

# **Design Subtyp-selektiver Agonisten und Antagonisten muskarinischer Rezeptoren**

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

vorgelegt von

**Jessica Vanessa Klöckner**

aus Ansbach

Würzburg 2013



Eingereicht bei der Fakultät für Chemie und Pharmazie am:

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

---

Teile dieser Arbeit wurden bereits in folgender Form publiziert:

### **Originalarbeiten**

Kloekner, J.; Schmitz, J.; Holzgrabe, U.

Convergent, short synthesis of the muscarinic superagonist iperoxo.

*Tetrahedron Lett.* **2010**, 51(27), 3470-3472

Heller, E.; Klöckner, J.; Lautenschläger, W. and Holzgrabe, U.

Online Monitoring of Microwave-Enhanced Reactions by UV/Vis Spectroscopy.

*Eur. J. Org. Chem.* **2010**, 19, 3569–3573.

Bock, A.; Merten, N.; Schrage, R.; Dallanoce, C.; Bätz, J.; Klöckner, J.; Schmitz, J.; Matera, C.; Simon, K.; Kebig, A.; Peters, L.; Müller, A.; Schrobang-Ley, J.; Tränkle, C.; Hoffmann, C.; De Amici, M.; Holzgrabe, U.; Kostenis, E.; Mohr, K.

The allosteric vestibule of a seven transmembrane helical receptor controls G-protein coupling.

*Nat. Commun.* **2012**, 3, 1044

Schrage, R.; Seemann, W. K.; Klöckner, J.; Dallanoce, C.; Racké, K.; Kostenis, E.; De Amici, M.; Holzgrabe, U.; Mohr, K.

Agonists with supraphysiological efficacy at the muscarinic M2 acetylcholine receptor.

*Br. J. Pharmacol.* DOI: 10.1111/bph.12003

### **Abstracta und Kongressmitteilungen**

Schmitz, J.; Klöckner, J.; Rohrer, S.; Baumann K.; Holzgrabe U.

*Syntheses of new subtype selective allosteric modulators of M4-muscarinic receptors.*

DPhG-Jahrestagung, **2007**, Erlangen

Klöckner, J.; Schmitz, J.; Kaufel, D.; Mohr, K.; Holzgrabe, U.

*A novel class of muscarinic receptor ligands: design, synthesis and testing of allosteric/orthosteric hybrid antagonists.*

DPhG-Jahrestagung, **2009**, Jena

Kaufel, D.; Klöckner, J.; Schmitz, J.; Holzgrabe, U.; Mohr, K.

*Muscarinic allosteric/orthosteric hybrid antagonists: structure-activity-relationships suggest a dual-steric binding topography.*

DPhG-Jahrestagung, **2009**, Jena

Kaufel, D.; Klöckner, J.; Schmitz, J.; Holzgrabe, U.; Mohr, K.

*Dualsteric binding mode of allo-/orthosteric hybrid antagonists at muscarinic receptors .*

DPGT-Jahrestagung, **2010**, Mainz, Naunyn-Schmiedebergs Arch Pharmacol 2010, 381 (Suppl 1): 12 (13)

Klöckner, J.; Kaufel, D.; Schmitz, J.; Mohr, K.; Holzgrabe, U.

*Design of allosteric/orthosteric hybrid compounds as antagonists for muscarinic receptors.*

21<sup>st</sup> International Symposium on Medicinal Chemistry, **2010**, Brüssel

Bätz, J.; Klöckner, J.; Ziegler, N.; Frölich, N.; Zabel, U.; Holzgrabe, U.; Mohr, K.; Lohse, M. J.; Hoffmann, C.

*How do orthosteric and allosteric ligands influence the conformational change of the M2 muscarinic acetylcholine receptor.*

International Symposium: Molecular Pharmacology of Receptors, Channels, and Transporters, **2011**, Würzburg

Bätz, J.; Klöckner, J.; Ziegler, N.; Frölich, N.; Zabel, U.; Holzgrabe, U.; Mohr, K.; Lohse, M. J.; Hoffmann, C.

*How do orthosteric and allosteric ligands influence the conformational change of the M2 muscarinic acetylcholine receptor.*

36<sup>th</sup> European Symposium on Hormones and Cell Regulation, **2011**, Mont Ste. Odile, Frankreich

Schrage, R.; Klöckner, J.; Holzgrabe, U.; Mohr, K.

*Superagonism at muscarinic acetylcholine receptors: methodical challenges and structural basis.*

Focused meeting on cell signaling-2, **2012**, Leicester

Schrage, R.; Klöckner, J.; Holzgrabe, U.; Mohr, K.

*In depth-analysis of biphasic agonist competition curves at muscarinic M2 receptors.*

DGPT Jahrestagung **2012**, Dresden, Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmacol. 2012, 385 (Suppl 1): 85 (374)

Bätz, J.; Klöckner, J.; Ziegler, N.; Frölich, N.; Zabel, U.; Holzgrabe, U.; Mohr, K.; Lohse, M. J.; Hoffmann, C.

*Orthosteric and allosteric ligands differentially influence the conformational change of the M<sub>2</sub> muscarinic acetylcholine receptor.*

DPGT-Jahrestagung, **2012**, Dresden, Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmacol. 2012, 385 (Suppl 1): 9

## **Danksagung**

Die vorliegende Arbeit entstand in der Zeit von Januar 2007 bis Juli 2012 am Institut für Pharmazie und Lebensmittelchemie der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg auf Anregung und unter der Anleitung von

### **Frau Prof. Dr. Ulrike Holzgrabe**

Ihr danke ich besonders für die freundliche Aufnahme in den Arbeitskreis, die interessante und abwechslungsreiche Aufgabenstellung, das in mich gesetzte Vertrauen, durch das ich stets eigenständig arbeiten konnte, sowie die Unterstützung während jeder Phase der Promotion.

Ein großer Dank gilt meinen Kooperationspartnern für die sehr angenehme, unkomplizierte und vor allem interessante Zusammenarbeit:

- Prof. Dr. Klaus Mohr vom Institut für Pharmakologie der Universität Bonn und seinen Mitarbeitern Dr. Dorina Kaufel, Andreas Bock und Ramona Schrage.
- Prof. Dr. Carsten Hoffmann vom Institut für Pharmakologie der Universität Würzburg und seiner Mitarbeiterin Dr. Julia Bätz. Ein Extra-Dankeschön an Dich Julia für den sehr interessanten Tag bei Dir im Institut, an dem ich einige Einblick in die FRET-Mikroskopie erhalten durfte.
- PD Dr. Cristian Tränkle vom Institut für Pharmakologie der Universität Bonn
- Prof. Dr. Evi Kostenis vom Institut für pharmazeutische Biologie der Universität Bonn.
- Prof. Dr. Marco DeAmici di Dipartimento di Scienze Farmaceutiche, Università degli Studi di Milano, Italy

Weiterer Dank geht an:

Frau Ebner und Frau Möhler, die sich immer um alles Organisatorische gekümmert und uns mit ihren flotten Sprüchen stets den Alltag versüßt haben.

Den vielen Kollegen im 3. Semester, allen voran Ines Schmidt. Mit Euch hatte ich trotz des stressigen Praktikumsalltags immer sehr viel Spaß.

Dem gesamten Arbeitskreis für die lustigen Stunden sowohl in Kaffee- und Mittagspausen als auch bei vielen abendlichen Unternehmungen.

Liana Pogorelaja, der guten Seele des 4er-Labors, für ihre tatkräftige Unterstützung in allen Laborbelangen.

Dr. Eberhard Heller, für unzählige Tipps und Tricks im Labor, vor allem wenn es um Mikrowellen-Fragestellungen ging.

Alexander Hörst, Jan Glaser und Raphael Kühnreich für die liebe Aufnahme in ihr Büro und die angenehme Atmosphäre. Ich habe mich sehr wohl gefühlt bei Euch!

Dr. Jens Schmitz, vor allem für die vielen themenbezogenen Diskussionen und die Hilfestellung zu Beginn der Promotion.

Den Synthese-Kollegen im 6er-Labor Dr. Christina Juli, Christine Topf, Florian Seufert, Georg Hiltensperger, Ines Schmidt, Maximilian Tischer und Dr. Michaela Prinz, für den freundschaftlichen Umgang in- und außerhalb des Labors. Besonders möchte ich hier Georg und Max für die wahnsinnig schöne Zeit in Brüssel danken. Allen voran und gerade für die letzten Monate danke ich Dir, Michi. Du warst mir sowohl durch Deine tatkräftige Unterstützung als auch mit Deinen aufmunternden Worten eine große Hilfe.

Meinen Laborkollegen Dr. Tim Göbel, Dr. Eva Kugelmann und Andreas Hartung. Durch Euch werde ich die Zeit im Labor immer in sehr guter Erinnerung behalten. Besonders möchte ich mich aber bei Dir bedanken, Andi! In der Zeit, in der wir quasi nur noch uns hatten im Labor, sind wir zu einem tollen Team geworden. Ich danke Dir vor allem für Deine lustigen musikalischen Einlagen, für Deine ehrliche und konstruktive Kritik und für unsere Gespräche „am Fenster“.

Andreas Hartung, Dr. Christoph Albert, Dr. Claudia Borst, Dr. Eva Kugelmann und Dr. Tim Göbel. Ihr habt mir nicht nur die Zeit an der Uni versüßt, ich habe auch die vielen Abende mit Euch genossen. Ich hoffe sehr, dass wir es weiterhin schaffen, uns immer wieder zu sehn und uns nicht aus den Augen zu verlieren. Und Claudi: Ich danke Dir so sehr für unsere Mädelsabende, für Deine lieben Mails und dafür, dass du immer für mich da bist!

Meinem Freundeskreis, besonders den restlichen Würzburgern Manuela, Peter, Steffen und Johannes für unzählige tolle Abende. Danke für die lange und treue Freundschaft!

Manuel und Matthias. Auch Euch danke ich für Eure Freundschaft, die zum Teil über große Entfernungen hinweg Bestand hatte.

Meinen Eltern und meinem Bruder Patrick. Danke für Eure unermüdliche Unterstützung in jeder Lebenslage, Euer Verständnis und dass Ihr immer hinter mir steht. Ohne Euch hätte ich so manches nicht geschafft!!!

Last but not least danke ich Dir, Nicholas. Du warst in den letzten Jahren meine größte Stütze und meine Zuflucht. Durch Deine Geduld, Deine Zuversicht und Deine Unterstützung hast Du mir immer wieder Kraft gegeben und mich aufgemuntert. Ich freue mich auf die kommende Zeit mit Dir und hoffe, Du hast Recht, was den Regen angeht!



**Meinen Eltern und  
meinem Bruder**



„Ein Gelehrter in einem Laboratorium  
ist nicht nur ein Techniker,  
er steht auch vor den Naturvorgängen  
wie ein Kind vor einer Märchenwelt.“

Marie Curie (1867-1934)



<b>1</b>	<b>EINLEITUNG.....</b>	<b>1</b>
1.1	G-PROTEIN-GEKOPPELTE REZEPTOREN .....	1
1.1.1	<i>Aufbau und Klassifizierung der GPCRs.....</i>	<i>1</i>
1.1.2	<i>Signalübertragung in GPCRs .....</i>	<i>3</i>
1.1.3	<i>Strukturaufklärung G-Protein-gekoppelter Rezeptoren.....</i>	<i>4</i>
1.1.3.1	Strukturmerkmale G-Protein-gekoppelter Rezeptoren .....	5
1.2	MUSKARINISCHE ACETYLCHOLINREZEPTOREN .....	6
1.2.1	<i>Aufbau und Klassifizierung.....</i>	<i>6</i>
1.2.2	<i>Therapeutischer Einsatz muskarinischer Liganden und ihre Problematik.....</i>	<i>8</i>
1.2.3	<i>Bindungsdomänen.....</i>	<i>10</i>
1.3	ALLOSTERE MODULATION MUSKARINISCHER REZEPTOREN .....	10
1.3.1	<i>Das ternäre Komplex-Modell.....</i>	<i>11</i>
1.3.2	<i>Arten allosterer Modulatoren .....</i>	<i>12</i>
1.3.3	<i>Erste allosterische Modulatoren und deren Bindungsareale .....</i>	<i>13</i>
1.4	ENTWICKLUNG DUALSTERER LIGANDEN FÜR MUSKARINREZEPTOREN.....	16
1.5	ZIELSETZUNG.....	20
<b>2</b>	<b>SYNTHESE UND PHARMAKOLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN DER ZIELVERBINDUNGEN.....</b>	<b>22</b>
2.1	ALLOSTERE MODULATOREN FÜR DEN M <sub>2</sub> -REZEPTOR UND HYBRID-VORSTUFEN .....	22
2.1.1	<i>Synthese.....</i>	<i>23</i>
2.1.1.1	Synthese der N-[3-(N',N'-Dimethylamin)propyl]-phthalimide bzw. -naphthalimide.....	23
2.1.1.2	Synthese der monoquartären verkürzten Phthalimid- bzw. Naphthalimid-Derivate.....	24
2.1.1.3	Synthese der Bromalkyl-trimethylammonium-Bromide.....	26
2.1.1.4	Synthese der verkürzten Bis-(ammonium)alkan-Bausteine .....	26
2.1.2	<i>Pharmakologische Untersuchungen .....</i>	<i>29</i>
2.1.2.1	Theoretische Grundlagen des Testsystems .....	29
2.1.2.2	Durchführung und Ergebnisse .....	30
2.1.3	<i>Ergebnisse.....</i>	<i>33</i>
2.2	IPEROXO .....	33
2.2.1	<i>Synthese.....</i>	<i>34</i>
2.2.1.1	Klassische Syntheseroute .....	34
2.2.1.2	Alternative Syntheseroute der Iperoxo-Base .....	35
2.2.1.3	Synthese des Agonisten Iperoxo.....	38
2.2.2	<i>Ergebnisse.....</i>	<i>38</i>
2.3	AGONISTISCHE HYBRIDVERBINDUNGEN UND VERKÜRZTE DERIVATE .....	39
2.3.1	<i>Synthese.....</i>	<i>39</i>
2.3.1.1	Dualstere Agonisten .....	39

## Inhaltsverzeichnis

---

2.3.1.2	Versuche zur Synthese verkürzter Iperoxo-Hybride.....	41
2.3.1.3	Synthese der N-alkylierten Iperoxo-Derivate .....	43
2.3.2	<i>Pharmakologische Untersuchungen</i> .....	44
2.3.2.1	Grundlagen der Testsysteme.....	44
2.3.2.2	Durchführung und Ergebnisse .....	47
2.3.3	<i>Ergebnisse</i> .....	51
2.4	ANTAGONISTISCHE HYBRIDVERBINDUNGEN UND VERKÜRZTE DERIVATE .....	51
2.4.1	<i>Synthese</i> .....	52
2.4.1.1	Synthese von Antagonist-Hybriden .....	52
2.4.1.2	Alternative Bindung des Allosters an Atropin.....	53
2.4.1.3	Herstellung von verkürzten Antagonist-Hybriden.....	55
2.4.2	<i>NMR-Diskussion</i> .....	59
2.4.3	<i>Pharmakologische Untersuchungen</i> .....	63
2.4.3.1	Theoretische Grundlagen des Testsystems .....	63
2.4.4	<i>Ergebnisse</i> .....	64
2.5	DUALSTERE HYBRIDVERBINDUNGEN FÜR DEN M <sub>4</sub> -REZEPTOR.....	65
2.5.1	<i>Synthese</i> .....	65
2.5.1.1	Synthese von N-Cyclopropyl-2-mercaptoacetamid .....	67
2.5.1.2	Synthese von 2,5,6-Trichlor-4-methylnicotinnitril .....	67
2.5.1.3	Versuche zur Einführung eines Spacers .....	69
2.5.2	<i>Ergebnisse</i> .....	69
2.6	DUALSTERE HYBRIDVERBINDUNGEN FÜR DEN M <sub>1</sub> -REZEPTOR.....	70
2.6.1	<i>Synthese</i> .....	71
2.6.1.1	Synthese des 4-Chinolon-Grundkörpers .....	71
2.6.1.2	Versuche zur Amidierung bzw. Veresterung der Säure-Gruppe.....	74
2.6.1.3	N-Alkylierung der Chinolon-Ester .....	76
2.6.1.4	Einführen eines Spacers.....	78
2.6.1.5	Substitution der Hydroxyl-Funktion.....	80
2.6.1.6	Synthese der Chinolon-Iperoxo-Hybrid-Verbindungen.....	83
2.6.2	<i>Pharmakologische Untersuchungen</i> .....	85
2.6.2.1	Grundlagen des Testsystems.....	85
2.6.2.2	Durchführung und Ergebnisse .....	85
2.6.3	<i>Ergebnisse</i> .....	88
2.7	FLUORESZENZ-MARKIERUNG .....	88
2.7.1	<i>Synthese</i> .....	89
2.7.1.1	Synthese von 2,4,6-Trimethylpyrylium-tetrafluorborat.....	89
2.7.1.2	Synthese von Py-1 .....	90
2.7.1.3	Einführen des Spacers .....	92
2.7.1.4	Versuche zur Umsetzung von <b>35</b> .....	93
2.7.2	<i>Ergebnisse</i> .....	97

<b>3</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>98</b>
<b>4</b>	<b>SUMMARY .....</b>	<b>103</b>
<b>5</b>	<b>EXPERIMENTELLER TEIL .....</b>	<b>107</b>
5.1	ALLGEMEINE ANGABEN.....	107
5.1.1	<i>Verwendete Geräte</i> .....	107
5.1.2	<i>Chromatographie</i> .....	108
5.1.3	<i>Chemikalien und Lösungsmittel</i> .....	108
5.1.4	<i>Abkürzungsverzeichnis</i> .....	108
5.2	SYNTHESEVORSCHRIFTEN UND ANALYTISCHE DATEN .....	109
5.2.1	<i>Synthese allosterer Modulatoren und ihrer Vorstufen</i> .....	109
5.2.1.1	Synthese der N-[3-(N',N'-Dimethylamin)propylphthalimid- bzw. naphthalimid-Derivate <b>1a-1c</b> .....	109
5.2.1.2	Synthese der verkürzten allosteren Bausteine <b>2a-2e</b> .....	110
5.2.1.3	Synthese der Zwischenstufe zur Herstellung unsymmetrischer Mono- bzw. Bis-(ammonium)alkan-Derivate <b>3a-3h</b> .....	111
5.2.1.4	Synthese der Bromalkyl-trimethylammonium-Bromide <b>4a</b> und <b>4b</b> .....	113
5.2.1.5	Synthese von verkürzten Bis-(ammonium)alkan-Bausteinen <b>5a</b> und <b>5b</b> .....	113
5.2.2	<i>Synthese von Iperoxo</i> .....	114
5.2.2.1	Synthese von 4-Dimethylamino-but-2-en-1-ol <b>10</b> .....	114
5.2.2.2	Synthese von 4-((4,5-Dihydroisoxazol-3-yl)oxy)-N,N-dimethylbut-2-yn-1-amin (Iperoxo-Base) <b>9</b> ....	115
5.2.2.3	Synthese von Iperoxo <b>11</b> .....	115
5.2.3	<i>Agonistische Hybridverbindungen und verkürzte Derivate</i> .....	116
5.2.3.1	Synthese der Alloster-Iperoxo-Hybrid-Verbindungen <b>12a-c</b> .....	116
5.2.3.2	Synthese des Iperoxo-Hexamethonium-Derivats <b>13</b> .....	117
5.2.3.3	Verkürzte Iperoxo-Derivate <b>14</b> und <b>15a-j</b> .....	118
5.2.4	<i>Antagonistische Hybridverbindungen und verkürzte Derivate</i> .....	122
5.2.4.1	Umsetzung von Scopolamin mit <b>4a</b> zu <b>16</b> und Synthese von verkürzten Atropin- bzw. Scopolamin-Derivaten <b>17a-h</b> und <b>18b-h</b> .....	122
5.2.5	<i>Synthese der Vorstufen von Thienopyridin</i> .....	129
5.2.5.1	Synthese von 2-Chlor-N-cyclopropylacetamid <b>19</b> .....	129
5.2.5.2	Synthese von 2-(Cyclopropylamin)-2-oxoethyl)-ethanthioat <b>20</b> .....	129
5.2.5.3	Synthese von N-Cyclopropyl-2-mercapto-acetamid <b>21</b> .....	130
5.2.5.4	Synthese von 3-Cyano-2,6-dihydroxy-4-methylpyridin <b>22</b> .....	131
5.2.5.5	Synthese von 3-Cyano-2,5,6-trichlor-4-methylpyridin <b>23</b> .....	131
5.2.6	<i>Synthese von Iperoxo-Chinolon-Hybridverbindungen</i> .....	132
5.2.6.1	Synthese der Anilinmethylenmalonsäurediethylester-Derivate <b>24a-h</b> .....	132
5.2.6.2	Synthese der Ethyl-4-oxo-1,4-dihydrochinolin-3-carboxylate <b>25a-g</b> .....	134
5.2.6.3	Synthese des 1-Benzyl-6-fluor-4-oxo-1,4-dihydrochinolin-3-carbonsäure <b>26</b> .....	135
5.2.6.4	Synthese der Ethyl-1-benzyl-4-oxo-1,4-dihydrochinolin-carboxylate <b>27a-h</b> .....	136
5.2.6.5	Synthese des Ethyl-6-fluor-4-oxo-1-(pyridin-2-ylmethyl)-1,4-dihydrochinolin-3-carboxylats <b>28h</b> ....	140
5.2.6.6	Synthese der 1-Benzyl-N-hydroxyalkyl-4-oxo-1,4-dihydrochinolin-3-carboxamide <b>29</b> .....	141
5.2.6.7	Synthese der N-Hydroxyalkyl-4-oxo-1-(pyrrolidin-2-ylmethyl)-1,4-dihydrochinolin-3-carboxamide <b>30h-C4, 30h-C-6</b> .....	150

## Inhaltsverzeichnis

---

5.2.6.8	Synthese der 1-Benzyl-N-bromalkyl-4-oxo-1,4-dihydrochinolin-3-carboxamide <b>31</b> .....	151
5.2.6.9	Synthese der Chinolon-Iperoxo-Hybridverbindungen <b>32</b> .....	158
5.2.7	<i>Synthese und Funktionalisierung des Fluoreszenzfarbstoffes Py-1</i> .....	165
5.2.7.1	Synthese von 2,4,6-Trimethylpyrylium-tetrafluoroborat <b>33</b> .....	165
5.2.7.2	Synthese von 2,6-Dimethyl-4-[( <i>E</i> )-2-(2,3,6,7-tetrahydro-1 <i>H</i> ,5 <i>H</i> -pyrido[3,2,1- <i>ij</i> ]-quinolin-9-yl)vinyl]pyranylium Tetrafluoroborate <b>34</b> .....	166
5.2.7.1	Synthese von ( <i>E</i> )-1-(6-Hydroxyhexyl)-2,6-dimethyl-4-[2-(2,3,6,7-tetrahydro-1 <i>H</i> ,5 <i>H</i> -benzo[ <i>ij</i> ]quinolizin-9-yl)ethenyl]pyridinium Tetrafluoroborate <b>35</b> .....	167
<b>6</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b> .....	<b>168</b>
<b>7</b>	<b>ÜBERSICHT ÜBER DIE SYNTHETISIERTEN VERBINDUNGEN</b>	

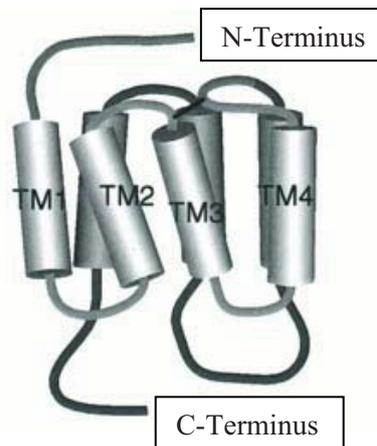
# 1 Einleitung

## 1.1 G-Protein-gekoppelte Rezeptoren

G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCRs, G: Guaninnukleotid-bindend) stellen mit ca. 1000 Vertretern die größte Gruppe in der Familie der membrangebundenen Rezeptoren im menschlichen Genom dar und zeichnen sich durch eine hohe Diversität aus.<sup>1,2,3</sup> Durch ihre ebenfalls weitreichende Verteilung im menschlichen Körper und der Beteiligung an vielen physiologischen Prozessen sind GPCRs eine wichtige Zielstruktur für die Entwicklung neuer Arzneistoffe. Derzeit interagiert etwa die Hälfte aller auf dem Markt befindlichen Arzneistoffe mit GPCRs und erwirtschaftet jährlich Umsätze von mehr als 40 Milliarden Dollar.<sup>4</sup> Allerdings zielen die bislang etablierten Arzneistoffe lediglich auf eine sehr kleine Zahl der GPCRs ab, so dass hier großes Potential liegt.<sup>5</sup> Diese Tatsache zeigt, warum die Forschung an G-Protein-gekoppelten Rezeptoren, d.h. die Aufklärung des Aufbaus dieser Rezeptorfamilie und ihrer Signaltransduktion, von großem Interesse ist.

### 1.1.1 Aufbau und Klassifizierung der GPCRs

Die GPCR-Familie wird aus einem Proteinstrang gebildet, der mit sieben  $\alpha$ -Helices die Plasmamembran durchläuft.<sup>5</sup> Diese heptahelicalen transmembranären (TM) Domänen sind verbunden durch jeweils drei alternierende intrazelluläre (IL) und extrazelluläre (EL) Schleifen („loops“) mit einem extrazellulären Amino-Terminus und dem zytoplasmatischen Carboxy-Terminus (siehe **Abb. 1**).<sup>6</sup>



**Abb. 1:** Schematische Darstellung eines G-Protein-gekoppelten Rezeptors (modifiziert nach Ji *et al.*<sup>7</sup>)

Im Gegensatz zu den weitestgehend hydrophoben transmembranären Fragmenten sind die intra- und extrazellulären Schleifen hydrophil.<sup>4</sup> Die sieben transmembranären Helices bestehen jeweils aus etwa 24 Aminosäuren, wohingegen die N- und C-terminalen Enden ebenso wie die intra- und extrazellulären Schleifen sehr stark in ihrer Länge variieren und bis zu 100 Aminosäuren aufweisen.<sup>4</sup>



formationen, dem aktiven ( $R^*$ ) und dem inaktiven ( $R$ ) Zustand.<sup>4,9</sup> Im aktiven Zustand hat der Rezeptor eine höhere Affinität zu G-Proteinen. Die Bindung eines Liganden an den Rezeptor verschiebt das Gleichgewicht, mit einem Agonisten (griech. *agonistís* - der Handelnde) zum aktiven und mit einem inversen Agonisten zum inaktiven Zustand. Antagonisten (griech. *antagonistés* - der Gegenhandler) verhindern die Bindung von Liganden, meist endogener Agonisten, ohne jedoch das Gleichgewicht zwischen aktivem und inaktivem Zustand zu beeinflussen. Obwohl dieses Zwei-Zustands-Modell in der Vergangenheit ein sehr nützliches Werkzeug für die Beschreibung und Untersuchung der Rezeptor-Aktivität war, wurde es doch deutlich erweitert, da zwischen dem aktiven und inaktiven Zustand offenbar viele Intermediate existieren.<sup>4</sup>

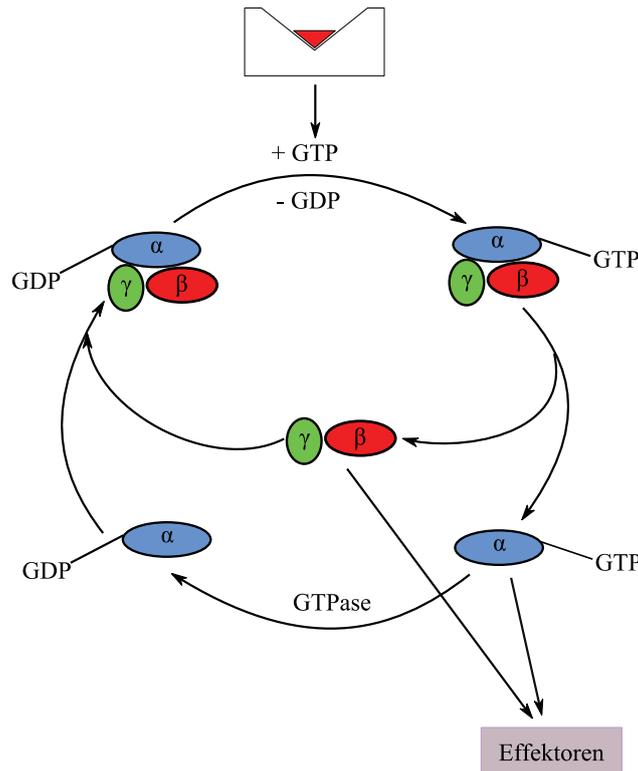
In allen GPCRs resultiert die Bindung eines orthosteren Agonisten und damit die Aktivierung in einer Konformationsänderung des Rezeptors, was einen Anstieg an Affinität für G-Proteine zur Folge hat. Neben der orthosteren Bindungsstelle weisen viele GPCRs eine oder mehrere weitere Bindungsstellen, sogenannte allosterische (griech. *allos* (anders) und *stereos* (Ort), d. h. „am anderen Ort“) Bindungsstellen auf, die sich räumlich wie auch funktionell unterscheiden.<sup>4</sup> Auf das Phänomen der allosteren Modulation wird in **Kapitel 1.3** genauer eingegangen.

