)ethoxy)ethyl)carbamate, (±) **21** (AH474)



C₃₄H₄₁N₃O₇
603.72 g/mol

Das Racemat **6a** (1.00 g, 2.67 mmol) wurde in abs. CH₃CN (20 mL) unter Argonatmosphäre gelöst. Nach Zugabe von DIPEA (0.50 mL, 2.94 mmol) wurde die Lösung 5 min bei RT gerührt und danach auf 0 °C gekühlt. Anschließend wurde 2,2,2-Trichlor-1,1-dimethylethylformiat (1.70 g, 7.08 mmol), gelöst in abs. CH₃CN (6.0 mL), hinzuge tropft und weitere 10 min bei 0 °C gerührt. Nach der direkten Zugabe von **20** (1.06 g, 4.27 mmol) wurde das Reaktionsgemisch 1 h bei 0 °C und 28 h bei RT gerührt. Nachdem das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt wurde, wurde das Rohprodukt mittel MPLC (EtOAc → EtOAc/HCOOH 5/0.1) gereinigt, sodass ein farbloser Feststoff (539 mg, 0.89 mmol, 33 %) erhalten wurde.

Experimenteller Part

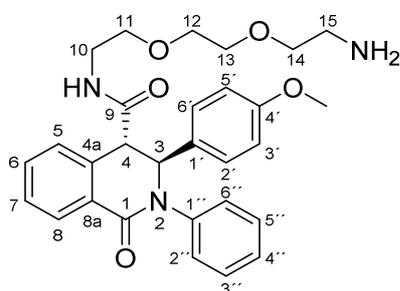
¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ 8.30 (m, 1H), 7.53-7.48 (m, 2H), 7.34-7.30 (m, 4H), 7.23-7.18 (m, 1H), 7.17-7.15 (m, 1H), 7.08-7.04 (m, 2H), 6.73-6.69 (m, 2H), 5.86 (s, 1H), 3.87 (s, 1H), 3.70 (s, 3H), 3.57-3.25 (m, 12H), 1.43 (s, 9H).

¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz): δ 170.3, 163.0, 159.1, 156.1, 142.0, 133.0, 131.2, 130.3, 129.2, 129.1, 129.0, 127.5, 127.0, 126.8, 114.1, 70.5, 70.2, 70.1, 70.0, 69.7, 65.2, 55.2, 40.0, 28.5.

IR $\tilde{\nu}$ 3323, 2931, 1701, 1648, 1510, 1460, 1248, 1174, 1106, 908, 727, 645 cm⁻¹.

R_f: 0.15 (PE/EtOAc 1/5, DC_{SIL}).

trans-N-(2-(2-(2-Aminoethoxy)ethoxy)ethyl)-3-(4-methoxyphenyl)-1-oxo-2-phenyl-1,2,3,4-tetrahydroisochinolin-4-carbonsäureamid, (±) **22** (AH484)



C₂₉H₃₃N₃O₅
503.60 g/mol

21 (120 mg, 0.20 mmol) wurde in abs. CH₃CN (2.0 mL) gelöst und auf 0 °C gekühlt. Nach der Zugabe von TFA (76.0 μL, 1.00 mmol) wurde das Gemisch weitere 30 min unter Kühlung und dann 22 h bei RT gerührt. Nachdem das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt wurden, wurde das Rohprodukt mittel Umkehrphasen-MPLC (H₂O/CH₃OH 3/1 → 0/1) gereinigt und als farbloser hygroskopischer Feststoff (60.0 mg, 0.12 mmol, 60 %) isoliert.

¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ 8.29-8.24 (m, 1H, H₈), 7.52-7.46 (m, 2H), 7.32-7.28 (m, 4H), 7.23-7.17 (m, 1H), 7.16-7.14 (m, 1H, H₅), 7.06-7.03 (m, 2H, H₂', H₆'), 6.72-6.68 (m, 2H, H₃', H₅'), 5.85 (d, *J*=1.6 Hz, 1H, H₃), 3.86 (d, *J*=1.7 Hz, 1H, H₄), 3.68 (s, 3H, OCH₃), 3.51-3.35 (m, 10H), 2.80-2.78 (m, 2H).

¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz): δ 170.2 (C₉), 163.0 (C₁), 159.0 (C₄'), 141.9 (C₁''), 133.2, 132.9, 131.2 (C₁'), 130.2, 129.1 (3C), 129.0, 127.5 (2C, C₂', C₆'), 127.0, 126.7, 114.0 (2C, C₃', C₅'), 73.3, 70.4, 70.1, 69.6, 65.1 (C₃), 55.2 (OCH₃), 54.1 (C₄), 41.7, 39.9.

IR $\tilde{\nu}$ 3299, 2916, 1693, 1509, 1454, 1240, 1112, 755, 698 cm⁻¹.

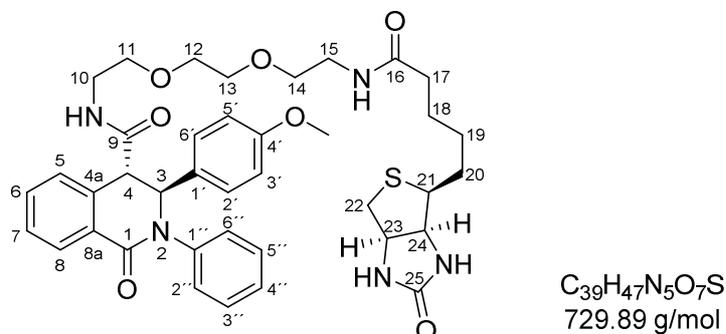
ESI-MS: *m/z* 504.5 [M+H⁺].

Reinheit: > 92 % (Methode **C**).

R_f: 0.42 (CH₃OH/NEt₃ 1/0.1, DC_{SIL}).

Experimenteller Part

trans-3-(4-Methoxyphenyl)-1-oxo-N-(2-(2-(2-(5-((3*a*S,4*S*,6*a*R)-2-oxohexahydro-1*H*-thieno[3,4-*d*]imidazol-4-yl)pentanamido)ethoxy)ethoxy)ethyl)-2-phenyl-1,2,3,4-tetrahydroisochinolin-4-carbonsäureamid, (±) **23** (AH487)



Zu der Lösung von NHS-Biotin (46.0 mg, 0.13 mmol) in abs. DMF (1.5 mL) wurde die Lösung von **22** (80.0 mg, 0.16 mmol) und DIPEA (54.0 µL, 0.32 mmol) in abs. DMF (1.5 mL) unter Argonatmosphäre langsam hinzugegeben. Die Reaktionsmischung wurde 22 h bei RT gerührt und anschließend *in vacuo* eingedunstet. Das Rohprodukt wurde direkt mittels Umkehrphasen-MPLC (H₂O/CH₃OH 9/1 → 0/1) gereinigt, sodass ein farbloser Feststoff (79.0 mg, 0.11 mmol, 69 %) isoliert wurde.

¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ 8.26-8.22 (m, 1H, H8), 7.54-7.48 (m, 2H), 7.34-7.29 (m, 4H), 7.24-7.16 (m, 2H), 7.07-7.05 (m, 2H, H2', H6'), 6.74-6.70 (m, 2H, H3', H5'), 5.81 (d, *J*=1.4 Hz, 1H, H3), 4.46-4.43 (m, 1H, H23), 4.27-4.23 (m, 1H, H24), 3.91 (d, *J*=1.6 Hz, 1H, H4), 3.70 (s, 3H, OCH₃), 3.60-3.54 (m, 1H), 3.50-3.23 (m, 11H), 3.13-3.08 (m, 1H, H21), 2.86 (dd, *J*=4.7, 12.8 Hz, 1H, H22), 2.70 (dd, *J*=3.1, 12.8 Hz, 1H, H22), 2.18-2.13 (m, 2H), 1.73-1.58 (m, 4H), 1.43-1.37 (m, 2H).

¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz): δ 173.6 (C16), 170.6 (C9), 163.7 (C25), 163.3 (C1), 159.1 (C4'), 142.0 (C1''), 133.3, 133.2, 133.1, 131.1 (C1'), 130.2, 129.2, 129.1 (2C), 127.6 (2C, C2', C6'), 127.1, 126.8, 114.2 (2C, C3', C5'), 70.4, 70.1 (2C), 69.6 (2C), 65.4 (C3), 61.9 (C24), 60.4 (C23), 55.5 (C21), 55.3 (OCH₃), 54.2 (C4), 40.5 (C22), 40.1, 39.3, 35.7, 28.1, 25.6.

IR $\tilde{\nu}$ 2930, 1698, 1637, 1509, 1458, 1428, 1247, 1177, 1097, 1027, 831, 749, 694, 646 cm⁻¹.

ESI-MS: *m/z* 730.7 [M+H⁺].

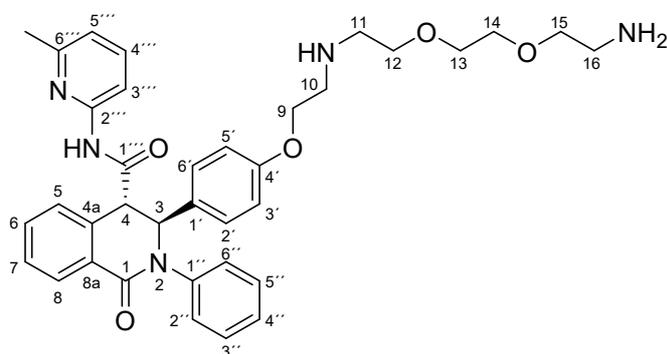
Smp.: 107-108 °C.

Reinheit: > 99 % (Methode **C**).

R_f: 0.40 (CH₃CN/H₂O 1/2, DC_{RP}).

Experimenteller Part

trans-3-(4-(2-((2-(2-(2-Aminoethoxy)ethoxy)ethyl)amino)ethoxy)phenyl)-*N*-(6-methylpyridin-2-yl)-1-oxo-2-phenyl-1,2,3,4-tetrahydroisochinolin-4-carbonsäureamid, (\pm) **24** (AH489)



C₃₆H₄₁N₅O₅
623.75 g/mol

7e (300 mg, 0.54 mmol) wurde in Gegenwart von K₂CO₃ (149 mg, 1.08 mmol) und 2,2'-(Ethyldioxy)diethylamin (396 μ L, 2.70 mmol) in abs. DMF (3.0 mL) für 5 h bei 80 °C in einem verschließbaren Zentrifugenrohr gerührt. Anschließend wurde die Suspension filtriert und das Filtrat *in vacuo* eingengt. Das Rohprodukt wurde zuerst mittels Normalphasen-MPLC (EtOAc+10 % NEt₃ / CH₃CN+10 % NEt₃ 1/1 \rightarrow 0/1) und dann mittels Umkehrphasen-MPLC (H₂O/CH₃CN 9/1 \rightarrow 1/9) gereinigt, sodass ein farbloses Öl (113 mg, 0.18 mmol, 34 %) isoliert wurde.

¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ 8.35-8.32 (m, 1H, H8), 8.03 (d, J =8.2 Hz, 1H, H3''), 7.60-7.54 (m, 2H), 7.33-7.27 (m, 5H), 7.23-7.18 (m, 1H), 7.07-7.04 (m, 2H, H2', H6'), 6.87 (d, J =7.4 Hz, 1H, H5''), 6.75-6.71 (m, 2H, H3', H5'), 5.89 (d, J =1.5 Hz, 1H, H3), 4.00 (d, J =1.6 Hz, 1H, H4), 3.97 (t, J =5.2 Hz, 2H, H9), 3.61-3.57 (m, 6H), 3.49-3.46 (m, 2H), 2.95 (t, J =5.2 Hz, 2H, H10), 2.83-2.81 (m, 4H), 2.34 (s, 3H, CH₃).

¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz): δ 168.4 (C1''), 163.2 (C1), 158.5 (C4'), 157.1 (C6''), 149.9 (C2''), 142.0 (C1'), 138.7, 133.5, 132.4, 131.3 (C1'), 130.2, 129.6 (2C), 129.2, 129.1, 127.6 (2C, C2', C6'), 127.1, 126.8, 120.0 (C5''), 114.8 (2C, C3', C5'), 110.9 (C3''), 73.2, 70.6, 70.4, 70.3, 67.5 (C9), 64.9 (C3), 54.9 (C4), 49.2, 48.7 (C10), 41.7, 23.9 (CH₃).

IR $\tilde{\nu}$ 2866, 1639, 1601, 1577, 1509, 1451, 1300, 1243, 111, 790, 727, 694 cm⁻¹.

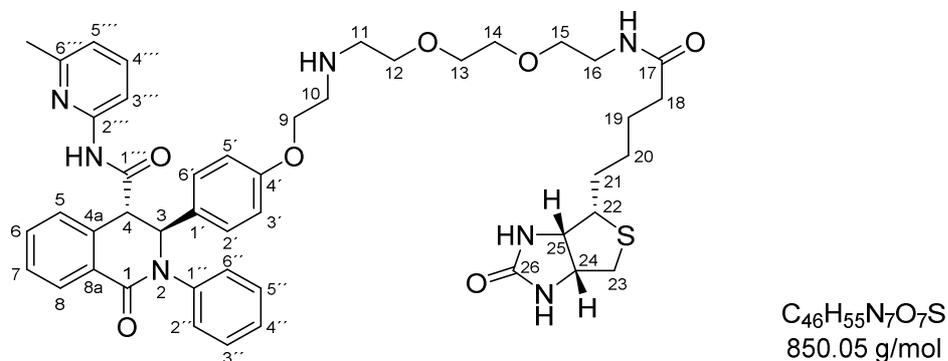
ESI-MS: m/z 312.8 [M+2H⁺].

Reinheit: > 98 % (Methode C).

R_f: 0.57 (H₂O/CH₃CN 1/3, DC_{RP}).

Experimenteller Part

trans-*N*-(6-Methylpyridin-2-yl)-1-oxo-3-(4-((13-oxo-17-((3*a*S,4*S*,6*a*R)-2-oxohexahydro-1*H*-thieno[3,4-*d*]imidazol-4-yl)-6,9-dioxa-3,12-diazaheptadecyl)oxy)phenyl)-2-phenyl-1,2,3,4-tetrahydroisochinolin-4-carbonsäureamid, (±) **25** (AH493)



Zu der Lösung von NHS-Biotin (90.0 mg, 0.26 mmol) in abs. DMF (1.5 mL) wurde die Lösung von **24** (200 mg, 0.32 mmol) und DIPEA (85.0 μ L, 0.50 mmol) in abs. DMF (1.5 equiv) unter Argonatmosphäre langsam hinzugegeben. Die Reaktionsmischung wurde 20 h bei RT gerührt und anschließend *in vacuo* eingedunstet. Das Rohprodukt wurde direkt mittels Umkehrphasen-MPLC (H₂O/CH₃CN 6/4 \rightarrow 1/1) gereinigt, sodass ein farbloser Feststoff (21.0 mg, 25.0 μ mol, 8 %) isoliert wurde.

Die vermessene NMR-Probe wies eine Mischung aus zwei Diastereomeren (Verhältnis 1/1) auf. Die jeweiligen Signalpaare sind durch „/“ getrennt und „Dia.“ gekennzeichnet.

¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ 9.19 (s, 1H, C1''''-NH, Dia.)/9.11 (s, 1H, C1''''-NH, Dia.), 8.35-8.28 (m, 2H, H8), 8.06-8.02 (m, 2H, H3'''), 7.60-7.55 (m, 4H), 7.53-7.47 (m, 4H), 7.32-7.27 (m, 10H), 7.23-7.17 (m, 4H, H2', H6'), 6.88-6.85 (m, 2H, H5'''), 6.80-6.78 (m, 1H, C16-NH, Dia.)/6.67-6.64 (m, 1H, C16-NH, Dia.), 6.75-6.72 (m, 4H, H3', H5'), 6.47 (s, 1H, C24-NH, Dia.)/6.34 (s, 1H, C24-NH, Dia.), 6.27 (s, 1H, C25-NH, Dia.)/6.25 (s, 1H, C25-NH, Dia.), 5.70 (s, 1H, H3, Dia.)/5.69 (s, 1H, H3, Dia.), 4.44-4.41 (m, 2H, H24, Dia.)/4.39-4.36 (m, 2H, H24, Dia.), 4.24-4.21 (m, 4H, H4, H25), 4.05-3.97 (m, 4H), 3.64-3.36 (m, 20H), 3.14-3.07 (m, 2H, H22), 3.04-3.01 (m, 4H), 2.90-2.82 (m, 6H), 2.70-2.63 (m, 2H), 2.38 (s, 3H, CH₃, Dia.)/2.37 (s, 3H, CH₃, Dia.), 2.21-2.16 (m, 4H), 1.78-1.55 (m, 8H), 1.49-1.37 (m, 4H).

¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz): δ 173.3 (2C, C17, Dia.), 169.3/169.2 (2C, C1''', Dia.), 164.2 (2C, C26, Dia.), 163.5 (2C, C1), 158.2/158.1 (2C, C4'', Dia.), 156.5 (2C, C6''', Dia.), 150.7 (2C, C2'''), 142.5 (2C, C1'', Dia.), 138.9 (2C, Dia.), 133.5 (2C), 133.1 (3C), 133.0, 132.2 (2C), 132.0 (2C), 130.4 (2C), 129.2, 129.1 (3C), 129.0 (2C), 128.8 (2C), 127.9 (2C), 127.1 (2C), 126.9, 126.8 (3C), 119.6 (2C, C5''', Dia.), 114.7/114.6 (2C, C3', C5', Dia.), 111.6/111.5 (2C, C3''', Dia.), 70.4 (2C), 70.3 (2C), 70.2 (2C), 69.9 (2C), 66.9 (2C), 65.1 (2C, C3, Dia.), 61.8 (2C),

Experimenteller Part

60.3/60.2 (2C, Dia.), 55.4 (2C, C22, Dia.), 53.9/53.8 (2C, C4, Dia.), 49.0 (2C), 48.5 (2C, Dia.), 40.7 (2C, C23, Dia.), 39.3/39.2 (2C, Dia.), 35.5 (2C, Dia.), 28.0 (2C, Dia.), 27.7 (2C), 25.7/25.6 (2C, Dia.), 25.7 (2C, Dia.), 23.9/23.8 (2C, CH₃, Dia.).

IR $\tilde{\nu}$ 3263, 2925, 1693, 1637, 1603, 1509, 1452, 1302, 1238, 1176, 1110, 791, 693 cm⁻¹.

ESI-MS: m/z 426.0 [M+2H⁺].

Smp.: 122-123 °C.

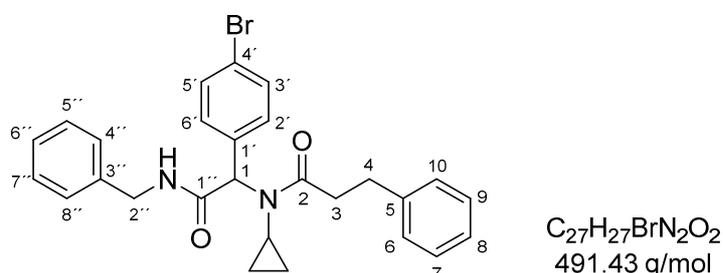
Reinheit: > 87 % (Methode **C**).

R_f: 0.19 (H₂O/CH₃CN 1/3, DC_{RP}).

9.2.3 Synthesen der α -Acylaminocarboxamid-Derivate

Allgemeine Vorschrift zur Synthese der α -Acylaminocarboxamide (\pm) 38c, (\pm) 38d, (\pm) 38e, (\pm) 38f, (\pm) 38g: Zu der Lösung des jeweiligen Benzaldehydes (1.00 equiv) in abs. CH₃OH wurde das Amin (1.00 equiv) hinzugegeben und 30 min bei RT gerührt. Nach anschließender Zugabe des Isocyanids (1.20-1.30 equiv) und der Säure (1.20-1.30 equiv) wurde das Reaktionsgemisch bei RT bis zur vollständigen Umsetzung gerührt.

N-(2-(Benzylamino)-1-(4-bromphenyl)-2-oxoethyl)-*N*-cyclopropyl-3-phenylpropanamid, (\pm) **38c** (AH367)



Das Gemisch aus 4-Brombenzaldehyd (1.06 g, 5.73 mmol), Cyclopropylamin (385 μ L, 5.40 mmol), Benzylisocyanid (800 μ L, 6.56 mmol) und 3-Phenylpropionsäure (990 mg, 6.60 mmol) wurde 2 h in abs. CH₃OH (5.0 mL) bei RT gerührt. Der entstandene Niederschlag wurde abfiltriert und mit kaltem CH₃OH (4 mL) gewaschen, sodass das Produkt als grauer Feststoff (1.86 g, 3.78 mmol, 66 %) isoliert wurde.

¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ 7.44-7.40 (m, 2H, H3', H5'), 7.34-7.19 (m, 10H), 7.17-7.14 (m, 2H, H2', H6'), 6.36 (t, $J=5.1$ Hz, 1H, NH), 5.54 (s, 1H, H1), 4.51-4.39 (m, 2H, H2''), 3.02-2.98 (m, 2H, H4), 2.96-2.91 (m, 2H, H3), 2.53-2.47 (m, 1H, CH_{c-Propyl}), 0.94-0.78 (m, 2H, CH_{2,c-Propyl}), 0.69-0.60 (m, 2H, CH_{2,c-Propyl}).

¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz): δ 176.3 (C2), 169.7 (C1'), 141.3 (C5), 138.1 (C3''), 134.9 (C1'), 131.8 (2C, C3', C5'), 130.8 (2C, C2', C6'), 128.8, 128.6, 127.7, 127.5, 126.3, 122.2 (C4'), 66.8 (C1), 43.8 (C2''), 36.4 (C3), 31.4 (CH_{c-Propyl}), 31.3 (C4), 10.7 (CH_{2,c-Propyl}), 9.3 (CH_{2,c-Propyl}).

IR $\tilde{\nu}$ 3210, 3063, 1645, 1395, 1253, 1073, 1012, 759, 698, 575 cm⁻¹.