### 1.1.2 Signalübertragung in GPCRs

Im Gegensatz zu den strukturellen Gemeinsamkeiten aktivieren die verschiedenen GPCRs unterschiedliche Signalwege, die verschiedene G-Protein-Subtypen einschließen, aber auch G-Protein-unabhängige Signalwege sowie komplexe regulatorische Prozesse.<sup>8</sup>

Im Allgemeinen erfolgt die Signalübertragung über die G-Proteine, die aus den drei Untereinheiten  $\alpha$ ,  $\beta$  und  $\gamma$  bestehen. Die  $\alpha$ -Untereinheit bindet GTP und hydrolysiert dieses durch seine GTPase-Aktivität zu GDP. Kommt es nach Bindung eines Agonisten zu einer Rezeptor-Aktivierung, wird ein Austausch von GDP durch GTP an dieser Untereinheit beschleunigt, was zur Dissoziation des  $G\alpha\beta\gamma$ -GTP-Komplexes in die  $G\alpha$ -GTP- und die  $G\beta\gamma$ -Untereinheiten führt, die unterschiedliche Reaktionskaskaden auslösen. Durch die GTPase wird das gebundene GTP zu GDP hydrolysiert und schließlich findet die Reassoziierung des  $G\alpha$  und des  $G\beta\gamma$  statt, wodurch der inaktive Zustand wieder hergestellt wird (siehe **Abb. 3**).<sup>1,10</sup>

Aufgrund der Vielfalt endogener Funktionen existiert eine Fülle verschiedenartiger G-Proteine, wie beispielsweise Cyclasen-stimulierende ( $G_s$ ), Cyclasen-inhibierende ( $G_i$ ), Phospholipase-C-aktivierende G-Proteine ( $G_q$ -Proteine) oder die  $G_o$ -Proteine (für „other“, da deren Funktion zunächst nicht geklärt war). In allen Fällen ist die dritte intrazelluläre Schleife des Rezeptors für die Bindung an das jeweilige G-Protein verantwortlich und entscheidet darüber, zu welchen der in der Zelle vorkommenden G-Proteine die Bindung erfolgt.<sup>1,10</sup>



**Abb. 3:** Schematische Darstellung der Aktivierung G-Protein-gekoppelter Rezeptoren (in Anlehnung an Milligan und Kostenis<sup>10</sup>)

Die Signalübertragung wird durch die Bindung endogener bzw. exogener Liganden zumeist an die orthostere Bindungsstelle des Rezeptors ausgelöst. Diese Orthostere lassen sich in verschiedene Klassen einteilen:<sup>11</sup>

- a) **Vollagonisten** sind in der Lage, eine maximale Rezeptor-Stimulation zu bewirken
- b) **Partialagonisten:** derartigen Liganden ist es auch in sättigenden Konzentrationen nicht möglich, die volle Aktivität hervorzurufen
- c) **Neutrale Antagonisten** haben keinen Effekt auf die Signalwirkungs-Aktivität, können allerdings andere Liganden daran hindern, an den Rezeptor zu binden
- d) **Inverse Agonisten** reduzieren das Level der basalen oder konstitutiven Aktivität unter das des unbesetzten Liganden

### 1.1.3 Strukturaufklärung G-Protein-gekoppelter Rezeptoren

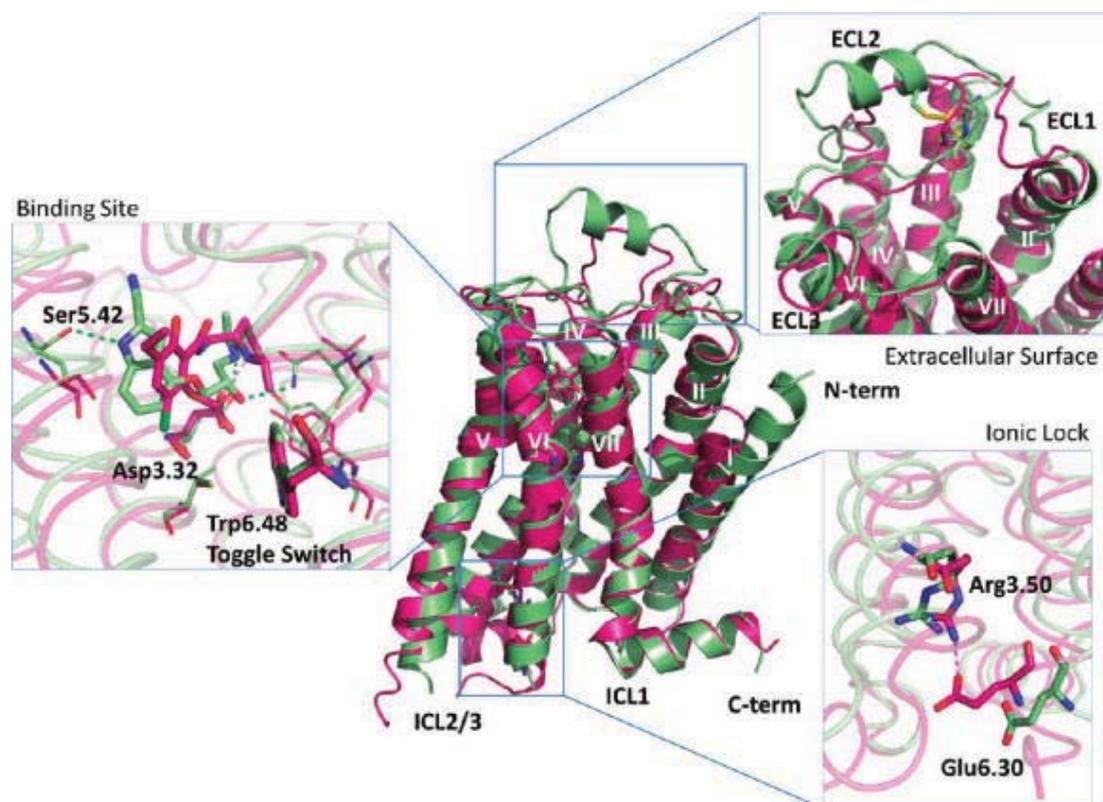
Um Liganden und damit Arzneistoffe zu finden, die gezielt an bestimmte GPCRs binden, ist es von großer Bedeutung den strukturellen Aufbau des jeweiligen GPCRs zu kennen. Da lange Zeit keine Röntgenstrukturen von GPCRs existierten, wurde mit Modellen gearbeitet, die lediglich von der Struktur des Bakteriorhodopsins abgeleitet waren. Diese wurde 1993 von Schertler *et al.* durch hochauflösende Elektronen-Kryomikroskopie sowie durch die niedrig aufgelöste Elektronendichte des bovinen Rhodopsins aufgeklärt.<sup>12</sup> Diese Modelle, so sehr sie die Forschung auf dem Gebiet der GPCRs auch

vorangetrieben haben, konnten nicht völlig erklären, wie ein Ligand an einen bestimmten Rezeptor bindet.<sup>13,14</sup>

Allerdings konnten in der letzten Dekade wichtige Erfolge auf dem Gebiet der Strukturaufklärung G-Protein gekoppelter Rezeptoren erzielt werden. So existieren heute hochaufgelöste Kristallstrukturen von GPCRs, in den meisten Fällen mit verschiedenen, gebundenen Liganden von kleiner Molekülgröße. Diese Rezeptoren sind: Rhodopsin,  $\beta_1$  und  $\beta_2$  adrenerge Rezeptoren, der Adenosin  $A_{2A}$ -Rezeptor, Chemokin CXCR<sub>4</sub>-Rezeptor, der Dopamin D<sub>3</sub>-Rezeptor, die Opioid-Rezeptoren  $\kappa$ -OR und  $\mu$ -OR sowie die muskarinischen Rezeptoren M<sub>2</sub> und M<sub>3</sub>. Von Rhodopsin, den beiden adrenergen Rezeptoren  $\beta_1$  und  $\beta_2$  und dem Adenosin  $A_{2A}$  konnten zusätzlich Strukturen mit sowohl gebundenem Agonisten als auch Antagonisten erhalten werden.<sup>13,15,16,17,18</sup>

### 1.1.3.1 Strukturmerkmale G-Protein-gekoppelter Rezeptoren

Durch die Röntgenstrukturen konnten strukturelle Gemeinsamkeiten und Besonderheiten der GPCRs identifiziert werden. **Abb. 4** veranschaulicht die Charakteristika der Familie A-GPCRs. Die transmembranäre Domäne, die, wie bereits beschrieben, aus sieben  $\alpha$ -helikalen Windungen besteht, stellt eine tiefe hydrophobe Kavität dar, die verschiedene H-Brücken-Donoren aufweist. Diese sind für die jeweiligen Rezeptor-Typen spezifisch.<sup>13</sup>



**Abb. 4:** Allgemeiner Aufbau der Familie A GPCRs (erhalten durch Röntgen-Kristallographie. Die Strukturen von  $\beta_1$ AR (grün, 2VT4) und D3R (rot, 3PBL) wurden übereinandergelegt und als repräsentative Struktur gewählt. Wesentliche Merkmale sind hervorgehoben.)<sup>13</sup> Mit freundlicher Genehmigung des Journal of Medicinal Chemistry. Copyright (2011) American Chemical Society.

EL2 geht aus den Enden von TM4 und TM5 hervor und befindet sich im extrazellulären Bereich der Familie A. Diese Domäne stellt eine Herausforderung dar, da EL2 zum einen sehr stark in Länge und Beschaffenheit (unterschiedlich starr durch Disulfid-Brücken) variiert, gleichzeitig aber eine Rolle in der Ligand-Bindung zu spielen scheint.<sup>13</sup>

Unmittelbar unterhalb der orthosteren Bindungsstelle an TM6 befindet sich ein hoch konservierter Tryptophan-Rest, der als „toggle switch“ (Kippschalter) bezeichnet wird und besonders für Rhodopsin eine wichtige Rolle spielt. Dieser Teil scheint nach derzeitigem Wissensstand an konformativen Veränderungen beteiligt zu sein, die durch eine vollständige Rezeptor-Aktivierung hervorgerufen werden. Der Einfluss dieses „toggle switch“ variiert jedoch sehr stark zwischen den einzelnen Rezeptor-Typen.<sup>13</sup>

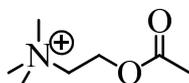
Ein weiteres Strukturmerkmal einiger Familie A-GPCRs ist der sogenannte „ionic lock“. Hierunter versteht man eine Salz-Brücke innerhalb der helikalen Domäne auf der intrazellulären Seite, die in der Konformation eines Grundzustandes (inverse Agonisten) geschlossen wird.<sup>13</sup>

Zwar konnten mittels der Strukturaufklärung einige wichtige Erkenntnisse erhalten werden, der genaue Mechanismus, mit der die Information eines Liganden weitergeleitet wird, ist aber bis heute noch ungeklärt. Die große Bedeutung dieses Forschungsgebiets wird durch die Vergabe des Chemie-Nobelpreises 2012 an Robert J. Lefkowitz und Brian K. Kobilka für ihre Studien an GPCRs deutlich.

## 1.2 Muskarinische Acetylcholinrezeptoren

### 1.2.1 Aufbau und Klassifizierung

Zur Rezeptorgruppe der GPCRs gehören eine Reihe wichtiger Neurotransmitter-Rezeptoren, wie beispielsweise die muskarinischen Acetylcholinrezeptoren (mAChR).<sup>1</sup> Die mAChRs sind Bestandteil des Parasympathikus, der gemeinsam mit dem Sympathikus das vegetative Nervensystem bildet. Der endogene Ligand Acetylcholin (siehe **Abb. 5**) leitet die Reize über nikotinische Acetylcholinrezeptoren (nAChR), bei denen es sich um ligandgesteuerte Ionenkanäle handelt, auf postganglionäre Neuronen weiter. Die Erregung der Erfolgsorgane erfolgt schließlich ebenfalls durch Acetylcholin an Muskarinrezeptoren, die sowohl in der Peripherie als auch im zentralen Nervensystem zu finden sind.<sup>19</sup> Durch Aktivierung des Parasympathikus wird eine Vielzahl von Effekten an unterschiedlichen Organen ausgelöst. So ist beispielsweise eine Sekretionssteigerung an Tränendrüse, Speichel- sowie Verdauungsdrüsen zu beobachten, ebenso wie verminderte Herzfrequenz und Kontraktion der Blasenwandmuskulatur.<sup>1</sup>



**Abb. 5:** Strukturformel Acetylcholin

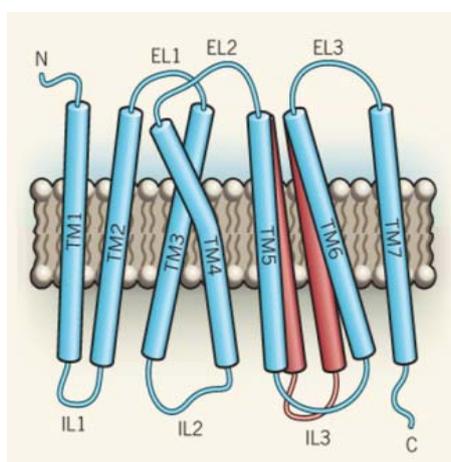
Aufgrund ihres Aufbaus lassen sich Muskarinrezeptoren der Familie der rhodopsinartigen GPCRs zuordnen (vgl. **Kapitel 1.1.3.1**). Unter Verwendung verschiedener Techniken, wie Klonierungsstudien, Sequenzanalysen, aber auch Radioligand-Bindungsexperimenten konnten fünf muskarinische Subtypen ( $M_1$ - $M_5$ ) differenziert werden.<sup>20</sup> Diese unterscheiden sich unter anderem in ihrer Verteilung im Organismus.  $M_1$ -,  $M_4$ - und  $M_5$ -Rezeptoren findet man hauptsächlich im zentralen Nervensystem (ZNS),  $M_2$ - und  $M_3$ -Rezeptoren treten im ZNS und in der Peripherie auf, wobei die meisten Zell- bzw. Gewebe-Typen oftmals mehr als einen der Subtypen exprimieren.<sup>21,22,23,24,25</sup> Neben ihrer Verbreitung im Körper lassen sich die Muskarinrezeptor-Subtypen auch gemäß ihrer unterschiedlichen Präferenz für die einzelnen G-Proteine in zwei Gruppen unterteilen. Die Subtypen  $M_1$ ,  $M_3$  und  $M_5$  aktivieren vornehmlich die Phospholipase-C und die Calcium-Freisetzung über G-Proteine des  $G_{q/11}$ -Typus. Dagegen inhibieren die  $M_2$ - und  $M_4$ -Subtypen die Aktivität der Adenylat-Cyclase bzw. modulieren die Leitfähigkeit der Ionen-Kanäle, was über die Interaktion mit  $G_{i/o}$ -Proteinen geschieht.<sup>21,22,25</sup> Aus dieser Variabilität sowohl der Verteilung muskarinischer Rezeptoren als auch der unterschiedlichen Signalwege wird ersichtlich, dass Muskarinrezeptoren an einer Vielzahl unterschiedlicher Körperfunktionen beteiligt sind. Die Muskarinrezeptoren, die sich im ZNS befinden, regulieren eine Reihe wichtiger Funktionen wie kognitive, sensorische, motorische und autonome Prozesse. So konnten bereits einige ZNS-Erkrankungen mit Muskarinrezeptoren in Verbindung gebracht werden, wie z.B. Morbus Alzheimer, Morbus Parkinson, aber auch Depression und Schizophrenie.<sup>25,26,27,28,29</sup> Durch Aktivierung der Rezeptoren in der Peripherie wird unter anderem die Herzfrequenz herabgesetzt ( $M_2$ ), und es erfolgt eine Erhöhung der glandulären Sekretion sowie der Kontraktion der glatten Muskulatur ( $M_3$ ).<sup>22,25,30,31</sup>

Kürzlich ist es Haga *et al.* und Kruse *et al.* gelungen, Kristallstrukturen der muskarinischen Subtypen  $M_2$  und  $M_3$  aufzuklären. Haga *et al.* beschreiben die Struktur des  $M_2$ -Rezeptors, an den der muskarinische Blocker 3-Chinuclidin-benzylat gebunden ist. Die Struktur des inaktiven  $M_2$ -Rezeptors unterscheidet sich hauptsächlich in der extrazellulären Oberfläche von anderen GPCRs. Hier weist der  $M_2$ -Subtyp einen 33 Ångström großen Kanal auf, der die orthostere Bindungsstelle beinhaltet, die sich in Richtung des Zellinneren ausbreitet.<sup>15</sup> Kruse *et al.* untersuchten die Struktur des  $M_3$ -Rezeptors, an den der Bronchodilator Tiotropiumbromid gebunden ist.<sup>16</sup>

Die Strukturen der Subtypen  $M_2$  und  $M_3$  stimmen weitestgehend überein, was auf einige Charakteristika für muskarinische Rezeptoren schließen lässt, wie beispielsweise eine nach außen geneigte TM4-Domäne, was bisher in anderen GPCRs nicht beobachtet werden konnte.<sup>16</sup> Allerdings wurden auch einige Unterschiede zwischen den inaktiven Strukturen von  $M_2$  und  $M_3$  festgestellt, z.B. das Vorkommen eines Phenylalanin-Restes in der zweiten extrazellulären Schleife des  $M_3$ -Rezeptors. Dieser hat einen Freiraum in der Bindungstasche zur Folge. Im  $M_2$ -Subtyp befindet sich an dieser Stelle ein Leucin-Rest. Dieser kleine Unterschied in den Strukturen der beiden Subtypen könnte möglicherweise für die Entwicklung hochselektiver Arzneistoffe von großer Bedeutung sein. Weiterhin unterscheiden sich die beiden Rezeptoren in der relativen Lage der TM7, was möglicherweise auf einen Unterschied

in der Abfolge der TM2-Aminosäuren und deren Wechselwirkung mit TM7 zurückzuführen ist.<sup>31</sup> Auch in TM5 - besonders am zytoplasmatischen Ende - ist ein Unterschied in der Struktur erkennbar. Hier reglementieren spezifische Aminosäuren der TM6, die mit TM5 am zytoplasmatischen Ende interagieren, die Selektivität der Kopplung zu den verschiedenen G-Proteinen. Dieser Unterschied könnte auch in anderen GPCRs die Kopplungs-Selektivität beeinflussen.

Der Abstand zwischen den transmembranären Helices 5 und 6 im M<sub>2</sub>-Subtyp ist größer als im M<sub>3</sub>-Subtyp. Dieser größere Abstand ist auch in anderen GPCRs, die mit G<sub>i</sub>-Proteinen wechselwirken, zu finden. Im Gegensatz dazu ist die Distanz der beiden Helices im M<sub>3</sub>-Subtyp und anderen G<sub>q</sub>-gekoppelten GPCRs entsprechend geringer (siehe **Abb. 6**).<sup>31</sup>



**Abb. 6:** Schematische Darstellung der Unterschiede der Subtypen M<sub>2</sub> und M<sub>3</sub>: zu sehen ist der größere Abstand der intrazellulären Enden der TM5 und der TM6 in M<sub>2</sub> (blau) und anderen G<sub>i</sub>-gekoppelten Rezeptoren als in M<sub>3</sub> (rot) und anderen G<sub>q</sub> gekoppelten-Rezeptoren.<sup>31</sup> Mit freundlicher Genehmigung der Nature Publishing Group. Copyright (2012) Nature Publishing Group.

### 1.2.2 Therapeutischer Einsatz muskarinischer Liganden und ihre Problematik

Eine Vielzahl muskarinischer Agonisten wie auch Antagonisten sind derzeit auf dem Markt und zielen auf die Behandlung verschiedener Erkrankungen ab. Hierbei wird zwischen Parasympathomimetika (Muskarinrezeptor-Agonisten) und Parasympatholytika (Muskarinrezeptor-Antagonisten) unterschieden.<sup>1</sup> Letztere lassen sich in zwei Gruppen einteilen: ungeladene und geladene Parasympatholytika. Erstere tragen ein tertiäres Stickstoffatom und zeichnen sich bei oraler Applikation durch eine gute und schnelle Resorption aus. Im Gegensatz hierzu werden Parasympatholytika, die ein quartäres Stickstoffatom tragen, aufgrund ihrer permanenten Ladung nur schlecht resorbiert. Daher muss entweder eine wesentlich höhere orale Dosis oder die Dosis parenteral verabreicht werden. Der Vorteil dieser Substanzen ist jedoch, dass sie aufgrund ihres quartären Zentrums die Blut-Hirn-Schranke nicht überwinden können und somit nicht zentral wirksam sind, d.h. keine zentralen Nebenwirkungen verursachen.<sup>1</sup>

**Tabelle 1:** Beispiele für muskarinische Arzneistoffe und ihre Anwendung<sup>1</sup>

Parasympathomimetika	
Arzneimittel	Indikation
Carbachol (Isopto-Carbachol <sup>®</sup> ), Pilocarpin (u.a. Pilomann <sup>®</sup> )	Glaukom
Bethanechol (Myocholine-Glenwood <sup>®</sup> )	(v.a. postoperativer) Darm- und Blasen- atonie

Parasympatholytika	
Arzneimittel	Indikation
tertär { Tolterodin (Detrusitol <sup>®</sup> ), Solifenacin (Vesikur <sup>®</sup> )	Blasenentleerungsstörungen
Butylscopolaminiumbromid (Buscopan <sup>®</sup> )	Spasmen der glatten Muskulatur
quartär { Glycopyrroniumbromid (Robinol <sup>®</sup> )	Herabsetzung des Speichelflusses und der Sekretion im Bronchialsystem
Ipratropiumbromid (Atrovent <sup>®</sup> ), Tiotropiumbromid (Spiriva <sup>®</sup> )	COPD

Trotz der großen Zahl muskarinischer Wirkstoffe ist ihr Nutzen durch das Auftreten gravierender Nebenwirkungen stark begrenzt, da sie unselektiv an einer Vielzahl von Muskarinrezeptoren angreifen. Aus diesem Grund wurde in den letzten 20 Jahren vermehrt an der Entwicklung von subtypselektiven muskarinischen Liganden geforscht. Mögliche Anwendungsgebiete selektiver muskarinischer Liganden sind in **Tabelle 2** dargestellt.

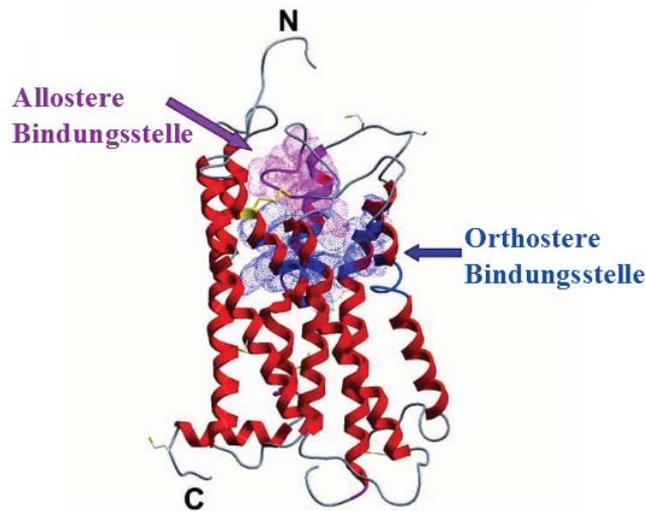
**Tabelle 2:** Mögliche Anwendungsgebiete für selektive muskarinische Liganden<sup>25,27,32</sup>

Therapeutische Anwendung	Selektiver muskarinischer Ligand
Morbus Alzheimer	M <sub>1</sub> -Agonisten, M <sub>2</sub> -Antagonist, M <sub>5</sub> -Agonist
Hyperaktive Blase, Reizdarm-Syndrom, COPD	M <sub>2</sub> - und M <sub>3</sub> -Antagonisten
Chronische Schmerzen	M <sub>2</sub> - und M <sub>4</sub> -Agonisten
Schizophrenie	M <sub>1</sub> - Agonisten, M <sub>5</sub> -Antagonisten
Drogenabhängigkeit, -entzug	M <sub>5</sub> -Antagonisten

Die Suche nach derartigen Verbindungen gestaltete sich jedoch schwierig, da die orthostere Bindungsstelle in den einzelnen Subtypen hochkonserviert vorliegt, d.h. sie unterscheidet sich kaum in ihrer Aminosäuresequenz.<sup>21,25,33</sup>

### 1.2.3 Bindungsdomänen

Wie die meisten GPCRs weisen auch Muskarinrezeptoren neben der orthosteren mindestens zwei allosteren Bindungsstellen auf.<sup>34,35</sup> Die orthostere Bindungsstelle ist in muskarinischen Rezeptoren innerhalb der durch die transmembranären Helices gebildeten Kavität lokalisiert, die allosteren Bindungsstellen befinden sich in den extrazellulären Schleifen sowie in den äußersten Segmenten der verschiedenen Transmembran-Helices (siehe **Abb. 7**).<sup>34,35</sup>



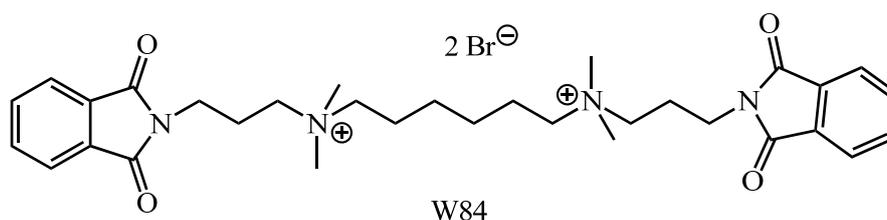
**Abb. 7:** Schematische Darstellung der orthosteren und allosteren Bindungsstellen am M<sub>2</sub>-Rezeptor, erhalten durch ein Homologie-Modell basierend auf der Kristallstruktur des inaktiven bovinen Rhodopsins. Modifiziert nach Gregory *et al.*<sup>36</sup>

Diese Regionen, besonders die extrazellulären Domänen, weisen ein deutlich weniger konserviertes Aminosäuresequenz-Muster auf.<sup>21,25</sup> Aus diesem Grund wurden sogenannte allosteren Modulatoren entwickelt, die an eine solche allosterische Bindungsstelle binden und die Wirkung des Orthosters beeinflussen können, d.h. selektiv nur einen muskarinischen Subtyp ansprechen, um somit cholinerge Nebenwirkungen durch unselektive Aktivierung bzw. Hemmung verschiedener Muskarinrezeptoren zu minimieren.

## 1.3 Allosterische Modulation muskarinischer Rezeptoren

Die hervorgerufenen Effekte eines allosteren Modulators hängen von den Liganden, also den allosteren Modulatoren und den Orthostern, aber auch vom Rezeptor selbst ab.<sup>4,37,38</sup> Im Hinblick auf gesteigerte Selektivität bieten Substanzen, die als allosterische Modulatoren wirken, ein enormes Potenzial.<sup>39</sup> Das Modell der allosteren Modulation wurde erstmals im Jahr 1965 von Monod *et al.*<sup>40</sup> für Enzyme aufgebracht und ist inzwischen auch für Rezeptoren etabliert. Beispielsweise binden Benzodiazepine und Barbiturate an  $\gamma$ -Aminobuttersäure (GABA)-Rezeptoren an einer allosteren Bindungsstelle.

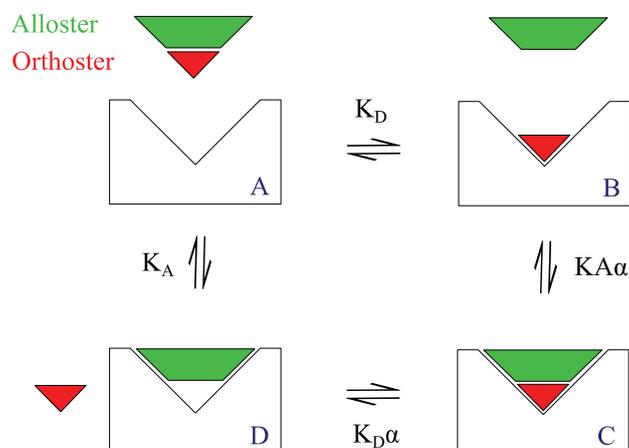
Erste Hinweise auf allosterische Modulation an GPCRs wurden an Muskarinrezeptoren entdeckt. Lüllmann *et al.* beobachteten eine unerwartet stark ausgeprägte Antidot-Wirkung gegen einen Inhibitor der Acetylcholin-Esterase in Mäusen, wenn der kompetitive Antagonist Atropin in Kombination mit der Bis-(ammonium)alkan-Verbindung W84 (siehe **Abb. 8**) verabreicht wurde.<sup>41</sup> In isolierten Herzvorhöfen von Meerschweinchen wurde weiterhin festgestellt, dass Bis-(ammonium)alkan-Verbindungen die Wirkung von acetylcholinartigen Muskarinrezeptor-Aktivatoren in sättigbarer Art antagonisieren können, was auf eine Rezeptor-Wechselwirkung in allosterischer Form hindeutet.<sup>42</sup> Der endgültige Beweis für einen allosteren Bindungsmodus folgte schließlich 1988 mit Hilfe von Radioligand-Bindungsstudien.<sup>43</sup>



**Abb. 8:** Strukturformel der Bis-(ammonium)alkan-Verbindung W84

### 1.3.1 Das ternäre Komplex-Modell

Um die Veränderungen der Bindungseigenschaften eines Orthosters durch einen allosteren Modulator verstehen und beschreiben zu können, entwickelten Ehlert *et al.* 1988 das ternäre Komplexmodell<sup>44</sup> (siehe **Abb. 9**). In diesem Modell werden vier Zustände beschrieben. An einen unbesetzte Rezeptor (vgl. **Abb. 9 A**) kann entweder ein Orthoster oder ein Alloster binden (vgl. **Abb. 9 B bzw. D**). Der Zustand, in dem Orthoster und Alloster simultan an den Rezeptor binden, wird als ternärer Komplex bezeichnet (siehe **Abb. 9 C**). Hierbei handelt es sich nicht um eine kompetitive, sondern um eine kooperative Wechselwirkung, da orthosterer und allosterer Ligand zeitgleich an den Rezeptor binden können und nicht etwa um die Bindungsstelle konkurrieren.<sup>45</sup>



**Abb. 9:** Schematische Darstellung des ternären Komplex-Modells (modifiziert nach Ehlert<sup>44</sup>)

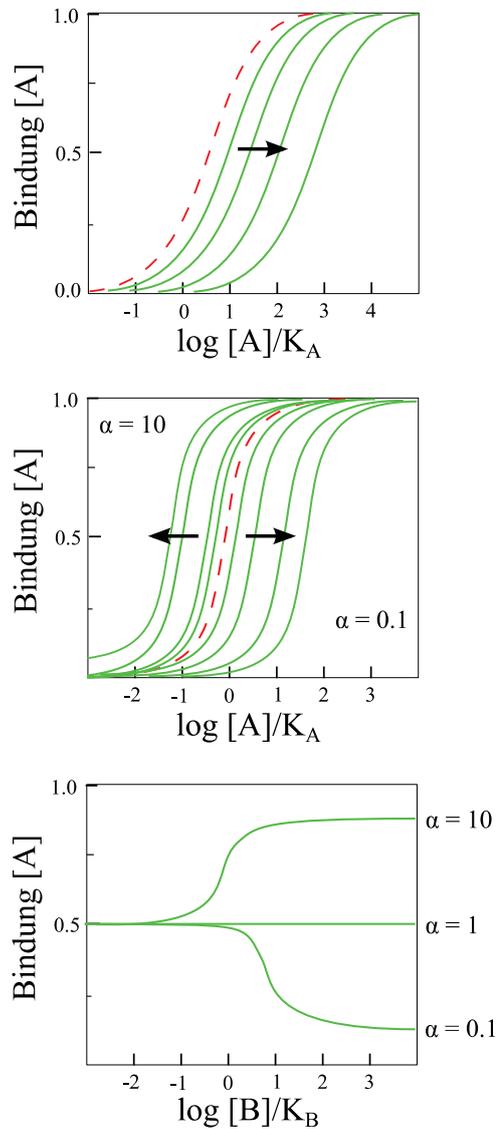
Diese Kooperativität spiegelt sowohl das Ausmaß als auch die Richtung der gegenseitigen Beeinflussung wider. Je nachdem ob Orthoster und Alloster ihre Gleichgewichtsbindung gegenseitig verstärken, hemmen oder nicht beeinflussen, spricht man von positiver, negativer oder neutraler Kooperativität.<sup>34</sup> Die gegenseitige Beeinflussung der beiden Partner findet in Abhängigkeit von der Art des Rezeptors ein Maximum.<sup>3,34,44,46,47</sup>

### 1.3.2 Arten allosterer Modulatoren

Nach der Art, die Bindung eines Orthosters an einen Rezeptor zu beeinflussen, lassen sich allosterische Liganden in verschiedenen Gruppen einteilen. So gibt es negative allosterische Modulatoren (NAMs), positive allosterische Modulatoren (PAMs), allosterische Agonisten, sowie stille allosterische Modulatoren (SAMs). Die Art eines allosterischen Liganden hängt jedoch vom Orthoster, den es zu modulieren gilt, sowie von dem verwendeten funktionellen Assay ab. Liganden können demnach nur in Hinblick auf den Assay und den orthosterischen Liganden in die einzelnen Typen NAM, PAM, SAM und allosterische Agonisten eingeteilt werden.<sup>31,38</sup>

- a) **NAMs:** Diese Liganden binden an eine allosterische Bindungsstelle und inhibieren damit die Rezeptor-Funktion. Diese NAMs verursachen eine Rechtsverschiebung der Konzentrations-Wirkungskurve der Agonisten. Dies kann zum einen aus der durch den NAM herabgesetzten Agonist-Affinität (gemessen im Gleichgewicht) resultieren, indem eine Konformation mit geringerer Affinität stabilisiert wird oder durch die erhöhte Energie-Barriere für den Übergang zum aktivierten Zustand bzw. durch beides. Der Grad der Verschiebung der Kurve mit steigender NAM-Konzentration ist begrenzt und erreicht das Maximum an dem Punkt, an dem die allosterische Bindungsstelle vollständig durch den NAM besetzt ist. Dies steht im Kontrast zu kompetitiven (orthosterischen) Antagonisten, die größere Rechtsverschiebungen bei ansteigender Konzentration ohne theoretisches Limit bewirken, da orthostere Antagonisten direkt um die orthostere Bindungsstelle konkurrieren.<sup>38</sup>
- b) **PAMs:** Die meisten PAMs bewirken eine Linksverschiebung der Konzentrations-Wirkungskurve, was durch eine erhöhte Agonist-Affinität und/oder durch Herabsetzen der Energiebarriere zum aktivierten Zustand hervorgerufen wird. Ebenso wie im Falle der negativen allosterischen Modulatoren ist auch hier der Grad der Kurven-Verschiebung limitiert und erreicht ein Maximum, wenn die allosterische Bindungsstelle vollständig durch den PAM besetzt ist.<sup>31</sup>
- c) **Allosterische Agonisten:** Diese Liganden können selbst eine Agonist-Aktivität besitzen, obgleich sie nicht die orthostere Bindungsstelle besetzen.<sup>4,48</sup> Einige Verbindungen, die als PAM wirken, zeigen auch eine allosterische Agonist-Aktivität in Abwesenheit eines orthosterischen Agonisten. Die Agonist-Aktivität wird für gewöhnlich bei Konzentrationen beobachtet, die höher sind als solche, die für PAM-Aktivität benötigt wird.<sup>4,48,49</sup>

- d) **SAMs**: Diese Liganden binden an die allosterische Bindungsstelle, die Rezeptor-Funktion wird jedoch nicht beeinflusst. Da diese Verbindungen an die selbe Stelle binden wie PAMs, NAMs oder allosterische Agonisten, konkurrieren sie mit diesen und verursachen so Rechtsverschiebungen der Kurven für die anderen allosterischen Liganden. Obwohl SAMs keinen therapeutischen Nutzen haben, sind sie doch ein wichtiges Werkzeug für die Grundlagenforschung.<sup>31</sup>



**Abb. 10:** Schematische Darstellung des Einflusses von orthosterischen und allosterischen Liganden auf Konzentrations-Wirkungskurven (in Anlehnung an May *et al.*<sup>35</sup>):

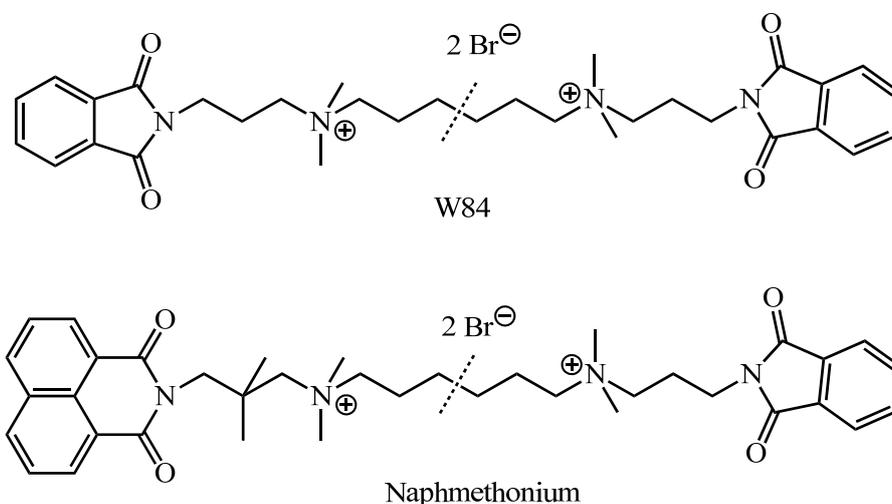
- A) Konkurrenz zweier orthosterischer Liganden A um dieselbe Bindungsstelle → theoretisch unbegrenzte Rechtsverschiebung der Konzentrations-Besetzungskurve
- B) Bei Anwesenheit eines Allosters → Verschiebung der Kurve in Abhängigkeit der Kooperativität nach links ( $\alpha > 1$ , PAM), bzw. nach rechts ( $\alpha < 1$ , NAM)
- C) Konstante Konzentration des Orthosters A und steigende Konzentration des Allosters B → Erhöhung des Rezeptor-Besetzungsgrades bis zu einem bestimmten Limit (positive Kooperativität,  $\alpha > 1$ ) bzw. Erniedrigung (negative Kooperativität,  $\alpha < 1$ )

### 1.3.3 Erste allosterische Modulatoren und deren Bindungsareale

Clark und Mitchelson zeigten in ersten Arbeiten auf diesem Gebiet, dass der neuromuskuläre Blocker Gallamin (siehe **Abb. 11**) in funktionellen Experimenten die Wirkung von Acetylcholin im Herzvorhof hemmen konnte.<sup>50</sup> Erste Befunde ließen darauf schließen, dass es sich bei der Wirkung des Gallamins um einen allosterischen Effekt handeln musste. Bestärkt wurden diese Ergebnisse durch Radioligand-Bindungsstudien, in denen Gallamin die Dissoziation des orthosterischen Antagonisten [<sup>3</sup>H]NMS (N-Methylscopolamin) verlangsamt.<sup>25,51,52</sup>



Abstand voneinander, sowie oftmals ein oder mehr Sauerstoffatome. Interessant ist die Tatsache, dass einige allosterische Modulatoren wie W84 und Naphmethonium (siehe **Abb. 12**), wenn man sie „halbiert“, noch immer allosteren Charakter aufweisen, wenn auch mit geringerer Affinität.<sup>53,59</sup>



**Abb. 12:** Strukturformeln der allosteren Modulatoren mit angedeuteter Schnittstelle zur Halbierung der Moleküle

Die Tatsache, dass allosterische Modulatoren nicht zwingend an dieselbe allosterische Bindungsstelle binden, erschwert die Suche nach einem Pharmakophormodell weiterhin. Man weiß jedoch, dass die allosteren Modulatoren Gallamin und Alcuronium die höchste Affinität zum M<sub>2</sub>-Rezeptor zeigen, wohingegen die Affinität zum M<sub>3</sub>-Rezeptor sehr gering ist.<sup>53,60,61</sup>

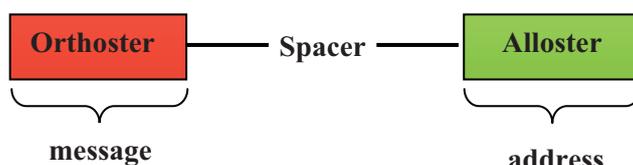
Durch selektiven Austausch einiger Aminosäuren der zweiten extrazellulären Schleife konnten im M<sub>2</sub>-Rezeptor die Aminosäuren <sup>168</sup>Valin und <sup>177</sup>Tyrosin als essenziell für die Bindung der strukturell unterschiedlichen Allosteren Alcuronium und W84 identifiziert werden.<sup>53,62,63</sup>

Darüber hinaus stellten sich einige Epitope an der Verbindung der EL3 und TM7 sowie der zweiten extrazellulären Schleife zwischen TM4 und 5 als maßgeblich verantwortlich für die hohe Affinität zum M<sub>2</sub>-Rezeptor von allosteren Modulatoren des Bis-(ammonium)alkan-Typs heraus.<sup>53,64</sup> Ein weiterer Bereich, der in Hinblick auf Affinität, sowie Subtypselektivität der Bis-(ammonium)alkan-Verbindungen W84 und Naphmethonium eine entscheidende Rolle zu spielen scheint, ist eine Gruppe aus M<sub>2</sub>-<sup>422</sup>Tryptophan und M<sub>2</sub>-<sup>423</sup>Threonin-Resten am oberen Teil der TM7. Docking-Studien mit diesen Substanzen in einem M<sub>2</sub>-Homologie-Modell deuteten darauf hin, dass die aromatischen Reste der Substanzklasse möglicherweise sandwichartig durch  $\pi$ - $\pi$ -Wechselwirkungen zwischen Tryptophan am Kopf der TM7 und Tyrosin inmitten der zweiten extrazellulären Schleife fixiert werden.<sup>53,65</sup>

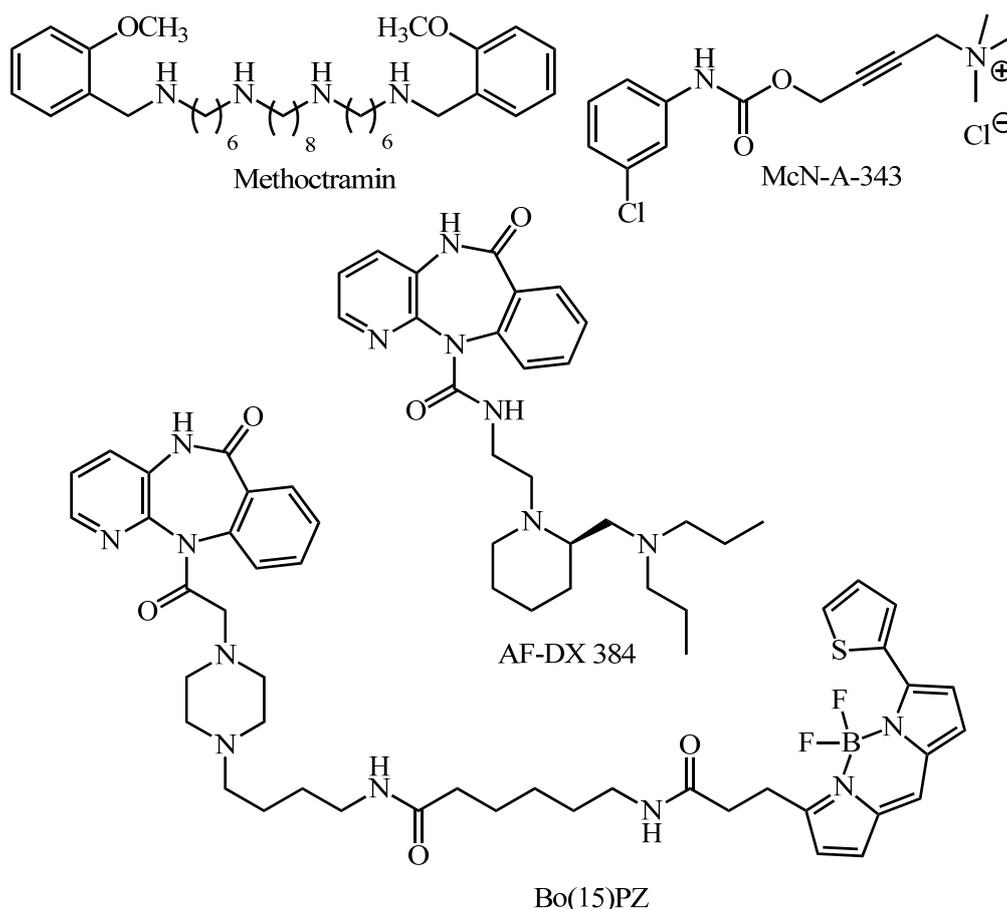
Mithilfe punktmutierter Rezeptor-Konstrukte konnten wichtige Aminosäuren für die allosterische Subtypselektivität identifiziert werden, wobei die Subtyp-unabhängige Grund-Affinität durch Tryptophan, in direkter Nachbarschaft zu M<sub>2</sub>-<sup>177</sup>Tyr, hervorgerufen wird.<sup>66,67,68,69,70</sup>

## 1.4 Entwicklung dualsterer Liganden für Muskarinrezeptoren

Kürzlich entwickelte sich ein neues Konzept des Wirkstoff-Designs, das versucht, die Vorteile von orthosterer und allosterer Bindungsstelle zu vereinen, indem Rezeptor-Aktivatoren simultan an beide Bindungsstellen binden und somit eine starke Aktivierung des Rezeptors gepaart mit Subtypselektivität hervorrufen sollen.<sup>71,72,73</sup> Derartige, aus zwei Bausteinen bestehende dualstere Liganden, die jeweils an die orthostere bzw. allosterische Bindungsstelle binden, verkörpern das „message-address-Konzept“ nach Schwyzer (siehe **Abb. 13**).<sup>74</sup> Da der allosterische Bauteil hochselektiv an einen speziellen Subtyp bindet, dient dieser als Adresse, der hochaktive Orthoster entscheidet über die Wirkung, d.h. Agonismus oder Antagonismus.



**Abb. 13:** Schematische Darstellung des „message-address-Konzepts“ nach Schwyzer



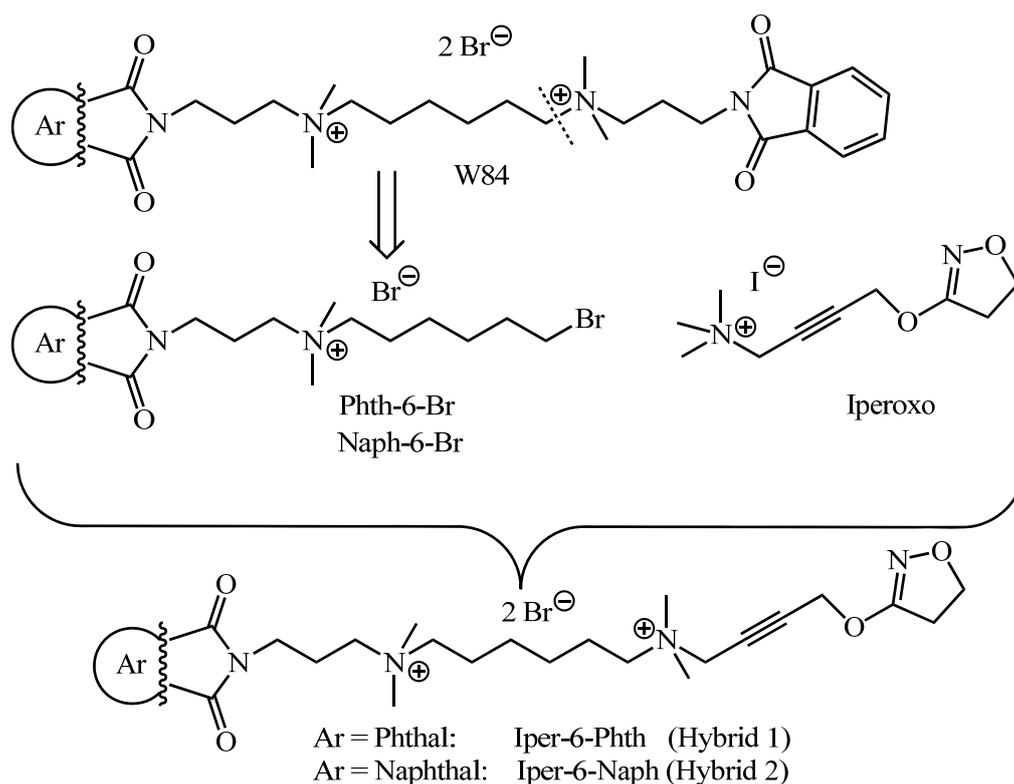
**Abb. 14:** Strukturen der Liganden mit alloster/orthosterem Bindungsmodus

Dualstere Liganden kombinieren somit die positiven Eigenschaften beider Komponenten, d.h. hohe

Aktivität und Subtypselektivität. Es existiert bereits eine Reihe von Verbindungen, für die ein dualsterer Bindungsmodus angenommen wird. Hierzu gehört unter anderem der M<sub>2</sub>-selektive Antagonist Methoctramin, der von einer alloster/orthosteren Bindung mit hoher Affinität zu einer rein allosteren Bindung wechseln kann, allerdings unter Affinitätsverlust.<sup>75,76</sup> Weitere Substanzen, die ebenfalls auf einen alloster/orthosteren Bindungsmodus hindeuten, ist die M<sub>2</sub>-selektive Verbindung AF-DX 384<sup>77,78,79</sup>, der M<sub>2</sub>-Partialagonist McN-A-343<sup>71,80</sup>, sowie der M<sub>1</sub>-Antagonist Bo(15)PZ<sup>81</sup> (siehe **Abb. 14**).

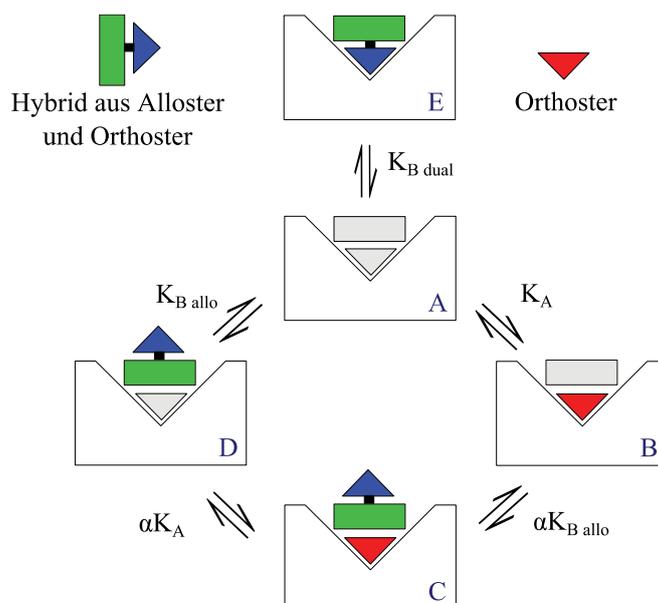
Keine der in **Abb. 14** dargestellten Verbindungen wurde jedoch aus vorher bestehenden orthosteren bzw. allosteren Bausteinen entwickelt, d.h. die Hinweise auf einen allosteren/orthosteren Bindungsmodus wurden eher zufällig entdeckt.

Dagegen wurden von Antony *et al.* gezielt dualstere Hybride entwickelt, die den M<sub>2</sub>-Rezeptor adressieren und sich aus dem Superagonisten Iperoxo und subtypselektiven, allosteren Bausteinen - abgeleitet von W84 und Naphmethonium - zusammensetzen (siehe **Abb. 15**).<sup>73</sup>



**Abb. 15:** Schematischer Aufbau der beiden Hybrid-Substanzen Iper-6-Phth und Iper-6-Naph

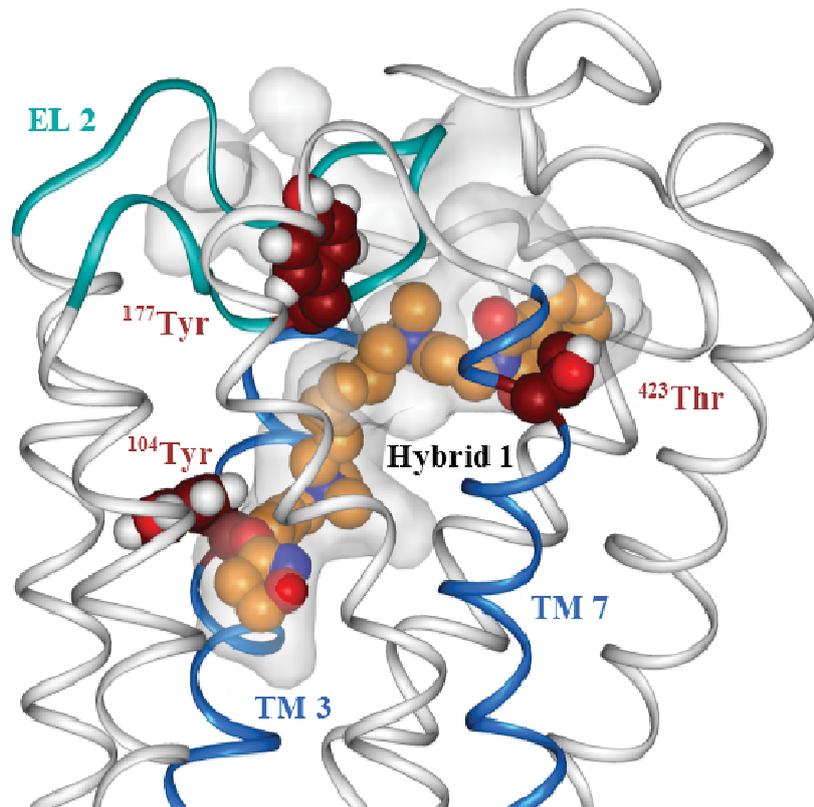
Um das dualstere Prinzip eindeutig bestätigen zu können, ist es wichtig zu klären, ob eine echte, also simultane alloster/orthoster-Bindung vorliegt. Um die erhaltenen Ergebnisse richtig deuten zu können, wurde das ternäre Komplex-Modell um einen dualsteren Bindungsmodus erweitert (siehe **Abb. 16**).<sup>73</sup> In Radioligand-Bindungsstudien zeigte sich, dass die oben beschriebenen Hybride eine stärkere Hemmung des orthosteren Radioliganden hervorrufen, als es die rein allosteren Bausteine bewirken.



**Abb. 16:** Ternäres Komplex-Modell erweitert durch dualeren Bindungsmodus (in Anlehnung an Antony *et al.*<sup>73</sup>)

Um sicherzustellen, dass die Hybridsubstanzen an beide Bindungsstellen binden, wurden Rezeptor-Mutanten erzeugt, in denen die für die Bindung wichtigen Aminosäuren ausgetauscht wurden. In der orthosteren Region wurde  $M_2$ -<sup>104</sup>Tyrosin gegen Alanin getauscht. Dies liegt unmittelbar neben  $M_2$ -<sup>103</sup>Asparaginsäure, die für die Anziehung positiv geladener Stickstoff-Atome wie in Acetylcholin und anderen orthosteren Liganden verantwortlich ist. Zur Untersuchung der allosteren Bindung wurde die  $M_2$ -<sup>177</sup>Tyrosin und -<sup>423</sup>Threonin-Doppelmutante verwendet, was eine starke Affinitätsabnahme von  $M_2$ -Modulatoren zur Folge hatte.<sup>73,82,83</sup> Mit Hilfe dieser Studie konnte der dualere Bindungsmodus der beiden Hybride verifiziert werden, da beide im Vergleich zum  $M_2$ -Wild-Typ-Rezeptor sowohl an der orthosteren, als auch an der allosteren Mutante an Affinität verloren, wohingegen ihre jeweiligen Bausteine lediglich an der entsprechenden Mutante an Affinität einbüßten. Die Hybride zeigten weiterhin eine  $M_2$ -Selektivität, die stark von den allosteren Epitopen  $M_2$ -<sup>177</sup>Tyrosin und  $M_2$ -<sup>423</sup>Threonin abhängt.<sup>73</sup> Ein 3D-Modell, in dem Iper-6-Phth in Dockingstudien in die Bindungstasche des  $M_2$ -Rezeptors eingebracht wurde, veranschaulicht die Lage des Moleküls im Rezeptor: Der Iperoxo-Rest befindet sich in der orthosteren Bindungstasche, wo sein quartäres Stickstoffatom eine Kation- $\pi$ -Wechselwirkung mit der Aminosäure  $M_2$ -<sup>104</sup>Tyrosin eingehen kann, wohingegen das zweite quartäre Zentrum ebenfalls durch Kation- $\pi$ -Wechselwirkungen mit den Aminosäuren  $M_2$ -<sup>177</sup>Tyrosin und  $M_2$ -<sup>422</sup>Tryptophan in der allosteren Bindungsstelle verankert ist (siehe **Abb. 17**).<sup>73</sup>

Neben der Bestätigung des dualeren Bindungsmodus und den damit einhergehenden Erkenntnissen zu Bindungstopographie und Subtyp-Selektivität konnten Antony *et al.* schließlich nachweisen, dass dualere Liganden spezifische Signalwege induzieren.<sup>73</sup>



**Abb. 17:** Abbildung des  $M_2$ -Rezeptors in den durch Docking-Studien die Verbindung Iper-6-Phth (Hybrid 1) eingebracht wurde (modifiziert nach Antony *et al.*<sup>73</sup>)

Modifikationen der Zellfunktion, die durch Binden eines Liganden an den Rezeptor ausgelöst wurden, haben eine Umverteilung der einzelnen Zellbestandteile zur Folge. Dies zeigt sich durch eine veränderte Lichtbrechung und kann mithilfe des Epic<sup>®</sup>-Systems gemessen werden.<sup>84</sup> Auf dieses Messsystem wird in **Kapitel 2.3.2.1** genauer eingegangen. Hier sei lediglich erwähnt, dass die resultierenden Signaturen der dynamischen Massenumverteilung (kurz: DMR dynamic mass redistribution) charakteristisch für die einzelnen Signalwege sind. Durch einen konventionellen Agonisten am  $M_2$ -Rezeptor wird neben dem  $G_{i/o}$ -Signalweg wird auch der  $G_s$ -Weg stimuliert.<sup>85</sup> Untersuchungen zeigten für  $M_2$ -Rezeptoren ähnliche Signaturen unabhängig davon, ob orthostere oder dualstere Agonisten eingesetzt wurden. Wurden die Zellen jedoch mit dem irreversiblen  $G_{i/o}$ -Inhibitor Pertussis-Toxin (PTX) vorbehandelt, konnte die Zellen zwar weiterhin durch die Agonisten Iperoxo und Acetylcholin, nicht aber durch die dualstere Agonisten stimuliert werden. Dies deutet darauf hin, dass rein orthostere Agonisten zusätzliche Signalwege aktivieren, die dualstere Verbindungen jedoch eine Signalwegs-Spezifität aufweisen.<sup>73</sup> Die resultierenden Signale der DMR-Messung stehen im Einklang zu einer  $G_s$ -Signalwegs-Aktivierung.<sup>86</sup>

## 1.5 Zielsetzung

Um weitere Erkenntnisse über die Bindungseigenschaften von muskarinischen Liganden zu erhalten, sollte zunächst die Reihe der von W84 abgeleiteten allosteren Modulatoren erweitert werden, um diese mithilfe einer neuen Technik, der FRET-Mikroskopie, untersuchen zu können. Darüber hinaus sollte untersucht werden, welchen Einfluss eine verlängerte Alkylkette sowohl am Agonist Iperoxo wie auch an den Antagonisten Atropin und Scopolamin auf die Wirksamkeit des Liganden ausübt. Hierzu sollten verschiedene N-alkylierte Derivate dieser drei Orthostere synthetisiert werden.