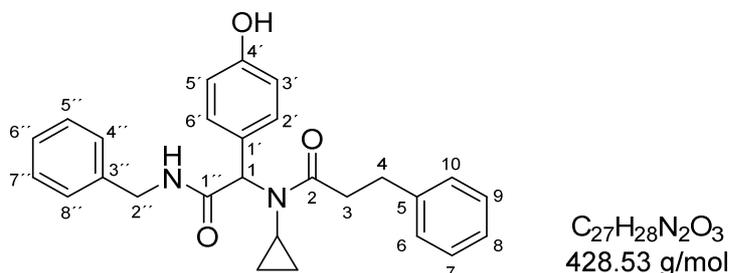
ESI-MS: m/z 514.9 [M+Na⁺].

Smp.: 152-153 °C.

Reinheit: > 94 % (Methode **B**).

R_f: 0.27 (PE/EtOAc 1/1, DC_{SIL}).

N-(2-(Benzylamino)-1-(4-hydroxyphenyl)-2-oxoethyl)-*N*-cyclopropyl-3-phenylpropanamid,
(±) **38d** (AH382)



Das Gemisch aus 4-Hydroxybenzaldehyd (500 mg, 4.10 mmol), Cyclopropylamin (285 µL, 4.10 mmol), Benzylisocyanid (599 µL, 4.91 mmol) und 3-Phenylpropionsäure (735 mg, 4.90 mmol) wurde 24 h in abs. CH₃OH (4.0 mL) bei RT gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt und das Rohprodukt mittels MPLC (PE/EtOAc 3/1 → 1/1) gereinigt. Das Produkt wurde als gelber Feststoff (1.40 g, 3.27 mmol, 80 %) erhalten.

¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ 7.21-7.08 (m, 10H), 7.05-7.02 (m, 2H, H2', H6'), 6.67-6.65 (m, 2H, H3', H5'), 6.13 (t, *J*=5.8 Hz, 1H, NH), 5.35 (s, 1H, H1), 4.42-4.29 (m, 2H, H2''), 2.93-2.81 (m, 4H, H3, H4), 2.50-2.44 (m, 1H, CH_{c-Propyl}), 0.85-0.65 (m, 2H, CH_{2,c-Propyl}), 0.60-0.50 (m, 2H, CH_{2,c-Propyl}).

¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz): δ 176.4 (C2), 170.7 (C1''), 156.6 (C4'), 141.4 (C5), 138.0 (C3'), 130.6 (2C, C2', C6'), 128.7, 128.6, 127.6, 127.4, 126.9, 126.2, 115.9 (2C, C3', C5'), 66.9 (C1), 43.9 (C2''), 36.5 (C3), 31.5 (CH_{c-Propyl}), 31.3 (C4), 10.7 (CH_{2,c-Propyl}), 9.1 (CH_{2,c-Propyl}).

IR $\tilde{\nu}$ 3270, 3023, 1612, 1513, 1231, 696, 568 cm⁻¹.

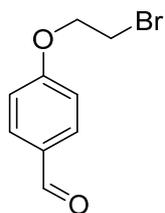
ESI-MS: *m/z* 429.10 [M+H⁺].

Smp.: 67-68 °C.

Reinheit: > 94 % (Methode C).

R_f: 0.26 (PE/EtOAc 1/1, DC_{SIL}).

4-(2-Bromoethoxy)-benzaldehyd, **40**



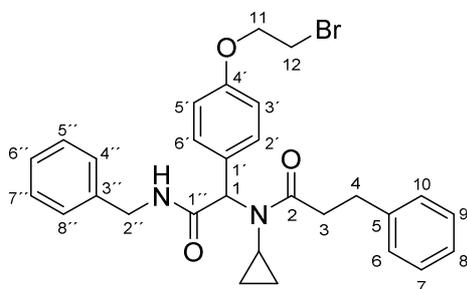
$C_9H_9BrO_2$
229.07 g/mol

4-(2-Bromoethoxy)-benzaldehyd wurde entsprechend Deniz et al.⁸⁵ hergestellt. 4-Hydroxybenzaldehyd (1.99 g, 16.2 mmol), K_2CO_3 (4.50 g, 32.5 mmol) und 1,4-Dibromethan (14.1 mL, 164 mmol) wurden in abs. CH_3CN (50 mL) unter Rückfluss bei 90 °C für 24 h gerührt. Nach Abkühlen des Reaktionsgemisches wurde der Rückstand abfiltriert und das Filtrat *in vacuo* eingengt. Das erhaltene Rohprodukt wurde mittels MPLC (PE/EtOAc 4/1 → 1/1) gereinigt, sodass ein farbloser Feststoff (3.26 mg, 14.2 mmol, 87 %) isoliert wurde.

R_f : 0.38 (PE/EtOAc 3/1, DC_{SIL}).

Die gemessenen physikalischen und spektroskopischen Daten stimmen mit den Angaben in der Literatur⁸⁵ überein. Ausbeute laut Literatur 60 %.

N-(2-(Benzylamino)-1-(4-(2-bromoethoxy)phenyl)-2-oxoethyl)-*N*-cyclopropyl-3-phenylpropanamid, (\pm) **38e** (AH389)



$C_{29}H_{31}BrN_2O_3$
535.48 g/mol

Das Gemisch aus 4-(2-Bromoethoxy)-benzaldehyd **40** (1.02 g, 4.45 mmol), Cyclopropylamin (340 μ L, 4.88 mmol), Benzylisocyanid (701 μ L, 5.74 mmol) und 3-Phenylpropionsäure (863 mg, 5.74 mmol) wurde 16 h in abs. CH_3OH (4.3 mL) bei RT gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt und das Rohprodukt mittels MPLC (PE/EtOAc/ CH_2Cl_2 1/0.5/0.5) gereinigt. Das Produkt wurde als farbloser Feststoff (1.60 g, 2.99 mmol, 67 %) erhalten.

1H NMR ($CDCl_3$, 400 MHz): δ 7.35-7.21 (m, 12H), 6.88-6.85 (m, 2H, H3', H5'), 6.26 (t, $J=5.4$ Hz, 1H, NH), 5.57 (s, 1H, H1), 4.53-4.44 (m, 2H, H2''), 4.30 (t, $J=6.2$ Hz, 2H, H11), 3.65 (t, $J=6.2$

Experimenteller Part

Hz, 2H, H12), 3.06-3.02 (m, 2H, H4), 2.97-2.93 (m, 2H, H3), 2.55-2.52 (m, 1H, CH_{c-Propyl}), 0.97-0.92 (m, 1H, CH_{2,c-Propyl}), 0.86-0.76 (m, 1H, CH_{2,c-Propyl}), 0.71-0.61 (m, 2H, CH_{2,c-Propyl}).

¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz): δ 176.1 (C2), 170.3 (C1''), 157.9 (C4'), 141.5 (C5), 138.3 (C3''), 130.8 (2C, C2', C6'), 128.7 (2C), 128.6, 128.6, 127.7, 127.4, 126.2, 114.8 (2C, C3', C5'), 67.9 (C11), 66.2 (C1), 43.8 (C2''), 36.4 (C3), 31.3 (C4), 31.1 (CH_{c-Propyl}), 29.1 (C12), 10.7 (CH_{2,c-Propyl}), 9.1 (CH_{2,c-Propyl}).

IR $\tilde{\nu}$ 3216, 3065, 1644, 1510, 1399, 1244, 1179, 698 cm⁻¹.

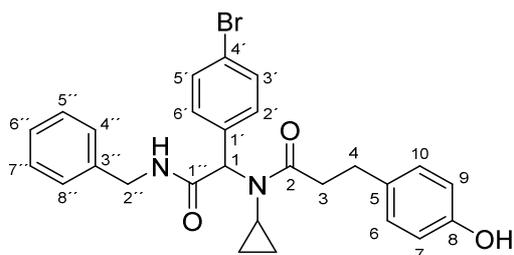
ESI-MS: *m/z* 537.0 [M+H⁺].

Smp.: 144-145 °C.

Reinheit: > 96 % (Methode C).

R_f: 0.27 (PE/EtOAc 1/1, DC_{SIL}).

N-(2-(Benzylamino)-1-(4-bromophenyl)-2-oxoethyl)-*N*-cyclopropyl-3-(4-hydroxyphenyl)propanamid, (±) **38f** (AH404)



C₂₇H₂₇BrN₂O₃
507.43 g/mol

Das Gemisch aus 4-Bromobenzaldehyd (500 mg, 2.70 mmol), Cyclopropylamin (207 μ L, 2.97 mmol), Benzylisocyanid (428 μ L, 3.51 mmol) und 3-(4-Hydroxyphenyl)-propionsäure (581 mg, 3.50 mmol) wurde 22 h in abs. CH₃OH (3.0 mL) bei RT gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt und das Rohprodukt mittels MPLC (PE/EtOAc 9/1) gereinigt. Das Produkt wurde als farbloser Feststoff (1.05 g, 2.07 mmol, 77 %) erhalten.

¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ 7.44-7.41 (m, 2H, H3', H5'), 7.31-7.20 (m, 5H), 7.13-7.11 (m, 2H, H2', H6'), 7.01-6.98 (m, 2H, H6, H10), 6.75-6.72 (m, 2H, H7, H9), 6.39 (t, *J*=5.8 Hz, 1H, NH), 5.46 (s, 1H, H1), 4.49-4.37 (m, 2H, H2''), 2.91-2.81 (m, 4H, H3, H4), 2.54-2.49 (m, 1H, CH_{c-Propyl}), 0.88-0.75 (m, 2H, CH_{2,c-Propyl}), 0.68-0.56 (m, 2H, CH_{2,c-Propyl}).

¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz): δ 176.7 (C2), 170.0 (C1''), 154.9 (C8), 137.8 (C3''), 134.7 (C1'), 132.5 (C5), 131.9 (2C, C3', C5'), 130.8 (2C, C2', C6'), 129.6 (2C, C6, C10), 128.7, 127.7 (2C, C4'', C8'), 127.5, 122.4 (C4'), 115.5 (2C, C7, C9), 66.5 (C1), 43.9 (C2''), 36.5 (C3), 31.5 (CH_{c-Propyl}), 30.4 (C4), 10.7 (CH_{2,c-Propyl}), 9.2 (CH_{2,c-Propyl}).

IR $\tilde{\nu}$ 3252, 1658, 1620, 1608, 1512, 1402, 1224, 1010, 823, 700 cm⁻¹.

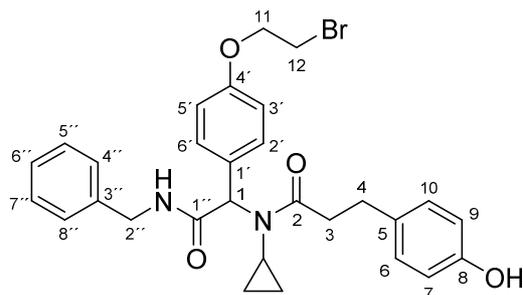
ESI-MS: m/z 509.0 [M+H⁺].

Smp.: 150-151 °C.

Reinheit: > 97 % (Methode **C**).

R_f: 0.3 (PE/EtOAc 10/1, DC_{SIL}).

N-(2-(Benzylamino)-1-(4-(2-bromoethoxy)phenyl)-2-oxoethyl)-*N*-cyclopropyl-3-(4-hydroxyphenyl)propanamid, (±) **38g** (AH425)



C₂₉H₃₁BrN₂O₄
551.48 g/mol

Das Gemisch aus 4-(2-Bromoethoxy)-benzaldehyd **40** (793 mg, 3.46 mmol), Cyclopropylamin (264 µL, 3.79 mmol), Benzylisocyanid (548 µL, 4.49 mmol) und 3-(4-Hydroxyphenyl)-propionsäure (748 mg, 4.50 mmol) wurde 16 h in abs. CH₃OH (3.5 mL) bei RT gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt und das Rohprodukt mittels MPLC (PE/EtOAc 1/1) gereinigt. Das Produkt wurde als farbloser Feststoff (1.39 g, 2.52 mmol, 73 %) erhalten.

¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ 7.31-7.21 (m, 7H), 7.03-6.99 (m, 2H, H6, H10), 6.85-6.82 (m, 2H, H3', H5'), 6.77-6.73 (m, 2H, H7, H9), 6.22 (t, $J=5.8$ Hz, 1H, NH), 5.43 (s, 1H, H1), 4.51-4.37 (m, 2H, H2''), 4.26 (t, $J=6.2$ Hz, 2H, H11), 3.61 (t, $J=6.2$ Hz, 2H, H12), 2.92-2.81 (m, 4H, H3, H4), 2.56-2.51 (m, 1H, CH_{c-Propyl}), 0.88-0.81 (m, 1H, CH_{2,c-Propyl}), 0.80-0.74 (m, 1H, CH_{2,c-Propyl}), 0.67-0.56 (m, 2H, CH_{2,c-Propyl}).

¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz): δ 176.4 (C2), 170.6 (C1'), 158.0 (C4'), 154.9 (C8), 138.0 (C3''), 132.7 (C5), 130.7 (2C, C2', C6'), 129.5 (2C, C6, C10), 128.7, 128.6 (C1'), 127.7, 127.5, 115.5 (2C, C7, C9), 115.0 (2C, C3', C5'), 67.9 (C11), 66.7 (C1), 43.9 (C2''), 36.9 (C3), 31.4 (CH_{c-Propyl}), 30.4 (C4), 29.1 (C12), 10.7 (CH_{2,c-Propyl}), 9.0 (CH_{2,c-Propyl}).

IR $\tilde{\nu}$ 3275, 1645, 1610, 1509, 1239, 1178, 827, 697 cm⁻¹.

ESI-MS: m/z 552.9 [M+H⁺].

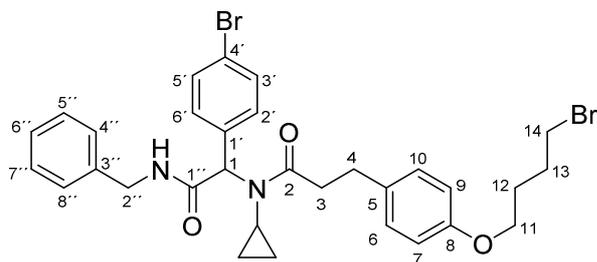
Smp.: 69-70 °C.

Reinheit: > 96 % (Methode **C**).

R_f: 0.29 (PE/EtOAc 1/1, DC_{SIL}).

Experimenteller Part

N-(2-(Benzylamino)-1-(4-bromophenyl)-2-oxoethyl)-3-(4-(4-bromobutoxy)phenyl)-*N*-cyclopropylpropanamide, (\pm) **39** (AH407)



$C_{31}H_{34}Br_2N_2O_3$
642.43 g/mol

38f (300 mg, 0.59 mmol) wurde in abs. CH_3CN (6.0 mL) unter Argonatmosphäre gelöst. K_2CO_3 (166 mg, 1.20 mmol) und 1,4-Dibrombutan (700 μL , 5.83 mmol) wurden hinzugefügt und das Reaktionsgemisch wurde für 3 h bei 100 °C in einem verschließbaren Zentrifugenrohr gerührt. Nach Abkühlen des Gemisches wurde die Suspension filtriert und das Filtrat *in vacuo* eingengt. Das Rohprodukt wurde mittels MPLC (PE/EtOAc 4/1 \rightarrow 1/4) gereinigt, sodass ein farbloser Feststoff (261 mg, 0.41 mmol, 70 %) isoliert wurde.

1H NMR ($CDCl_3$, 400 MHz): δ 7.44-7.42 (m, 2H, H3', H5'), 7.35-7.25 (m, 5H), 7.16-7.12 (m, 4H, H2', H6', H6, H10), 6.81 (m, 2H, H7, H9), 6.51 (t, $J=5.6$ Hz, 1H, NH), 5.59 (s, 1H, H1), 4.50-4.42 (m, 2H, H2''), 3.99 (t, $J=6.0$ Hz, 2H, H11), 3.51 (t, $J=6.6$ Hz, 2H, H14), 2.97-2.84 (m, 4H, H3, H4), 2.51-2.46 (m, 1H, $CH_{c-Propyl}$), 2.13-2.06 (m, 2H, H12), 1.99-1.92 (m, 2H, H13), 0.95-0.90 (m, 1H, $CH_{2,c-Propyl}$), 0.86-0.80 (m, 1H, $CH_{2,c-Propyl}$), 0.71-0.60 (m, 2H, $CH_{2,c-Propyl}$).

^{13}C NMR ($CDCl_3$, 100 MHz): δ 176.3 (C2), 169.7 (C1'), 157.4 (C8), 138.1 (C3''), 134.8 (C1'), 133.3 (C5), 131.6 (2C, C3', C5'), 130.8 (2C, C2', C6'), 129.5 (2C, C6, C10), 128.7, 127.6, 127.4, 122.1 (C4'), 114.5 (2C, C7, C9), 66.9 (C11), 65.8 (C1), 43.7 (C2''), 36.5 (C3), 33.5 (C14), 31.2 ($CH_{c-Propyl}$), 30.4 (C4), 29.5 (C12), 28.0 (C13), 10.6 ($CH_{2,c-Propyl}$), 9.3 ($CH_{2,c-Propyl}$).

IR $\tilde{\nu}$ 3252, 3065, 2925, 1642, 1512, 1397, 1246, 1071, 1011, 822, 700 cm^{-1} .

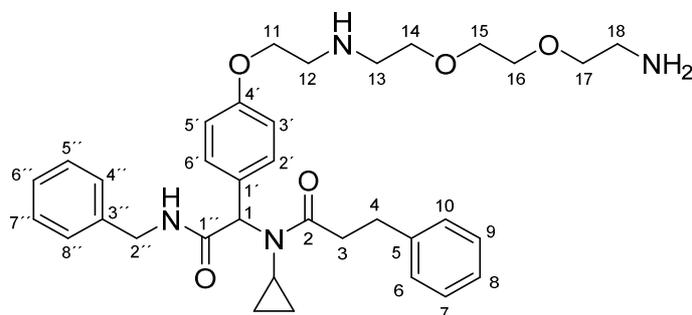
ESI-MS: m/z 642.9 [$M+H^+$].

Smp.: 112-113 °C.

Reinheit: > 99 % (Methode C).

R_f: 0.5 (PE/EtOAc 1/1, DC_{SIL}).

N-(1-(4-(2-((2-(2-(2-Aminoethoxy)ethoxy)ethyl)amino)ethoxy)phenyl)-2-(benzylamino)-2-oxoethyl)-*N*-cyclopropyl-3-phenylpropanamid, (\pm) **41** (AH390)



C₃₅H₄₆N₄O₅
602.78 g/mol

38e (1.00 g, 1.86 mmol) wurde in Gegenwart von K₂CO₃ (516 mg, 3.73 mmol) und 2,2'-(Ethyldioxy)diethylamin (1.36 mL, 9.30 mmol) in abs. CH₃CN (10 mL) für 6 h bei 80 °C in einem verschließbaren Zentrifugenrohr gerührt. Anschließend wurde die Suspension abfiltriert und das Filtrat *in vacuo* eingedunstet. Das Rohprodukt wurde mittels Umkehrphasen-MPLC (H₂O/CH₃CN 9/1 → 0/1) gereinigt und das Produkt als gelbliches Öl (494 mg, 0.82 mmol, 44 %) isoliert.

¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ 7.32-7.18 (m, 12H), 6.86-6.82 (m, 2H, H3', H5'), 6.44 (t, *J*=5.8 Hz, 1H, NH), 5.58 (s, 1H, H1), 4.51-4.39 (m, 2H, H2''), 4.06 (t, *J*=5.3 Hz, 2H, H11), 3.63-3.61 (m, 6H), 3.49 (t, *J*=5.2 Hz, 2H, H17), 3.03-2.99 (m, 4H, H3, H12), 2.95-2.90 (m, 2H, H4), 2.88 (t, *J*=5.2 Hz, 2H, H13), 2.83 (t, *J*=5.2 Hz, 2H, H18), 2.51-2.46 (m, 1H, CH_{c-Propyl}), 0.98-0.92 (m, 1H, CH_{2,c-Propyl}), 0.81-0.74 (m, 1H, CH_{2,c-Propyl}), 0.68-0.56 (m, 2H, CH_{2,c-Propyl}).

¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz): δ 175.9 (C2), 170.3 (C1'), 158.6 (C4'), 141.4 (C5), 138.3 (C3'), 130.6 (2C, C2', C6'), 128.6, 128.5, 128.4, 127.9 (C1'), 127.5, 127.2, 126.0, 114.5 (2C, C3', C5'), 73.5 (C17), 70.7 (C15), 70.4 (C14), 70.2 (C16), 67.5 (C11), 65.9 (C1), 49.2 (C13), 48.7 (C12), 43.6 (C2''), 41.8 (C18), 36.3 (C4), 31.2 (C3), 30.8 (CH_{c-Propyl}), 10.6 (CH_{2,c-Propyl}), 9.5 (CH_{2,c-Propyl}).

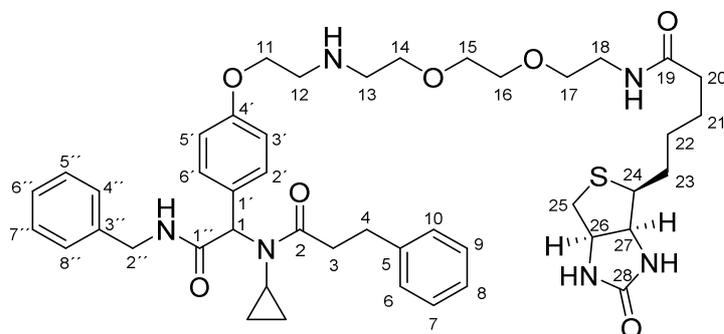
IR $\tilde{\nu}$ 3324, 2869, 1641, 1509, 1240, 1108, 1030, 727 cm⁻¹.

ESI-MS: *m/z* 603.2 [M+H⁺].

Reinheit: > 98 % (Methode C).