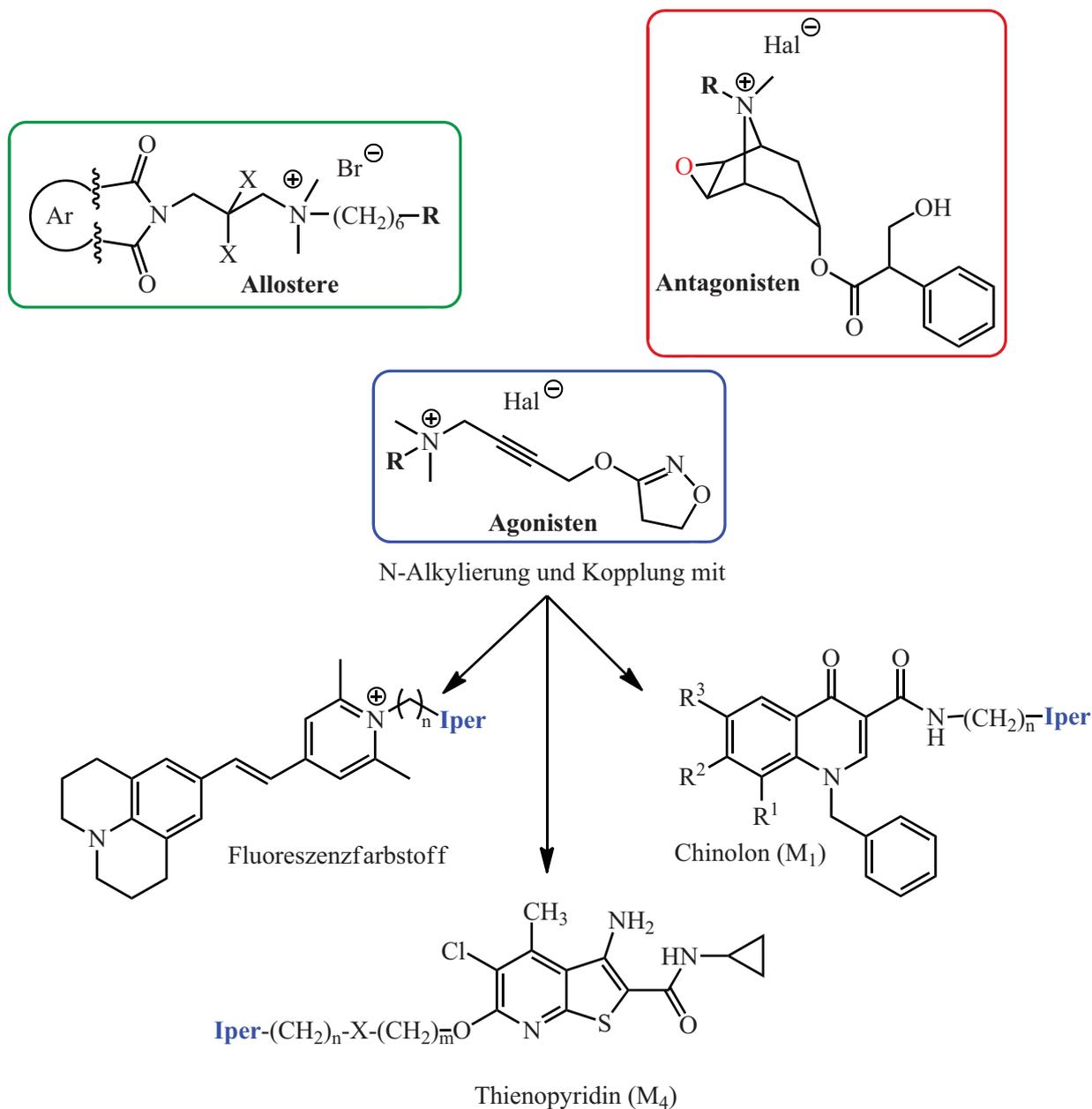


Abb. 18: Übersicht über die verschiedenen Projekte der vorliegenden Arbeit

Weiterhin sollten Hybridsubstanzen gemäß des „message-address“-Konzepts hergestellt werden. Als Nachricht sollte hierbei der Agonist Iperoxo fungieren, als Adresse dienen die als selektive allosteren Modulatoren beschriebenen Thienopyridine ( $M_4$ -selektiv) und Chinolone ( $M_1$ -selektiv). Schließlich sollte Iperoxo mit dem Fluoreszenzfarbstoff Py-1 gekoppelt werden. **Abb. 18** zeigt eine Übersicht über die einzelnen, in dieser Arbeit bearbeiteten Projekte.

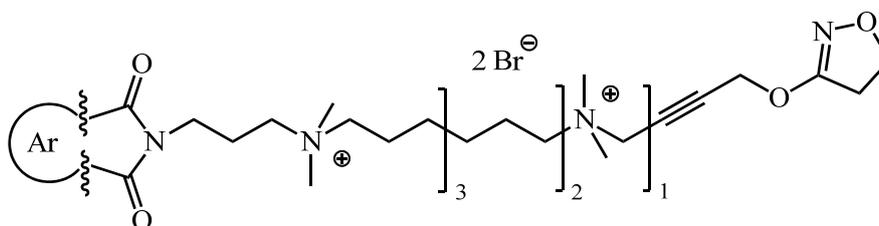
Auf die Motivation bzw. Zielsetzung der einzelnen Projekte wird in den jeweiligen einleitenden Kapiteln genauer eingegangen.

## 2 Synthese und pharmakologische Untersuchungen der Zielverbindungen

### 2.1 Allosterische Modulatoren für den M<sub>2</sub>-Rezeptor und Hybrid-Vorstufen

Iper-6-Phth und Iper-6-Naph (siehe **Abb. 15**) stellen Leitstrukturen für die Untersuchung dualsterer Liganden am M<sub>2</sub>-Rezeptor dar. Um diese und verwandte Substanzen herstellen zu können, ist es erforderlich, die Vorstufen für die jeweilige Verbindung zu synthetisieren. Da sich diese Hybride neben dem orthosteren Iperoxo von einem allosteren Baustein des W84-Typs ableiten, sollten hier zunächst die allosteren Bausteine bzw. ihre Vorstufen hergestellt werden.

Einige dieser allosteren Bausteine wurden darüber hinaus bereits in funktionellen Experimenten bzw. Radioligandbindungsstudien untersucht,<sup>41,87,88</sup> wodurch Einblicke in ihr Verhalten bezüglich Affinität sowie Subtypselektivität erhalten werden konnten. Eine neue Technik, die FRET-Mikroskopie, ermöglicht ligandeninduzierte Konformationsänderungen der Rezeptoren zu untersuchen, was neue Erkenntnisse bezüglich der Bindungsweise allosterer Modulatoren an den Rezeptor liefern könnte. Da bislang keine Untersuchungen der oben genannten Allosteren mithilfe von FRET-Experimenten durchgeführt wurden, sollten einige dieser allosteren Bausteine nach- bzw. neue Verbindungen synthetisiert werden. Um die Einflüsse der einzelnen Bausteine genauer zu untersuchen, wurden die beiden Hybride in verschiedene Segmente unterteilt (siehe **Abb. 19**).



**Abb. 19:** Strukturformel des Iper-6-Phth/Naph mit angedeuteten Segmenten (Erläuterungen siehe Text)

So sollten zum einen bisquartäre Derivate ohne den orthosteren Baustein (Klammer 1) synthetisiert werden. Zum anderen sollten Derivate hergestellt werden, die lediglich ein positives Zentrum aufweisen - hier sollten zudem verschiedene Alkylkettenlängen angehängt werden (für Hexyl-Rest siehe Klammer 2, ½ W84 siehe Klammer 3).

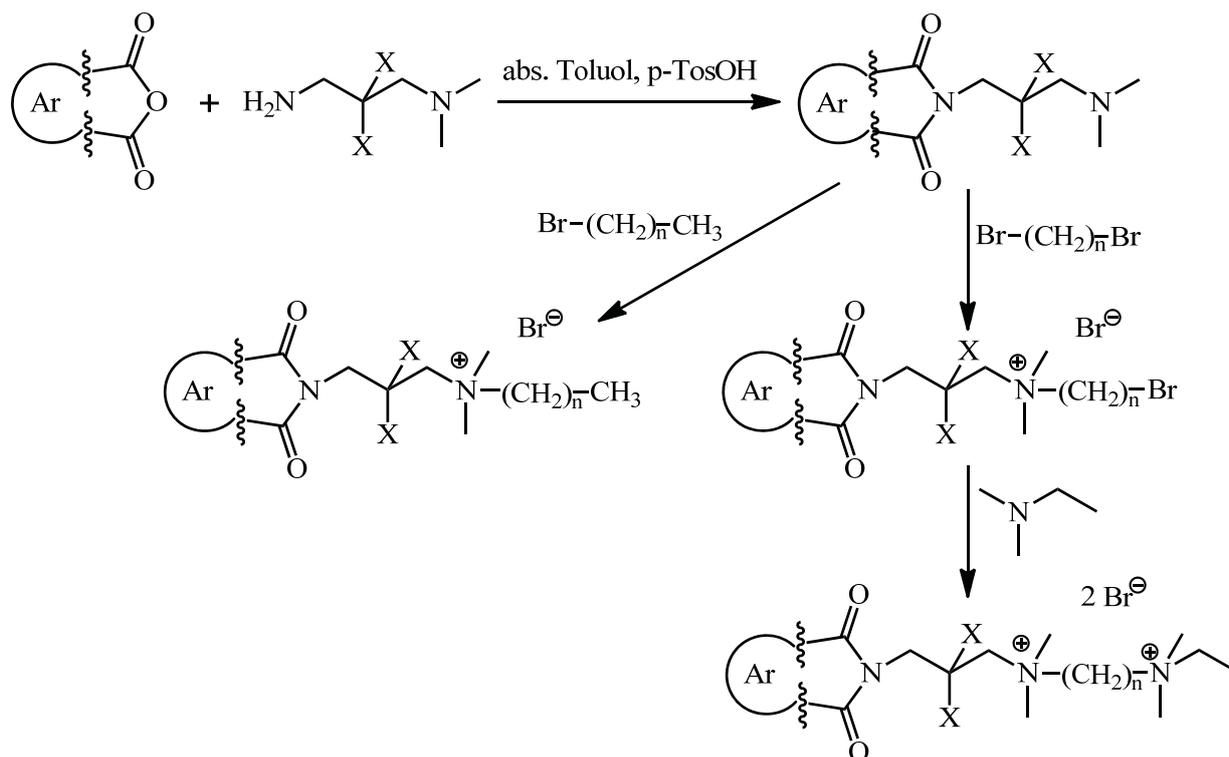
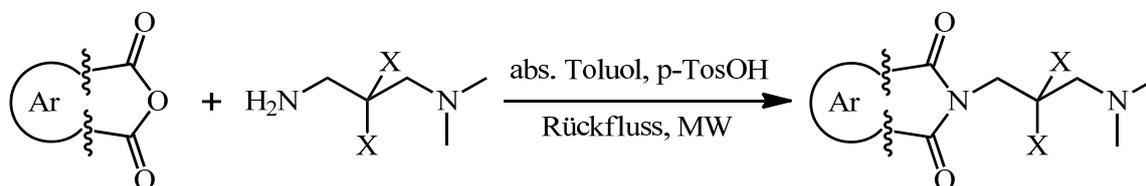


Abb. 20: Allgemeines Syntheschema zur Herstellung allosterer Modulatoren des W84-Typs

## 2.1.1 Synthese

### 2.1.1.1 Synthese der N-[3-(N',N'-Dimethylamin)propyl]-phthalimide bzw. -naphthalimide



**1a:** Ar = Phth, X = H  
(82 %, Lit.: 91 %<sup>89</sup>)

**1b:** Ar = Naph, X = H  
(89 %, Lit.: 90 %<sup>89</sup>)

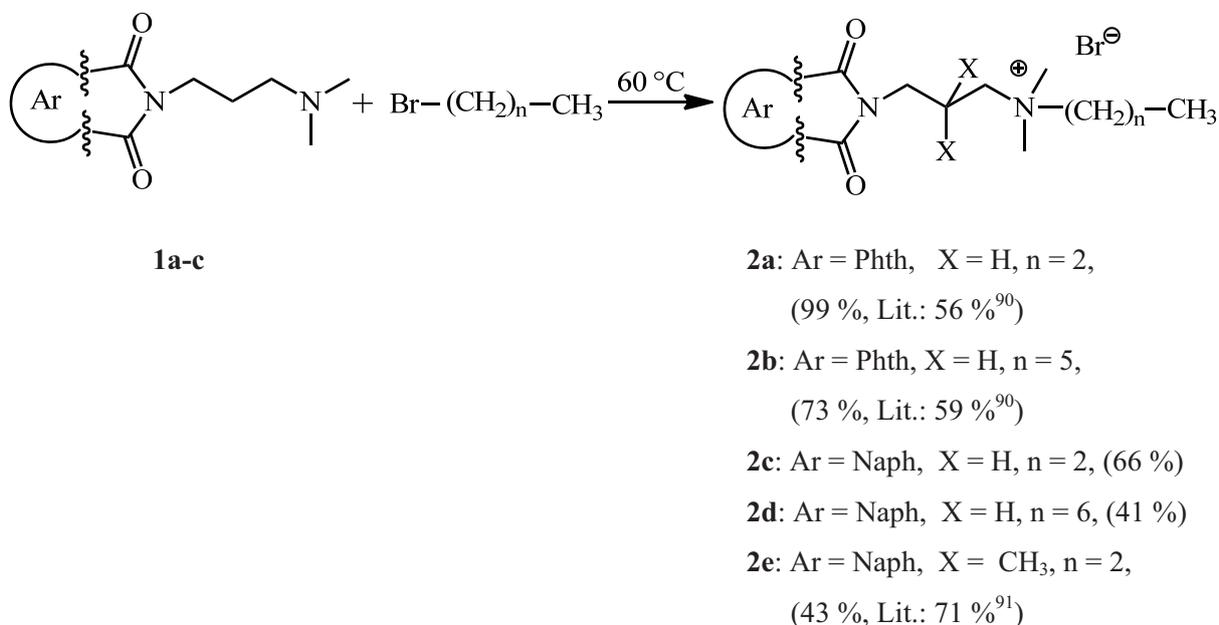
**1c:** Ar = Naph, X = CH<sub>3</sub>  
(83 %, Lit.: 86 %<sup>89</sup>)

Abb. 21: Syntheschema zur Herstellung der Phthal- bzw. Naphthalimid-Derivate

Zunächst wurden die beiden Grundbausteine, die N-[3-(N',N'-Dimethylamin)propyl]-phthalimide bzw. -naphthalimide, synthetisiert. Diese literaturbekannten Vorstufen wurden in Analogie zu Schmitz *et al.*<sup>89</sup> hergestellt, wobei äquimolare Mengen der jeweiligen Phthal- bzw. Naphthalanhydrid-Derivate und des entsprechenden N,N-Dimethyl-1,3-diamin-Derivates unter Zugabe einer katalytischen Menge *p*-Toluolsulfonsäure in abs. Toluol gelöst, die Mischung am Wasserabscheider mikro-

wellenunterstützt unter Rückfluss erhitzt (Aufheizrate: 30 °C/min., 800 Watt) und die Reaktion dünn-schichtchromatographisch (Kieselgel, EtOAc/PE 1:1) verfolgt wurde. Nach Abkühlen und Entfernen des Lösungsmittels wurde der erhaltene weiße bis hellbraune Rückstand aus Ethanol umkristallisiert und der Feststoff getrocknet. Die Verbindungen **1a-c** wurden als weiße Feststoffe isoliert.

### 2.1.1.2 Synthese der monoquartären verkürzten Phthalimid- bzw. Naphthalimid-Derivate

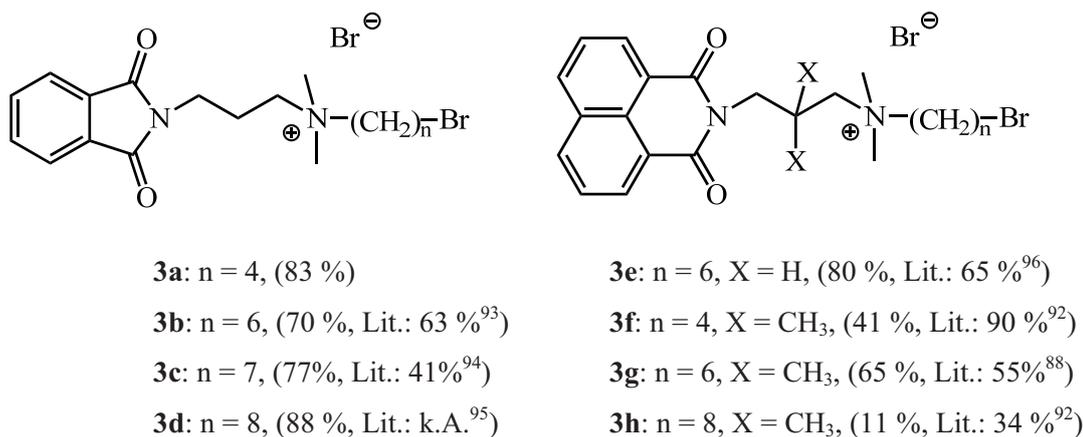


**Abb. 22:** Syntheschema zur Herstellung der monoquartären Phthalimid- bzw. Naphthalimid-Derivate

Dann wurden die Phthal- bzw. Naphthalimide **1a-c** mit Alkylketten verschiedener Länge versehen. Das propylierte sowie das hexylierte Phthalimid **2a** und **b** wurden bereits 2004 von Mohr *et al.*<sup>90</sup>, das propylierte Naphthalimid **2e** 2007 von Jäger *et al.*<sup>91</sup> beschrieben. Im Gegensatz zu diesen Vorschriften, in denen das Phthal- bzw. Naphthalimidpropylamin mit äquimolaren Mengen des entsprechenden 1-Bromalkans in Ethanol unter Rückfluss erhitzt wurde, wurde hier die jeweilige Vorstufe **1a-c** in abs. Acetonitril gelöst, mit einem 15-fachen Überschuss des entsprechenden 1-Bromalkans sowie einer katalytischen Menge KI/K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> versetzt und im Glasbombenrohr auf 60 °C erhitzt. Im Falle der Umsetzung des Phthalimids **1a** mit 1-Brompropan wurden zur vollständigen Lösung ca. 2 ml Acetonitril zugegeben. In allen Reaktionen bildete sich nach 1 (**2a**) bis 40 (**2c**) Tagen ein weißer Niederschlag, der abfiltriert, mehrmals mit Diethylether gewaschen und im Vakuum getrocknet wurde. Der Niederschlag der Verbindung **2c** war jedoch zu fein, um ihn filtrieren zu können, weshalb die Reaktionslösung portionsweise in Et<sub>2</sub>O getropft wurde. Mit dem dabei entstandenen Niederschlag konnte analog zu den übrigen Derivaten verfahren werden. Der Einsatz des großen Überschusses an Bromalkan erhöht die Kontaktwahrscheinlichkeit der beiden Edukte, wodurch in Kombination mit der erniedrigten Temperatur im Falle der Phthalimid-Derivate **2a** und **b** die Ausbeuten im Vergleich zur Literatur deutlich gesteigert werden konnten. Im Falle des ebenfalls literaturbekannten Naphthalimid-Derivats **2e**

konnte zwar die Reaktionsdauer deutlich verkürzt werden, die Ausbeute lag jedoch unter der in der Literatur angegebenen.

Für die Synthese der mit Ausnahme von Verbindung **3a** bereits mehrfach beschriebenen unsymmetrischen Hybridverbindungen<sup>88,92,93,94,95,96</sup> wurde analog der Synthese der alkylierten Derivate **2a-e** verfahren. Hier wurde lediglich das 1-Bromalkan durch das entsprechende Dibromalkan ersetzt. Die in **Abb. 23** dargestellten Verbindungen wurden als weiße Feststoffe isoliert.



**Abb. 23:** Strukturformeln der synthetisierten Verbindungen

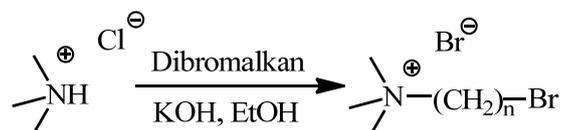
Im Falle von **3a** und **3h** bildeten sich jeweils zwei Komponenten, eine ölige und ein Feststoff. Hier wurde das Öl zunächst abgetrennt, der sehr harte Feststoff fein verrieben und in Et<sub>2</sub>O erhitzt. Anschließend wurde abfiltriert, mit Et<sub>2</sub>O gewaschen und getrocknet. Da Verbindung **3h** noch immer Reste des Bromalkans aufwies, wurde aus Ethanol umkristallisiert. Die Umsetzungen des Phthalimids mit 1,10-Dibromdecan sowie die des Naphthalimids mit 1,7-Dibromheptan führten nicht zum Produkt, wobei bei letzterem keine Umsetzung erkennbar war. In erstgenanntem Fall war nach einem Monat ein Niederschlag erkennbar. Da dieser zu fein war, wurde die Reaktionslösung portionsweise in Et<sub>2</sub>O getropft. Hierbei bildete sich eine ölige Konsistenz, wodurch eine Filtration nicht möglich war. In der Mutterlauge bildeten sich Kristalle, die ebenfalls filtriert wurden, doch auch hier bildete sich erneut ein Öl. Auch Umkristallisationsversuche lieferten keinen Feststoff. Spektroskopische Untersuchungen des Öls zeigten eine stark verunreinigte Substanz.

Aus diesem Grund wurde der Versuch im Mikrowellen-Druckreaktor durchgeführt. Hierzu wurde der Ansatz wie oben beschrieben vorbereitet und anstelle des Bombenrohrs im Druckreaktor zunächst 20 min bei 80 °C erhitzt. Da die Reaktionskontrolle mittels Dünnschichtchromatographie keine Umsetzung erkennen ließ, wurde die Temperatur auf 110 °C erhöht. Nach 50 min war eine Umsetzung zu beobachten (DC-Kontrolle). Es wurde auf Raumtemperatur abgekühlt und versucht, mithilfe eines Eisbades bzw. im Ultraschallbad eine Kristallisation zu begünstigen. Zwar bildeten sich Kristalle, die jedoch bei Raumtemperatur erneut eine ölige Konsistenz annahmen. Waschversuche sowie Umkristallisieren blieben ebenso erfolglos wie bei der klassischen Variante.

## 2.1.1.3 Synthese der Bromalkyl-trimethylammonium-Bromide

Weiterhin sollten Vorstufen synthetisiert werden, die durch Umsetzung mit einem Orthoster, wie z. B. Iperoxo oder Scopolamin, über einen Spacer ein zweites quartäres Stickstoffatom in das Molekül einbringen können.

Hierzu eignet sich die Herstellung eines Bromalkyl-trimethylammonium-Bromids (siehe **Abb. 24**).<sup>97</sup>



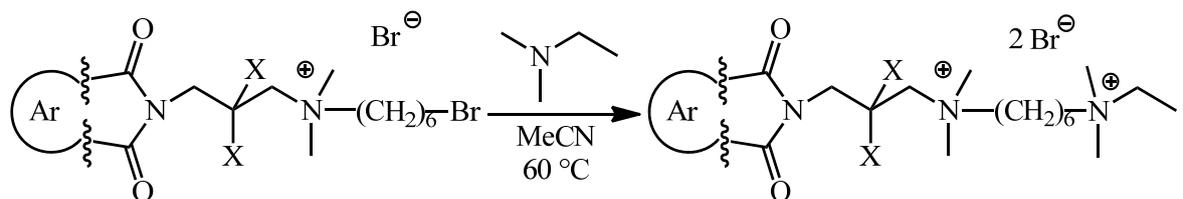
**4a:** n = 6, (75 %, Lit.: 14 %<sup>97</sup>)

**4b:** n = 8, (43 %, Lit.: 30 %<sup>97</sup>)

**Abb. 24:** Syntheschema zur Herstellung der Bromalkyl-trimethylammonium-Bromide

Wie von Schmitz<sup>96</sup> beschrieben wurde Trimethylammonium-Hydrochlorid und ein 1,6-facher Überschuss des Dibromalkans in 250 ml Ethanol gelöst. Eine Lösung aus einem 1,6-fachen Überschuss Kaliumhydroxid in Ethanol wurde langsam zutropft. Das nach 3 Tagen ausgefallene Kaliumchlorid wurde abfiltriert, das Filtrat im Vakuum eingedunstet und anschließend in kaltem Et<sub>2</sub>O gegossen. Nach Lagerung bei 4 °C wurde der weiße Niederschlag abfiltriert und im Anschluss über eine Soxhlet-Apparatur mit Aceton extrahiert, um das entstandene Produkt von dem ebenso bei dieser Reaktion entstandenen Dimer abzutrennen. Nachdem der Extrakt eingedunstet worden war, wurde erneut auf Et<sub>2</sub>O gegossen und der Niederschlag schließlich filtriert, mit Et<sub>2</sub>O gewaschen und im Vakuum getrocknet um **4a** in 75 %-iger und **4b** in 43 %-iger Ausbeute zu erhalten.

## 2.1.1.4 Synthese der verkürzten Bis-(ammonium)alkan-Bausteine



**3b, 3g**

**5a:** Ar = Phth, X = H (95 %, Lit.: 16 %<sup>90</sup>)

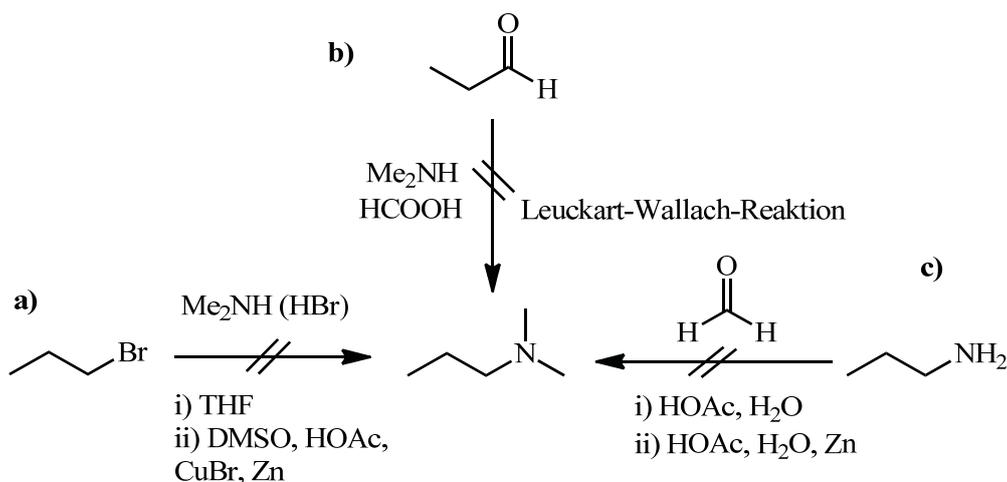
**5b:** Ar = Naph, X = CH<sub>3</sub> (53%, Lit.: 93 %<sup>73</sup>)

**Abb. 25:** Syntheschema zur Herstellung der verkürzten Bis-(ammonium)alkane

Weiterhin von Interesse sind die allosteren Bausteine, die zwei quartäre Stickstoffatome aufweisen, um den Einfluss der zweiten positiven Ladung zu untersuchen. Aus diesem Grund wurden die Verbindungen **3b** und **3g** gemäß Mohr<sup>90</sup> bzw. Antony *et al.*<sup>73</sup> jeweils in abs. Acetonitril gelöst, mit 10 Äquivalenten N,N-Dimethylethylamin sowie einer Spatelspitze KI/K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> versetzt und analog der oben

beschriebenen Synthesen im Glasbombenrohr erhitzt und aufgearbeitet, wobei die ebenfalls literaturbekannten Verbindungen **5a**<sup>90</sup> und **5b**<sup>73</sup> als weiße Feststoffe isoliert werden konnten. Im Falle von **5a** konnte die Ausbeute im Vergleich zur Literatur von 16 auf 95 % gesteigert, bei **5b** konnte die Literaturausbeute von 93 % nicht erreicht werden.

Neben den Derivaten mit Ethyl-Rest am zweiten quartären Zentrum sollten Derivate mit Propyl-Rest synthetisiert werden. Da N,N-Dimethylpropylamin zumindest in Deutschland bei gängigen Anbietern nicht kommerziell erhältlich war, sollte dieses zunächst hergestellt werden. **Abb. 26** zeigt die verschiedenen Synthesestrategien zur Herstellung dieser Verbindung.