R_f: 0.1 (EtOAc/EtOH/NEt₃ 1/1/0.1, DC_{SIL}).

N-(2-(2-(2-((2-(4-(2-(Benzylamino)-1-(*N*-cyclopropyl-3-phenylpropanamido)-2-oxoethyl)phenoxy)ethyl)amino)ethoxy)ethoxy)ethyl)-5-((3*aS*,4*S*,6*aR*)-2-oxohexahydro-1*H*-thieno[3,4-*d*]imidazol-4-yl)pentanamid, (\pm) **42** (AH486)



C₄₅H₆₀N₆O₇S
829.07 g/mol

Zu der Lösung von NHS-Biotin (40.0 mg, 0.12 mmol) in abs. DMF (1.5 mL) wurde die Lösung von **41** (89.0 mg, 0.15 mmol) und DIPEA (50.0 μ L, 0.29 mmol) in abs. DMF (1.5 mL) unter Argonatmosphäre langsam hinzugegeben. Die Reaktionsmischung wurde 16 h bei RT gerührt und anschließend *in vacuo* eingedunstet. Das Produkt wurde direkt mittels Umkehrphasen-MPLC (H₂O/CH₃CN 8/1 \rightarrow 6/4) gereinigt und als farbloser Feststoff (46.0 mg, 0.06 mmol, 40 %) isoliert.

¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ 7.31-7.17 (m, 12 H), 6.83-6.78 (m, 3H, H3', H5', C19-NH), 6.59 (m, 1H, C2''-NH), 6.34 (s, 1H, C26-NH), 5.58 (s, 1H, H1), 5.47 (d, $J=11.6$ Hz, 1H, C27-NH), 4.50-4.38 (m, 3H, H2'', H26), 4.25-4.20 (m, 1H, H27), 4.05 (t, $J=5.1$ Hz, 2H, H11), 3.63-3.60 (m, 6H), 3.54-3.51 (m, 2H), 3.41-3.35 (m, 2H), 3.10-3.06 (m, 1H, H24), 3.02-2.97 (m, 4H), 2.94-2.90 (m, 2H), 2.88-2.81 (m, 3H, H25), 2.67 (d, $J=12.7$ Hz, 1H, H25), 2.50-2.44 (m, 1H, CH_c-Propyl), 2.17 (t, $J=7.8$ Hz, 2H), 1.73-1.55 (m, 4H), 1.42-1.39 (m, 2H), 0.97-0.89 (m, 1H, CH_{2,c}-Propyl), 0.80-0.72 (m, 1H, CH_{2,c}-Propyl), 0.67-0.54 (m, 2H, CH_{2,c}-Propyl).

¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz): δ 176.1 (C2), 173.3 (C19), 170.4 (C1'), 163.9 (C28), 158.5 (C4'), 141.5 (C5), 138.4 (C3''), 130.7 (2C, C2', C6'), 128.6 (2C, C6, C10), 128.5 (2C), 128.1 (C1'), 127.1, 127.3, 126.2, 114.5 (2C, C3', C5'), 70.6, 70.2 (2C), 70.0, 67.5 (C11), 66.0 (C1), 61.8 (C27), 60.2 (C26), 55.6 (C24), 49.2, 48.8 (C12), 43.7 (C2'), 40.5 (C25), 39.2, 36.4, 36.0, 31.3, 30.9 (CH_c-Propyl), 28.2 (2C), 25.6, 10.7 (CH_{2,c}-Propyl), 9.2 (CH_{2,c}-Propyl).

IR $\tilde{\nu}$ 3313, 2925, 1694, 1510, 1454, 1240, 1113, 699, 576 cm⁻¹.

ESI-MS: m/z 829.2 [M+H⁺].

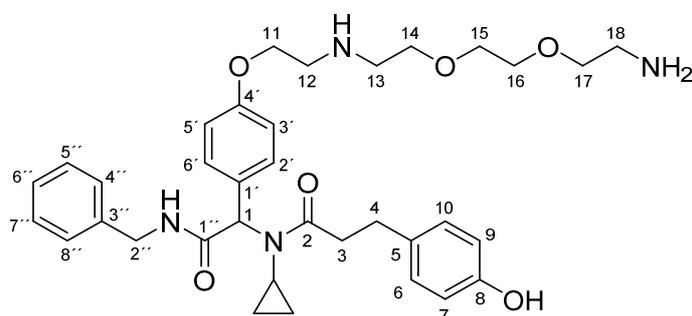
Smp.: 79-81 °C.

Reinheit: > 91 % (Methode **A**).

R_f: 0.1 (CH₂Cl₂/CH₃OH, DC_{SIL}).

Experimenteller Part

N-(1-(4-(2-((2-(2-(2-aminoethoxy)ethoxy)ethyl)amino)ethoxy)phenyl)-2-(benzylamino)-2-oxoethyl)-*N*-cyclopropyl-3-(4-hydroxyphenyl)propanamide, (\pm) **43** (AH483)



C₃₅H₄₆N₄O₆
618.78 g/mol

38g (496 mg, 0.90 mmol) wurde in Gegenwart von K₂CO₃ (149 mg, 1.08 mmol) und 2,2'-(Ethylendioxy)diethylamin (660 μ L, 4.50 mmol) in abs. CH₃CN (4.5 mL) für 3 h bei 80 °C in einem verschließbaren Zentrifugenrohr gerührt. Anschließend wurde die Suspension filtriert und das Filtrat *in vacuo* eingengt. Das Rohprodukt wurde mittels MPLC (EtOAc/EtOH/NEt₃ 1/1/0.1) gereinigt, sodass ein gelbliches Öl (490 mg, 0.79 mmol, 88 %) isoliert wurde.

¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ 7.29-7.19 (m, 5H), 7.03-7.01 (m, 2H, H2', H6'), 6.92-6.90 (m, 2H, H6, H10), 6.75-6.73 (m, 2H, H3', H5'), 6.64-6.60 (m, 3H, H7, H9, C2''-NH), 5.43 (s, 1H, H1), 4.48-4.36 (m, 2H, H2''), 4.10-4.01 (m, 2H, H11), 3.63-3.58 (m, 6H), 3.53-3.51 (m, 2H), 3.00 (t, $J = 5.13$ Hz, 2H, H12), 2.91-2.79 (m, 8H), 2.34-2.29 (m, 1H, CH_{c-Propyl}), 0.94-0.73 (m, 2H, CH_{2,c-Propyl}), 0.69-0.58 (m, 2H, CH_{2,c-Propyl}).

¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz): δ 176.3 (C2), 170.5 (C1'), 158.4 (C4'), 155.7 (C8), 138.3 (C3''), 131.5 (C5), 130.6 (2C, C2', C6'), 129.6 (2C, C6, C10), 128.6, 127.9, 127.6, 127.3 (C1'), 115.4 (2C, C7, C9), 114.4 (2C, C3', C5'), 72.3, 70.4, 70.2, 70.1, 67.2, 66.3 (C1), 49.1, 48.5, 43.7 (C2''), 41.2, 36.0 (C3), 31.3 (CH_{c-Propyl}), 30.5 (C4), 10.3 (CH_{2,c-Propyl}), 9.7 (CH_{2,c-Propyl}).

IR $\tilde{\nu}$ 3300, 2865, 1646, 1510, 1453, 1240, 1100, 1047, 828, 555 cm⁻¹.

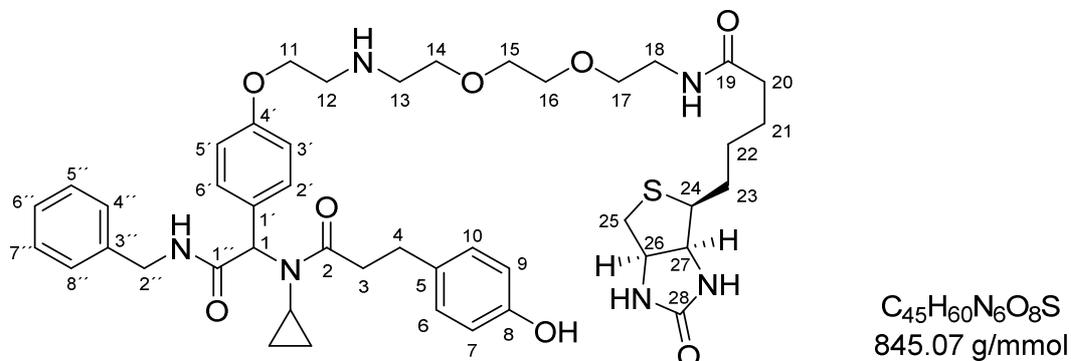
ESI-MS: m/z 619.2 [M+H⁺].

Reinheit: > 93 % (Methode C).

R_f: 0.1 (EtOAc/EtOH/NEt₃ 1/1/0.1, DC_{SIL}).

Experimenteller Part

N-(2-(2-(2-((2-(4-(2-(benzylamino)-1-(*N*-cyclopropyl-3-(4-hydroxyphenyl)propanamido)-2-oxoethyl)phenoxy)ethyl)amino)ethoxy)ethoxy)ethyl)-5-((3*aS*,4*S*,6*aR*)-2-oxohexahydro-1*H*-thieno[3,4-*d*]imidazol-4-yl)pentanamide, (\pm) **44** (AH436)



Zu der Lösung von NHS-Biotin (40.0 mg, 0.12 mmol) in abs. DMF (1.5 mL) wurde die Lösung von **43** (87.0 mg, 0.14 mmol) und DIPEA (52.0 μ L, 0.28 mmol) in abs. DMF (1.5 mL) unter Argonatmosphäre langsam hinzugegeben. Die Reaktionsmischung wurde 24 h bei RT gerührt und anschließend *in vacuo* eingedunstet. Das Rohprodukt wurde direkt mittels Umkehrphasen-MPLC (H_2O/CH_3OH 8/2 \rightarrow 1/9) gereinigt, sodass ein farbloser Feststoff (45.0 mg, 0.05 mmol, 35 %) isoliert wurde.

1H NMR ($CDCl_3$, 400 MHz): δ 7.30-7.19 (m, 5H), 7.07-7.05 (m, 2H, H2', H6'), 6.94-6.84 (m, 4H, H6, H10, C19-NH, C2''-NH), 6.76-6.74 (m, 2H, H3', H5'), 6.67-6.65 (m, 2H, H7, H9), 6.36 (d, $J=5.1$ Hz, 1H, C26-NH), 5.55 (s, 1H, C27-NH), 5.48 (d, $J=3.0$ Hz, 1H, H1), 4.49-4.37 (m, 3H, H2'', H26), 4.20-4.16 (m, 1H, H27), 4.11-4.02 (m, 2H, H11), 3.63-3.48 (m, 8H), 3.40-3.36 (m, 2H), 3.06-2.78 (m, 10H, H25), 2.65-2.62 (m, 1H, H25), 2.36-2.31 (m, 1H, $CH_{c-Propyl}$), 2.16 (t, $J=7.4$ Hz, 2H), 1.68-1.53 (m, 4H), 1.41-1.31 (m, 2H), 0.97-0.88 (m, 1H, $CH_{2,c-Propyl}$), 0.80-0.73 (m, 1H, $CH_{2,c-Propyl}$), 0.69-0.55 (m, 2H, $CH_{2,c-Propyl}$).

^{13}C NMR ($CDCl_3$, 100 MHz): δ 176.4 (C2), 173.8 (C19), 170.5 (C1'), 164.0 (C28), 158.3 (C4'), 155.4 (C8), 138.5 (C3''), 131.8 (C5), 130.7 (2C, C2', C6'), 129.6 (2C, C6, C10), 128.6, 128.1 (C1'), 127.7, 127.3, 115.4 (2C, C7, C9), 114.4 (2C, C3', C5'), 70.2 (2C), 70.1, 70.0, 67.2, 66.3 (C1), 61.9 (C27), 60.2 (C26), 55.6 (C24), 49.1, 48.6, 43.7 (C2''), 40.5 (C25), 39.3, 36.1, 35.9, 31.2 ($CH_{c-Propyl}$), 30.5, 28.3, 28.1, 25.6, 10.3 ($CH_{2,c-Propyl}$), 9.8 ($CH_{2,c-Propyl}$).

IR $\tilde{\nu}$ 3288, 2924, 1686, 1644, 1511, 1453, 1238, 1100, 1029, 828, 576 cm^{-1} .

ESI-MS: m/z 845.2 [$M+H^+$].

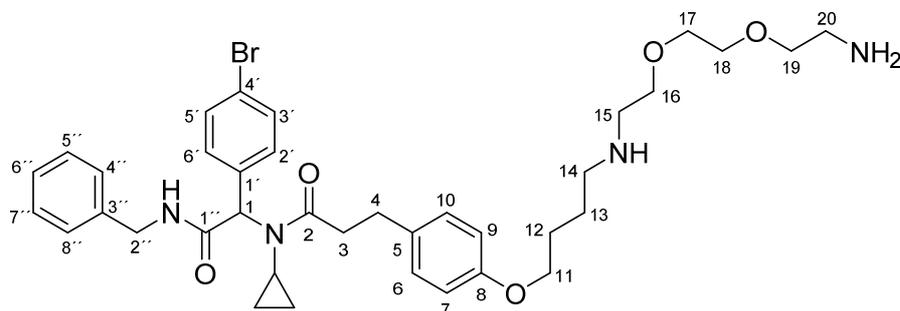
Smp.: 67-69 $^{\circ}C$.

Reinheit: > 92 % (Methode C).

R_f: 0.1 (H_2O/CH_3CN 1/1, DC_{RP}).

Experimenteller Part

3-(4-(4-((2-(2-(2-aminoethoxy)ethoxy)ethyl)amino)butoxy)phenyl)-N-(2-(benzylamino)-1-(4-bromophenyl)-2-oxoethyl)-N-cyclopropylpropanamide, (\pm) **45** (AH494)



$C_{37}H_{49}BrN_4O_5$
709.73 g/mol

39 (600 mg, 0.93 mmol) wurde in Gegenwart von K_2CO_3 (250 mg, 1.80 mmol) und 2,2'-(Ethyldioxy)diethylamin (675 μ L, 4.59 mmol) in abs. CH_3CN (10 mL) für 3 h bei 100 °C in einem verschließbaren Zentrifugenrohr gerührt. Anschließend wurde die Suspension filtriert und das Filtrat *in vacuo* eingengt. Das Rohprodukt wurde direkt mittels MPLC (EtOAc/EtOH/ NEt_3 1/1/0.1) gereinigt, sodass ein gelbliches Öl (465 mg, 0.66 mmol, 71 %) isoliert wurde.

1H NMR ($CDCl_3$, 400 MHz): δ 7.42-7.38 (m, 2H, H3', H5'), 7.32-7.21 (m, 5H), 7.13-7.08 (m, 4H, H6, H10, H2', H6'), 6.79-6.77 (m, 2H, H7, H9), 6.45 (t, $J=5.6$ Hz, 1H, C2''-NH), 5.53 (s, 1H, H1), 4.49-4.37 (m, 2H, H2''), 3.94 (t, $J=6.4$ Hz, 2H, H11), 3.61-3.59 (m, 6H), 3.50 (t, $J=5.2$ Hz, 2H), 2.93-2.84 (m, 6H), 2.81 (t, $J=5.2$ Hz, 2H), 2.69 (t, $J=7.2$ Hz, 2H), 2.49-2.43 (m, 1H, $CH_{2,c-Propyl}$), 1.85-1.78 (m, 2H), 1.71-1.64 (m, 2H), 0.93-0.76 (m, 2H, $CH_{2,c-Propyl}$), 0.69-0.58 (m, 2H, $CH_{2,c-Propyl}$).

^{13}C NMR ($CDCl_3$, 100 MHz): δ 176.4 (C2), 169.7 (C1''), 157.6 (C8), 138.1 (C3''), 134.8 (C1'), 133.1 (C5), 131.7 (2C, C3', C5'), 130.8 (2C, C2', C6'), 129.5 (2C, C6, C10), 128.7, 127.6, 127.5, 122.1 (C4'), 114.6 (2C, C7, C9), 73.4, 70.6, 70.4, 70.3, 67.8 (C11), 66.0 (C1), 49.6, 49.3, 43.8 (C2''), 41.8, 36.5 (C3), 31.3 ($CH_{c-Propyl}$), 30.4 (C4), 27.2, 26.7, 10.7 ($CH_{2,c-Propyl}$), 9.3 ($CH_{2,c-Propyl}$).

IR $\tilde{\nu}$ 3312, 2863, 1647, 1509, 1395, 1239, 1106, 1010, 824, 699, 550 cm^{-1} .

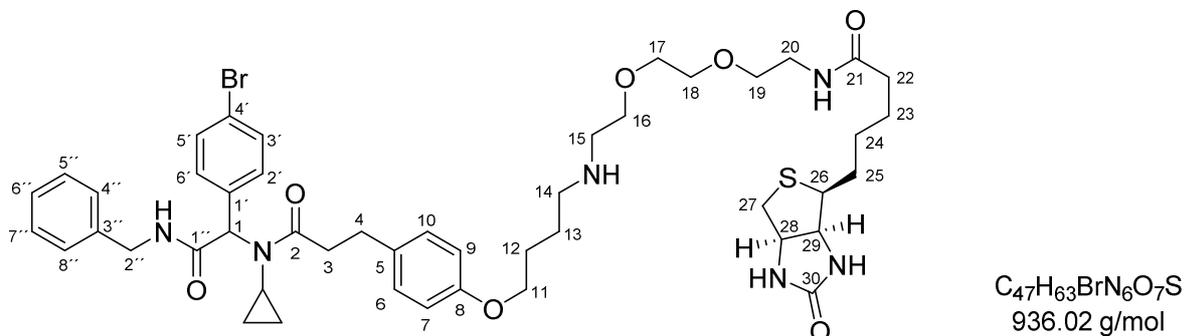
ESI-MS: m/z 355.6 [$M+2H^+$].

Reinheit: > 91 % (Methode C).

R_f: 0.1 (EtOAc/EtOH/ NEt_3 1/1/0.1, DC_{SIL}).

Experimenteller Part

N-(2-(2-(2-((4-(4-(3-((2-(benzylamino)-1-(4-bromophenyl)-2-oxoethyl)(cyclopropyl)amino)-3-oxopropyl)phenoxy)butyl)amino)ethoxy)ethoxy)ethyl)-5-((3*a*S,4*S*,6*a*R)-2-oxohexahydro-1*H*-thieno[3,4-*d*]imidazol-4-yl)pentanamide, (\pm) **46** (AH495)



Zu der Lösung von NHS-Biotin (81.0 mg, 0.23 mmol) in abs. DMF (1.5 mL) wurde die Lösung von **45** (200 mg, 0.28 mmol) und DIPEA (100 μ L, 0.58 mmol) in abs. DMF (1.5 mL) unter Argonatmosphäre langsam hinzugegeben. Die Reaktionsmischung wurde 22 h bei RT gerührt und anschließend *in vacuo* eingedunstet. Das Rohprodukt wurde direkt mittels Umkehrphasen-MPLC (H_2O/CH_3OH 8/2 \rightarrow 1/9) gereinigt, sodass ein farbloser Feststoff (149 mg, 0.16 mmol, 53 %) isoliert wurde.

1H NMR ($CDCl_3$, 400 MHz): δ 7.41-7.39 (m, 2H, H3', H5'), 7.32-7.22 (m, 5H), 7.13-7.08 (m, 4H, H6, H10, H2', H6'), 6.82-6.77 (m, 3H, H7, H9, C21-NH), 6.63 (dt, $J=5.8, 17.7$ Hz, 1H, C2''-NH), 6.27 (d, $J=8.8$ Hz, 1H, C28-NH), 5.58 (s, 1H, H1), 5.38 (d, $J=7.7$ Hz, 1H, C29-NH), 4.49-4.37 (m, 3H, H2'', H28), 4.26-4.23 (m, 1H, H29), 3.94 (t, $J=6.3$ Hz, 2H, H11), 3.60-3.58 (m, 6H), 3.54 (t, $J=4.9$ Hz, 2H), 3.43-3.38 (m, 2H), 3.12-3.08 (m, 1H, H26), 2.93-2.79 (m, 8H, H27), 2.71-2.66 (m, 3H, H27), 2.46-2.41 (m, 1H, $CH_{c-Propyl}$), 2.23-2.16 (m, 2H), 1.85-1.78 (m, 2H), 1.74-1.60 (m, 6H), 1.45-1.37 (m, 2H), 0.94-0.85 (m, 1H, $CH_{2,c-Propyl}$), 0.83-0.76 (m, 1H, $CH_{2,c-Propyl}$), 0.70-0.57 (m, 2H, $CH_{2,c-Propyl}$).

^{13}C NMR ($CDCl_3$, 100 MHz): δ 176.4 (C2), 173.3 (C21), 169.8 (C1''), 163.8 (C30), 157.5 (C8), 138.2 (C3'), 134.9 (C1'), 133.2 (C5), 131.7 (2C, C3', C5'), 130.9 (2C, C2', C6'), 129.5 (2C, C6, C10), 128.7, 127.7, 127.4, 122.1 (C4'), 114.6 (2C, C7, C9), 70.5, 70.2 (2C), 70.1, 67.8 (C11), 65.8 (C1), 61.9 (C29), 60.2 (C28), 55.6 (C26), 49.6, 49.2, 43.8 (C2''), 40.6 (C27), 39.2, 36.4 (C3), 36.0, 31.1 ($CH_{c-Propyl}$), 30.4 (C4), 28.3, 28.2, 27.2, 26.7 (C12), 25.6, 10.7 ($CH_{2,c-Propyl}$), 9.3 ($CH_{2,c-Propyl}$).

IR $\tilde{\nu}$ 3295, 2923, 1696, 1644, 1509, 1239, 1073, 1010, 567 cm^{-1} .