**Abb. 26:** Synthesewege zur Herstellung von N,N-Dimethylpropylamin

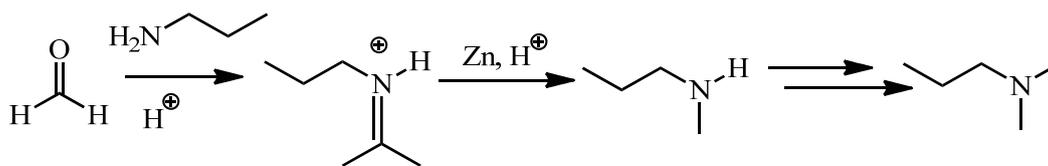
a) Bei der ersten Syntheseroute sollte 1-Bromalkan mittels N,N-Dimethylamin alkyliert werden. Dazu wurde 1-Brompropan in THF vorgelegt und mit Dimethylamin-Lösung in THF versetzt. Nach wenigen Minuten bildete sich ein weißer Niederschlag, dieser wurde abfiltriert. Aber weder bei diesem Feststoff noch beim Filtrat handelte es sich um das Produkt. In einem zweiten Ansatz wurde in Anlehnung an Estevam *et al.*<sup>98</sup> verfahren, wobei lediglich das 1-Iodpropan durch das bromierte Analogon ersetzt wurde. Dimethylamin-Hydrochlorid wurde zusammen mit 4 Äquivalenten Essigsäure, 2 Äquivalenten 1-Brompropan in DMSO vorgelegt und die Mischung bei Raumtemperatur gerührt. Nun wurden 5 Äquivalente Formaldehyd-Lösung (40 %-ig), katalytische Mengen Kupferbromid sowie grob gepulvertes Zink zugegeben. Die Lösung wurde zunächst gelb und anschließend farblos. Nach 6 Stunden Rühren bei Raumtemperatur wurde mit verdünnter Natronlauge hydrolysiert und mit Diethylether extrahiert. Spektroskopische Untersuchungen zeigten kein N,N-Dimethylpropylamin. Diese Reaktion wurde erneut durchgeführt, allerdings wurde diesmal N,N-Dimethylamin-Lösung in THF verwendet. Auch hier konnte das Produkt nicht isoliert werden.

b) In einem weiteren Versuch sollte N,N-Dimethylpropylamin mittels einer **Leuckart-Wallach-Reaktion**<sup>99</sup> synthetisiert werden. Hierbei wird ein Aldehyd oder Keton mit einem Amin unter Zugabe

von Ameisensäure umgesetzt. Das gebildete Iminiumion reagiert schließlich über einen zyklischen Übergangszustand mit Ameisensäure und man erhält das entsprechende tertiäre Amin.

Zur Durchführung wurde gemäß der allgemeinen Vorschrift des „Organikums“<sup>100</sup> zur Herstellung von N,N-Dimethylalkylaminen Dimethylamin-Lösung in THF vorgelegt und unter Eiskühlung 5 Äquivalente 98 %-ige Ameisensäure zugesetzt. Nach Abklingen der exothermen Reaktion wurden 1,2 Äquivalente Propionaldehyd zugetropft und die Mischung zunächst 5 Stunden auf 60 °C und schließlich weitere 3 Stunden auf 80 °C erhitzt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurde mit konz. Salzsäure angesäuert, die Mischung im Vakuum eingengt und der Rückstand in dem. Wasser aufgenommen. Dann wurde die freie Amin-Base mit konz. Natronlauge freigesetzt und mit Diethylether extrahiert. In dem braunen Öl konnte N,N-Dimethylpropylamin nicht identifiziert werden. Auch nach einem weiteren Ansatz mit verkürzter Heizzeit konnte das Produkt nicht isoliert werden.

c) Schließlich wurde die Strategie der reduktiven Methylierung verfolgt. Gemäß da Silva *et al.*<sup>101</sup> sollte n-Propylamin mit Formaldehyd umgesetzt werden, das dabei entstehende Iminiumion sollte dann mit Zink reduziert werden (siehe **Abb. 27**).



**Abb. 27:** Syntheschema zur reduktiven Methylierung von n-Propylamin

Das Edukt wurde zusammen mit einem 1,5-fachen Überschuss Formaldehyd-Lösung (37 %), einer katalytischen Menge Essigsäure sowie 2 Äquivalenten Zink-Granulat in dem. Wasser bei Raumtemperatur gerührt. Nach einem Tag wurde das Reaktionsgemisch im Vakuum eingengt und der Rückstand in DMSO aufgenommen um ihn NMR-spektroskopisch zu untersuchen, N-Methylpropylamin wurde jedoch nicht aufgefunden.

Ein weiterer Ansatz mit einem dreifachen Überschuss an Formaldehyd-Lösung und 3 Äquivalenten Zink-Granulat lieferte weder das einfach methylierte noch das zweifach methylierte Produkt. Auch der Einsatz von Zink-Staub anstelle des Granulats führte nicht zu N,N-Dimethylpropylamin.

Da verkürzte allosterische Derivate mit zwei quartären Zentren und Propyl-Rest nicht auf dem gleichen Weg wie die vergleichbaren Derivate mit Ethyl-Rest verfügbar waren, wurde versucht diese auf anderem Weg zu erhalten (siehe **Abb. 28**). Ausgehend von der jeweiligen bromierten Verbindung **3b** und **3g** in abs. Acetonitril gelöst, mit einem dreifachen Überschuss an N,N-Dimethylamin-Lösung in THF versetzt und zusammen mit einer katalytischen Menge KI/K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> wurde im Glasbombenrohr bei 60 °C Ölbadtemperatur gerührt. In beiden Fällen konnte lediglich ein braunes Öl isoliert werden, dass sich nicht weiter reinigen ließ.

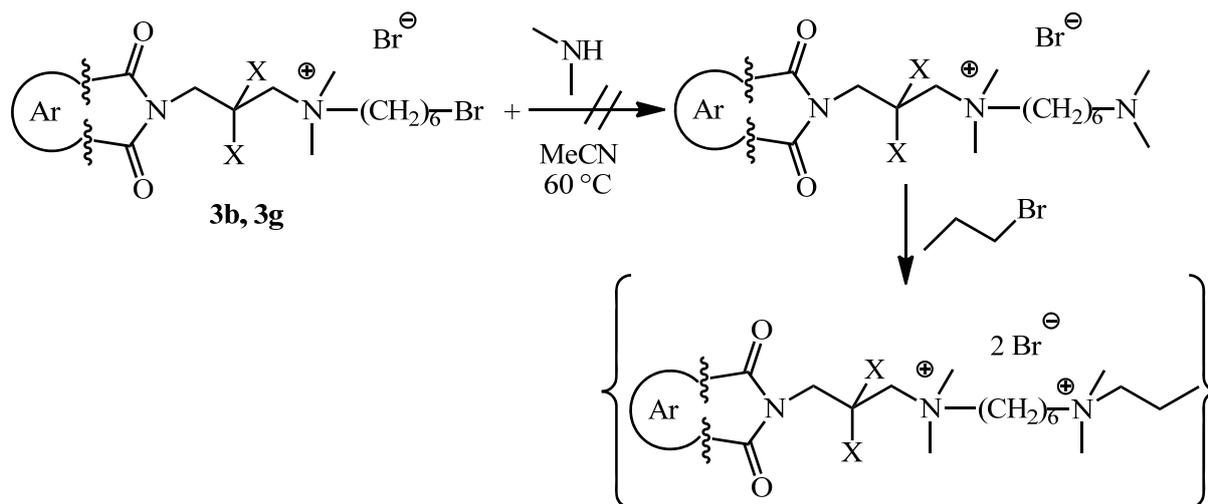


Abb. 28: Alternative Synthese zur Herstellung verkürzter allosterer Bausteine mit Propyl-Rest

## 2.1.2 Pharmakologische Untersuchungen

### 2.1.2.1 Theoretische Grundlagen des Testsystems

Die im Folgenden beschriebenen Untersuchungen wurden am Institut für Pharmakologie der Universität Würzburg im Arbeitskreis von Prof. Dr. Hoffmann von Frau Dr. Julia Bätz durchgeführt. Diesen Experimenten liegt der sogenannte Förster-Resonanz-Energietransfer (auch Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer), kurz FRET, zugrunde. Hierbei handelt es sich um die strahlungsfreie Energieübertragung von einem Donorfluorophor auf einen Akzeptorfluorophor. Die Energieübertragung erfolgt über Dipol-Dipol-Wechselwirkungen beider Fluorophore, was jedoch nur möglich ist, wenn folgende Voraussetzungen erfüllt sind:

- 1) Das Absorptionsspektrum des Akzeptors und das Emissionsspektrum des Donors müssen hinreichend überlappen (> 30 %).
- 2) Die Dipole der beiden Fluorophore müssen parallel ausgerichtet sein.
- 3) Die beiden Fluorophore müssen sich in räumlicher Nähe befinden (10-100 Å), was für das Ausmaß der Energieübertragung entscheidend ist. Diese sogenannte FRET-Effizienz gibt die Wahrscheinlichkeit an, mit der ein strahlungsloser Energietransfer nach Donor-Exzitation auftritt und wird mithilfe der Förster-Gleichung berechnet. (siehe **Gl. 1**).

$$E_{FRET} = \frac{1}{1 + \left(\frac{r}{R_0}\right)^6} \quad \text{Gl. 1}$$

Zu erkennen ist die Abhängigkeit der FRET-Effizienz vom Förster-Radius ( $R_0$ ) und der Distanz der beiden Fluorophore ( $r$ ).<sup>102,103</sup>

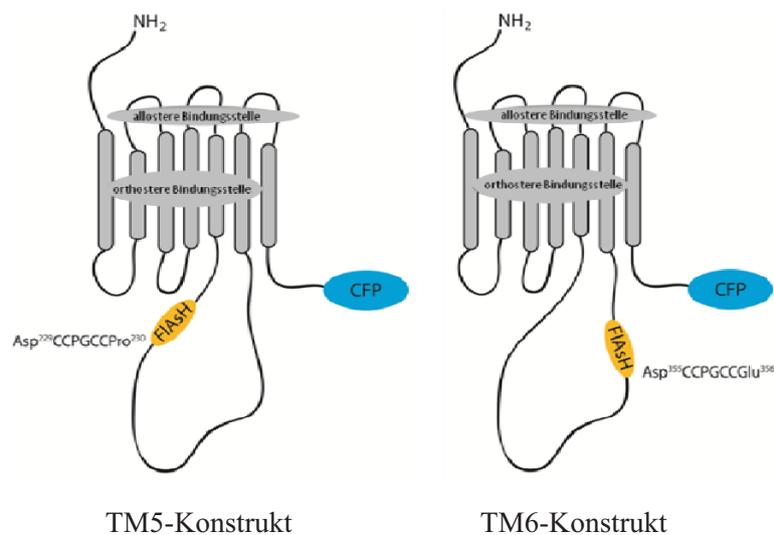
Es gibt verschiedene Möglichkeiten die FRET-Effizienz zu messen:<sup>102,103,104,105,106,107</sup>

- Intensitätsbasierte FRET-Messung
- Fluorescence-Lifetime-Imaging, FLIM (Messung der Fluoreszenz-Lebenszeit)
- Homo-FRET (Messung der Fluoreszenz-Anisotropie)

Bei den beiden erstgenannten Methoden werden zwei unterschiedliche Fluorophore verwendet, im Falle der homo-FRET-Messung hingegen ein Paar aus identischen Fluorophoren.

### 2.1.2.2 Durchführung und Ergebnisse

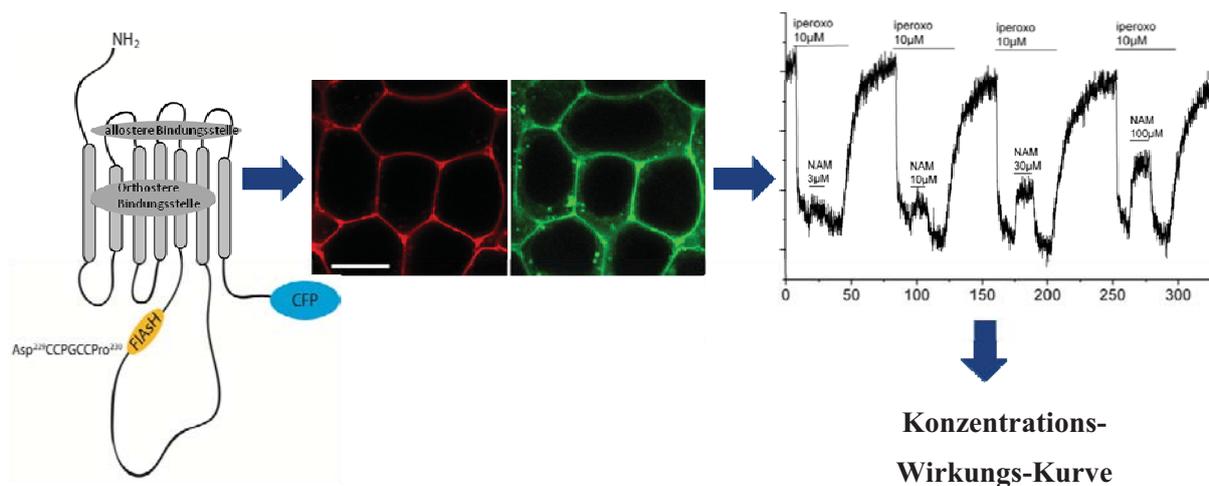
Hier wurde die Technik der intensitätsbasierten FRET-Messung verwendet. Dazu wurden zunächst Zellen kultiviert, die geeignete Konstrukte exprimieren, d. h. Zellen, die einen  $M_2$ -Rezeptor aufweisen, der an den gewünschten Stellen die beiden Fluoreszenz-Farbstoffe CFP (Cyan fluoreszierendes Protein) und FAsH (*Fluorescein arsenical helix binder*) in seiner Aminosäuresequenz trägt. In den hier untersuchten Fällen wurde CFP jeweils am C-Terminus des Rezeptors und FAsH einmal in die transmembranäre Helix fünf und im zweiten Fall in die transmembranäre Helix sechs jeweils im intrazellulären Loop eingebaut (siehe **Abb. 29**).



**Abb. 29:** Schematische Darstellung der verschiedenen Konstrukte, die für die Untersuchung verwendet wurden

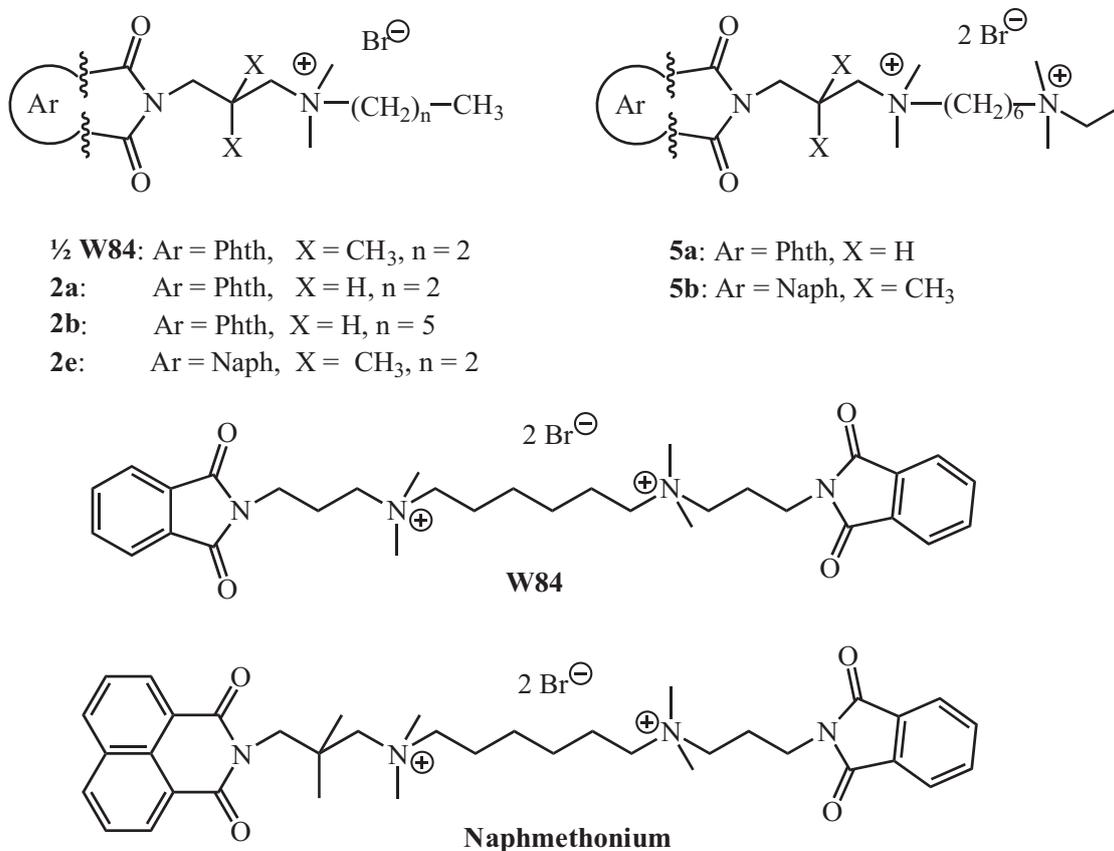
Anschließend wird unter dem Mikroskop unter Anregung des Donor-Fluorophors (CFP) eine geeignete Zelle ausgewählt. Diese wird gezielt mit dem Agonisten Iperoxo (10  $\mu$ m) vorstimuliert und im Anschluss mit einer Kombination aus Iperoxo und dem jeweiligen allosteren Baustein stimuliert. Die Konzentration des Allosters wird schließlich kontinuierlich erhöht, wohingegen die Konzentration des Agonisten konstant gehalten wird. Erhalten wird zunächst ein Zahnschema, bei dem die FRET-Intensität gegen die Zeit aufgetragen wird. Aus diesem Schema lassen sich die Höhen der durch Stimulation mit der Alloster/Agonist-Kombination hervorgerufenen FRET-Signale bestimmen und weiterhin als prozentuale Anteile des Referenzsignals berechnen. Schließlich lassen sich durch graphische

Auftragung dieser prozentualen Effekte des jeweiligen Allosters in Abhängigkeit seiner Konzentration Konzentrations-Wirkungskurven erhalten (siehe **Abb. 30**).

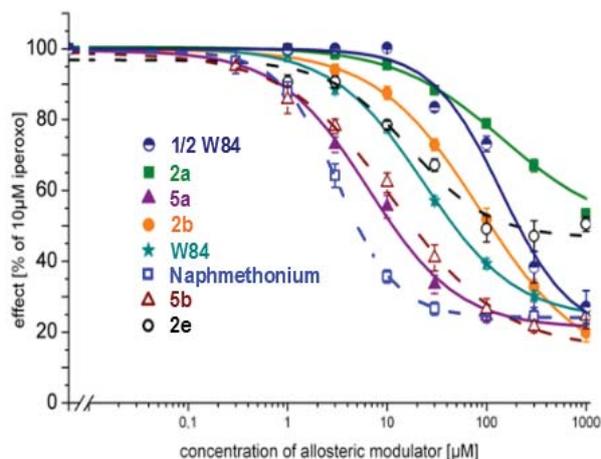


**Abb. 30:** Schematische Darstellung der FRET-Messung

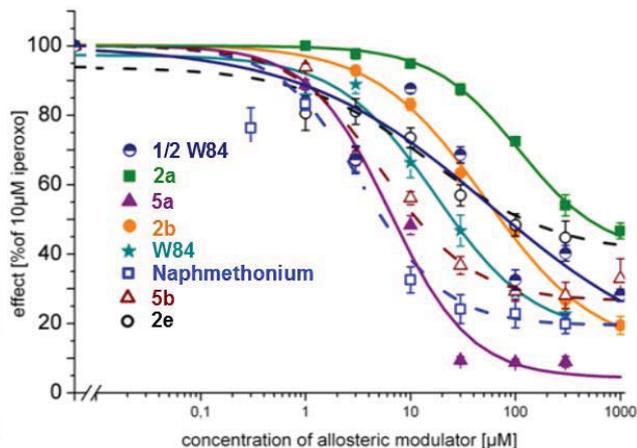
Im Folgenden werden die Konzentrations-Wirkungs-Kurven einiger allosterer Bausteine an den zwei verschiedenen Konstrukten TM 5 und TM 6 dargestellt.



**Abb. 31:** Strukturformeln der untersuchten Substanzen



**Abb. 32:** Konzentrations-Wirkungskurve am TM 5 Konstrukt zur Ermittlung der Hemmwirkung der allosteren Liganden auf einen mit Iperoxo vorstimulierten Rezeptor



**Abb. 33:** Konzentrations-Wirkungskurve am TM 6 Konstrukt zur Ermittlung der Hemmwirkung der allosteren Liganden auf einen mit Iperoxo vorstimulierten Rezeptor

In beiden Diagrammen zeigt sich, dass alle hier getesteten Substanzen Einfluss auf die Wirkung des Orthosters Iperoxo haben. Darüber hinaus weisen alle Substanzen einen sogenannten „ceiling-effect“ auf (Abflachung der Kurve auf ein Plateau), d. h. der vorstimulierte Rezeptor lässt sich nicht vollständig in den Grundzustand überführen, was ein Charakteristikum für einen allosteren Modulator darstellt. Besonders gut zu erkennen ist dieser Effekt bei Naphmethonium sowie bei der ebenfalls bisquartären Verbindung **5a**.

Alle dargestellten Allosteren üben einen hemmenden Effekt aus, was an dem Abfallen der Kurven erkennbar ist. Interessant ist die Tatsache, dass die beiden monoquartären Verbindungen **2a** und **2e** in beiden Konstrukten einen vergleichsweise schwach hemmenden Effekt auf den Orthoster ausüben, das ebenfalls monoquartäre Derivat **2b** Iperoxo jedoch deutlich stärker hemmt. Im Vergleich zu den Phthal- bzw. Naphthalimid-Derivaten **2a** und **2e**, die eine Propylkette am quartären Stickstoffatom aufweisen, trägt das Phthalimid-Derivat **2b** eine Hexylkette. Daraus lässt sich ableiten, dass die Länge der Alkylkette einen signifikanten Einfluss auf die allosteren Eigenschaften der Testsubstanzen nimmt.

Weiterhin ist zu erkennen, dass die beiden bisquartären Verbindungen **5a** und **5b** Aktivitäten zeigen, die den bekannten allosteren Modulatoren Naphmethonium und W84 sehr ähnlich sind, was dafür spricht, dass ein zweiter aromatischer Rest im Molekül nicht erforderlich für die ausgeprägte Wirkung ist, sehr wohl aber ein zweites positiv geladenes Zentrum.

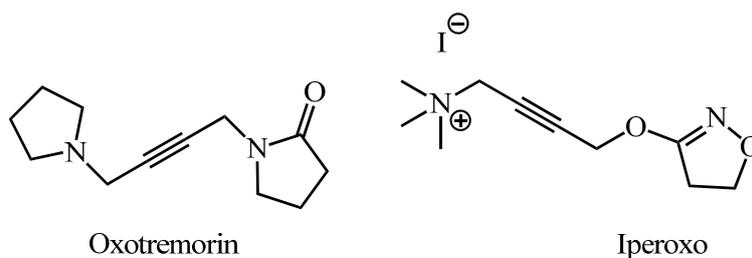
Vergleicht man die zwei unterschiedlichen Konstrukte, erkennt man, dass fast alle Substanzen in beiden Fällen nahezu identische Wirkung zeigen. Lediglich Verbindung **5a** zeigt in TM 6 eine bemerkenswert hohe Aktivität. Die Iperoxo-Wirkung wird hier nahezu vollständig gehemmt. Dies spricht dafür, dass diese Substanz zusätzlich eine weitere Rezeptorkonformation begünstigt.

### 2.1.3 Ergebnisse

Es konnten einige allosterische Bausteine sowie neue Substanzen in guten und verbesserten Ausbeuten (im Vergleich zur Literatur) synthetisiert werden. Durch die Synthesen dieser allosterischen Modulatoren konnten FRET-Experimente durchgeführt und mit diesen die Ergebnisse von Antony *et al.*<sup>73</sup> bestätigt werden. So ließen sich alle hier untersuchten Substanzen als negative allosterische Modulatoren (NAMs) identifizieren.

## 2.2 Iperoxo

Hoch aktive Agonisten muskarinischer Rezeptoren sind derzeit von großem Interesse, beispielsweise für die Behandlung von Morbus Alzheimer sowie in der Schmerztherapie. Ein Beispiel für einen solchen Agonisten stellt das Oxotremorin dar (siehe **Abb. 34**). Der von dieser Substanz abgeleitete hochaktive, wenngleich unselektive Agonist Iperoxo (siehe **Abb. 34**) sollte zunächst für weitere Untersuchungen synthetisiert werden.



**Abb. 34:** Strukturformel des Oxotremorin und Iperoxo

Die Verbindung 4-(4,5-Dihydro-isoxazol-3-yloxy)-but-2-ynyl]-*N,N,N*-trimethylammonium-Iodid, Trivialname Iperoxo, zeigt eine um zwei Größenordnungen höhere Aktivität als der endogene Ligand Acetylcholin selbst. Dieser Umstand, ebenso wie die Tatsache, dass Iperoxo ein wichtiger Baustein für die Entwicklung subtypselektiver, dualsterer Agonisten, wie Iper-6-Phth ist, zeigt die Bedeutung dieser Verbindung für die Grundlagenforschung auf dem Gebiet der Signalweiterleitung an muskarinischen Rezeptoren.

Die Synthese des Zwischenproduktes, der Iperoxo-Base, stellte lange Zeit eine Herausforderung dar. Zum einen erforderten einige Syntheseschritte eine sehr arbeitsintensive säulenchromatographische Reinigung, was einen hohen Lösungsmittelverbrauch sowie geringe Ausbeuten mit sich brachte. Darüber hinaus war die Reproduzierbarkeit nicht gewährleistet. Daraus ergab sich die Notwendigkeit, die einzelnen Syntheseschritte zu optimieren bzw. nach einer neuen Syntheseroute zu suchen.

## 2.2.1 Synthese

## 2.2.1.1 Klassische Syntheseroute

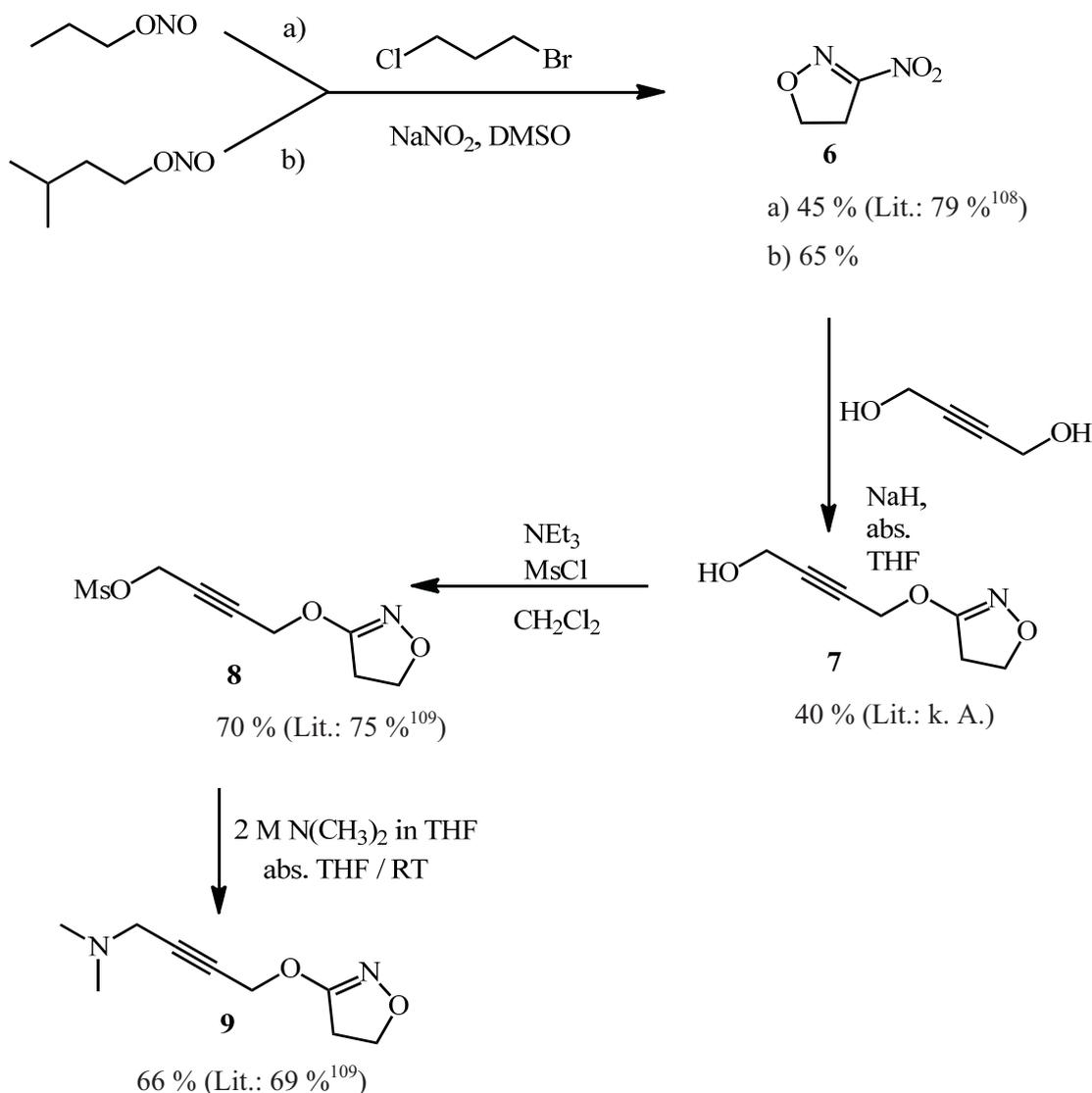


Abb. 35: Klassische Syntheseroute zur Herstellung der Iperoxo-Base

Die in **Abb. 35** dargestellte Vier-Stufen-Synthese begann zunächst mit der Umsetzung von *n*-Propylnitrit mit 1-Brom-3-chlorpropan in Gegenwart von Natriumnitrit. Das Nitrit substituiert hierbei zunächst das Bromid des Halogenalkans. Nach Umlagerung und anschließender intramolekularer Substitution erfolgt der Ringschluss zum 3-Nitro-Δ<sup>2</sup>-isoxazolin (**6**).