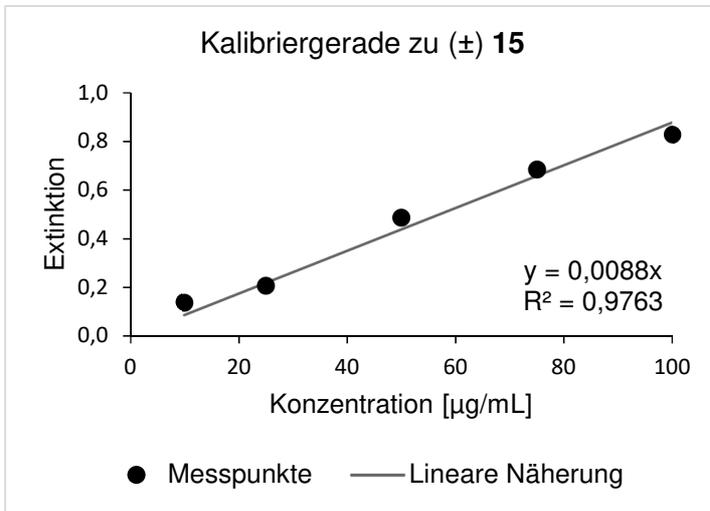
ESI-MS: m/z 937.5 [$M+H^+$].

Reinheit: > 89 % (Methode A).

R_f: 0.1 (H_2O/CH_3OH 1/3, DC_{RP}).

10 Anhang

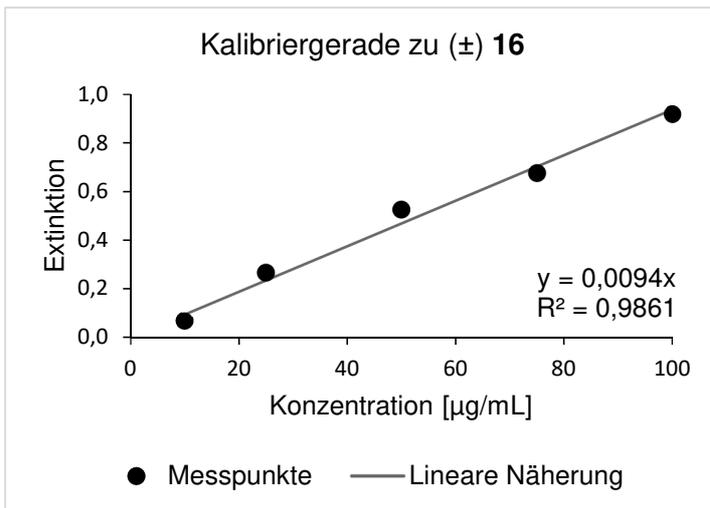
10.1 Kalibriergeraden von (±) 6a, (±) 15, (±) 16



Gesättigte Lösung (±) 15:

$$E = y = 0.189$$

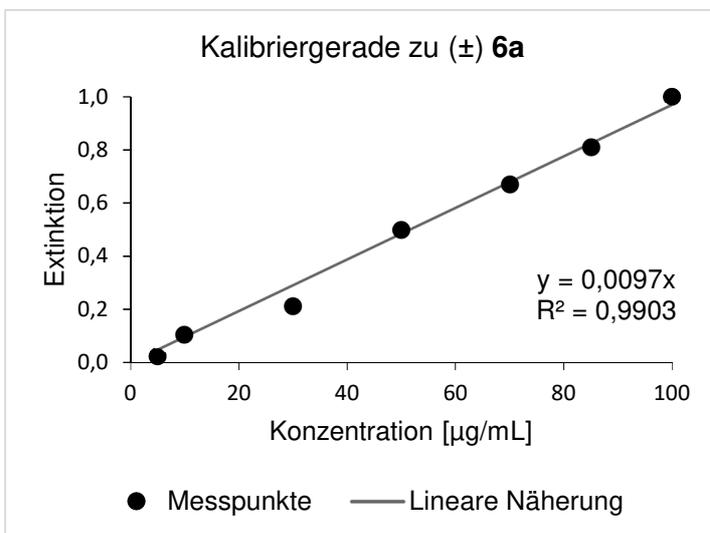
Verdünnungsfaktor $f_V = 100$



Gesättigte Lösung (±) 16:

$$E = y = 0.195$$

Verdünnungsfaktor $f_V = 100$



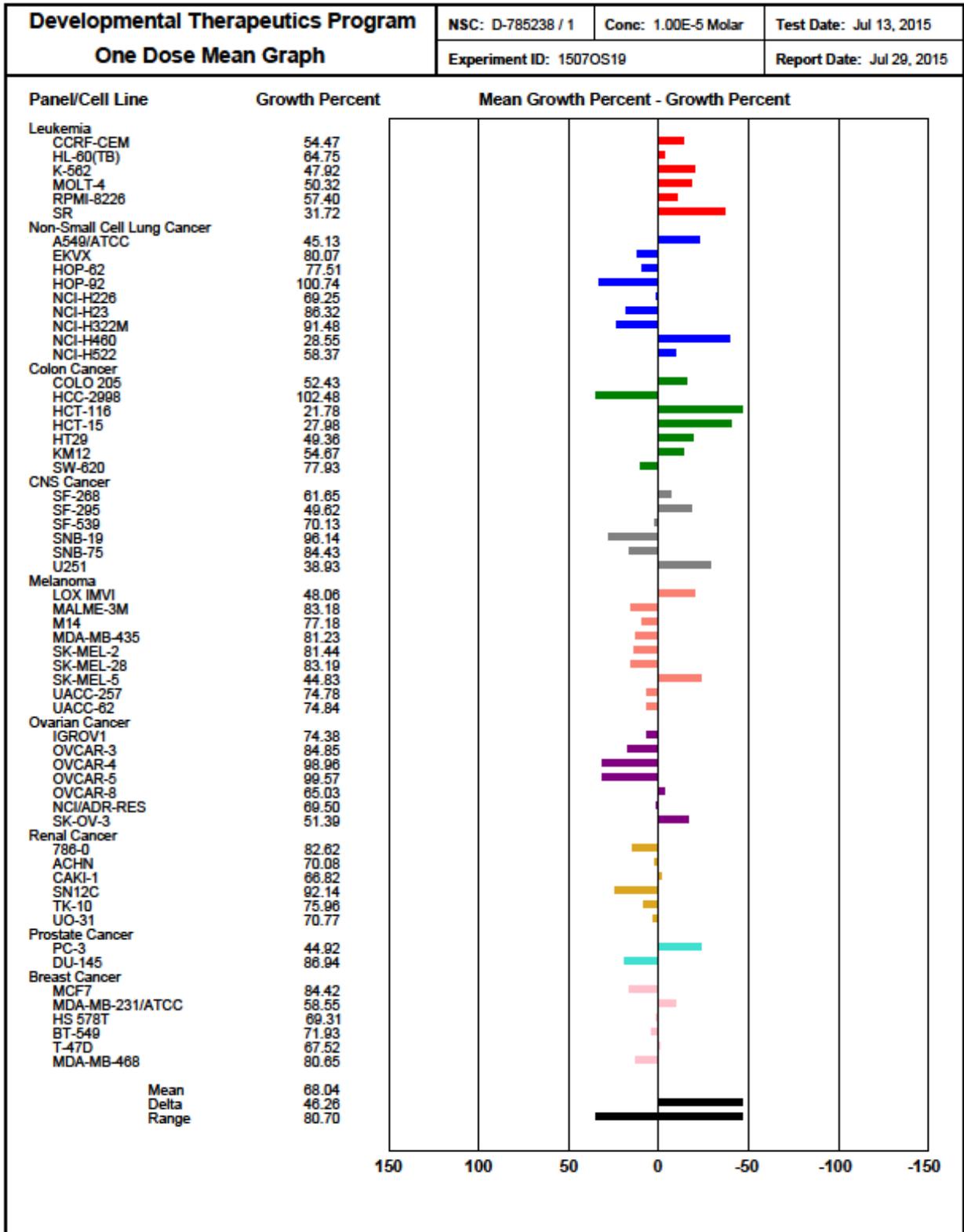
Gesättigte Lösung (±) 6a:

$$E = y = 0.823$$

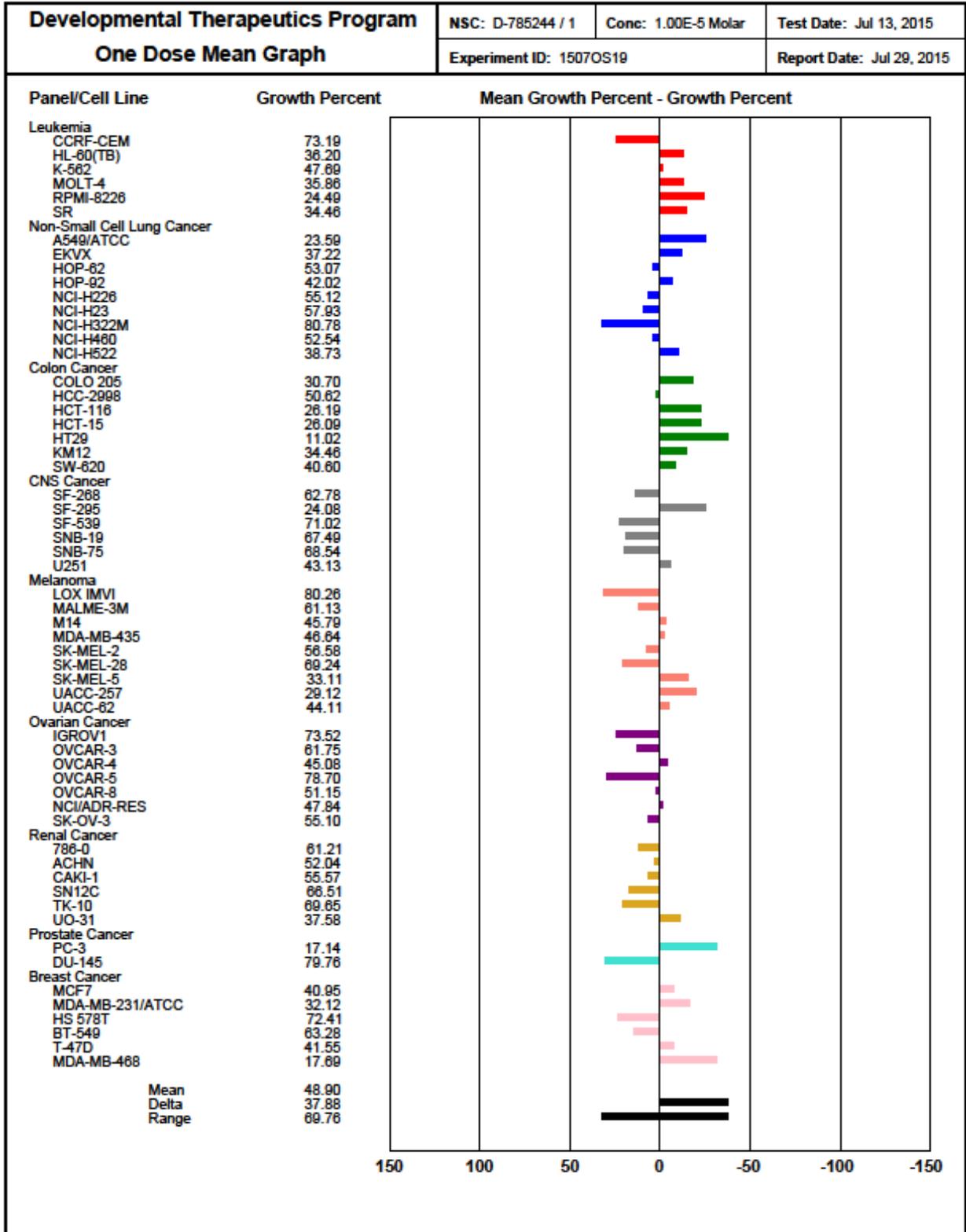
Verdünnungsfaktor $f_V = 100$

10.2 NCI-Datenblätter

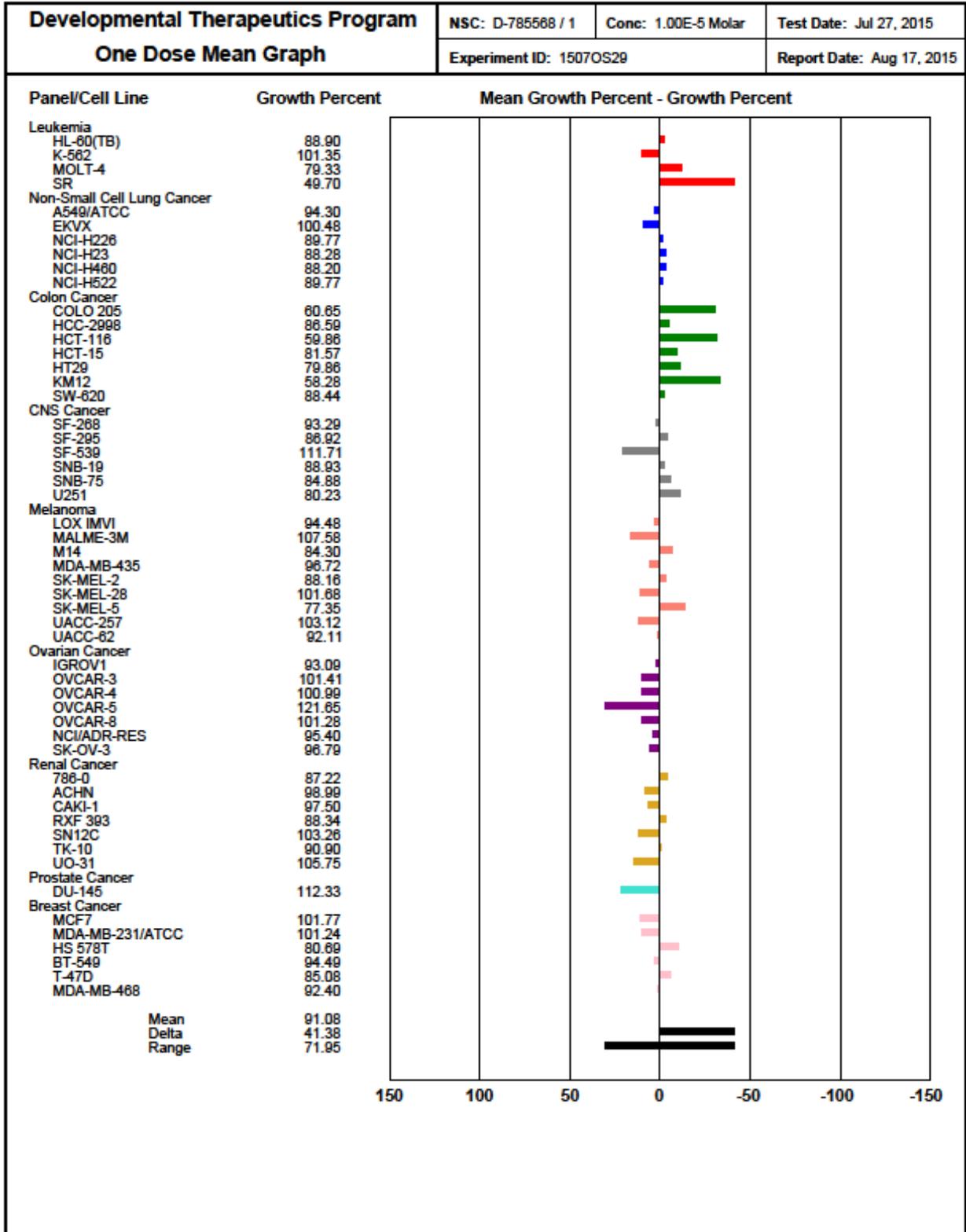
10.2.1 AH083t



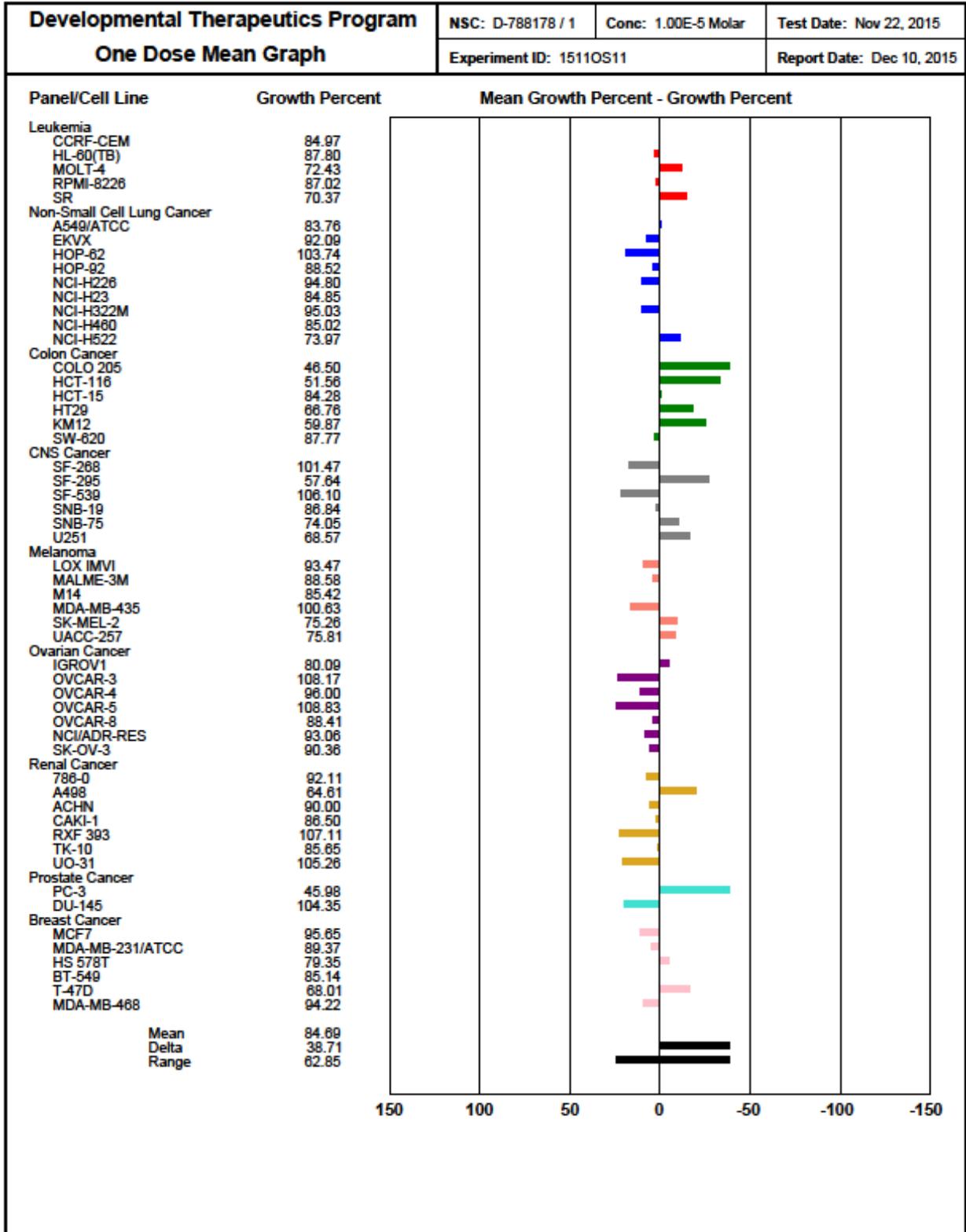
10.2.2 AH100t



10.2.3 AH122t

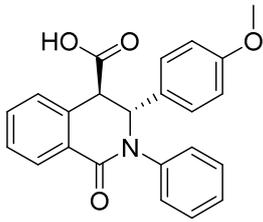


10.2.4 AH316

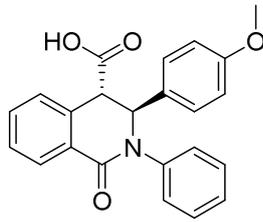


10.3 Übersicht der Substanzendstufen

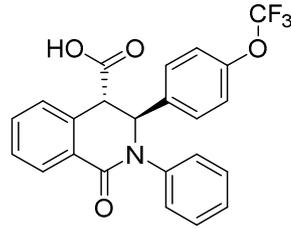
10.3.1 3,4-Dihydroisochinolin-1(2H)-on-Derivate



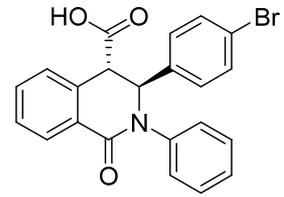
3R,4R-6a
(3R,4R-AH203)
EC₅₀: 1.52 μM



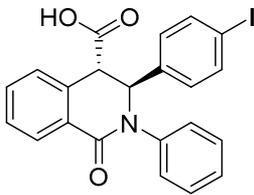
3S,4S-6a
(3S,4S-AH203)
EC₅₀: > 50 μM



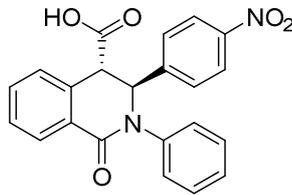
(±) 6b
(AH417)
EC₅₀: 0.85 μM



(±) 6c
(AHFG06)
EC₅₀: 0.17 μM



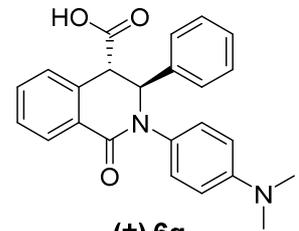
(±) 6d
(AH316)
EC₅₀: > 50 μM



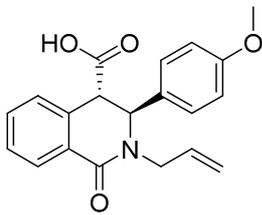
(±) 6e
(AH423)
EC₅₀: 10.8 μM



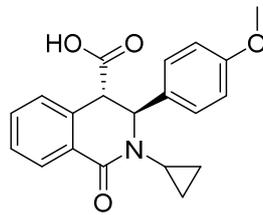
(±) 6f
(AHFG19)
EC₅₀: 1.10 μM



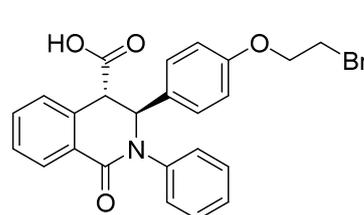
(±) 6g
(AHLL04)
EC₅₀: > 50 μM



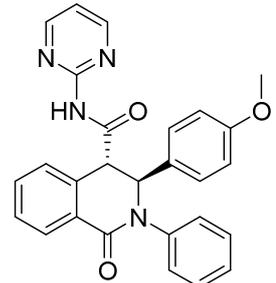
(±) 6h
(AHLL08)
EC₅₀: > 100 μM



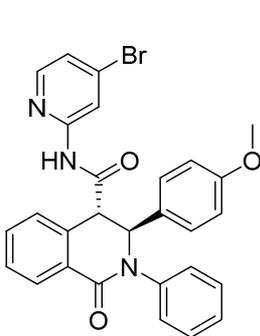
(±) 6i
(AHLL07)
EC₅₀: > 100 μM



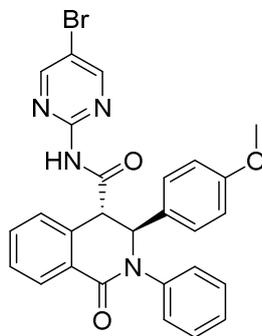
(±) 6j
(AH463)
EC₅₀: 0.18 μM



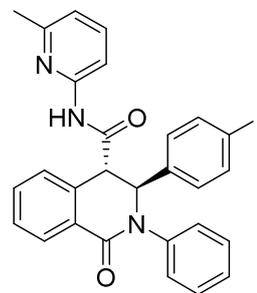
(±) 7a
(AH122t)
EC₅₀: 0.20 μM



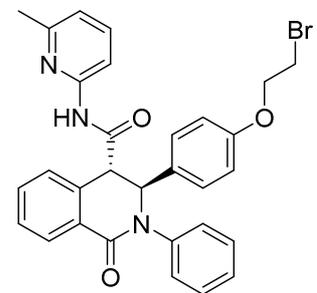
(±) 7b
(AH313)
EC₅₀: 0.79 μM



(±) 7c
(AH448)
EC₅₀: 0.47 μM

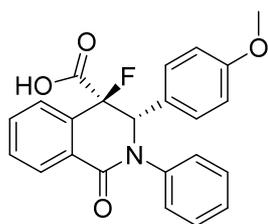


(±) 7d
(AHLL13)
EC₅₀: 34.8 nM

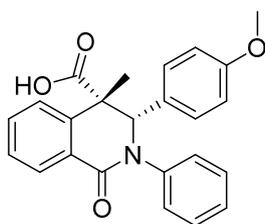


(±) 7e
(AH468)
EC₅₀: 43.7 μM

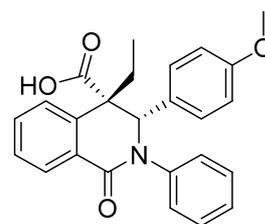
Anhang



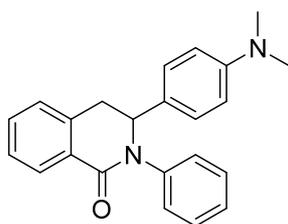
(±) 11
(AHLLM10)
EC₅₀: > 100 μM



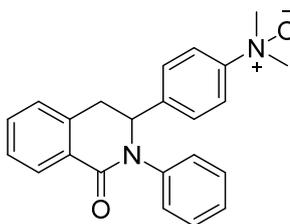
(±) 15
(AHLLM11)
EC₅₀: > 100 μM



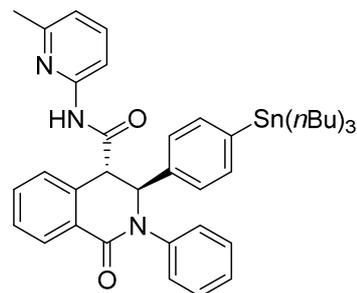
(±) 16
(AHLLM13)
EC₅₀: > 100 μM



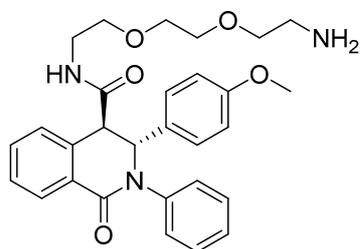
17
(AH455)
EC₅₀: 0.58 μM



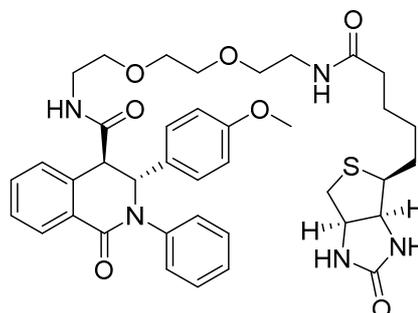
18
(AH458)
EC₅₀: 2.00 μM



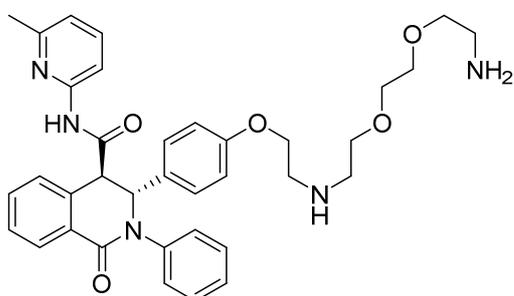
(±) 19
(AHLL12)



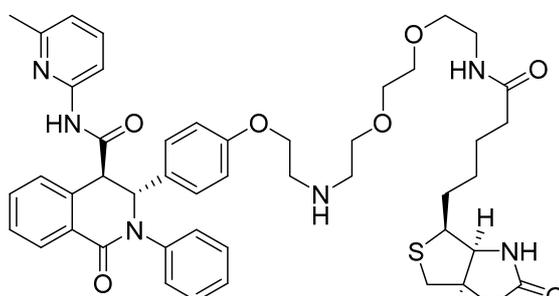
(±) 22
(AH484)



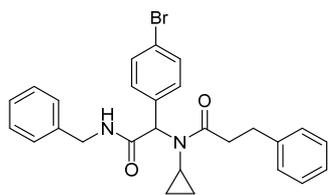
(±) 23
(AH487)



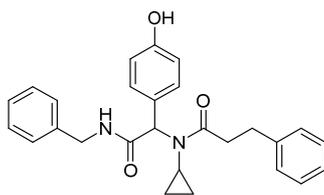
(±) 24
(AH489)



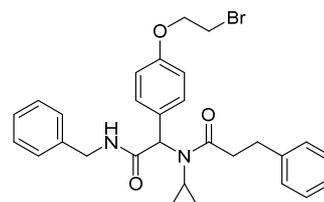
(±) 25
(AH493)

10.3.2 α -Acylaminocarboxamid-Derivate

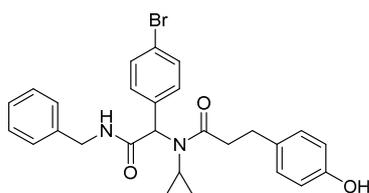
(±) 38c
(AH367)



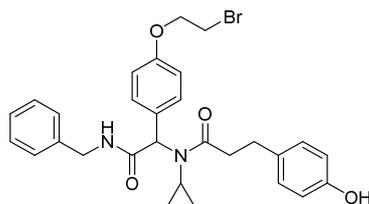
(±) 38d
(AH382)



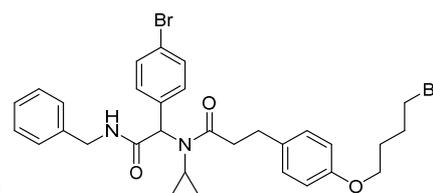
(±) 38e
(AH389)



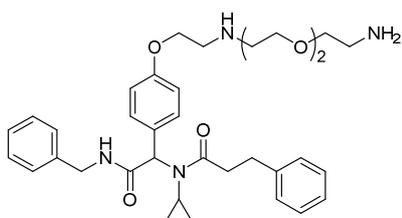
(±) 38f
(AH404)



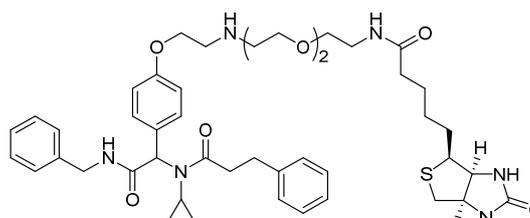
(±) 38g
(AH425)



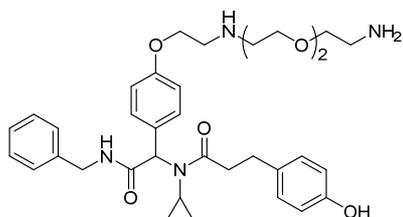
(±) 39
(AH407)



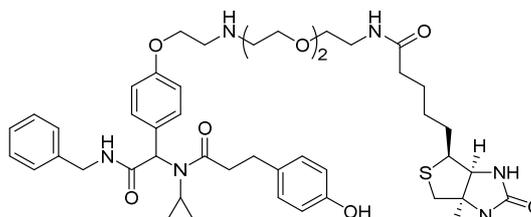
(±) 41
(AH390)



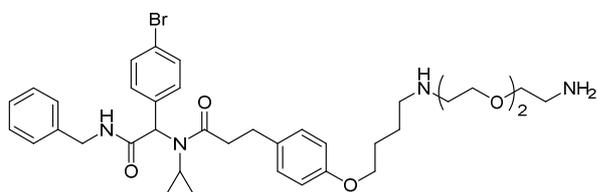
(±) 42
(AH486)



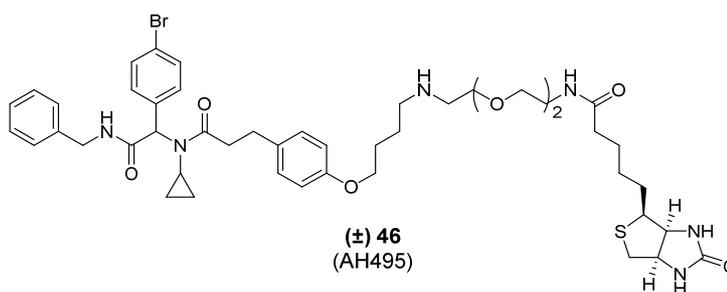
(±) 43
(AH483)



(±) 44
(AH436)



(±) 45
(AH494)



(±) 46
(AH495)

11 Referenzen

1. World Health Organization. <http://www.who.int/features/factfiles/cancer/en/> (abgerufen am 4. November, 2016).
2. Torre, L.; Siegel, R.; Jemal, A. *Global Cancer Facts & Figures*; American Cancer Society: Atlanta, 2015.
3. Kaatsch, P.; Spix, C.; Katalinic, A.; Hentschel, S.; Luttmann, S.; Stegmaier, C.; Caspritz, S.; Christ, M.; Ernst, A.; Folkerts, J.; Hansmann, J.; Klein, S.; Kranzhöfer, K.; Kunz, B.; Manegold, K.; Penzkofer, A.; Treml, K.; Weg-Remers, S.; Wittenberg, K. *Krebs in Deutschland 2011/2012*; Robert Koch-Institut: Berlin, 2015.
4. Bertz, J.; Dahm, S.; Haberland, J.; Kraywinkel, K.; Kurth, B.-M.; Wolf, U. *Verbreitung von Krebserkrankungen in Deutschland. Entwicklung der Prävalenz zwischen 1990 und 2010*; Robert Koch-Institut: Berlin, 2010.
5. Luengo-Fernandez, R.; Leal, J.; Gray, A.; Sullivan, R. Economic burden of cancer across the European Union: a population-based cost analysis. *Lancet Oncol.* **2013**, *14* (12), 1165-1174.
6. Chabner, B. A.; Roberts, T. G., Jr. Timeline: Chemotherapy and the war on cancer. *Nat. Rev. Cancer* **2005**, *5* (1), 65-72.
7. Workman, P. Genomics and the second golden era of cancer drug development. *Mol. Biosyst.* **2005**, *1* (1), 17-26.
8. Varmus, H. The new era in cancer research. *Science* **2006**, *312* (5777), 1162-1165.
9. *Deutsche Gesellschaft für Hämatologie und Medizinische Onkologie e.V.. Multiples Myelom. Leitlinie.*; Berlin, 2013.
10. Graham-Rowe, D. Overview: Multiple lines of attack. *Nature* **2011**, *480* (7377), S34-35.
11. Raab, M. S.; Podar, K.; Breitkreutz, I.; Richardson, P. G.; Anderson, K. C. Multiple myeloma. *Lancet* **2009**, *374* (9686), 324-339.
12. Graber, C. Aetiology: The path to disease. *Nature* **2011**, *480* (7377), S54-55.
13. Kuppers, R. Mechanisms of B-cell lymphoma pathogenesis. *Nat. Rev. Cancer* **2005**, *5* (4), 251-262.
14. Saltarella, I.; Lamanuzzi, A.; Reale, A.; Vacca, A.; Ria, R. Identify multiple myeloma stem cells: Utopia? *World J. Stem Cells* **2015**, *7* (1), 84-95.
15. Podar, K.; Chauhan, D.; Anderson, K. C. Bone marrow microenvironment and the identification of new targets for myeloma therapy. *Leukemia* **2009**, *23* (1), 10-24.
16. Chatterjee, M.; Jain, S.; Stuhmer, T.; Andrulis, M.; Ungethum, U.; Kuban, R. J.; Lorentz, H.; Bommert, K.; Topp, M.; Kramer, D.; Muller-Hermelink, H. K.; Einsele, H.; Greiner, A.; Bargou, R. C. STAT3 and MAPK signaling maintain overexpression of heat shock proteins 90alpha and beta in multiple myeloma cells, which critically contribute to tumor-cell survival. *Blood* **2007**, *109* (2), 720-728.

Referenzen

17. Tu, Y.; Gardner, A.; Lichtenstein, A. The Phosphatidylinositol 3-Kinase/AKT Kinase Pathway in Multiple Myeloma Plasma Cells: Roles in Cytokine-dependent Survival and Proliferative Responses. *Cancer Res.* **2000**, *60*, 6763-6770.
18. Osterborg, A.; Bjorkholm, M.; Bjoreman, M.; Brenning, G.; Carlson, K.; Celsing, F.; Gahrton, G.; Grimfors, G.; Gyllenhammar, H.; Hast, R.; Johansson, B; Juliusson, G; Jarnmark, M; Kimby, E; Lerner, R; Linder, O; Merk, K; Nilsson, B; Ohrling, M; Paul, C; Simonsson, B; Smedmyr, B; Svedmyr, E; Stalfelt, A; Strander, H; Uden, A; Osby, E; Mellstedt, H. Natural interferon-alpha in combination with melphalan/prednisone versus melphalan/prednisone in the treatment of multiple myeloma stages II and III: a randomized study from the Myeloma Group of Central Sweden. *Blood* **1993**, *81* (6), 1428-1434.
19. D'Amato, R. J.; Loughnan, M. S.; Flynn, E.; Folkman, J. Thalidomide is an inhibitor of angiogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1994**, *91* (9), 4082-4085.
20. Dimopoulos, M.; Spencer, A.; Attal, M.; Prince, H. M.; Harousseau, J. L.; Dmoszynska, A.; San Miguel, J.; Hellmann, A.; Facon, T.; Foa, R.; Corso, A.; Masliak, Z.; Olesnyckyj, M.; Yu, Z.; Patin, J.; Zeldis, J. B.; Knight, R. D.; Multiple Myeloma Study, I. Lenalidomide plus dexamethasone for relapsed or refractory multiple myeloma. *N. Engl. J. Med.* **2007**, *357* (21), 2123-2132.
21. Appel, A. Drugs: More shots on target. *Nature* **2011**, *480* (7377), S40-42.
22. Miguel, J. S.; Weisel, K.; Moreau, P.; Lacy, M.; Song, K.; Delforge, M.; Karlin, L.; Goldschmidt, H.; Banos, A.; Oriol, A.; Alegre, A.; Chen, C.; Cavo, M.; Garderet, L.; Ivanova, V.; Martinez-Lopez, J.; Belch, A.; Palumbo, A.; Schey, S.; Sonneveld, P.; Yu, X.; Sternas, L.; Jacques, C.; Zaki, M.; Dimopoulos, M. Pomalidomide plus low-dose dexamethasone versus high-dose dexamethasone alone for patients with relapsed and refractory multiple myeloma (MM-003): a randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet Oncol.* **2013**, *14* (11), 1055-1066.
23. Paramore, A.; Frantz, S. Bortezomib. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2003**, *2* (8), 611-612.
24. Das, M. Carfilzomib therapy improves quality of life in multiple myeloma. *Lancet Oncol.* **2016**, *17* (10), e427.
25. US Food and Drug Administration. Daratumumab injection. <http://www.fda.gov/Drugs/InformationOnDrugs/ApprovedDrugs/ucm472904.htm> (abgerufen am 17. October, 2016).
26. Lokhorst, H. M.; Plesner, T.; Laubach, J. P.; Nahi, H.; Gimsing, P.; Hansson, M.; Minnema, M. C.; Lassen, U.; Krejcik, J.; Palumbo, A.; van de Donk, N. W.; Ahmadi, T.; Khan, I.; Uhlar, C. M.; Wang, J.; Sasser, A. K.; Losic, N.; Lisby, S.; Basse, L.; Brun, N.; Richardson, P. G. Targeting CD38 with Daratumumab Monotherapy in Multiple Myeloma. *N. Engl. J. Med.* **2015**, *373* (13), 1207-1219.
27. Malavasi, F.; Deaglio, S.; Funaro, A.; Ferrero, E.; Horenstein, A. L.; Ortolan, E.; Vaisitti, T.; Aydin, S. Evolution and function of the ADP ribosyl cyclase/CD38 gene family in physiology and pathology. *Physiol. Rev.* **2008**, *88* (3), 841-886.

Referenzen

28. US Food and Drug Administration. Elotuzumab.
<http://www.fda.gov/Drugs/InformationOnDrugs/ApprovedDrugs/ucm474719.htm> (abgerufen am 17. October, 2016).
29. Lonial, S.; Dimopoulos, M.; Palumbo, A.; White, D.; Grosicki, S.; Spicka, I.; Walter-Croneck, A.; Moreau, P.; Mateos, M. V.; Magen, H.; Belch, A.; Reece, D.; Beksac, M.; Spencer, A.; Oakervee, H.; Orłowski, R. Z.; Taniwaki, M.; Rollig, C.; Einsele, H.; Wu, K. L.; Singhal, A.; San-Miguel, J.; Matsumoto, M.; Katz, J.; Bleickardt, E.; Poulart, V.; Anderson, K. C.; Richardson, P.; Investigators, E.-. Elotuzumab Therapy for Relapsed or Refractory Multiple Myeloma. *N. Engl. J. Med.* **2015**, *373* (7), 621-631.
30. European Medicines Agency. First HDAC inhibitor for treatment of multiple myeloma recommended for approval in EU. EMA/CHMP/423123/2015., London, UK, 2015.
31. San-Miguel, J. F.; Hungria, V. T.; Yoon, S. S.; Beksac, M.; Dimopoulos, M. A.; Elghandour, A.; Jedrzejczak, W. W.; Gunther, A.; Nakorn, T. N.; Siritanaratkul, N.; Corradini, P.; Chuncharunee, S.; Lee, J. J.; Schlossman, R. L.; Shelekhova, T.; Yong, K.; Tan, D.; Numbenjapon, T.; Cavenagh, J. D.; Hou, J.; LeBlanc, R.; Nahi, H.; Qiu, L.; Salwender, H.; Pulini, S.; Moreau, P.; Warzocha, K.; White, D.; Blade, J.; Chen, W.; de la Rubia, J.; Gimsing, P.; Lonial, S.; Kaufman, J. L.; Ocio, E. M.; Veskovski, L.; Sohn, S. K.; Wang, M. C.; Lee, J. H.; Einsele, H.; Sopala, M.; Corrado, C.; Bengoudifa, B. R.; Binlich, F.; Richardson, P. G. Panobinostat plus bortezomib and dexamethasone versus placebo plus bortezomib and dexamethasone in patients with relapsed or relapsed and refractory multiple myeloma: a multicentre, randomised, double-blind phase 3 trial. *Lancet Oncol.* **2014**, *15* (11), 1195-1206.
32. Delude, C. Tumorigenesis: Testing ground for cancer stem cells. *Nature* **2011**, *480* (7377), S43-45.
33. Chatterjee, M.; Andrulis, M.; Stuhmer, T.; Muller, E.; Hofmann, C.; Steinbrunn, T.; Heimberger, T.; Schraud, H.; Kressmann, S.; Einsele, H.; Bargou, R. C. The PI3K/Akt signaling pathway regulates the expression of Hsp70, which critically contributes to Hsp90-chaperone function and tumor cell survival in multiple myeloma. *Haematologica* **2013**, *98* (7), 1132-1141.
34. Landriscina, M.; Amoroso, M. R.; Piscazzi, A.; Esposito, F. Heat shock proteins, cell survival and drug resistance: the mitochondrial chaperone TRAP1, a potential novel target for ovarian cancer therapy. *Gynecol. Oncol.* **2010**, *117* (2), 177-182.
35. Ciocca, D. R.; Arrigo, A. P.; Calderwood, S. K. Heat shock proteins and heat shock factor 1 in carcinogenesis and tumor development: an update. *Arch. Toxicol.* **2013**, *87* (1), 19-48.
36. Voet, D.; Voet, J. G.; Pratt, C. W., *Fundamental of Biochemistry*. John Wiley & Sons: USA, **1998**.
37. Taldone, T.; Ochiana, S. O.; Patel, P. D.; Chiosis, G. Selective targeting of the stress chaperome as a therapeutic strategy. *Trends Pharmacol. Sci.* **2014**, *35* (11), 592-603.
38. Richardson, P. G.; Chanan-Khan, A. A.; Alsina, M.; Albitar, M.; Berman, D.; Messina, M.; Mitsiades, C. S.; Anderson, K. C. Tanespimycin monotherapy in relapsed multiple myeloma: results of a phase 1 dose-escalation study. *Br. J. Haematol.* **2010**, *150* (4), 438-445.