Es wurden Natriumnitrit und *n*-Propylnitrit in DMSO vorgelegt und unter Rühren 1-Brom-3-chlorpropan langsam zugetropft. Hierbei sollte eine Temperatur von 40 °C nicht überschritten werden. Nach ca. 20 Stunden wurde die Mischung auf Eis geschüttet und mehrmals mit Dichlormethan extrahiert. Nach Trocknen über Natriumsulfat und Entfernen des Lösungsmittels wurde die Lösung unter Vakuum fraktionierend destilliert, um **6** zu erhalten. Durch Verwendung von Isopentylnitrit anstelle

des *n*-Propylnitrit konnte im Vergleich zu Dallanoce *et al.*<sup>109</sup> die Ausbeute von 45 % auf 65 % gesteigert werden.

Im zweiten Schritt wurde ebenfalls in Analogie zu Dallanoce *et al.*<sup>109</sup> 2-Butin-1,4-diol unter Schutzgasatmosphäre in abs. THF vorgelegt und Natriumhydrid (zuvor mit *n*-Pentan gewaschen) vorsichtig zugegeben. Die Mischung wurde eine Stunde bei Raumtemperatur gerührt, anschließend 3-Nitro- $\Delta^2$ -isoxazolin in THF zugetropft und die Mischung 6 Stunden unter Rückfluss erhitzt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurde das Reaktionsgemisch auf Wasser gegossen, mit Dichlormethan extrahiert, die organischen Phasen getrocknet und das Lösungsmittel entfernt. Durch säulenchromatographische Reinigung (Kieselgel, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/EA Gradient: 4:1→1:1, R<sub>f</sub> = 0.49) wurde 4-((4,5-Dihydro-isoxazol-3-yl)oxy)but-2-yn-1-ol (**7**) in 40 %-iger Ausbeute erhalten.

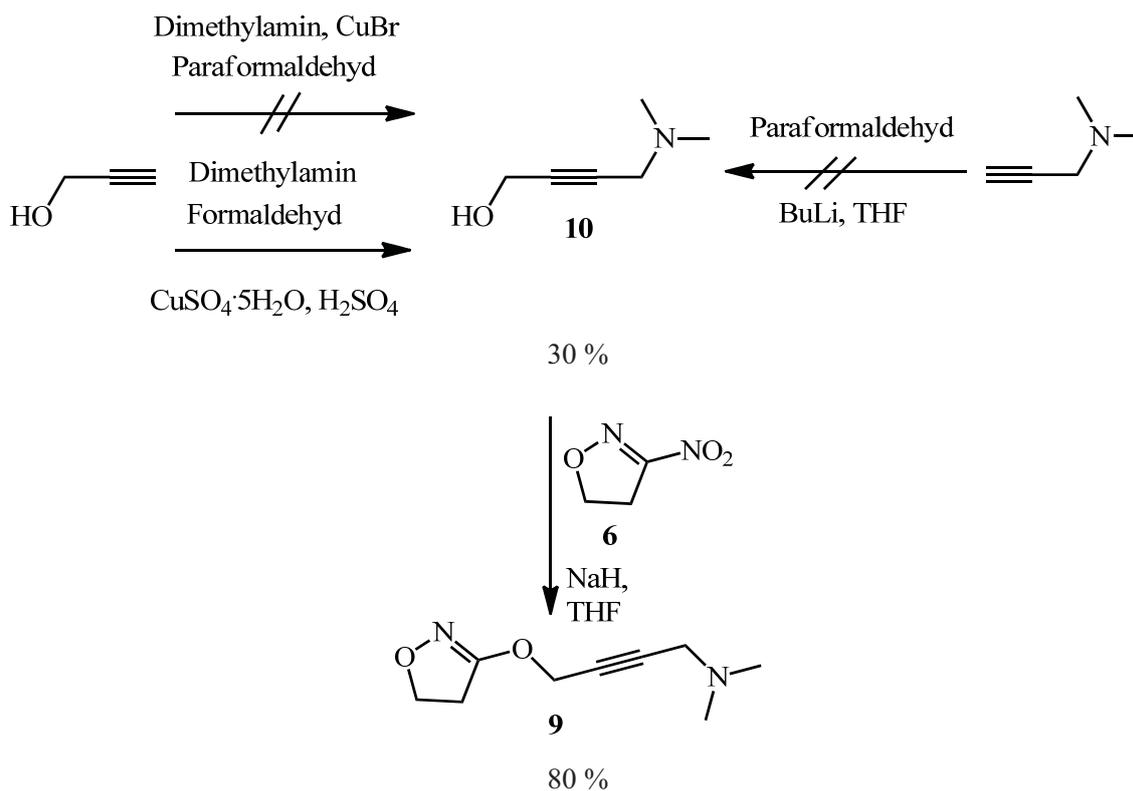
Im Folgenden sollte die Hydroxyl-Funktion in eine gute Abgangsgruppe überführt werden. Hierzu wurde die Verbindung unter Schutzgasatmosphäre in abs. Dichlormethan aufgenommen, mit Triethylamin versetzt und anschließend bei 0 °C langsam Methansulfonylchlorid zugetropft. Nach 20 Stunden Rühren bei Raumtemperatur wurde 1N Salzsäure zugegeben, die wässrige Phase mit Dichlormethan extrahiert, die vereinigten organischen Phasen über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel entfernt. Wie von Schmitz<sup>96</sup> beschrieben wurde das Rohprodukt durch Säulenchromatographie gereinigt (Kieselgel, PE/EA 1:1, R<sub>f</sub> = 0.44) und das Mesylat **8** wurde in 70 %-iger Ausbeute erhalten.

Im letzten Schritt wurde dieses Mesylat schließlich in abs. Methanol mit 2M Dimethylamin-Lösung in THF sowie Triethylamin versetzt und unter Schutzgasatmosphäre bei Raumtemperatur gerührt. Der Reaktionsverlauf wurde dünnschichtchromatographisch verfolgt (Kieselgel, MeOH/CHCl<sub>3</sub> 1:9, R<sub>f</sub> = 0.45). Nach beendeter Reaktion (zwei bis vier Tage) wurde der Reaktionsansatz auf Wasser gegossen, mit Chloroform extrahiert, die organischen Phasen getrocknet und das Lösungsmittel entfernt, um **9** als gelbes Öl zu erhalten. Auch in diesem Schritt wurde die von Dallanoce *et al.*<sup>109</sup> beschriebene Destillation durch eine säulenchromatographische Reinigung (Kieselgel, MeOH/CHCl<sub>3</sub> 1:9, R<sub>f</sub> = 0.45) ersetzt, wodurch eine leichte Ausbeutensteigerung von 64 %<sup>109</sup> auf 66 % erzielt werden konnte.

Zwar konnten einzelne Schritte dieser Syntheseroute optimiert werden, allerdings stellte die sehr zeit- und materialintensive Durchführung, die geringen Ausbeuten ebenso wie die geringe Reproduzierbarkeit ein großes Problem dar. Gerade das Produkt der letzten Stufe konnte oftmals nicht hergestellt werden bzw. es bildete sich ein dunkelbraunes Öl, aus dem sich auch nach mehrfacher säulenchromatographischer Reinigung Iperoxo nicht rein isolieren ließ.

### 2.2.1.2 Alternative Syntheseroute der Iperoxo-Base

Aufgrund der oben erläuterten Problematik der klassischen Synthese wurde nach einem neuen Weg gesucht Iperoxo-Base herzustellen. In **Abb. 36** sind die verschiedenen Synthesevarianten dargestellt.



**Abb. 36:** Übersicht über die verschiedenen Syntheseschritte zur Herstellung der Iperoxo-Base

Zunächst wurde in Anlehnung an Calogeropoulou *et al.*<sup>110</sup> von N,N-Dimethylpropargylamin ausgegangen. Durch Umsetzung mit einer starken Base, hier Butyllithium, sollte das endständige Ethinkohlenstoffatom deprotoniert werden und dieses mit Paraformaldehyd im Sinne einer nukleophilen Addition zum Produkt reagieren. Unter Schutzgasatmosphäre wurde das Amin in abs. THF gelöst und auf -55 °C gekühlt. Nun wurde Butyllithium zugetropft, wobei ein farbloser Niederschlag entstand. Nach einer Stunde Rühren bei -55 °C wurde in abs. THF gelöstes Paraformaldehyd zugegeben und die Reaktionsmischung auf Raumtemperatur erwärmt. Hierbei löste sich der farblose Niederschlag und es wurde eine weitere Stunde bei Raumtemperatur gerührt. Die DC-Kontrolle (Kieselgel, Chloroform/Methanol 2:1) des Reaktionsgemisches ließ eine Umsetzung erkennen. Die einzelnen Fraktionen konnten säulenchromatographisch getrennt werden, jedoch handelte es sich bei keiner der erhaltenen Fraktionen um 4-Dimethylamino-but-2-en-1-ol.

Eine weitere Synthesestrategie nutzte Propargylalkohol als Ausgangsstoff. Dieses sollte mittels einer Mannich-Reaktion zu 4-Dimethylamino-but-2-en-1-ol reagieren. Anders als im Falle der klassischen Mannich-Reaktion wird hier jedoch anstelle des Ammoniaks Dimethylamin eingesetzt, das zunächst mit Formaldehyd unter Wasserabspaltung zu einem Iminium- bzw. Carbenium-Ion reagiert und weiterhin unter Deprotonierung an eine CH-acide Verbindung addiert wird.<sup>99</sup> Es wurden zwei verschiedene Katalysatoren eingesetzt:

Variante 1: CuBr als Katalysator

Hier wurden zunächst Propargylalkohol mit 1.7 Äquivalenten Paraformaldehyd, 1.2 Äquivalenten Dimethylamin und 0.03 Äquivalenten Kupferbromid in THF bei Raumtemperatur gerührt. Weder im entstehenden Niederschlag, noch in der Mutterlauge konnte  $^1\text{H-NMR}$ -spektroskopisch das Produkt nachgewiesen werden. Auch nach Erhitzen des Reaktionsgemisches auf  $80\text{ }^\circ\text{C}$  in einem neuen Ansatz und anschließender säulenchromatographischer Reinigung (Kieselgel, Chloroform/Methanol 2:1) konnte die Zielverbindung nicht isoliert werden. Aus diesem Grund wurde ein neuer Katalysator eingesetzt.

Variante 2: Kupfersulfat als Katalysator

Es wurde analog zu Baeckström *et al.*<sup>111</sup> verfahren, wobei das Dimethylamin durch Dimethylamin-Hydrochlorid ersetzt wurde. Zunächst wurde dieses in Wasser gelöst und mit Schwefelsäure auf einen  $\text{pH} = 9$  eingestellt. Nach Zugabe von 40 %-iger Formaldehyd-Lösung, Propargylalkohol und  $\text{CuSO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$  wurde  $\text{pH} = 8$  eingestellt. Die Mischung wurde eine Stunde auf  $80\text{ }^\circ\text{C}$  erwärmt und verfärbte sich durch Abkühlen blau. Das Gemisch wurde auf wässrige Ammoniak-Lösung gegossen und mit Diethylether mithilfe eines kontinuierlichen Flüssig-Flüssig-Extraktors über Nacht extrahiert. Anschließend wurde der Ether entfernt und der Rückstand fraktionierend destilliert (Sdp.:  $51\text{ }^\circ\text{C}/3.5 \cdot 10^{-3}$  mbar), um das Produkt **10** als gelbes Öl zu erhalten. Da diese Synthese zwar stets reproduzierbar war, die Ausbeuten jedoch unter 27 % blieben, wurden die einzelnen Parameter so verändert, bis schließlich Ausbeuten bis zu 80 % erreicht werden konnten. Zum einen konnten durch längere Extraktionszeiten geringe Ausbeutesteigerungen erzielt werden. Die klassische Extraktion lieferte nicht nur deutlich schlechtere Ausbeuten, sondern führte zusätzlich zu stark verunreinigten Rohprodukten. Weiterhin wurde die verdünnte Ammoniak-Lösung durch konz. Ammoniak ersetzt und schließlich zeigte sich, dass bei diesem Verfahren eine fraktionierte Destillation nicht länger erforderlich war. In manchen Fällen war eine säulenchromatographische Reinigung nötig, was möglicherweise auf variierende Lösungsmittel- bzw. Edukt-Reinheiten zurückzuführen war. Diese verlief jedoch im Vergleich zu den Reinigungen der klassischen Syntheserouten unproblematisch und erforderte keine großen Mengen an Kieselgel oder Lösungsmittel.

Das erhaltene 4-Dimethylamino-but-2-en-1-ol (**10**) wurde schließlich in abs. THF unter Schutzgasatmosphäre vorgelegt, Natriumhydrid (vorher mit Pentan gewaschen) zugegeben und die Mischung eine Stunde bei Raumtemperatur gerührt. Nun wurde 3-Nitro- $\Delta^2$ -isoxazolin (**6**) zugetropft und das Reaktionsgemisch 4 Stunden unter Rückfluss erhitzt. Im Anschluss wurde der Ansatz auf Wasser geschüttet, mit Chloroform extrahiert, die organischen Phasen getrocknet und das erhaltene Öl säulenchromatographisch gereinigt (Kieselgel,  $\text{MeOH}/\text{CHCl}_3$  9:1,  $R_f = 0.66$ ) um die Iperoxo-Base **9** als gelbes Öl in bis zu 80 %-iger Ausbeute zu erhalten. Da die Reinheit der Substanzen für die Bildung von quartären bzw. bisquartären Verbindungen von großer Bedeutung ist, war es in manchen Fällen erforderlich, die

Iperoxo-Base durch eine weitere Säulenchromatographie zu reinigen. Hierbei wurden verschiedene Mischungsverhältnisse von Chloroform und Methanol als Laufmittel gewählt, jeweils auf die vorhandene Verunreinigung angepasst.

Für pharmakologische Untersuchungen sollte die Iperoxo-Base als Salz ausgefällt werden. Um die Base als Hydrochlorid auszufällen, wurde das gelbe Öl in abs. Diethylether gelöst und tropfenweise propanolische Salzsäure zugegeben. Nachdem sich eine Trübung zeigte, wurde 24 Stunden bei 4 °C aufbewahrt. Es konnte hier jedoch lediglich ein Öl isoliert werden. In einem weiteren Versuch wurde Iperoxo-Base in Acetonitril gelöst. Eine äquimolare Menge an Oxalsäure wurde in Ethanol gelöst und zur Iperoxo-Base getropft. Da kein Niederschlag erkennbar war, wurde ein Kristall Oxalsäure als Kristallisationskeim zugegeben und es bildete sich ein starker, weißer Niederschlag. Es wurde erneut bei 4 °C aufbewahrt und nach einer Stunde abfiltriert, mehrfach mit Diethylether sowie Chloroform gewaschen und Iperoxo-Oxalat als weißer Feststoff erhalten.

### 2.2.1.3 Synthese des Agonisten Iperoxo

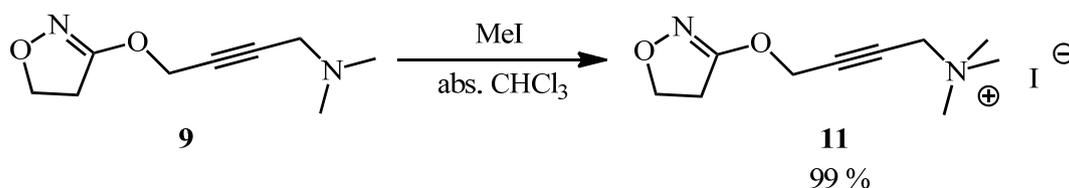


Abb. 37: Syntheschema zur Herstellung von Iperoxo

Für die Synthese des Agonisten Iperoxo wurde gemäß Dallanoce *et al.*<sup>109</sup> die Iperoxo-Base **9** mit Methyljodid in abs. Chloroform versetzt. Bereits bei Zutropfen des Methylierungsreagenzes war eine Trübung der Lösung zu erkennen. Zur vollständigen Umsetzung wurde jedoch einen Tag bei Raumtemperatur gerührt. Nach Entfernen des Lösungsmittels und mehrmaligem Waschen mit Diethylether wurde Iperoxo **11** als weißer Feststoff erhalten.

## 2.2.2 Ergebnisse

Zunächst konnten die einzelnen Syntheseschritte der klassischen Herstellung des Agonisten Iperoxo verbessert werden. Da jedoch Ausbeuten sowie Reproduzierbarkeit nicht zufriedenstellend waren, wurde eine neue Synthesestrategie entwickelt. Hier wurde auf Basis einer Mannich-Reaktion zunächst 4-Dimethylamino-but-2-en-1-ol (**10**) hergestellt, was mit 3-Nitro- $\Delta^2$ -isoxazolin (**6**) zur Iperoxo-Base (**9**) reagieren konnte. Diese neue Synthesevariante verbesserte nicht nur die Gesamtausbeute von 12 auf 42 %, sondern bedeutete gleichzeitig eine deutliche Kosten- und Zeitersparnis und gewährleistete eine Reproduzierbarkeit, wodurch es möglich war, die im Folgenden beschriebenen Derivate zu synthetisieren.

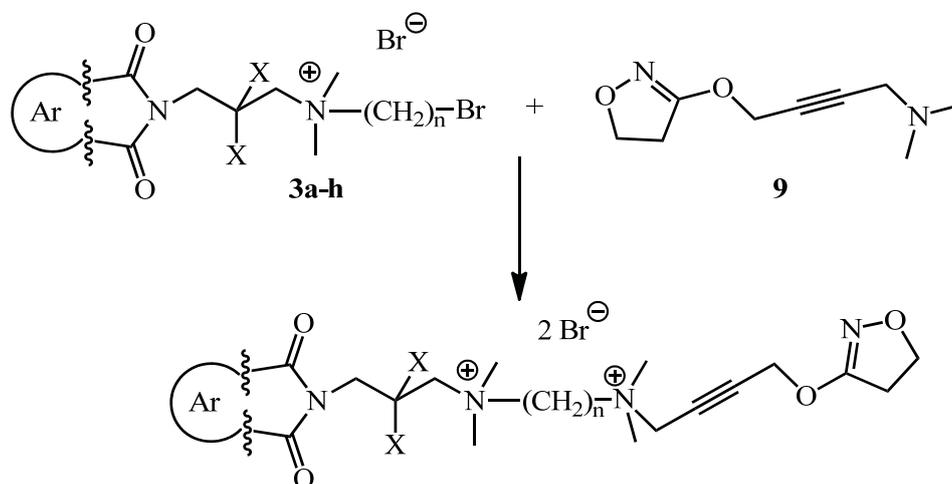
## 2.3 Agonistische Hybridverbindungen und verkürzte Derivate

Für Hybride mit Iperoxo, wie z.B. Iper-6-Phth sowie Iper-6-Naph, konnten dualstere Bindungsmodi nachgewiesen werden. Für weitere Untersuchungen sollten zunächst diese beiden Substanzen sowie Hybride mit Alkylketten unterschiedlicher Längen dargestellt werden.

Wie bereits mehrfach erwähnt, ist Iperoxo ein hoch potenter muskarinischer Agonist mit größerer Aktivität als der endogene Ligand Acetylcholin. Ziel war es, Derivate mit verschiedenen langen Alkylketten am quartären Stickstoff-Atom zu synthetisieren, um deren Verhalten auf die Signalweiterleitung untersuchen zu können.

### 2.3.1 Synthese

#### 2.3.1.1 Dualstere Agonisten



**12a:** Ar = Phth, X = H, n = 4, (74 %)

**12b:** Ar = Phth, X = H, n = 6 (69 %, Lit.: 65<sup>73</sup>)

**12c:** Ar = Naph, X = CH<sub>3</sub>, n = 6 (46 %, Lit.: 59<sup>73</sup>)

**Abb. 38:** Syntheschema der Herstellung von dualstere Agonisten

Zur Herstellung der dualster bindenden Hybride Iper-6-Phth und Iper-6-Naph und deren Derivate mit anderen Kettenlängen wurde die jeweilige monoquartäre Vorstufe **3a-h** in Acetonitril gelöst, 1.2 Äquivalente Iperoxo-Base sowie eine Spatelspitze KI/K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> zugegeben und die Lösung im Glasbombenrohr auf 55 °C erhitzt. Der Reaktionsverlauf wurde dünnschichtchromatographisch verfolgt (Kieselgel, MeOH/0.2 M NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> 3:2, R<sub>f</sub> = 0.3-0.4). Nach beendeter Reaktion wurde portionsweise in Diethylether getropft, der entstandene Niederschlag abfiltriert und mehrmals mit Diethylether gewaschen. Die beiden von Antony *et al.*<sup>73</sup> beschriebenen Hybride konnten isoliert werden, wobei im Falle des Iper-6-Phth (**12b**) eine kleine Ausbeutensteigerung von in 65 % auf 69 % erzielt werden konnte, die Synthese des Iper-6-Naph (**12c**) führte jedoch zu einer Verschlechterung der Ausbeute von 59 auf 46 %.

Im Falle des Iper-4-Phth (**12a**) entstand im ersten Ansatz ein dunkelbraunes Öl, das sich in keinem gängigen Lösungsmitteln löste und daher auch nicht weiter reinigen ließ. In einem weiteren Versuch wurde absolutisiertes Acetonitril verwendet. Hier entstand zwar kein dunkelbraunes Öl, das Produkt konnte jedoch ebenfalls nicht rein isoliert werden. Aus diesem Grund wurde eine säulenchromatographische Reinigung (Kieselgel, MeOH/0.2 M NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> 3:2) durchgeführt. Es wurden zwei Fraktionen erhalten, die erste Fraktion (R<sub>f</sub> = 0.4) zeigte einen von den Edukten verschiedenen DC-Fleck. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und es wurde ein orange-farbenes Öl erhalten. Dieses wurde <sup>1</sup>H-NMR-spektroskopisch untersucht, zeigte jedoch eine Vielzahl von Verbindungen. Aus diesem Grund wurde Diethylether zugegeben und das Öl emulgiert. Nach Entfernen des Lösungsmittels wurde aus Ethanol umkristallisiert. Der erhaltene weiße Feststoff wurde <sup>1</sup>H-NMR-spektroskopisch untersucht, es handelte sich dabei jedoch nicht um Iper-4-Phth.

Schließlich wurde ein mikrowellenunterstützter Ansatz durchgeführt. **3b** wurde in abs. Acetonitril und 1/10 Chloroform gelöst, Iperoxo-Base und eine katalytische Menge KI/K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> zugegeben und die Mischung im Druckreaktor der Mikrowelle auf 70 °C (Aufheizrate: 17.5 °C/Min) erhitzt. Nach 30 Minuten wurde der Reaktionsfortschritt dünnschichtchromatographisch (Kieselgel, MeOH/0.2 M NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> 3:2) verfolgt. Es wurde weitere 3 Minuten auf 80 °C erhitzt. Da der Iperoxo-Fleck auf der DC-Platte nicht mehr erkennbar war, Edukt aber schon, wurden 3 Tropfen Iperoxo-Base (**9**) zugegeben und die Mischung schließlich 40 Minuten bei 90 °C erhitzt. Da nach dieser Zeit erneut kein Iperoxo mehr vorhanden war, wurde die Mischung abgekühlt und 3 Tage bei 4 °C gelagert. Es hatte sich kein Niederschlag gebildet, weshalb portionsweise in Diethylether getropft und der dabei entstandene Niederschlag abfiltriert wurde. Hierbei handelte es sich jedoch um das Edukt. Da Iperoxo-Base dünnschichtchromatographisch nicht mehr nachweisbar war, ist davon auszugehen, dass sie sich unter diesen Bedingungen zersetzt hatte.

Es wurde ein kleinerer Ansatz, allerdings mit einem größeren Überschuss an Iperoxo-Base (0.558 mmol Edukt und 1.12 mmol Iperoxo-Base) im Glasbombenrohr bei 60 °C durchgeführt. Nach 14 Tagen zeigte sich eine Umsetzung und es wurde portionsweise in Diethylether getropft und der entstandene Niederschlag abfiltriert. Dieser wurde schließlich mehrfach mit Diethylether gewaschen, im Vakuum getrocknet und es konnte Iper-4-Phth (**12a**) als weißer Feststoff erhalten werden.

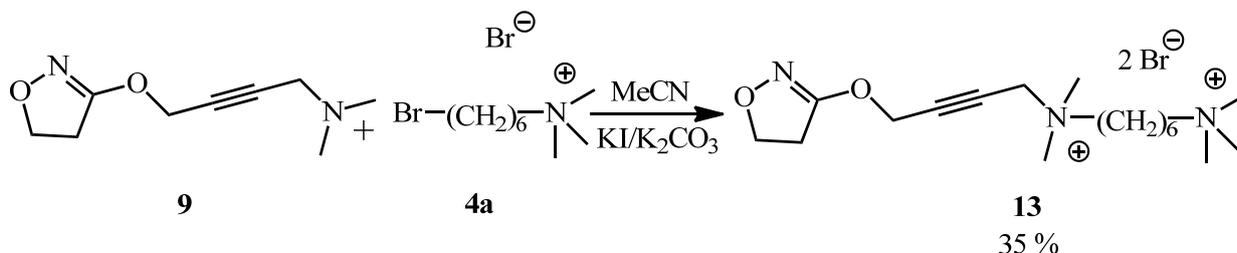
Parallel dazu wurde die Synthese des Iper-4-Naph durchgeführt. Hier war nach 26 Tagen Rühren bei 55 °C eine Umsetzung erkennbar. Es wurde portionsweise in Diethylether getropft und ein beige-farbener Feststoff erhalten. In <sup>1</sup>H-NMR-spektroskopischen Untersuchungen zeigte sich, dass das Produkt zwar entstanden war, jedoch sehr stark verunreinigt vorlag. Aus diesem Grund wurde aus verschiedenen Lösungsmitteln umkristallisiert, das reine Produkt konnte jedoch nicht isoliert werden.

Zusätzlich wurden Versuche unternommen die jeweiligen Derivate mit den Kettenlängen sieben und acht zu synthetisieren. Allerdings entstanden hier meist ölige Substanzen, die sich auch nach Umkris-

tallisationen in verschiedenen Lösungsmitteln und Erhitzen nicht reinigen ließen, so dass die erwarteten Produkte nicht isoliert werden konnten.

### 2.3.1.2 Versuche zur Synthese verkürzter Iperoxo-Hybride

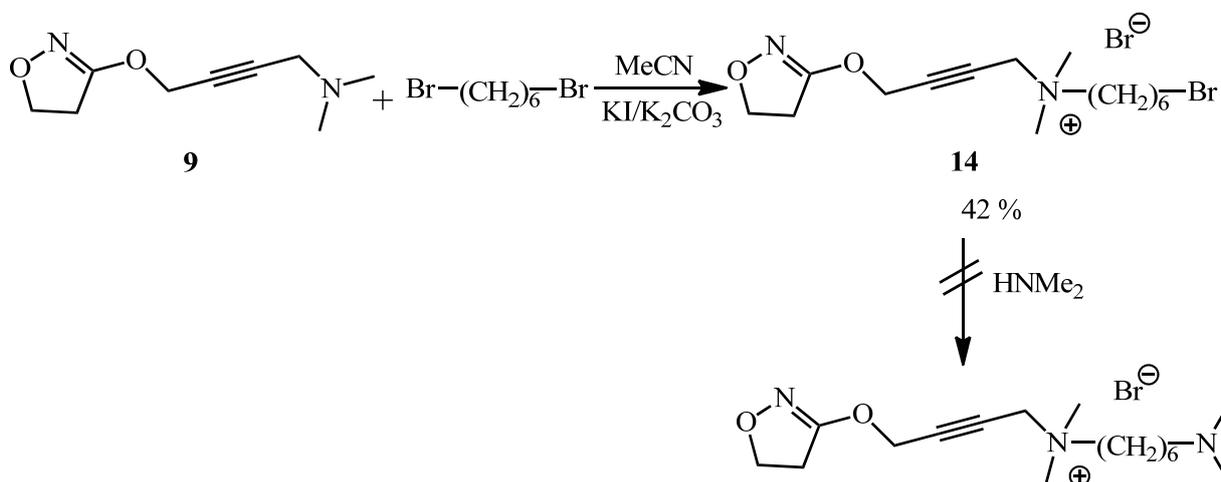
a) Durch Herstellung von Iperoxo-Derivaten, die aus Iperoxo und einer Hexamethonium-Vorstufe bestehen, sollte die Rolle des zweiten positiven Zentrums untersucht werden.



**Abb. 39:** Synthese des Iperoxo-Hexamethonium-Derivats

Zu diesem Zweck wurde Iperoxo-Base (**9**) in abs. Acetonitril gelöst, die Hexamethonium-Vorstufe **4a** sowie eine Spatelspitze KI/K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> zugegeben und die Mischung im Glasbombenrohr bei 55 °C Ölbadtemperatur erhitzt. Nach 2 Tagen war ein weißer Niederschlag erkennbar, der abfiltriert, mehrmals mit Diethylether gewaschen und **13** wurde in 87 %-iger Ausbeute erhalten.

b) Es sollte zudem ein Iperoxo-Derivat mit einem Aminoalkyl-Spacer hergestellt werden. Hierzu musste Iperoxo-Base **9** zunächst mit einem Alkylhalogenid versetzt werden, das im nächsten Schritt in ein sekundäres Amin überführt werden konnte.