Referenzen

39. Stuhmer, T.; Zollinger, A.; Siegmund, D.; Chatterjee, M.; Grella, E.; Knop, S.; Kortum, M.; Unzicker, C.; Jensen, M. R.; Quadt, C.; Chene, P.; Schoepfer, J.; Garcia-Echeverria, C.; Einsele, H.; Wajant, H.; Bargou, R. C. Signalling profile and antitumour activity of the novel Hsp90 inhibitor NVP-AUY922 in multiple myeloma. *Leukemia* **2008**, *22* (8), 1604-1612.
40. Stuhmer, T.; Chatterjee, M.; Grella, E.; Seggewiss, R.; Langer, C.; Muller, S.; Schoepfer, J.; Garcia-Echeverria, C.; Quadt, C.; Jensen, M. R.; Einsele, H.; Bargou, R. C. Anti-myeloma activity of the novel 2-aminothienopyrimidine Hsp90 inhibitor NVP-BEP800. *Br. J. Haematol.* **2009**, *147* (3), 319-327.
41. Powers, M. V.; Clarke, P. A.; Workman, P. Dual targeting of HSC70 and HSP72 inhibits HSP90 function and induces tumor-specific apoptosis. *Cancer Cell* **2008**, *14* (3), 250-262.
42. Powers, M. V.; Jones, K.; Barillari, C.; Westwood, I.; van Montfort, R. L.; Workman, P. Targeting HSP70: the second potentially druggable heat shock protein and molecular chaperone? *Cell Cycle* **2010**, *9* (8), 1542-1550.
43. Bertelsen, E. B.; Chang, L.; Gestwicki, J. E.; Zuiderweg, E. R. Solution conformation of wild-type E. coli Hsp70 (DnaK) chaperone complexed with ADP and substrate. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2009**, *106* (21), 8471-8476.
44. Swain, J. F.; Dinler, G.; Sivendran, R.; Montgomery, D. L.; Stotz, M.; Gierasch, L. M. Hsp70 chaperone ligands control domain association via an allosteric mechanism mediated by the interdomain linker. *Mol. Cell* **2007**, *26* (1), 27-39.
45. Kumar, S.; Stokes, J., 3rd; Singh, U. P.; Scissum Gunn, K.; Acharya, A.; Manne, U.; Mishra, M. Targeting Hsp70: A possible therapy for cancer. *Cancer Lett.* **2016**, *374* (1), 156-166.
46. Cho, H. J.; Gee, H. Y.; Baek, K. H.; Ko, S. K.; Park, J. M.; Lee, H.; Kim, N. D.; Lee, M. G.; Shin, I. A small molecule that binds to an ATPase domain of Hsc70 promotes membrane trafficking of mutant cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133* (50), 20267-20276.
47. Evans, L. E.; Cheeseman, M. D.; Yahya, N.; Jones, K. Investigating Apoptozole as a Chemical Probe for HSP70 Inhibition. *PLoS One* **2015**, *10* (10), e0140006.
48. Leu, J. I.; Pimkina, J.; Frank, A.; Murphy, M. E.; George, D. L. A small molecule inhibitor of inducible heat shock protein 70. *Mol. Cell* **2009**, *36* (1), 15-27.
49. Leu, J. I.; Zhang, P.; Murphy, M. E.; Marmorstein, R.; George, D. L. Structural basis for the inhibition of HSP70 and DnaK chaperones by small-molecule targeting of a C-terminal allosteric pocket. *ACS Chem. Biol.* **2014**, *9* (11), 2508-2516.
50. Schlecht, R.; Scholz, S. R.; Dahmen, H.; Wegener, A.; Sirrenberg, C.; Musil, D.; Bomke, J.; Eggenweiler, H. M.; Mayer, M. P.; Bukau, B. Functional analysis of Hsp70 inhibitors. *PLoS One* **2013**, *8* (11), e78443.
51. Propper, D. J.; Braybrooke, J. P.; Taylor, D. J.; Lodi, R.; Styles, P.; Cramer, J. A.; Collins, W. C. J.; Levitt, N. C.; Talbot, D. C.; Ganesan, T. S.; Harris, A. L. Phase I trial of the selective mitochondrial toxin MKT 077 in chemo-resistant solid tumours. *Ann. Oncol.* **1999**, *10* (8), 923-927.

Referenzen

52. Wen, W.; Liu, W.; Shao, Y.; Chen, L. VER-155008, a small molecule inhibitor of HSP70 with potent anti-cancer activity on lung cancer cell lines. *Exp. Biol. Med.* **2014**, *239* (5), 638-645.
53. Gragerov, A.; Zeng, L.; Zhao, X.; Burkholder, W.; Gottesman, M. E. Specificity of DnaK-peptide binding. *J. Mol. Biol.* **1994**, *235* (3), 848-854.
54. Kityk, R.; Kopp, J.; Sinning, I.; Mayer, M. P. Structure and dynamics of the ATP-bound open conformation of Hsp70 chaperones. *Mol. Cell* **2012**, *48* (6), 863-874.
55. Jiang, J.; Prasad, K.; Lafer, E. M.; Sousa, R. Structural basis of interdomain communication in the Hsc70 chaperone. *Mol. Cell* **2005**, *20* (4), 513-524.
56. Zilian, D. T. Neuartige, empirische Scoring-Modelle für Protein-Ligand-Komplexe und computergestützte Entwicklung von Hsp70-Inhibitoren. Julius-Maximilians-Universität Würzburg, **2014**.
57. Hartung, A. W. Entwicklung neuartiger pharmakologischer Wirkstoffe als Inhibitoren des HSF-1/HSP70-Systems zur Behandlung des Multiplen Myeloms. Dissertation, Julius-Maximilians-Universität Würzburg, **2013**.
58. Calderwood, S. K.; Khaleque, M. A.; Sawyer, D. B.; Ciocca, D. R. Heat shock proteins in cancer: chaperones of tumorigenesis. *Trends Biochem. Sci.* **2006**, *31* (3), 164-172.
59. Heimberger, T.; Andrulis, M.; Riedel, S.; Stuhmer, T.; Schraud, H.; Beilhack, A.; Bumm, T.; Bogen, B.; Einsele, H.; Bargou, R. C.; Chatterjee, M. The heat shock transcription factor 1 as a potential new therapeutic target in multiple myeloma. *Br. J. Haematol.* **2013**, *160* (4), 465-476.
60. Whitesell, L.; Lindquist, S. Inhibiting the transcription factor HSF1 as an anticancer strategy. *Expert Opin. Ther. Targets* **2009**, *13* (4), 469-478.
61. Shah, S. P.; Lonial, S.; Boise, L. H. When Cancer Fights Back: Multiple Myeloma, Proteasome Inhibition, and the Heat-Shock Response. *Mol. Cancer Res.* **2015**, *13* (8), 1163-1173.
62. Billy, E. d.; Powers, M. V.; Smith, J. R.; Workman, P. Druggin the heat shock factor 1 pathway. *Cell cycle* **2009**, *8* (23), 3806-3808.
63. De Thonel, A.; Mezger, V.; Garrido, C. Implication of heat shock factors in tumorigenesis: therapeutical potential. *Cancers (Basel)* **2011**, *3* (1), 1158-1181.
64. Hosokawa, N.; Hirayoshi, K.; Nakai, A.; Hosokawa, Y.; Marui, N.; Yoshida, M.; Sakai, T.; Nishino, H.; Aoike, A.; Kawai, K.; Nagata, K. Flavonoids inhibit the expression of heat shock proteins. *Cell Struct. Funct.* **1990**, *15* (6), 393-401.
65. Akagawa, H.; Takano, Y.; Ishii, A.; Mizuno, S. Stresgenin B, an Inhibitor of Heat-induced Heat Shock Protein Gene Expression, Produced by *Streptomyces* sp. AS-9. *J. Antibiot.* **1999**, *52*, 960-970.
66. Westerheide, S. D.; Kawahara, T. L.; Orton, K.; Morimoto, R. I. Triptolide, an inhibitor of the human heat shock response that enhances stress-induced cell death. *J. Biol. Chem.* **2006**, *281* (14), 9616-9622.

Referenzen

67. Zaarur, N.; Gabai, V. L.; Porco, J. A., Jr.; Calderwood, S.; Sherman, M. Y. Targeting heat shock response to sensitize cancer cells to proteasome and Hsp90 inhibitors. *Cancer Res.* **2006**, *66* (3), 1783-1791.
68. Yokota, S.; Kitahara, M.; Nagata, K. Benzylidene lactam compound, KNK437, a novel inhibitor of acquisition of thermotolerance and heat shock protein induction in human colon carcinoma cells. *Cancer Res.* **2000**, *60* (11), 2942-2948.
69. Santagata, S.; Xu, Y. M.; Wijeratne, E. M.; Kontnik, R.; Rooney, C.; Perley, C. C.; Kwon, H.; Clardy, J.; Kesari, S.; Whitesell, L.; Lindquist, S.; Gunatilaka, A. A. Using the heat-shock response to discover anticancer compounds that target protein homeostasis. *ACS Chem. Biol.* **2012**, *7* (2), 340-349.
70. Yoon, Y. J.; Kim, J. A.; Shin, K. D.; Shin, D. S.; Han, Y. M.; Lee, Y. J.; Lee, J. S.; Kwon, B. M.; Han, D. C. KRIBB11 inhibits HSP70 synthesis through inhibition of heat shock factor 1 function by impairing the recruitment of positive transcription elongation factor b to the hsp70 promoter. *J. Biol. Chem.* **2011**, *286* (3), 1737-1747.
71. Cheeseman, M. D.; Chessum, N. E.; Rye, C. S.; Pasqua, A. E.; Tucker, M. J.; Wilding, B.; Evans, L. E.; Lepri, S.; Richards, M.; Sharp, S. Y.; Ali, S.; Rowlands, M.; O'Fee, L.; Miah, A.; Hayes, A.; Henley, A. T.; Powers, M.; Te Poele, R.; De Billy, E.; Pellegrino, L.; Raynaud, F.; Burke, R.; van Montfort, R. L.; Eccles, S. A.; Workman, P.; Jones, K. Discovery of a Chemical Probe Bisamide (CCT251236): An Orally Bioavailable Efficacious Pirin Ligand from a Heat Shock Transcription Factor 1 (HSF1) Phenotypic Screen. *J. Med. Chem.* **2016**.
72. Lindquist, S. The heat-shock response. *Annu. Rev. Biochem.* **1986**, *55*, 1151-1191.
73. Cushman, M.; Madaj, E. J. A Study and Mechanistic Interpretation of the Electronic and Steric Effects That Determine the Stereochemical Outcome of the Reaction of Schiff-Bases with Homophthalic Anhydride and 3-Phenylsuccinic Anhydride. *J. Org. Chem.* **1987**, *52* (5), 907-915.
74. Kaneti, J.; Bakalova, S. M.; Pojarlieff, I. G. Schiff base addition to cyclic dicarboxylic anhydrides: an unusual concerted reaction. An MO and DFT theoretical study. *J. Org. Chem.* **2003**, *68* (17), 6824-6827.
75. Vara, Y.; Bello, T.; Aldaba, E.; Arrieta, A.; Pizarro, J. L.; Arriortua, M. I.; Lopez, X.; Cossio, F. P. Trans-stereoselectivity in the reaction between homophthalic anhydride and imines. *Org. Lett.* **2008**, *10* (21), 4759-4762.
76. Gonzalez-Lopez, M.; Shaw, J. T. Cyclic anhydrides in formal cycloadditions and multicomponent reactions. *Chem. Rev.* **2009**, *109* (1), 164-189.
77. Cushman, M.; Gentry, J.; Dekow, F. W. Condensation of imines with homophthalic anhydrides. A convergent synthesis of cis- and trans-13-methyltetrahydroprotoberberines. *J. Org. Chem.* **1977**, *42* (7), 1111-1116.
78. Haimova, M. A.; Mollov, N. M.; Ivanova, S. C.; Dimitrova, A. I.; Ognyanov, V. I. A highly stereoselective synthesis of 3,4-dihydro-1(2H)-isoquinolinones and 8-oxoberberines from homophthalic anhydrides and azomethines. *Tetrahedron* **1977**, *33* (3), 331-336.

Referenzen

79. Yadav, J. S.; Reddy, B. V. S.; Raj, K. S.; Prasad, A. R. Room temperature ionic liquids promoted three-component coupling reactions: a facile synthesis of cis-isoquinolonic acids. *Tetrahedron* **2003**, *59* (10), 1805-1809.
80. Smart, B. E. Fluorine substituent effects (on bioactivity). *J. Fluorine Chem.* **2001**, *109* (1), 3-11.
81. Lechner, L. Tetrahydroisochinolinonderivate als Inhibitoren von HSP70. Masterarbeit, Julius-Maximilians-Universität Würzburg, **2016**.
82. Purser, S.; Moore, P. R.; Swallow, S.; Gouverneur, V. Fluorine in medicinal chemistry. *Chem. Soc. Rev.* **2008**, *37* (2), 320-330.
83. Liang, T.; Neumann, C. N.; Ritter, T. Einführung von Fluor und fluorhaltigen funktionellen Gruppen. *Angew. Chem.* **2013**, *125* (32), 8372-8423.
84. Heidelberger, C.; Chaudhuri, N. K.; Danneberg, P.; Mooren, D.; Griesbach, L.; Duschinsky, R.; Schnitzer, R. J.; Plevin, E.; Scheiner, J. Fluorinated pyrimidines, a new class of tumour-inhibitory compounds. *Nature* **1957**, *179* (4561), 663-666.
85. Deniz, E.; Ray, S.; Tomasulo, M.; Impellizzeri, S.; Sortino, S.; Raymo, F. M. Photoswitchable fluorescent dyads incorporating BODIPY and [1,3]oxazine components. *J. Phys. Chem. A.* **2010**, *114* (43), 11567-11575.
86. Takeda, K.; Akiyama, A.; Nakamura, H.; Takizawa, S.; Mizuno, Y.; Takayanagi, H.; Harigaya, Y. Dicarbonates - Convenient 4-Dimethylaminopyridine Catalyzed Esterification Reagents. *Synthesis* **1994**, *1994* (10), 1063-1066.
87. Differding, E.; Ofner, H. N-Fluorobenzenesulfonimide - a Practical Reagent for Electrophilic Fluorinations. *Synlett* **1991**, *1991* (3), 187-189.
88. Davis, F. A.; Han, W.; Murphy, C. K. Selective, Electrophilic Fluorinations Using N-Fluoro-O-Benzenedisulfonimide. *J. Org. Chem.* **1995**, *60* (15), 4730-4737.
89. VanVliet, D. S.; Lee, K. H. Antitumor agents. 193. A high yield preparation of 2-fluoropodophyllotoxin. *Tetrahedron Lett.* **1999**, *40* (12), 2259-2262.
90. Ahari, M.; Perez, A.; Menant, C.; Vasse, J. L.; Szymoniak, J. A direct stereoselective approach to trans-2,3-disubstituted piperidines: application in the synthesis of 2-Epi-CP-99,994 and (+)-epilupinine. *Org. Lett.* **2008**, *10* (12), 2473-2476.
91. Mehta, A.; Jaouhari, R.; Benson, T. J.; Douglas, K. T. Improved efficiency and selectivity in peptide synthesis: Use of triethylsilane as a carbocation scavenger in deprotection of t-butyl esters and t-butoxycarbonyl-protected sites. *Tetrahedron Lett.* **1992**, *33* (37), 5441-5444.
92. Li, B.; Berliner, M.; Buzon, R.; Chiu, C. K.; Colgan, S. T.; Kaneko, T.; Keene, N.; Kissel, W.; Le, T.; Leeman, K. R.; Marquez, B.; Morris, R.; Newell, L.; Wunderwald, S.; Witt, M.; Weaver, J.; Zhang, Z.; Zhang, Z. Aqueous phosphoric acid as a mild reagent for deprotection of tert-butyl carbamates, esters, and ethers. *J. Org. Chem.* **2006**, *71* (24), 9045-9050.
93. Reddy, A. G. K.; Satyanarayana, G. A simple efficient sequential one-pot intermolecular aza-Michael addition and intramolecular Buchwald-Hartwig alpha-arylation of amines: synthesis of functionalized tetrahydroisoquinolines. *Tetrahedron* **2012**, *68* (38), 8003-8010.

Referenzen

94. Lehmann, A.; Lechner, L.; Radacki, K.; Braunschweig, H.; Holzgrabe, U. Crystal structure of cis-4-fluoro-3-(4-methoxyphenyl)-1-oxo-2-phenyl-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline-4-carboxylic acid. *Acta Cryst.* **2017**, *In Revision*.
95. National Physical Laboratory. http://www.kayelaby.npl.co.uk/chemistry/3_8/3_8_7.html (abgerufen am 1. Februar, 2017).
96. Sowmiah, S.; Srinivasadesikan, V.; Tseng, M. C.; Chu, Y. H. On the chemical stabilities of ionic liquids. *Molecules* **2009**, *14* (9), 3780-3813.
97. Cymerman Craig, J.; Purushothaman, K. K. An improved preparation of tertiary amine N-oxides. *J. Org. Chem.* **1970**, *35* (5), 1721-1722.
98. Cook, N. D. Scintillation proximity assay: A versatile high-throughput screening technology. *Drug Discovery Today* **1996**, *1* (7), 287-294.
99. Xia, L.; de Vries, H.; AP, I. J.; Heitman, L. H. Scintillation proximity assay (SPA) as a new approach to determine a ligand's kinetic profile. A case in point for the adenosine A1 receptor. *Purinergic. Signal.* **2016**, *12* (1), 115-126.
100. Udenfriend, S.; Gerber, L.; Nelson, N. Scintillation proximity assay: a sensitive and continuous isotopic method for monitoring ligand/receptor and antigen/antibody interactions. *Anal. Biochem.* **1987**, *161* (2), 494-500.
101. Koehler, L.; Gagnon, K.; McQuarrie, S.; Wuest, F. Iodine-124: a promising positron emitter for organic PET chemistry. *Molecules* **2010**, *15* (4), 2686-2718.
102. Hunter, W. M.; Greenwood, F. C. Preparation of iodine-131 labelled human growth hormone of high specific activity. *Nature* **1962**, *194* (4827), 495-496.
103. Seevers, R. H.; Counsell, R. E. Radioiodination Techniques for Small Organic-Molecules. *Chem. Rev.* **1982**, *82* (6), 575-590.
104. Pickett, J. E.; Varadi, A.; Palmer, T. C.; Grinnell, S. G.; Schrock, J. M.; Pasternak, G. W.; Karimov, R. R.; Majumdar, S. Mild, Pd-catalyzed stannylation of radioiodination targets. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2015**, *25* (8), 1761-1764.
105. Cuatrecasas, P.; Wilchek, M.; Anfinsen, C. B. Selective enzyme purification by affinity chromatography. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1968**, *61* (2), 636-643.
106. Cuatrecasas, P. Affinity chromatography. *Annu. Rev. Biochem.* **1971**, *40*, 259-278.
107. Surry, D. S.; Buchwald, S. L. Dialkylbiaryl Phosphines in Pd-Catalyzed Amination: A User's Guide. *Chem. Sci.* **2011**, *2* (1), 27-50.
108. Fors, B. P.; Krattiger, P.; Strieter, E.; Buchwald, S. L. Water-mediated catalyst preactivation: an efficient protocol for C-N cross-coupling reactions. *Org. Lett.* **2008**, *10* (16), 3505-3508.
109. Mauger, C.; Mignani, G. The synthesis of important pharmaceutical building blocks by palladium-catalyzed coupling reaction: Access to various arylhydrazines. *Adv. Synth. Catal.* **2005**, *347* (6), 773-782.

Referenzen

110. Legault, C. Y.; Garcia, Y.; Merlic, C. A.; Houk, K. N. Origin of regioselectivity in palladium-catalyzed cross-coupling reactions of polyhalogenated heterocycles. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129* (42), 12664-12665.
111. Wolfe, J. P.; Tomori, H.; Sadighi, J. P.; Yin, J.; Buchwald, S. L. Simple, efficient catalyst system for the palladium-catalyzed amination of aryl chlorides, bromides, and triflates. *J. Org. Chem.* **2000**, *65* (4), 1158-1174.
112. Hooper, M. W.; Utsunomiya, M.; Hartwig, J. F. Scope and mechanism of palladium-catalyzed amination of five-membered heterocyclic halides. *J. Org. Chem.* **2003**, *68* (7), 2861-2873.
113. Maiti, D.; Fors, B. P.; Henderson, J. L.; Nakamura, Y.; Buchwald, S. L. Palladium-Catalyzed Coupling of Functionalized Primary and Secondary Amines with Aryl and Heteroaryl Halides: Two Ligands Suffice in Most Cases. *Chem. Sci.* **2011**, *2* (1), 57-68.
114. Lee, B. K.; Biscoe, M. R.; Buchwald, S. L. Simple, Efficient Protocols for the Pd-Catalyzed Cross-Coupling Reaction of Aryl Chlorides and Dimethylamine. *Tetrahedron Lett.* **2009**, *50* (26), 3672-3674.
115. Amatore, C.; Jutand, A. Role of dba in the reactivity of palladium(0) complexes generated in situ from mixtures of Pd(dba)₂ and phosphines. *Coord. Chem. Rev.* **1998**, *178*, 511-528.
116. Dallas, A. S.; Gothelf, K. V. Effect of water on the palladium-catalyzed amidation of aryl bromides. *J. Org. Chem.* **2005**, *70* (8), 3321-3323.
117. Tundel, R. E.; Anderson, K. W.; Buchwald, S. L. Expedited palladium-catalyzed amination of aryl nonaflates through the use of microwave-irradiation and soluble organic amine bases. *J. Org. Chem.* **2006**, *71* (1), 430-433.
118. Kuethe, J. T.; Childers, K. G.; Humphrey, G. R.; Journet, M.; Peng, Z. H. A Rapid, Large-Scale Synthesis of a Potent Cholecystokinin (CCK) 1R Receptor Agonist. *Org. Process Res. Dev.* **2008**, *12* (6), 1201-1208.
119. Armarego, W. L. F.; Chai, C. L. L., *Purification of Laboratory Chemicals* 6th ed.; Butterworth-Heinemann: Oxford, UK, **2009**.
120. I. Ugi, C. S. Über ein neues Kondensations-Prinzip. *Angew. Chem.* **1960**, *72*, 267-268.
121. Domling, A.; Ugi, I. I. Multicomponent Reactions with Isocyanides. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, *39* (18), 3168-3210.
122. Bach, M.; Lehmann, A.; Brännert, D.; Vanselow, J. T.; Hartung, A.; Bargou, R. C.; Holzgrabe, U.; Schlosser, A.; Chatterjee, M. Ugi reaction-derived α -acyl aminocarboxamides bind to PI 3-kinase-related kinases, inhibit HSF1-dependent heat shock response, and induce apoptosis in multiple myeloma cells. *J. Med. Chem.* **2016**, doi: 10.1012/acs.jmedchem.6b01613.
123. Xie, J.; Marusich, M. F.; Souda, P.; Whitelegge, J.; Capaldi, R. A. The mitochondrial inner membrane protein mitofilin exists as a complex with SAM50, metaxins 1 and 2, coiled-coil-helix coiled-coil-helix domain-containing protein 3 and 6 and DnaJC11. *FEBS Lett.* **2007**, *581* (18), 3545-3549.
124. Collart, M. A.; Panasenko, O. O. The Ccr4--not complex. *Gene* **2012**, *492* (1), 42-53.