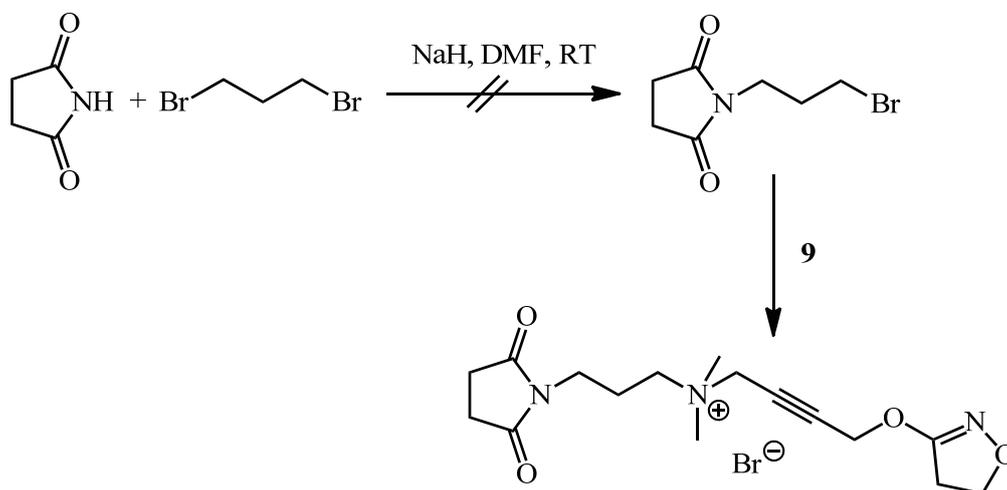


**Abb. 40:** Syntheschema zur Umsetzung von Iperoxo

Iperoxo-Base **9** wurde in abs. Acetonitril vorgelegt, 1,2 Äquivalente 1,6-Dibromhexan, sowie eine Spatelspitze KI/K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> zugegeben und die Lösung im Glasbombenrohr auf 55 °C erhitzt. Der Reaktionsfortschritt wurde dünnschichtchromatographisch verfolgt (Kieselgel, MeOH/0.2 M NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> 3:2, R<sub>f</sub> = 0.45). Nach einer Woche wurde portionsweise in Diethylether getropft, es bildete sich jedoch kein Niederschlag. In einem zweiten Ansatz wurden 1.5 Äquivalente 1,6-Dibromhexan eingesetzt. Nach einem Tag bildete sich ein Niederschlag, dieser wurde abfiltriert und so lange mit Diethylether

und Petrolether gewaschen, bis der braune Niederschlag hellbeige-farben wurde. Bei diesem handelte es sich um Verbindung **14**. Diese Verbindung wurde in einem Gemisch aus abs. Acetonitril und abs. Methanol im Verhältnis 3:1 vorgelegt und 3 Äquivalente Dimethylamin-Lösung in THF sowie eine katalytische Menge KI/K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> zugegeben und die Mischung im Glasbombenrohr bei 55 °C erhitzt. Die Reaktion wurde mittels Dünnschichtchromatographie verfolgt (Kieselgel, MeOH/0.2 M NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> 3:2, Anfärbereagenz: Dragendorff). Eine Umsetzung war erkennbar, jedoch konnte das aminierte Produkt nicht isoliert werden. Verschiedene Variationen der Reaktionsbedingungen wie Erhöhung der Temperatur auf bis zu 70 °C sowie Umsetzung der Edukte in unterschiedlichen Verhältnissen führten nicht zum gewünschten Produkt.

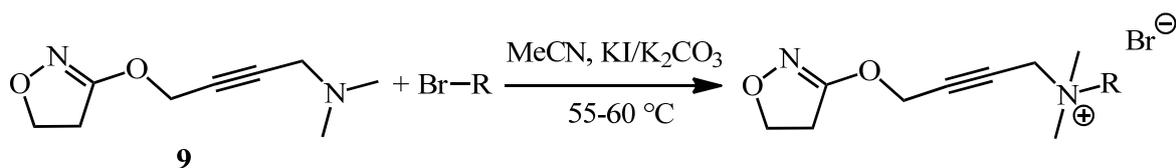
c) Um die Rolle des aromatischen Phthalimidopropylamin-Restes für die Bindung an den Rezeptor zu eruieren, sollte Iperoxo mit 1-(3-(Dimethylamin)-propyl)pyrrolidin-2,5-dion umgesetzt werden. Dieses sollte zunächst hergestellt werden.



**Abb. 41:** Syntheschema zur Umsetzung von Succinimid mit Dibrompropan und Kopplung mit Iperoxo-Base **9**

Succinimid wurde in abs. DMF gelöst, eine äquimolare Menge an Natriumhydrid, das zuvor mit *n*-Pentan gewaschen wurde, zugegeben und eine halbe Stunde bei Raumtemperatur gerührt. Schließlich wurden 2 Äquivalente 1,3-Dibrompropan zugetropft und die Mischung bei Raumtemperatur gerührt (siehe **Abb. 41**). Der Reaktionsverlauf wurde dünnschichtchromatographisch verfolgt (Kieselgel, EA/PE 2:1). Nach 24 Stunden Rühren zeigte sich eine Umsetzung. Aus der Reaktionslösung wurde mit Petrolether ein weißer Niederschlag ausgefällt und mit Diethylether gewaschen. <sup>1</sup>H-NMR-spektroskopische Untersuchungen zeigten jedoch weder im weißen Feststoff noch im Filtrat das gewünschte Produkt.

## 2.3.1.3 Synthese der N-alkylierten Iperoxo-Derivate



	R =	Ausbeute [%]		R =	Ausbeute [%]
<b>15a:</b>	Ethyl	89	<b>15f:</b>	Heptyl	74
<b>15b:</b>	Propyl	88	<b>15g:</b>	Octyl	48
<b>15c:</b>	Butyl	65	<b>15h:</b>	Nonyl	80
<b>15d:</b>	Pentyl	78	<b>15i:</b>	Decyl	83
<b>15e:</b>	Hexyl	85			

Abb. 42: Syntheschema der Herstellung verkürzter Iperoxo-Derivate

Es sollte der Einfluss von unterschiedlichen Alkylkettenlängen am positiv geladenen Stickstoff-Atom untersucht werden. Hierzu wurde Iperoxo-Base **9** in abs. Acetonitril vorgelegt, das entsprechende 1-Bromalkan im Überschuss sowie eine Spatelspitze KI/K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> zugegeben und die Mischung in einem Glasbombenrohr auf Temperaturen zwischen 55 und 70 °C erhitzt. Das Beenden der Reaktion zeigte sich teilweise durch eine Trübung, die im Falle der langkettigen Derivate nicht beobachtet wurde. Hier wurde das Ende der Reaktion mittels Dünnschichtchromatographie ermittelt (Kieselgel, MeOH/0.2 M NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> 3:2, R<sub>f</sub> = 0.58-0.73). Die Reaktionsdauer variierte zwischen 1 und 58 Tagen. War ein Niederschlag erkennbar, wurde dieser abfiltriert und mehrmals mit Diethylether gewaschen. Wenn keine Trübung auftrat, wurde das Reaktionsgemisch in Diethylether getropft. Hierbei wurde zunächst die ganze Mischung in Ether getropft und erst im Anschluss abfiltriert. Dies führte jedoch in den meisten Fällen dazu, dass die Mischung eine ölige Konsistenz annahm und kein reines Produkt mehr erhalten werden konnte. Tropfte man jedoch nur portionsweise 1 ml Reaktionsgemisch in ca. 3-5 ml Diethylether und filtrierte sofort ab, konnten weiße bis leicht beige-farbene Feststoffe erhalten werden. Teilweise zeigten die erhaltenen Produkte noch Reste von Diethylether und Acetonitril. In diesen Fällen wurden die Substanzen in warmem Pentan aufgenommen, abfiltriert und mehrmals mit Pentan gewaschen.

Besonders zu beachten ist bei diesem Reaktionstypus, dass die Edukte sehr sauber sind. Schon kleine Verunreinigungen führten dazu, dass kein Produkt isoliert werden konnte. Dies gilt vor allem für die Iperoxo-Base, jedoch auch für die entsprechenden Bromalkane. So wurde beispielsweise die Hexyl-Verbindung mehrfach mit unterschiedlichen Chargen 1-Bromhexan angesetzt, wobei das Produkt nicht isoliert werden konnte. Erst mit einer frisch geöffneten Flasche konnte **15e** in guten Ausbeuten erhalten werden.

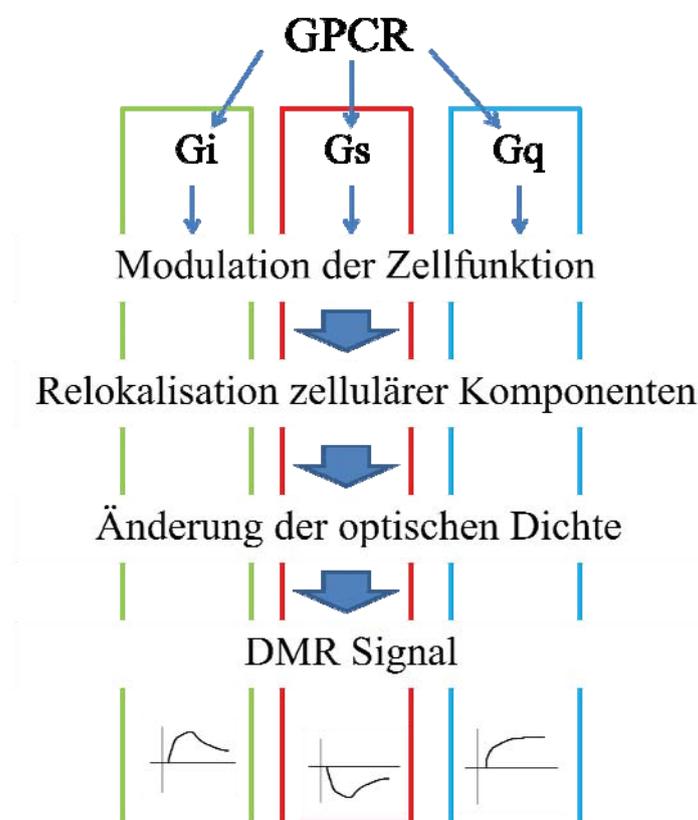
Der Fortgang der Reaktion ist anhand der Farbe der Lösung erkennbar. Zu Beginn der Reaktion handelt es sich um eine leicht gelbe Lösung, die mit der Zeit dunkler wird. Zeigte sich eine Braunverfärbung, sollte der Ansatz aufgearbeitet werden, da es hier zu einer Zersetzung der Iperoxo-Base kommt. Weiterhin ist eine konstante Temperatur unabdingbar. Konnte aus technischen Gründen die Temperatur während der Reaktion nicht konstant gehalten werden, kam es zur Bildung eines dunkelbraunen Öls, das nicht wieder in Lösung gebracht werden konnte. Diese Ansätze wurden verworfen.

## 2.3.2 Pharmakologische Untersuchungen

### 2.3.2.1 Grundlagen der Testsysteme

#### a) Dynamische Massen-Umverteilung (Dynamic Mass redistribution - DMR)

Das Prinzip des Epic<sup>®</sup>-Biosensorsystems zur Messung der zellulären dynamischen Massenumverteilung beruht auf der Tatsache, dass Signaltransduktionen, die über zelluläre Strukturen vermittelt werden, räumliche und zeitliche Veränderungen der Massenverteilung innerhalb der Zelle und damit der optischen Dichte hervorrufen. Durch diese Technik werden je nach unterschiedlichem Signalweg charakteristische, optische Signaturen erzeugt, was die Möglichkeit liefert, Reaktionen auf pharmakologische Stimuli in Echtzeit und vor allem in lebenden Zellen zu detektieren.<sup>112,113,114</sup>

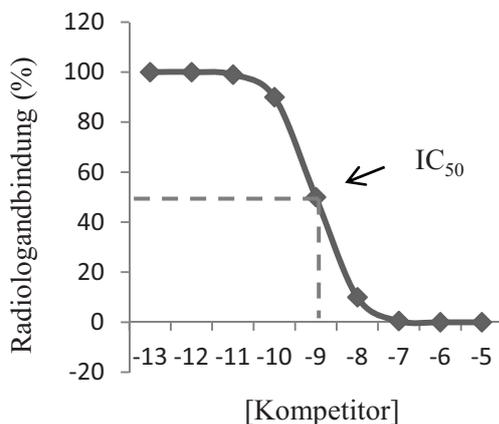


**Abb. 43:** Schematische Darstellung des Epic<sup>®</sup>-Biosensors zur Messung der zellulären Massenumverteilung (in Anlehnung an Kebig<sup>114</sup>)

**Abb. 43** zeigt schematisch das Prinzip der Messung dynamischer Massenumverteilung. Der optische Biosensor befindet sich in den einzelnen Kavitäten einer Mikroplatte. Eine darüber befindliche konfluent gezüchtete Zellschicht wird mithilfe eines Breitbandlasers angestrahlt. Eine spezifische Wellenlänge wird vom Biosensor weitergeleitet und durchdringt die Zellen mit einer Eindringtiefe von ca. 150 nm. In Abhängigkeit von der optischen Dichte und damit auch des Brechungsindex der Zellschicht verändert sich die Wellenlänge des reflektierten Lichts, das detektiert werden kann. Vor Stimulation wird eine Basislinie bestimmt. Reichern sich nach Stimulation Partikel im Messbereich an, resultiert eine erhöhte optische Dichte, was schließlich zu einer langsameren Ausbreitungsgeschwindigkeit und somit zu einer erniedrigten Energie (= größere Wellenlänge) führt. In Relation zur vorher bestimmten Basislinie werden hierbei also Massenumverteilungen im positiven Bereich detektiert. Eine verringerte optische Dichte bewirkt demzufolge eine Verschiebung der Wellenlänge in den negativen Bereich. Mithilfe des Epic<sup>®</sup>-Biosensors können Wellenlängenveränderungen über einen Zeitverlauf detektiert werden.<sup>86,114,115,116</sup> Für die im Folgenden beschriebenen Testungen wurde ca. alle 30 Sekunden ein Messwert aufgenommen.

#### b) Radioligand-Bindungsstudien

Die Interaktion extrazellulärer Liganden mit membrangebundenen Rezeptoren lässt sich mithilfe von Radioligand-Bindungsstudien untersuchen. Für diesen Zweck wird ein radioaktiv markierter Ligand (hier der Antagonist [<sup>3</sup>H]NMS) zu einer Rezeptor-haltigen Membransuspension gegeben.



**Abb. 44:** Schematische Darstellung des Kurvenverlaufs eines Wettbewerbs-experiments.

Ordinate: Bindung des Radioliganden in Prozent eines Kontrollwertes

Abszisse: Konzentration des eingesetzten Kompetitors als Logarithmus der molaren Konzentration.

Nach einer festgelegten Inkubationszeit werden die Rezeptoren durch Filtration bzw. Zentrifugation von der Suspension abgetrennt. Nun kann die Radioaktivität des Filtrerrückstands gemessen werden. Diese entspricht dem gebundenen Liganden. Werden Inhibitionsexperimente mit einem dem Radioligand strukturell nicht identischen Liganden durchgeführt, spricht man von „Heterologen Interaktions-experimenten“. Zu einer mit Radioligand gesättigten Membransuspension werden orthostere Agonis-

ten oder Antagonisten in steigender Konzentration zugegeben, wodurch die Bindung des antagonistischen Radioliganden unter Gleichgewichtsbedingungen abnimmt.

c) [<sup>35</sup>S]GTP $\gamma$ S-Bindungsstudien

Mit Hilfe des [<sup>35</sup>S]GTP $\gamma$ S-Bindungs-Assays wird die durch eine Agonist-Bindung an den Rezeptor ausgelöste G-Protein-Aktivierung gemessen. Der große Vorteil dieser Technik besteht darin, dass die funktionellen Konsequenzen der Bindung des Agonisten direkt gemessen werden können. So können die klassischen pharmakologischen Parameter wie Aktivität und Affinitäten bestimmt werden.<sup>117</sup>

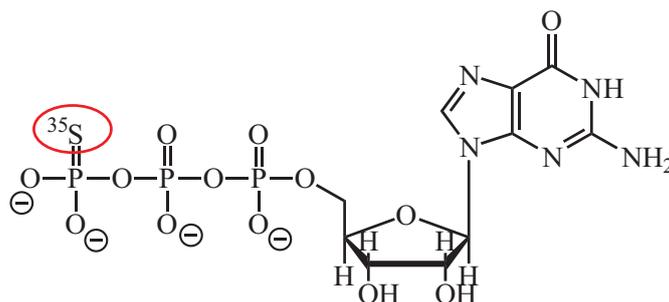


Abb. 45: Strukturformel des [<sup>35</sup>S]GTP $\gamma$ S

Bei dieser Methode wird in die Rezeptor-vermittelte G-Protein-Aktivierung (siehe **Kapitel 1.1.2**) eingegriffen. Um die intrinsische Aktivität von Agonisten mit diesem Bindungs-Assay untersuchen zu können, werden die Experimente mit dem radioaktiv markierten Nukleotid-Analogon [<sup>35</sup>S]GTP $\gamma$ S durchgeführt (siehe **Abb. 45**).

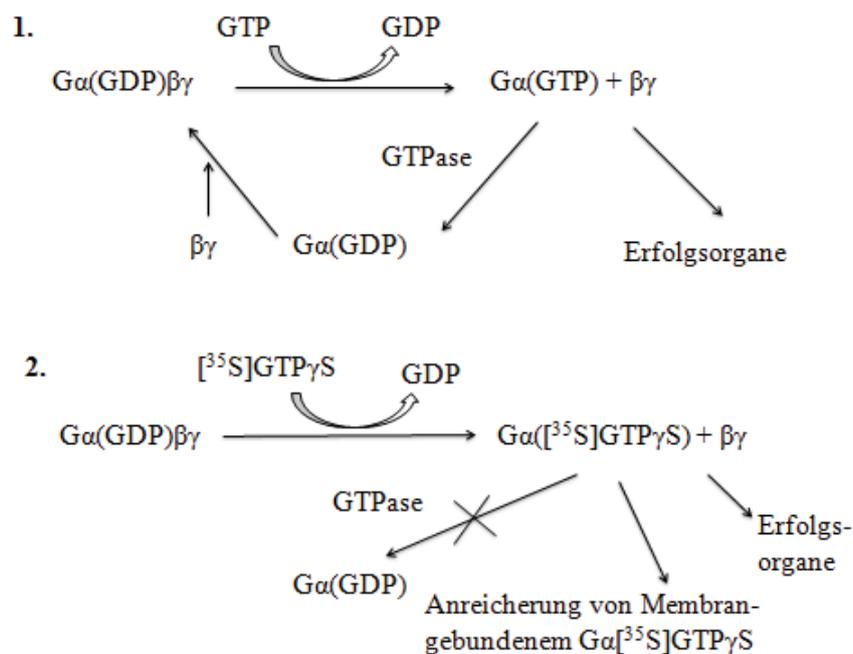


Abb. 46: Schematische Darstellung des GDP-GTP-Kreislaufes (1.) und des durch Einbringen des [<sup>35</sup>S]GTP $\gamma$ S ablaufenden Mechanismus (2.) (In Anlehnung an Harrison *et al.*<sup>117</sup>)

Durch den Austausch eines Sauerstoffatoms durch das Schwefelisotop  $^{35}$  im  $\gamma$ -ständigen Phosphat-Rest des Guanosintriphosphats wird die  $\gamma$ -Triphosphat-Bindung hydrolysestabil gegenüber der GTPase und die Bindung an die  $\alpha$ -Untereinheit irreversibel. Das G-Protein wird somit dauerhaft aktiviert, d. h. es kann sich nicht zu einem Heterotrimer zusammenfügen. Die an [ $^{35}$ S]GTP $\gamma$ S gebundenen G $\alpha$ -Untereinheiten reichern sich in der Membran an und können schließlich durch Messung der radioaktiven Zerfälle detektiert werden (schematische Darstellung siehe **Abb. 46**). Je höher die Bindung des Radioliganden, umso größer ist die Fähigkeit einer Testsubstanz, den Rezeptor zu aktivieren.<sup>117,118</sup>

### 2.3.2.2 Durchführung und Ergebnisse

Die im Folgenden beschriebenen Testungen wurden in den Arbeitskreisen von Prof. Dr. Mohr und Prof. Dr. Kostenis der Universität Bonn von Frau Schrage und Frau Seemann durchgeführt. Verwendet wurden Flp-In<sup>TM</sup>-Ovar-Zellen chinesischer Hamster, kurz CHO-Zellen, die entweder den hM<sub>2</sub>-Rezeptor oder eine Rezeptor-Mutante, in der die Aminosäure  $^{104}$ Tyrosin durch Alanin ausgetauscht wurde (hM<sub>2</sub>-Y104<sup>3,33</sup>A-Rezeptor-Mutante - Nomenklatur nach Ballesteros und Weinstein<sup>119</sup>) exprimieren.

#### a) Dynamische Massenumverteilung

Die entsprechenden CHO-Zellen wurden 20-24 Stunden auf Epic<sup>®</sup>-Biosensor-384-well-Mikroplatten kultiviert. Vor Beginn der Messung wurden die Zellen zweimal mit einer Salzlösung (HBSS, Hank's balanced salt solution), die 20mM HEPES (pH 7.0) enthielt, gewaschen und für 2 Stunden im Epic<sup>®</sup>-Reader bei 28 °C aufbewahrt. Die DMR wurde vor und nach Zugabe der Substanz-Lösung für 3,600 Sekunden gemessen. Für Experimente, die eine G<sub>S</sub>-Protein-Aktivierung quantifizieren sollten, wurden die Zellen mit Pertussis-Toxin (PTX 100 ng/ml) für 18-24 Stunden vorbehandelt.

#### b) Radioligand-Bindungsstudien

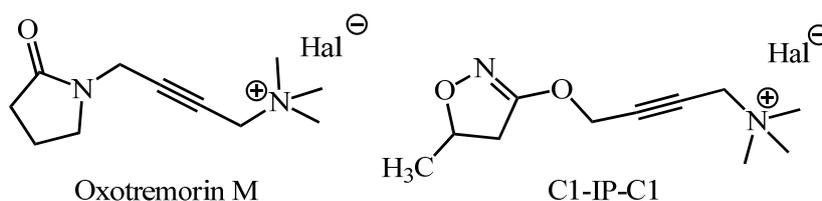
Alle Komponenten wurden zunächst in eine 96-Loch-Mikrotiterplatte pipettiert. Der Versuch wurde mit Zugabe der Membransuspension gestartet. Die Radioligandkonzentration betrug 0.2 nM. Im Falle der orthosterischen Mutante M<sub>2</sub>  $^{104}$ Tyr $\rightarrow$ Ala wurde die Konzentration auf 1 nM gesteigert.

#### c) [ $^{35}$ S]GTP $\gamma$ S-Bindungsstudien

Membran-Homogenate von CHO-hM<sub>2</sub>-Wild-Typ- oder CHO-h<sub>2</sub>M-Y104<sup>3,33</sup>A-Zellen (40 $\mu$ g/ml) wurden mit 0.07 nM [ $^{35}$ S]GTP $\gamma$ S inkubiert und die maximale Agonist-induzierte [ $^{35}$ S]GTP $\gamma$ S-Bindung wurde nach einer Stunde vermessen. Zur Auswertung wurde jeweils die intrinsische Aktivität bezogen auf einen Kontrollwert (hier: Quotient aus gemessener [ $^{35}$ S]GTP $\gamma$ S-Bindung und der Acetylcholin-induzierten [ $^{35}$ S]GTP $\gamma$ S-Bindung) gegen den Logarithmus der Konzentration an Testsubstanz aufgetragen. Durch nichtlineare Regression wird eine sigmoidale Konzentrations-Effekt-Kurve erhalten. Der EC<sub>50</sub>-Wert ist die Konzentration der Testsubstanz, die einen halbmaximalen Effekt auslöst und der

$E_{max}$ -Wert ist das obere Plateau der Kurve, durch das der maximale Effekt der Testsubstanz beschrieben wird.<sup>118</sup>

Zum Vergleich wurden in den folgenden pharmakologischen Untersuchungen zusätzlich der endogene Ligand Acetylcholin, sowie die Agonisten Oxotremorin M und C1-IP-C1 betrachtet. Letzteres leitet sich von Iperoxo ab, wobei der Einfluss einer Alkylierung am Isoxazolin-Rings untersucht werden sollte. Aus Gründen der Übersichtlichkeit werden in den folgenden Abbildungen die Iperoxo-Derivate gemäß ihrer Kettenlänge abgekürzt: So wird Iperoxo-Base (**9**) als IP-H, Iperoxo (**11**) selbst als IP-C1 und die übrigen Derivate entsprechend ihrer Alkylkette als IP-Cx.



**Abb. 47:** Strukturformeln des Oxotremorin M und C1-IP-C1

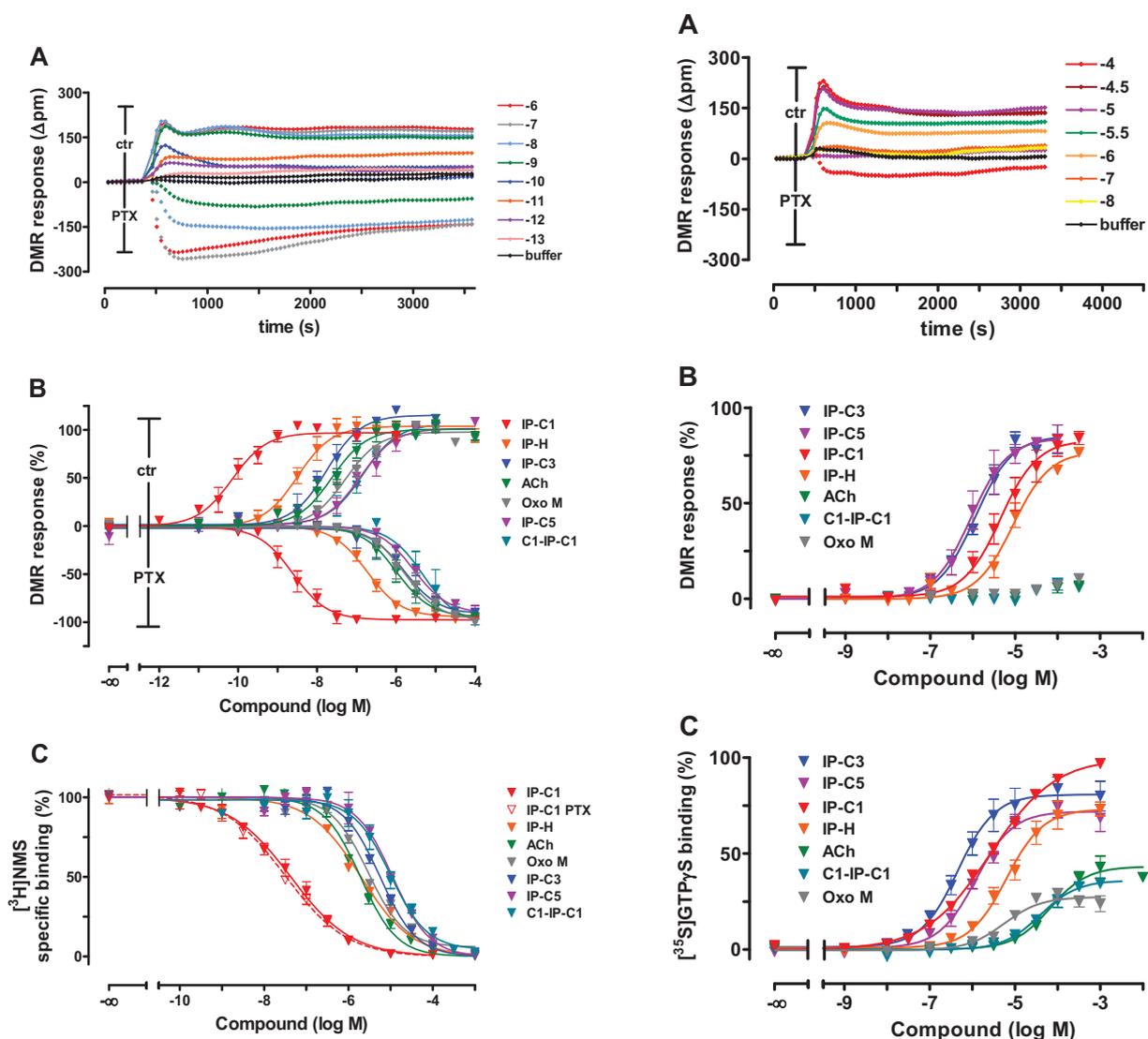
In **Abb. 48** sind die Untersuchungen am Rezeptor-Wildtyp zusammengefasst. **Abbildung A** zeigt die durch Iperoxo-induzierte dynamische Massenumverteilung bei verschiedenen logarithmischen Konzentrationen. Aufgetragen ist hier die Wellenlängenveränderung in  $\Delta pm$  gegen die Zeit. Die hier verwendeten  $hM_2$ -Rezeptoren aktivieren unter normalen Bedingungen den  $G_i$ -Signalweg, erkennbar am positiven Ausschlag der Kurve. Durch Vorbehandlung der Zellen mit PTX wird der  $G_i$ -Weg inaktiviert und es wird die Aktivierung des  $G_s$ -Proteins erkennbar, die einen negativ ausgerichteten Kurvenverlauf induziert.

**Abbildung B** stellt die prozentuale Zellantwort bei steigender Konzentration der eingesetzten Iperoxo-Derivate dar. Auch hier sind jeweils die beiden verschiedenen Signalwegs-Aktivierungen durch den unterschiedlich ausgerichteten Kurvenverlauf erkennbar (positiv =  $G_i$ , negativ =  $G_s$ ).