Referenzen

125. Weber, A. M.; Ryan, A. J. ATM and ATR as therapeutic targets in cancer. *Pharmacol. Ther.* **2015**, *149*, 124-138.
126. Tu, Y.; Ji, C.; Yang, B.; Yang, Z.; Gu, H.; Lu, C. C.; Wang, R.; Su, Z. L.; Chen, B.; Sun, W. L.; Xia, J. P.; Bi, Z. G.; He, L. DNA-dependent protein kinase catalytic subunit (DNA-PKcs)-SIN1 association mediates ultraviolet B (UVB)-induced Akt Ser-473 phosphorylation and skin cell survival. *Mol. Cancer* **2013**, *12* (1), 172.
127. Sarbassov, D. D.; Ali, S. M.; Sabatini, D. M. Growing roles for the mTOR pathway. *Curr. Opin. Cell Biol.* **2005**, *17* (6), 596-603.
128. Huang, J.; Nueda, A.; Yoo, S.; Dynan, W. S. Heat shock transcription factor 1 binds selectively in vitro to Ku protein and the catalytic subunit of the DNA-dependent protein kinase. *J. Biol. Chem.* **1997**, *272* (41), 26009-26016.
129. Nueda, A.; Hudson, F.; Mivechi, N. F.; Dynan, W. S. DNA-dependent protein kinase protects against heat-induced apoptosis. *J. Biol. Chem.* **1999**, *274* (21), 14988-14996.
130. Baretic, D.; Williams, R. L. PIKKs--the solenoid nest where partners and kinases meet. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2014**, *29*, 134-142.
131. Dahlstrom, K. M.; Salminen, T. A. 3D model for Cancerous Inhibitor of Protein Phosphatase 2A armadillo domain unveils highly conserved protein-protein interaction characteristics. *J. Theor. Biol.* **2015**, *386*, 78-88.
132. Shoemaker, R. H. The NCI60 human tumour cell line anticancer drug screen. *Nat. Rev. Cancer* **2006**, *6* (10), 813-823.
133. NCI-60 Human Tumor Cell Lines Screen. https://dtp.cancer.gov/discovery_development/nci-60/ (abgerufen am 1.März, 2017).
134. Cell Lines in the In Vitro Screen. https://dtp.cancer.gov/discovery_development/nci-60/cell_list.htm (abgerufen am 1.März, 2017).
135. NCI-60 Screening Methodology. https://dtp.cancer.gov/discovery_development/nci-60/methodology.htm (abgerufen am 1.März, 2017).
136. Gottlieb, H. E.; Kotlyar, V.; Nudelman, A. NMR chemical shifts of common laboratory solvents as trace impurities. *J. Org. Chem.* **1997**, *62* (21), 7512-7515.
137. Mahajan, S.; Singh, I. P. Determining and reporting purity of organic molecules: why qNMR. *Magn. Reson. Chem.* **2013**, *51* (2), 76-81.
138. Torregrosa, R.; Pastor, I. M.; Yus, M. Isoprene-catalyzed lithiation of imidazole: synthesis of 2-(hydroxyalkyl)- and 2-(aminoalkyl) imidazoles. *Tetrahedron* **2005**, *61* (47), 11148-11155.
139. Bennett, J. S.; Charles, K. L.; Miner, M. R.; Heuberger, C. F.; Spina, E. J.; Bartels, M. F.; Foreman, T. Ethyl lactate as a tunable solvent for the synthesis of aryl aldimines. *Green Chem.* **2009**, *11* (2), 166-168.
140. Weinstein, J.; McIninch, E. Base Strengths of p-Substituted Benzalanilines¹. *J. Am. Chem. Soc.* **1960**, *82* (23), 6064-6067.

Referenzen

141. Tabei, K.; Saitou, E. The Nuclear Magnetic Resonance and Infrared Spectra of Aromatic Azomethines. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1969**, *42* (5), 1440-1443.
142. Pagadala, R.; Meshram, J. S.; Chopde, H. N.; Jetti, V.; Udayini, V. An Expeditious One-Pot Synthesis of Substituted Phenylazetid-2-ones in the Presence of Zeolite. *J. Heterocycl. Chem.* **2011**, *48* (5), 1067-1072.
143. Ricketts, J.; Cho, C. Notes- A Spectral Study of Some Schiff Base Derivatives of p-Aminoazobenzene. *J. Org. Chem.* **1961**, *26* (6), 2125-2127.
144. Ibrahim, M. N.; Al - Deeb, H. K. Synthesis, Characterization and Study of the Biological activity of Some Aldimines Derivatives. *E-Journal of Chemistry* **2006**, *3* (4), 257-261.
145. Guy, R. K.; Zhu, F.; Clark, J. A.; Guiguemde, W. A.; Floyd, D.; Knapp, S.; Stein, P.; Castro, S. Substituted 2-alkyl-1-oxo-n-phenyl-3-heteroaryl-1,2,3,4- tetrahydroisoquinoline-4-carboxamides for antimalarial therapies. PCT/IB2012/054305, **2013**.
146. Song, H. Y.; Ngai, M. H.; Song, Z. Y.; MacAry, P. A.; Hopley, J.; Lear, M. J. Practical synthesis of maleimides and coumarin-linked probes for protein and antibody labelling via reduction of native disulfides. *Org. Biomol. Chem.* **2009**, *7* (17), 3400-3406.

**NATURE PUBLISHING GROUP LICENSE
TERMS AND CONDITIONS**

May 09, 2017

This Agreement between Anna Lehmann ("You") and Nature Publishing Group ("Nature Publishing Group") consists of your license details and the terms and conditions provided by Nature Publishing Group and Copyright Clearance Center.

| | |
|--|--|
| License Number | 4104641425787 |
| License date | May 09, 2017 |
| Licensed Content Publisher | Nature Publishing Group |
| Licensed Content Publication | Nature Reviews Cancer |
| Licensed Content Title | Chemotherapy and the war on cancer |
| Licensed Content Author | Bruce A. Chabner and Thomas G. Roberts |
| Licensed Content Date | Jan 1, 2005 |
| Licensed Content Volume | 5 |
| Licensed Content Issue | 1 |
| Type of Use | reuse in a dissertation / thesis |
| Requestor type | academic/educational |
| Format | print and electronic |
| Portion | figures/tables/illustrations |
| Number of figures/tables/illustrations | 1 |
| High-res required | no |
| Figures | Some details from the timeline (the history of chemotherapy) were adopted. |
| Author of this NPG article | no |
| Your reference number | |
| Title of your thesis / dissertation | Entwicklung potenzieller Inhibitoren der Hitzeschockkomponenten HSF1 und HSP70 am Modell des Multiplen Myeloms |
| Expected completion date | Jun 2017 |
| Estimated size (number of pages) | 180 |
| Requestor Location | Anna Lehmann Universität Würzburg Institut für Pharmacy Am Hubland Würzburg, DE 97074 Germany Attn: Anna Lehmann |
| Customer VAT ID | DE |
| Billing Type | Invoice |
| Billing Address | Anna Lehmann Universität Würzburg Institut für Pharmacy Am Hubland Würzburg, Germany 97074 Attn: Anna Lehmann |
| Total | 0.00 EUR |
| Terms and Conditions | |

Terms and Conditions for Permissions

Nature Publishing Group hereby grants you a non-exclusive license to reproduce this material for this purpose, and for no other use, subject to the conditions below:

1. NPG warrants that it has, to the best of its knowledge, the rights to license reuse of this material. However, you should ensure that the material you are requesting is original to Nature Publishing Group and does not carry the copyright of another entity (as credited in the published version). If the credit line on any part of the material you have requested indicates that it was reprinted or adapted by NPG with permission from another source, then you should also seek permission from that source to reuse the material.
2. Permission granted free of charge for material in print is also usually granted for any electronic version of that work, provided that the material is incidental to the work as a whole and that the electronic version is essentially equivalent to, or substitutes for, the print version. Where print permission has been granted for a fee, separate permission must be obtained for any additional, electronic re-use (unless, as in the case of a full paper, this has already been accounted for during your initial request in the calculation of a print run). NB: In all cases, web-based use of full-text articles must be authorized separately through the 'Use on a Web Site' option when requesting permission.
3. Permission granted for a first edition does not apply to second and subsequent editions and for editions in other languages (except for signatories to the STM Permissions Guidelines, or where the first edition permission was granted for free).
4. Nature Publishing Group's permission must be acknowledged next to the figure, table or abstract in print. In electronic form, this acknowledgement must be visible at the same time as the figure/table/abstract, and must be hyperlinked to the journal's homepage.
5. The credit line should read:
Reprinted by permission from Macmillan Publishers Ltd: [JOURNAL NAME] (reference citation), copyright (year of publication)
For AOP papers, the credit line should read:
Reprinted by permission from Macmillan Publishers Ltd: [JOURNAL NAME], advance online publication, day month year (doi: 10.1038/sj.[JOURNAL ACRONYM].XXXXX)

Note: For republication from the *British Journal of Cancer*, the following credit lines apply.

Reprinted by permission from Macmillan Publishers Ltd on behalf of Cancer Research UK: [JOURNAL NAME] (reference citation), copyright (year of publication) For AOP papers, the credit line should read:

Reprinted by permission from Macmillan Publishers Ltd on behalf of Cancer Research UK: [JOURNAL NAME], advance online publication, day month year (doi: 10.1038/sj.[JOURNAL ACRONYM].XXXXX)

6. Adaptations of single figures do not require NPG approval. However, the adaptation should be credited as follows:

Adapted by permission from Macmillan Publishers Ltd: [JOURNAL NAME] (reference citation), copyright (year of publication)

Note: For adaptation from the *British Journal of Cancer*, the following credit line applies.

Adapted by permission from Macmillan Publishers Ltd on behalf of Cancer Research UK: [JOURNAL NAME] (reference citation), copyright (year of publication)

7. Translations of 401 words up to a whole article require NPG approval. Please visit <http://www.macmillanmedicalcommunications.com> for more information. Translations of up to a 400 words do not require NPG approval. The translation should be credited as follows:

Translated by permission from Macmillan Publishers Ltd: [JOURNAL NAME] (reference citation), copyright (year of publication).

Note: For translation from the *British Journal of Cancer*, the following credit line applies.

Translated by permission from Macmillan Publishers Ltd on behalf of Cancer Research UK: [JOURNAL NAME] (reference citation), copyright (year of publication)

We are certain that all parties will benefit from this agreement and wish you the best in the use of this material. Thank you.

Special Terms:

v1.1

Questions? customercare@copyright.com or +1-855-239-3415 (toll free in the US) or +1-978-646-2777.

**NATURE PUBLISHING GROUP LICENSE
TERMS AND CONDITIONS**

May 09, 2017

This Agreement between Anna Lehmann ("You") and Nature Publishing Group ("Nature Publishing Group") consists of your license details and the terms and conditions provided by Nature Publishing Group and Copyright Clearance Center.

| | |
|--|--|
| License Number | 4104651142171 |
| License date | May 09, 2017 |
| Licensed Content Publisher | Nature Publishing Group |
| Licensed Content Publication | Nature Reviews Cancer |
| Licensed Content Title | Mechanisms of B-cell lymphoma pathogenesis |
| Licensed Content Author | Ralf Küppers |
| Licensed Content Date | Apr 1, 2005 |
| Licensed Content Volume | 5 |
| Licensed Content Issue | 4 |
| Type of Use | reuse in a dissertation / thesis |
| Requestor type | academic/educational |
| Format | print and electronic |
| Portion | figures/tables/illustrations |
| Number of figures/tables/illustrations | 1 |
| High-res required | no |
| Figures | Details were adopted from the figure 2 (B-cell differentiation in the germinal-centre reaction). |
| Author of this NPG article | no |
| Your reference number | |
| Title of your thesis / dissertation | Entwicklung potenzieller Inhibitoren der Hitzeschockkomponenten HSF1 und HSP70 am Modell des Multiplen Myeloms |
| Expected completion date | Jun 2017 |
| Estimated size (number of pages) | 180 |
| Requestor Location | Anna Lehmann Universität Würzburg Institut for Pharmacy Am Hubland Würzburg, DE 97074 Germany Attn: Anna Lehmann |
| Customer VAT ID | DE |
| Billing Type | Invoice |
| Billing Address | Anna Lehmann Universität Würzburg Institut for Pharmacy Am Hubland Würzburg, Germany 97074 Attn: Anna Lehmann |
| Total | 0.00 EUR |
| Terms and Conditions | |

Terms and Conditions for Permissions

Nature Publishing Group hereby grants you a non-exclusive license to reproduce this material for this purpose, and for no other use, subject to the conditions below:

1. NPG warrants that it has, to the best of its knowledge, the rights to license reuse of this material. However, you should ensure that the material you are requesting is original to Nature Publishing Group and does not carry the copyright of another entity (as credited in the published version). If the credit line on any part of the material you have requested indicates that it was reprinted or adapted by NPG with permission from another source, then you should also seek permission from that source to reuse the material.
2. Permission granted free of charge for material in print is also usually granted for any electronic version of that work, provided that the material is incidental to the work as a whole and that the electronic version is essentially equivalent to, or substitutes for, the print version. Where print permission has been granted for a fee, separate permission must be obtained for any additional, electronic re-use (unless, as in the case of a full paper, this has already been accounted for during your initial request in the calculation of a print run). NB: In all cases, web-based use of full-text articles must be authorized separately through the 'Use on a Web Site' option when requesting permission.
3. Permission granted for a first edition does not apply to second and subsequent editions and for editions in other languages (except for signatories to the STM Permissions Guidelines, or where the first edition permission was granted for free).
4. Nature Publishing Group's permission must be acknowledged next to the figure, table or abstract in print. In electronic form, this acknowledgement must be visible at the same time as the figure/table/abstract, and must be hyperlinked to the journal's homepage.
5. The credit line should read:
Reprinted by permission from Macmillan Publishers Ltd: [JOURNAL NAME] (reference citation), copyright (year of publication)
For AOP papers, the credit line should read:
Reprinted by permission from Macmillan Publishers Ltd: [JOURNAL NAME], advance online publication, day month year (doi: 10.1038/sj.[JOURNAL ACRONYM].XXXXX)

Note: For republication from the *British Journal of Cancer*, the following credit lines apply.

Reprinted by permission from Macmillan Publishers Ltd on behalf of Cancer Research UK: [JOURNAL NAME] (reference citation), copyright (year of publication) For AOP papers, the credit line should read:

Reprinted by permission from Macmillan Publishers Ltd on behalf of Cancer Research UK: [JOURNAL NAME], advance online publication, day month year (doi: 10.1038/sj.[JOURNAL ACRONYM].XXXXX)

6. Adaptations of single figures do not require NPG approval. However, the adaptation should be credited as follows:

Adapted by permission from Macmillan Publishers Ltd: [JOURNAL NAME] (reference citation), copyright (year of publication)

Note: For adaptation from the *British Journal of Cancer*, the following credit line applies.

Adapted by permission from Macmillan Publishers Ltd on behalf of Cancer Research UK: [JOURNAL NAME] (reference citation), copyright (year of publication)

7. Translations of 401 words up to a whole article require NPG approval. Please visit <http://www.macmillanmedicalcommunications.com> for more information. Translations of up to a 400 words do not require NPG approval. The translation should be credited as follows:

Translated by permission from Macmillan Publishers Ltd: [JOURNAL NAME] (reference citation), copyright (year of publication).

Note: For translation from the *British Journal of Cancer*, the following credit line applies.

Translated by permission from Macmillan Publishers Ltd on behalf of Cancer Research UK: [JOURNAL NAME] (reference citation), copyright (year of publication)

We are certain that all parties will benefit from this agreement and wish you the best in the use of this material. Thank you.

Special Terms:

v1.1

Questions? customercare@copyright.com or +1-855-239-3415 (toll free in the US) or +1-978-646-2777.

**ELSEVIER LICENSE
TERMS AND CONDITIONS**

May 09, 2017

This Agreement between Anna Lehmann ("You") and Elsevier ("Elsevier") consists of your license details and the terms and conditions provided by Elsevier and Copyright Clearance Center.

| | |
|--|--|
| License Number | 4104690716009 |
| License date | May 09, 2017 |
| Licensed Content Publisher | Elsevier |
| Licensed Content Publication | Trends in Biochemical Sciences |
| Licensed Content Title | Heat shock proteins in cancer: chaperones of tumorigenesis |
| Licensed Content Author | Stuart K. Calderwood,Md Abdul Khaleque,Douglas B. Sawyer,Daniel R. Ciocca |
| Licensed Content Date | March 2006 |
| Licensed Content Volume | 31 |
| Licensed Content Issue | 3 |
| Licensed Content Pages | 9 |
| Start Page | 164 |
| End Page | 172 |
| Type of Use | reuse in a thesis/dissertation |
| Intended publisher of new work | other |
| Portion | figures/tables/illustrations |
| Number of figures/tables/illustrations | 1 |
| Format | both print and electronic |
| Are you the author of this Elsevier article? | No |
| Will you be translating? | Yes |
| Number of languages | 1 |
| Languages | German |
| Order reference number | |
| Original figure numbers | Figure 1 |
| Title of your thesis/dissertation | Entwicklung potenzieller Inhibitoren der Hitzeschockkomponenten HSF1 und HSP70 am Modell des Multiplen Myeloms |
| Expected completion date | Jun 2017 |
| Estimated size (number of pages) | 180 |
| Elsevier VAT number | GB 494 6272 12 |
| Requestor Location | Anna Lehmann Universität Würzburg Institut for Pharmacy Am Hubland Würzburg, DE 97074 Germany Attn: Anna Lehmann |

| | |
|------------------|----------------|
| Publisher Tax ID | GB 494 6272 12 |
| Customer VAT ID | DE |
| Total | 0.00 EUR |

Terms and Conditions

INTRODUCTION

1. The publisher for this copyrighted material is Elsevier. By clicking "accept" in connection with completing this licensing transaction, you agree that the following terms and conditions apply to this transaction (along with the Billing and Payment terms and conditions established by Copyright Clearance Center, Inc. ("CCC"), at the time that you opened your Rightslink account and that are available at any time at <http://myaccount.copyright.com>).

GENERAL TERMS

2. Elsevier hereby grants you permission to reproduce the aforementioned material subject to the terms and conditions indicated.

3. Acknowledgement: If any part of the material to be used (for example, figures) has appeared in our publication with credit or acknowledgement to another source, permission must also be sought from that source. If such permission is not obtained then that material may not be included in your publication/copies. Suitable acknowledgement to the source must be made, either as a footnote or in a reference list at the end of your publication, as follows:

"Reprinted from Publication title, Vol /edition number, Author(s), Title of article / title of chapter, Pages No., Copyright (Year), with permission from Elsevier [OR APPLICABLE SOCIETY COPYRIGHT OWNER]." Also Lancet special credit - "Reprinted from The Lancet, Vol. number, Author(s), Title of article, Pages No., Copyright (Year), with permission from Elsevier."

4. Reproduction of this material is confined to the purpose and/or media for which permission is hereby given.

5. Altering/Modifying Material: Not Permitted. However figures and illustrations may be altered/adapted minimally to serve your work. Any other abbreviations, additions, deletions and/or any other alterations shall be made only with prior written authorization of Elsevier Ltd. (Please contact Elsevier at permissions@elsevier.com). No modifications can be made to any Lancet figures/tables and they must be reproduced in full.

6. If the permission fee for the requested use of our material is waived in this instance, please be advised that your future requests for Elsevier materials may attract a fee.

7. Reservation of Rights: Publisher reserves all rights not specifically granted in the combination of (i) the license details provided by you and accepted in the course of this licensing transaction, (ii) these terms and conditions and (iii) CCC's Billing and Payment terms and conditions.

8. License Contingent Upon Payment: While you may exercise the rights licensed immediately upon issuance of the license at the end of the licensing process for the transaction, provided that you have disclosed complete and accurate details of your proposed use, no license is finally effective unless and until full payment is received from you (either by publisher or by CCC) as provided in CCC's Billing and Payment terms and conditions. If full payment is not received on a timely basis, then any license preliminarily granted shall be deemed automatically revoked and shall be void as if never granted. Further, in the event that you breach any of these terms and conditions or any of CCC's Billing and Payment terms and conditions, the license is automatically revoked and shall be void as if never granted. Use of materials as described in a revoked license, as well as any use of the materials beyond the scope of an unrevoked license, may constitute copyright infringement and publisher reserves the right to take any and all action to protect its copyright in the materials.

9. Warranties: Publisher makes no representations or warranties with respect to the licensed material.

10. Indemnity: You hereby indemnify and agree to hold harmless publisher and CCC, and their respective officers, directors, employees and agents, from and against any and all claims arising out of your use of the licensed material other than as specifically authorized pursuant to this license.

11. **No Transfer of License:** This license is personal to you and may not be sublicensed, assigned, or transferred by you to any other person without publisher's written permission.
12. **No Amendment Except in Writing:** This license may not be amended except in a writing signed by both parties (or, in the case of publisher, by CCC on publisher's behalf).
13. **Objection to Contrary Terms:** Publisher hereby objects to any terms contained in any purchase order, acknowledgment, check endorsement or other writing prepared by you, which terms are inconsistent with these terms and conditions or CCC's Billing and Payment terms and conditions. These terms and conditions, together with CCC's Billing and Payment terms and conditions (which are incorporated herein), comprise the entire agreement between you and publisher (and CCC) concerning this licensing transaction. In the event of any conflict between your obligations established by these terms and conditions and those established by CCC's Billing and Payment terms and conditions, these terms and conditions shall control.
14. **Revocation:** Elsevier or Copyright Clearance Center may deny the permissions described in this License at their sole discretion, for any reason or no reason, with a full refund payable to you. Notice of such denial will be made using the contact information provided by you. Failure to receive such notice will not alter or invalidate the denial. In no event will Elsevier or Copyright Clearance Center be responsible or liable for any costs, expenses or damage incurred by you as a result of a denial of your permission request, other than a refund of the amount(s) paid by you to Elsevier and/or Copyright Clearance Center for denied permissions.

LIMITED LICENSE

The following terms and conditions apply only to specific license types:

15. **Translation:** This permission is granted for non-exclusive world **English** rights only unless your license was granted for translation rights. If you licensed translation rights you may only translate this content into the languages you requested. A professional translator must perform all translations and reproduce the content word for word preserving the integrity of the article.
16. **Posting licensed content on any Website:** The following terms and conditions apply as follows: Licensing material from an Elsevier journal: All content posted to the web site must maintain the copyright information line on the bottom of each image; A hyper-text must be included to the Homepage of the journal from which you are licensing at <http://www.sciencedirect.com/science/journal/xxxxx> or the Elsevier homepage for books at <http://www.elsevier.com>; Central Storage: This license does not include permission for a scanned version of the material to be stored in a central repository such as that provided by Heron/XanEdu.
- Licensing material from an Elsevier book: A hyper-text link must be included to the Elsevier homepage at <http://www.elsevier.com> . All content posted to the web site must maintain the copyright information line on the bottom of each image.

Posting licensed content on Electronic reserve: In addition to the above the following clauses are applicable: The web site must be password-protected and made available only to bona fide students registered on a relevant course. This permission is granted for 1 year only. You may obtain a new license for future website posting.

17. **For journal authors:** the following clauses are applicable in addition to the above:

Preprints:

A preprint is an author's own write-up of research results and analysis, it has not been peer-reviewed, nor has it had any other value added to it by a publisher (such as formatting, copyright, technical enhancement etc.).

Authors can share their preprints anywhere at any time. Preprints should not be added to or enhanced in any way in order to appear more like, or to substitute for, the final versions of articles however authors can update their preprints on arXiv or RePEc with their Accepted Author Manuscript (see below).

If accepted for publication, we encourage authors to link from the preprint to their formal publication via its DOI. Millions of researchers have access to the formal publications on ScienceDirect, and so links will help users to find, access, cite and use the best available version. Please note that Cell Press, The Lancet and some society-owned have different preprint policies. Information on these policies is available on the journal homepage.

Accepted Author Manuscripts: An accepted author manuscript is the manuscript of an article that has been accepted for publication and which typically includes author-incorporated changes suggested during submission, peer review and editor-author communications.

Authors can share their accepted author manuscript:

- immediately
 - via their non-commercial person homepage or blog
 - by updating a preprint in arXiv or RePEc with the accepted manuscript
 - via their research institute or institutional repository for internal institutional uses or as part of an invitation-only research collaboration work-group
 - directly by providing copies to their students or to research collaborators for their personal use
 - for private scholarly sharing as part of an invitation-only work group on commercial sites with which Elsevier has an agreement
- After the embargo period
 - via non-commercial hosting platforms such as their institutional repository
 - via commercial sites with which Elsevier has an agreement

In all cases accepted manuscripts should:

- link to the formal publication via its DOI
- bear a CC-BY-NC-ND license - this is easy to do
- if aggregated with other manuscripts, for example in a repository or other site, be shared in alignment with our hosting policy not be added to or enhanced in any way to appear more like, or to substitute for, the published journal article.

Published journal article (JPA): A published journal article (PJA) is the definitive final record of published research that appears or will appear in the journal and embodies all value-adding publishing activities including peer review co-ordination, copy-editing, formatting, (if relevant) pagination and online enrichment.

Policies for sharing publishing journal articles differ for subscription and gold open access articles:

Subscription Articles: If you are an author, please share a link to your article rather than the full-text. Millions of researchers have access to the formal publications on ScienceDirect, and so links will help your users to find, access, cite, and use the best available version. Theses and dissertations which contain embedded PJAs as part of the formal submission can be posted publicly by the awarding institution with DOI links back to the formal publications on ScienceDirect.

If you are affiliated with a library that subscribes to ScienceDirect you have additional private sharing rights for others' research accessed under that agreement. This includes use for classroom teaching and internal training at the institution (including use in course packs and courseware programs), and inclusion of the article for grant funding purposes.

Gold Open Access Articles: May be shared according to the author-selected end-user license and should contain a [CrossMark logo](#), the end user license, and a DOI link to the formal publication on ScienceDirect.

Please refer to Elsevier's [posting policy](#) for further information.

18. **For book authors** the following clauses are applicable in addition to the above:

Authors are permitted to place a brief summary of their work online only. You are not allowed to download and post the published electronic version of your chapter, nor may you scan the printed edition to create an electronic version. **Posting to a repository:** Authors are permitted to post a summary of their chapter only in their institution's repository.

19. **Thesis/Dissertation:** If your license is for use in a thesis/dissertation your thesis may be submitted to your institution in either print or electronic form. Should your thesis be published commercially, please reapply for permission. These requirements include permission for the Library and Archives of Canada to supply single copies, on demand, of the complete thesis and include permission for Proquest/UMI to supply single copies, on demand, of the complete thesis. Should your thesis be published commercially, please

reapply for permission. Theses and dissertations which contain embedded PJAs as part of the formal submission can be posted publicly by the awarding institution with DOI links back to the formal publications on ScienceDirect.

Elsevier Open Access Terms and Conditions

You can publish open access with Elsevier in hundreds of open access journals or in nearly 2000 established subscription journals that support open access publishing. Permitted third party re-use of these open access articles is defined by the author's choice of Creative Commons user license. See our [open access license policy](#) for more information.

Terms & Conditions applicable to all Open Access articles published with Elsevier:

Any reuse of the article must not represent the author as endorsing the adaptation of the article nor should the article be modified in such a way as to damage the author's honour or reputation. If any changes have been made, such changes must be clearly indicated.

The author(s) must be appropriately credited and we ask that you include the end user license and a DOI link to the formal publication on ScienceDirect.

If any part of the material to be used (for example, figures) has appeared in our publication with credit or acknowledgement to another source it is the responsibility of the user to ensure their reuse complies with the terms and conditions determined by the rights holder.

Additional Terms & Conditions applicable to each Creative Commons user license:

CC BY: The CC-BY license allows users to copy, to create extracts, abstracts and new works from the Article, to alter and revise the Article and to make commercial use of the Article (including reuse and/or resale of the Article by commercial entities), provided the user gives appropriate credit (with a link to the formal publication through the relevant DOI), provides a link to the license, indicates if changes were made and the licensor is not represented as endorsing the use made of the work. The full details of the license are available at <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0>.

CC BY NC SA: The CC BY-NC-SA license allows users to copy, to create extracts, abstracts and new works from the Article, to alter and revise the Article, provided this is not done for commercial purposes, and that the user gives appropriate credit (with a link to the formal publication through the relevant DOI), provides a link to the license, indicates if changes were made and the licensor is not represented as endorsing the use made of the work. Further, any new works must be made available on the same conditions. The full details of the license are available at <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0>.

CC BY NC ND: The CC BY-NC-ND license allows users to copy and distribute the Article, provided this is not done for commercial purposes and further does not permit distribution of the Article if it is changed or edited in any way, and provided the user gives appropriate credit (with a link to the formal publication through the relevant DOI), provides a link to the license, and that the licensor is not represented as endorsing the use made of the work. The full details of the license are available at <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0>.

Any commercial reuse of Open Access articles published with a CC BY NC SA or CC BY NC ND license requires permission from Elsevier and will be subject to a fee.

Commercial reuse includes:

- Associating advertising with the full text of the Article
- Charging fees for document delivery or access
- Article aggregation
- Systematic distribution via e-mail lists or share buttons

Posting or linking by commercial companies for use by customers of those companies.

20. Other Conditions:

v1.9

Questions? customercare@copyright.com or +1-855-239-3415 (toll free in the US) or +1-978-646-2777.

Title: Trans-Stereoselectivity in the Reaction between Homophthalic Anhydride and Imines

Author: Yosu Vara, Tamara Bello, Eneko Aldaba, et al

Publication: Organic Letters

Publisher: American Chemical Society

Date: Nov 1, 2008

Copyright © 2008, American Chemical Society

LOGIN

If you're a [copyright.com user](#), you can login to RightsLink using your copyright.com credentials. Already a [RightsLink user](#) or want to [learn more?](#)

PERMISSION/LICENSE IS GRANTED FOR YOUR ORDER AT NO CHARGE

This type of permission/license, instead of the standard Terms & Conditions, is sent to you because no fee is being charged for your order. Please note the following:

- Permission is granted for your request in both print and electronic formats, and translations.
- If figures and/or tables were requested, they may be adapted or used in part.
- Please print this page for your records and send a copy of it to your publisher/graduate school.
- Appropriate credit for the requested material should be given as follows: "Reprinted (adapted) with permission from (COMPLETE REFERENCE CITATION). Copyright (YEAR) American Chemical Society." Insert appropriate information in place of the capitalized words.
- One-time permission is granted only for the use specified in your request. No additional uses are granted (such as derivative works or other editions). For any other uses, please submit a new request.

If credit is given to another source for the material you requested, permission must be obtained from that source.

BACK

CLOSE WINDOW

**NATURE PUBLISHING GROUP LICENSE
TERMS AND CONDITIONS**

May 09, 2017

This Agreement between Anna Lehmann ("You") and Nature Publishing Group ("Nature Publishing Group") consists of your license details and the terms and conditions provided by Nature Publishing Group and Copyright Clearance Center.

| | |
|--|--|
| License Number | 4104651469051 |
| License date | May 09, 2017 |
| Licensed Content Publisher | Nature Publishing Group |
| Licensed Content Publication | Leukemia |
| Licensed Content Title | Bone marrow microenvironment and the identification of new targets for myeloma therapy |
| Licensed Content Author | K Podar, D Chauhan and K C Anderson |
| Licensed Content Date | Oct 9, 2008 |
| Licensed Content Volume | 23 |
| Licensed Content Issue | 1 |
| Type of Use | reuse in a dissertation / thesis |
| Requestor type | academic/educational |
| Format | print and electronic |
| Portion | figures/tables/illustrations |
| Number of figures/tables/illustrations | 2 |
| High-res required | no |
| Figures | Figure 1 and 3 were adopted and edited |
| Author of this NPG article | no |
| Your reference number | |
| Title of your thesis / dissertation | Entwicklung potenzieller Inhibitoren der Hitzeschockkomponenten HSF1 und HSP70 am Modell des Multiplen Myeloms |
| Expected completion date | Jun 2017 |
| Estimated size (number of pages) | 180 |
| Requestor Location | Anna Lehmann Universität Würzburg Institut for Pharmacy Am Hubland Würzburg, DE 97074 Germany Attn: Anna Lehmann |
| Customer VAT ID | DE |
| Billing Type | Invoice |
| Billing Address | Anna Lehmann Universität Würzburg Institut for Pharmacy Am Hubland Würzburg, Germany 97074 Attn: Anna Lehmann |
| Total | 0.00 USD |
| Terms and Conditions | |

Terms and Conditions for Permissions

Nature Publishing Group hereby grants you a non-exclusive license to reproduce this material for this purpose, and for no other use, subject to the conditions below:

1. NPG warrants that it has, to the best of its knowledge, the rights to license reuse of this material. However, you should ensure that the material you are requesting is original to Nature Publishing Group and does not carry the copyright of another entity (as credited in the published version). If the credit line on any part of the material you have requested indicates that it was reprinted or adapted by NPG with permission from another source, then you should also seek permission from that source to reuse the material.
2. Permission granted free of charge for material in print is also usually granted for any electronic version of that work, provided that the material is incidental to the work as a whole and that the electronic version is essentially equivalent to, or substitutes for, the print version. Where print permission has been granted for a fee, separate permission must be obtained for any additional, electronic re-use (unless, as in the case of a full paper, this has already been accounted for during your initial request in the calculation of a print run). NB: In all cases, web-based use of full-text articles must be authorized separately through the 'Use on a Web Site' option when requesting permission.
3. Permission granted for a first edition does not apply to second and subsequent editions and for editions in other languages (except for signatories to the STM Permissions Guidelines, or where the first edition permission was granted for free).
4. Nature Publishing Group's permission must be acknowledged next to the figure, table or abstract in print. In electronic form, this acknowledgement must be visible at the same time as the figure/table/abstract, and must be hyperlinked to the journal's homepage.
5. The credit line should read:
Reprinted by permission from Macmillan Publishers Ltd: [JOURNAL NAME] (reference citation), copyright (year of publication)
For AOP papers, the credit line should read:
Reprinted by permission from Macmillan Publishers Ltd: [JOURNAL NAME], advance online publication, day month year (doi: 10.1038/sj.[JOURNAL ACRONYM].XXXXX)

Note: For republication from the *British Journal of Cancer*, the following credit lines apply.

Reprinted by permission from Macmillan Publishers Ltd on behalf of Cancer Research UK: [JOURNAL NAME] (reference citation), copyright (year of publication) For AOP papers, the credit line should read:

Reprinted by permission from Macmillan Publishers Ltd on behalf of Cancer Research UK: [JOURNAL NAME], advance online publication, day month year (doi: 10.1038/sj.[JOURNAL ACRONYM].XXXXX)

6. Adaptations of single figures do not require NPG approval. However, the adaptation should be credited as follows:

Adapted by permission from Macmillan Publishers Ltd: [JOURNAL NAME] (reference citation), copyright (year of publication)

Note: For adaptation from the *British Journal of Cancer*, the following credit line applies.

Adapted by permission from Macmillan Publishers Ltd on behalf of Cancer Research UK: [JOURNAL NAME] (reference citation), copyright (year of publication)

7. Translations of 401 words up to a whole article require NPG approval. Please visit <http://www.macmillanmedicalcommunications.com> for more information. Translations of up to a 400 words do not require NPG approval. The translation should be credited as follows:

Translated by permission from Macmillan Publishers Ltd: [JOURNAL NAME] (reference citation), copyright (year of publication).

Note: For translation from the *British Journal of Cancer*, the following credit line applies.

Translated by permission from Macmillan Publishers Ltd on behalf of Cancer Research UK: [JOURNAL NAME] (reference citation), copyright (year of publication)

We are certain that all parties will benefit from this agreement and wish you the best in the use of this material. Thank you.

Special Terms:

v1.1

Questions? customercare@copyright.com or +1-855-239-3415 (toll free in the US) or +1-978-646-2777.



Journal Reprints

Title: Targeting HSP70: The second potentially druggable heat shock protein and molecular chaperone?

Author: Marissa V. Powers, Keith Jones, Caterina Barillari, et al

Publication: Cell Cycle

Publisher: Taylor & Francis

Date: Apr 15, 2010

Copyright © 2010 Taylor & Francis

Logged in as:

Anna Lehmann

Account #:
3001082425

[LOGOUT](#)

Thesis/Dissertation Reuse Request

Taylor & Francis is pleased to offer reuses of its content for a thesis or dissertation free of charge contingent on resubmission of permission request if work is published.

[BACK](#)

[CLOSE WINDOW](#)

AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH ORDER DETAILS

May 09, 2017

| | |
|--|--|
| Order Number | 501267936 |
| Order date | May 09, 2017 |
| Licensed Content Publisher | American Association for Cancer Research |
| Licensed Content Publication | Molecular Cancer Research |
| Licensed Content Title | When Cancer Fights Back: Multiple Myeloma, Proteasome Inhibition, and the Heat-Shock Response |
| Licensed Content Author | Shardule P. Shah, Sagar Lonial, Lawrence H. Boise |
| Licensed Content Date | 2015-08-01 |
| Licensed Content Volume | 13 |
| Licensed Content Issue | 8 |
| Type of Use | Thesis/Dissertation |
| Requestor type | academic/educational |
| Format | print and electronic |
| Portion | figures/tables/illustrations |
| Number of figures/tables/illustrations | 1 |
| Will you be translating? | yes |
| Number of languages | 1 |
| Languages | German |
| Circulation | 10 |
| Title of your thesis / dissertation | Entwicklung potenzieller Inhibitoren der Hitzeschockkomponenten HSF1 und HSP70 am Modell des Multiplen Myeloms |
| Expected completion date | Jun 2017 |
| Estimated size (number of pages) | 180 |
| Customer Tax ID | DE |
| Requestor Location | Anna Lehmann Universität Würzburg Institut für Pharmacy Am Hubland Würzburg, DE 97074 Germany Attn: Anna Lehmann |
| Customer VAT ID | DE |
| Total | Not Available |



ACS Publications Title:
Most Trusted. Most Cited. Most Read.

Ugi Reaction-Derived α -Acyl
Aminocarboxamides Bind to
Phosphatidylinositol 3-Kinase-
Related Kinases, Inhibit HSF1-
Dependent Heat Shock
Response, and Induce Apoptosis
in Multiple Myeloma Cells

Author: Matthias Bach, Anna Lehmann,
Daniela Brännert, et al

Publication: Journal of Medicinal Chemistry

Publisher: American Chemical Society

Date: May 1, 2017

Copyright © 2017, American Chemical Society

Logged in as:

Anna Lehmann

Account #:

3001082425

[LOGOUT](#)

PERMISSION/LICENSE IS GRANTED FOR YOUR ORDER AT NO CHARGE

This type of permission/license, instead of the standard Terms & Conditions, is sent to you because no fee is being charged for your order. Please note the following:

- Permission is granted for your request in both print and electronic formats, and translations.
- If figures and/or tables were requested, they may be adapted or used in part.
- Please print this page for your records and send a copy of it to your publisher/graduate school.
- Appropriate credit for the requested material should be given as follows: "Reprinted (adapted) with permission from (COMPLETE REFERENCE CITATION). Copyright (YEAR) American Chemical Society." Insert appropriate information in place of the capitalized words.
- One-time permission is granted only for the use specified in your request. No additional uses are granted (such as derivative works or other editions). For any other uses, please submit a new request.

[BACK](#)

[CLOSE WINDOW](#)

Science Photo Library | Tumblingerstr. 32 | 80337 München

Universität Würzburg
Am Hubland
97074 Würzburg

Rechnung

Nummer 2016-109719
Datum 14.12.2016
Kundennummer 10403
Ansprechpartner Martina Braun
Telefon 089-747202-33
Email martina.braun@science-photo.de

Bitte bei allen Rückfragen angeben !

Ihr Projekt: Anna Lehmann
Ihre Jobnummer:

Ihre UStIDNr:

Entwicklung potentieller Inhibitoren der Hitzeschockkomponenten HSF1 und HSP70 am Model des Multiplen Myeloms
Auflage: 10 Stück
Rechte für 1. Auflage 2016, DE
Leistungszeitraum: 1 Ausgabe/ungberenz

| Pos. | Produktnr. | Bezeichnung | SC | Menge | Einzelpreis | Gesamtpreis |
|------|------------|--|----------------------------|-----------------|-------------|--------------|
| 1 | 11602388 | Bildrechte RM Skull in bone marrow cancer,X-ray Urheber: ZEPHYR/SCIENCE PHOTO LIBRARY Wissenschaftliche Publikation 1/4 Seite, Innen | 2 | 1 Stk | 27,00 | 27,00 |
| 2 | | Servicepauschale | 2 | 1 Stk | 3,00 | 3,00 |
| | | | SC | Zwischensumme | EUR | 30,00 |
| | | | zzgl. MwSt. mit Steuercode | 2 | 7,00 % von | 30,00 |
| | | | | Endsumme | EUR | 32,10 |

Zahlungsvereinbarungen:

Zahlung erfolgt durch Kreditkarte

sciencephotolibrary – Ein Unternehmensbereich der StockFood GmbH

Tumblingerstr. 32 | 80337 München | Deutschland
Tel. +49 (89) 747 202 30 | Fax +49 (89) 721 1020
willkommen@science-photo.de | www.science-photo.de

Geschäftsführer: Martin Skultety
Registergericht München | HRB 156897
USt-IdNr. DE814345876

Kreissparkasse München Starnberg Ebersberg
IBAN DE02 7025 0150 0028 5189 83
SWIFT BYLADEM1KMS

Es gelten ausschließlich die Geschäftsbedingungen der sciencephotolibrary, einem Geschäftsbereich der StockFood GmbH, die im Internet unter www.science-photo.de/agb abgerufen und ausgedruckt werden können. Auf Wunsch senden wir Ihnen die Geschäftsbedingungen auch kostenlos in Text- und Schriftform zu. Entgegenstehende oder abweichende Bedingungen erkennt sciencephotolibrary nicht an und widerspricht diesen hiermit ausdrücklich.