In **Abbildung C** ist die Verdrängung des Radioliganden [ $^3H$ ]NMS durch die Testsubstanzen dargestellt. Repräsentativ für die übrigen Substanzen ist für Iperoxo zusätzlich das Bindungsverhalten nach Vorstimulation mit PTX dargestellt, allerdings hat Pertussis-Toxin keinen Einfluss auf die Bindung der agonistischen Substanzen, jedoch auf die Aktivierung der jeweiligen Signalwege. Interessant ist der deutliche Aktivitätsabfall (Rechtsverschiebung der Kurve um zwei Größenordnungen) von Iperoxo, sobald eine längere Alkylkette am quartären Zentrum eingeführt wird. Gut zu erkennen ist weiterhin die deutlich bessere Verdrängung des Radioliganden durch Iperoxo bzw. Iperoxo-Base als durch den endogenen Ligand Acetylcholin, was die große Affinität von Iperoxo zum Rezeptor belegt.

Um sehen zu können, welche Einflüsse die für die orthostere Bindung wichtige Aminosäure Y104 auf das Bindungsverhalten sowie auf die Signalwegs-Aktivierung hat, wurde für weitere Untersuchungen

die Rezeptor-Mutante CHO-hM<sub>2</sub>-Y104<sup>3,33</sup>A verwendet, in der diese Aminosäure durch Alanin ausgetauscht wurde.



**Abb. 48:** Zellantwort bzw. Rezeptor-Bindung der verschiedenen Verbindungen am CHO-hM<sub>2</sub>-Rezeptor (Erläuterungen siehe Text)

**Abb. 49:** Zellantwort bzw. Rezeptor-Bindung der verschiedenen Verbindungen an der Rezeptor-Mutante CHO-hM<sub>2</sub>-Y104<sup>3,33</sup>A (Erläuterungen siehe Text)

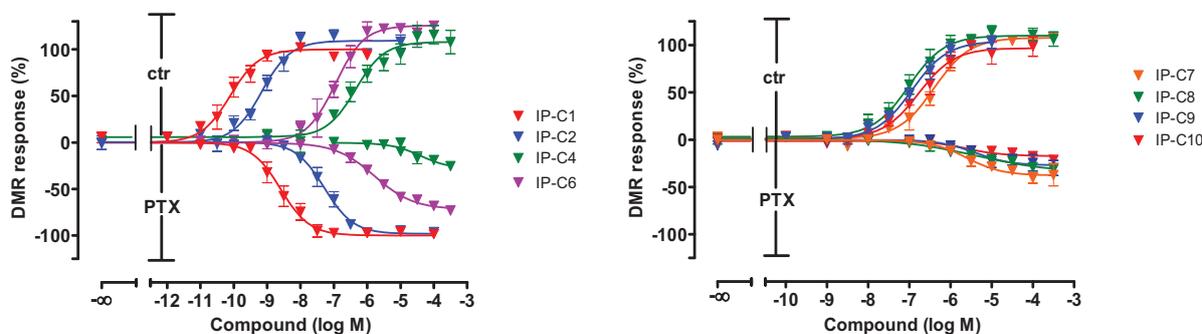
Beide Abbildungen sind entnommen aus Schrage, Seemann, Klöckner, Dallanoce, Racké, Kostenis, De Amici, Holzgrabe, Mohr. Agonists with supraphysiological efficacy at the muscarinic M2 acetylcholine receptor. *Br. J. Pharmacol.* DOI: 10.1111/bph.12003.<sup>120</sup> Mit freundlicher Genehmigung des British Journal of Pharmacology. Copyright (2012) John Wiley and Sons.

In **Abb. 49** sind die entsprechenden Zellantworten und Bindungseigenschaften der Iperoxo-Derivate an der Rezeptor-Mutante CHO-hM<sub>2</sub>-Y104<sup>3,33</sup>A dargestellt. In **Abbildung A**, sind Iperoxo-induzierte dynamische Massenumverteilungen bei verschiedenen logarithmischen Konzentrationen dargestellt. Man sieht deutlich, dass im Gegensatz zum Rezeptor-Wildtyp durch Zugabe von PTX in der Mutante der G<sub>s</sub>-Signalweg fast vollständig blockiert ist.

**Abbildung B** veranschaulicht die Konzentrations-DMR-Kurven der einzelnen Testsubstanzen.

Um die Ergebnisse vergleichen zu können, wurde die Anhäufung von [ $^{35}$ S]GTP $\gamma$ S in den Zellmembranen gemessen, wodurch eine  $G_i$ -Signalwegsaktivierung verifiziert werden konnte (siehe **Abb. 49 C**).

In **Abb. 50** sind die prozentualen Zellantworten der übrigen Iperoxo-Derivate C1 bis C10 dargestellt.



**Abb. 50:** Prozentuale Zellantwort bei steigender Konzentration der eingesetzten Iperoxo-Derivate C6 bis C10 am CHO-hM<sub>2</sub>-Rezeptor (Erläuterungen siehe Text). *Unpublizierte Daten von Ramona Schrage, Institut für Pharmakologie der Universität Bonn*

Vergleicht man die Daten der Testsubstanzen am M<sub>2</sub>-Wildtyp-Rezeptor, zeigt der „Superagonist“ Iperoxo eine deutlich höhere Wirksamkeit als die Agonisten Oxotremorin M, C1-IP-C1 und der endogene Agonist Acetylcholin. Aus der Verlängerung der Alkylkette am Iperoxomolekül resultiert ein zunächst leichter Wirksamkeitsverlust zum N-Ethyl-Iperoxo (IP-C2) und schließlich ein deutlicher Abfall der Wirksamkeit ab einer Kettenlänge von C3. Die Wirksamkeiten der Derivate mit den Kettenlängen C4 bis C10 sind alle in einem vergleichbaren Bereich (0.1 bis 1  $\mu$ M). Ferner zeigt sich, dass alle untersuchten Substanzen unter Kontrollbedingungen das gleiche Maximum aufweisen. Daher ist der „Superagonismus“ von Iperoxo in diesem System nicht sofort zu erkennen, sondern erfordert die Berechnung der Rezeptorreserve oder den Einsatz einer orthosterischen „loss-of-function“-Mutante (Antony *et al.*<sup>73</sup> siehe unten).

Durch Vorbehandlung der Rezeptor-exprimierenden Zellen mit Pertussis-Toxin lässt sich die Interaktion des Rezeptors mit dem  $G_i$ -Protein selektiv inhibieren. Können Iperoxo, Oxotremorin M, Acetylcholin und die kurzkettingen Iperoxo-Derivate zusätzlich den  $G_s$ -Weg aktivieren, zeigt sich für die langkettigen Derivate ab C7 eine  $G_i$ -Signalwegs-Selektivität. Eine Ausnahme stellt das N-Butylperoxo (IP-C4) dar, das anders als die folgenden Derivate C5 und C6 den  $G_s$ -Weg kaum aktivieren kann.

Betrachtet man die Untersuchungen an der Rezeptor-Mutante, (siehe **Abb. 49**) ist zu erkennen, dass für den maximalen Effekt eine deutlich höhere Konzentration der Iperoxo-Derivate benötigt wird. Besonders stark ist dieser Wirksamkeitsverlust bei Iperoxo selbst ausgeprägt. Auffallend ist, dass die Agonisten Acetylcholin, Oxotremorin M und C1-IP-C1 auch in sehr hohen Konzentrationen an der

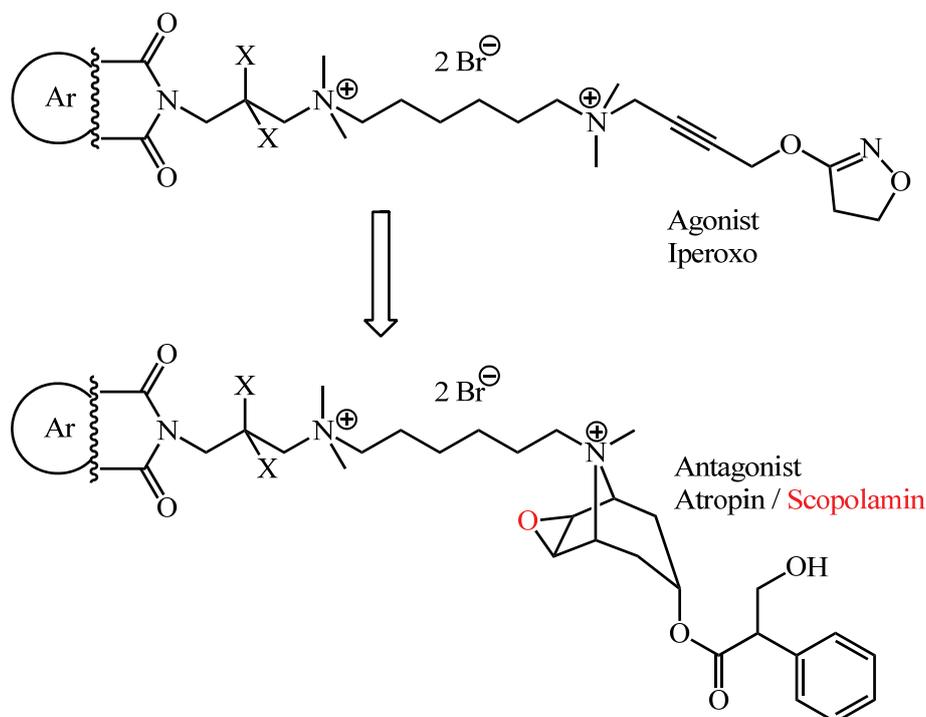
Rezeptor-Mutante keine signifikante Zellantwort auslösen. Daher wird an dieser Rezeptormutante eine höhere intrinsische Aktivität von Iperoxo und den verschiedenen Iperoxo-Derivaten ersichtlich.

### 2.3.3 Ergebnisse

Es konnten die beiden literaturbekannten Hybride Iper-6-Phth und Iper-6-Naph sowie ein neues Derivat mit verkürzter Kettenlänge Iper-4-Phth hergestellt werden. Die Synthesen der übrigen Derivate mit unterschiedlichen Kettenlängen führten nicht zum Ziel. Schließlich wurde die Iperoxo-Base mit Bromalkanen der Kettenlängen Ethyl bis Decyl alkyliert. Pharmakologische Untersuchungen zeigten einen deutlichen Wirksamkeitsverlust bezüglich der prozentualen Zellantwort im Vergleich zu Iperoxo ab einer Kettenlänge von C3, d. h. es wurden höhere Konzentrationen als bei Iperoxo benötigt um den Maximaleffekt auszulösen. Die Wirksamkeiten der Derivate mit Kettenlängen von C4 bis C10 bewegen sich in einem ähnlichen Bereich. Ferner zeigte sich eine  $G_i$ -Signalwegs-Selektivität der Derivate ab C7, da diese - im Gegensatz zu den kurzkettingen Derivaten und Iperoxo selbst - nach Stimulation mit PTX nicht in der Lage sind den  $G_s$ -Weg zu aktivieren.

## 2.4 Antagonistische Hybridverbindungen und verkürzte Derivate

Da für die agonistischen Hybride wie Iper-6-Phth und Iper-6-Naph ein dualsterer Bindungsmodus nachgewiesen werden konnte, sollte geprüft werden, ob sich dieses Konzept auch auf Antagonist-Hybride übertragen lässt. Dazu wurde der Iperoxo-Teil des Hybrids gegen die Antagonisten Atropin und Scopolamin ausgetauscht (siehe **Abb. 51**).



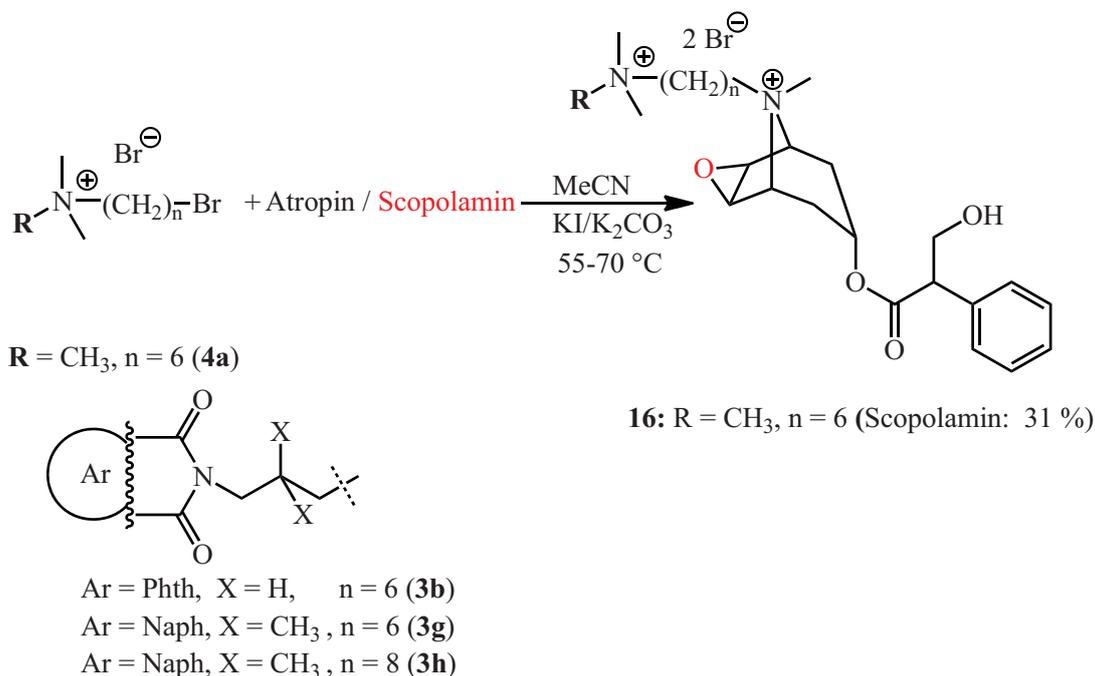
**Abb. 51:** Übertragung des Konzepts dualsterer Hybride auf Antagonisten

In diesen Fällen wird der allosterische Baustein über den Tropin-Stickstoff mit den Antagonisten verknüpft. Eine weitere Möglichkeit wäre die Kopplung über die Alkohol-Funktion. Aus diesem Grund sollte eine Synthese zur Einführung eines Spacers an der Hydroxyl-Gruppe entwickelt werden, um so den allosterischen Baustein mit dem Orthoster verknüpfen zu können.

In Analogie zu den alkylierten Iperoxo-Derivaten sollten die Antagonisten mit verschiedenen Kettenlängen alkyliert werden.

## 2.4.1 Synthese

### 2.4.1.1 Synthese von Antagonist-Hybriden



**Abb. 52:** Syntheschema zur Herstellung der Antagonist-Hybride

**Abb. 52** zeigt die Herstellung der Antagonist-Hybride. Da Scopolamin lediglich als Salz kommerziell erhältlich war, musste für die Herstellung von Scopolamin-Hybriden bzw. von verkürzten Derivaten zunächst die Base freigesetzt werden. Hierzu wurde Scopolamin-Hydrobromid in dem. Wasser gelöst und der pH-Wert der Lösung mithilfe von 1 M Natriumhydroxid-Lösung auf 11 eingestellt. Die freie Base wurde mit Dichlormethan extrahiert, die organische Phase getrocknet und das Lösungsmittel entfernt. Scopolamin wurde als weißes, hoch viskoses Öl erhalten.

Zur Synthese der Hybride aus Atropin und Scopolamin mit einem Hexyl-Spacer und Phthalimid- bzw. Naphthalimid-Rest wurde jeweils das Edukt **3b** bzw. **3g** in abs. Acetonitril gelöst, die äquimolare Menge an Atropin bzw. Scopolamin sowie eine katalytische Menge KI/K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> zugegeben und das Reaktionsgemisch im Glasbomenrohr auf 55 °C erhitzt. Der Reaktionsverlauf wurde dünn-schichtchromatographisch (Kieselgel, MeOH/NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> 3:2, Anfärbereagenz: Dragendorff) verfolgt; in

allen Fällen konnte lediglich das Edukt reisoliert werden. Es wurden verschiedene Ansatzgrößen gewählt, die von 1 bis 3 mmol des jeweiligen Alkaloids ebenso wie in den Temperaturen zwischen 55 und 70 °C variierten. In den meisten Fällen war keine Umsetzung erkennbar, in wenigen Fällen bildete sich nach mehreren Monaten Erhitzen ein Niederschlag, bei dem es sich jedoch nicht um die Zielverbindungen handelte. Es wurde weiterhin versucht, Derivate mit Butyl-Kette zu synthetisieren. Im Falle der Umsetzung von Atropin mit **3f** zeigte sich nach zwei Monaten eine Umsetzung, die Zielverbindung konnte jedoch nicht isoliert werden.

Des Weiteren wurde die Umsetzung von Atropin mit **3h** in Analogie zu den oben beschriebenen Synthesen durchgeführt. Zwar zeigte die dünnschichtchromatographische Reaktionskontrolle eine Umsetzung, die Zielverbindung war nicht entstanden, was NMR-spektroskopische Untersuchungen ergaben.

Zur Herstellung von Hexamethonium-Derivaten wurde Scopolamin-Base analog der oben beschriebenen Synthesen mit **4a** auf 55 °C erhitzt. Nach vier Tagen bildete sich ein weißer Niederschlag, der abfiltriert und mit Diethylether sowie Petrolether gewaschen wurde, um **16** in zu erhalten.

Eine analoge Umsetzung mit Atropin führte nicht zur Zielverbindung. Hier bildete sich ein gelbes Öl, das sich weder durch Waschen mit Diethylether noch durch Umkristallisationsversuche mit Ethanol und Methanol reinigen ließ. Auch ein weiterer Ansatz mit höherer Temperatur (65 °C) zeigte nicht das Hexamethonium-Derivat des Atropins.

#### 2.4.1.2 Alternative Bindung des Allosters an Atropin

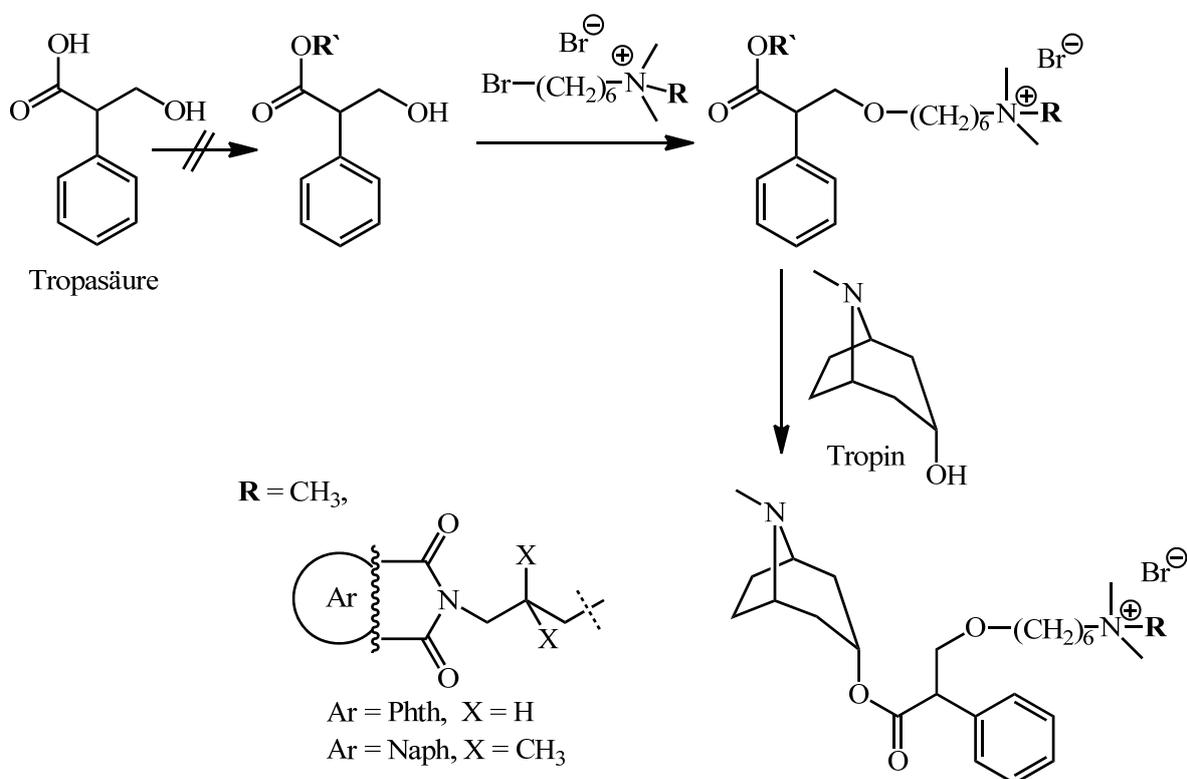
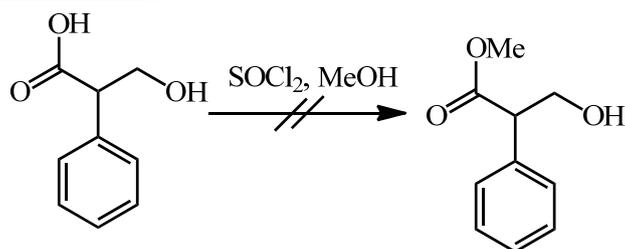


Abb. 53: Syntheschema zur Verknüpfung des Atropins mit allosteren Bausteinen über die Hydroxyl-Gruppe

Um einen Alloster nicht klassisch über den Tropin-Stickstoff des Atropins, sondern über die Alkohol-Funktion binden zu können, sollte zunächst die Säurefunktion der Tropasäure geschützt werden, was über eine Veresterung geschehen sollte. Im Anschluss sollte der Alkohol deprotoniert und mit einem allosteren Baustein umgesetzt werden. Entweder vor Umsetzung mit dem Alloster oder als letzter Schritt sollte mit Tropin eine Umesterung stattfinden, um so das Atropin-Gerüst aufzubauen. Die geplanten Reaktionsschritte sind in **Abb. 53** dargestellt.

#### Veresterung der Tropasäure

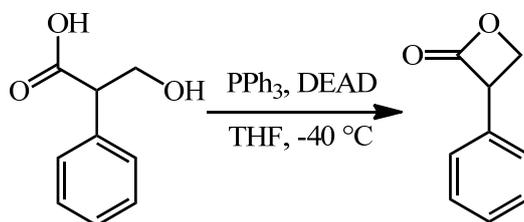
##### a) Säurekatalysierte Veresterung



**Abb. 54** Säurekatalysierte Umsetzung der Tropasäure

Zunächst muss die Säure durch Umsetzung zum Säurechlorid aktiviert werden. Zur Synthese wurde die Säure unter Schutzgasatmosphäre in abs. Methanol gelöst und langsam Thionylchlorid zugetropft. Das Reaktionsgemisch wurde 12 Stunden bei Raumtemperatur gerührt und anschließend 12 Stunden unter Rückfluss erhitzt. Nach Entfernen des Lösungsmittels wurde der Rückstand NMR-spektroskopisch charakterisiert, wobei es sich nicht um den Tropasäuremethylester handelte. Banholzer beschreibt die Aktivierung der Tropasäure mit Thionylchlorid zur Darstellung verschiedener Tropasäure-Ester, hier wird jedoch zuvor am Alkohol acetyliert.<sup>121</sup>

##### b) Mitsunobu-Veresterung der Tropasäure



**Abb. 55** Umsetzung der Tropasäure unter Mitsunobu-Bedingungen

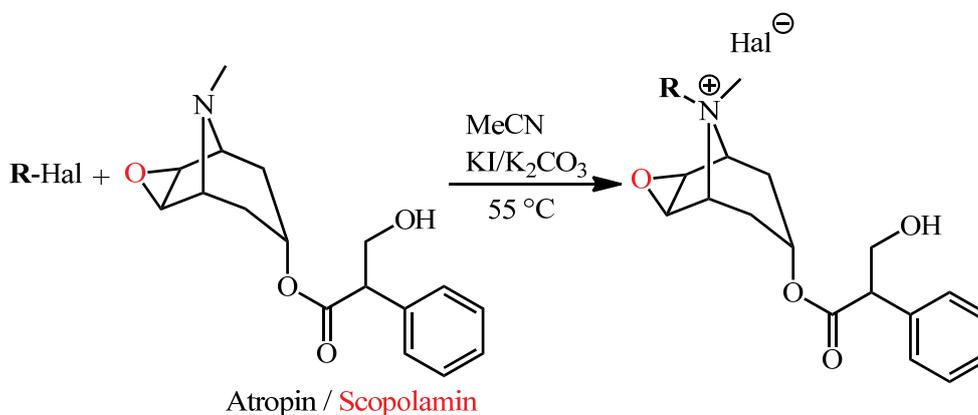
Eine zweite Strategie, die Tropasäure zu schützen, war die Umsetzung unter Mitsunobu-Bedingungen. Die Tropasäure sollte in ein  $\beta$ -Lacton überführt werden, wobei Triphenylphosphin und Diethylazodicarboxylat (DEAD) zunächst zu einem zwitterionischen Addukt reagieren, das die Carbonsäure deprotoniert. Durch nukleophilen Angriff des Alkohols und anschließender Abspaltung

eines Hydrazin-Derivats wird Triphenylphosphinoxid erhalten, das schließlich als gute Abgangsgruppe intramolekular durch die deprotonierte Carbonsäure substituiert wird.<sup>99</sup>

In Anlehnung an die Vorschrift von Ramer *et al.*<sup>122</sup> zur Herstellung von Serin- $\beta$ -Lactonen wurde Triphenylphosphin unter Schutzgasatmosphäre in abs. THF gelöst und im Kältebad (Ethanol/Trockeneis) auf  $-62\text{ }^{\circ}\text{C}$  abgekühlt. DEAD wurde tropfenweise zugegeben, wobei sich ein farbloser Niederschlag bildete, der durch Zugabe der in abs. THF gelösten Tropasäure abreagierte. Das Reaktionsgemisch wurde 30 Minuten bei  $-62\text{ }^{\circ}\text{C}$  und im Anschluss 48 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch gereinigt (Kieselgel, Hexan/Ethylacetat 6: 4) und das erhaltene Öl NMR-spektroskopisch untersucht. Es handelte sich jedoch nicht um das erwartete Lacton. Nach zwei Tagen bildeten sich Kristalle in diesem Öl, die nach Waschen mit Petrolether und Trocknen im Vakuum untersucht wurden, jedoch ebenfalls nicht das Produkt darstellten.

Da die Verknüpfung des Allosters mit Atropin über die Hydroxyl-Funktion bereits an der Funktionalisierung der Tropasäure scheiterte, konnten die übrigen Syntheseschritte nicht durchgeführt werden. In zukünftigen Arbeiten wäre die von Dimitrov beschriebene Umsetzung von Methylphenylacetat mit Paraformaldehyd zum Tropasäure-methylester denkbar.<sup>123</sup>

#### 2.4.1.3 Herstellung von verkürzten Antagonist-Hybriden



**R =** Atropin:

**17a:** Methyl (99 %)

**17b:** Ethyl<sup>124</sup>

**17c:** Propyl<sup>124</sup>

**17d:** Butyl (58 %)

**17e:** Pentyl (76 %)

**17f:** Hexyl (77 %)

**17g:** Heptyl (97 %, Lit.: 50 %<sup>125</sup>)

**17h:** Octyl (12 %)

Scopolamin:

**18a:** Methyl<sup>126</sup>

**18b:** Ethyl (71 %)

**18c:** Propyl (60 %)

**18d:** Butyl<sup>127</sup>

**18e:** Pentyl (62 %)

**18f:** Hexyl (4 %)

**18g:** Heptyl (24 %)

**18h:** Octyl (8 %)

**Abb. 56:** Syntheschema zur Herstellung verkürzter Antagonist-Derivate, wobei die synthetisierten Substanzen durch Angabe der Ausbeute gekennzeichnet sind

Im Folgenden sollten Atropin und Scopolamin analog der Iperoxo-Derivate alkyliert werden (siehe **Abb. 56**). Zwar werden alle im Folgenden aufgeführten Derivate in der Literatur erwähnt, in den meisten Fällen sind jedoch weder Synthesevorschriften noch spektroskopische Daten aufgeführt.

#### N-Methylatropin

Zur Synthese von N-Methylatropin wurde Atropin in abs. Chloroform gelöst, 2 Äquivalente Methyljodid zugegeben und die Mischung bei Raumtemperatur gerührt. Nach 2 Tagen bildete sich ein gelbes Öl in einer farblosen Lösung. Das Lösungsmittel wurde entfernt, wobei das gelbe Öl einen weißen Schaum bildete. Dieser wurde im Vakuum getrocknet und Methylatropin **17a** in 99 % Ausbeute erhalten.

#### Längerkettige N-Alkyl-Antagonisten

Die Antagonisten wurden zusammen mit einem großen Überschuss des jeweiligen 1-Bromalkans (um die Wahrscheinlichkeit des nukleophilen Angriffs zu erhöhen) und einer Spatelspitze KI/K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> in Chloroform gelöst und die Mischung im Glasbombenrohr bei 55 °C gerührt. Der Reaktionsfortschritt wurde jeweils dünnschichtchromatographisch verfolgt (Kieselgel, MeOH/NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> 3:2, Anfärbereagenz: Permanganat oder Dragendorff). Da sich jeweils zwei Phasen bildeten wurde 1 bis 5 ml abs. Acetonitril zugegeben.

##### *a) Umsetzung mit 1-Bromethan*

Atropin: Nach einer Woche war dünnschichtchromatographisch eine Umsetzung erkennbar, bei der es sich, wie sich NMR-spektroskopisch zeigte, um eine Reihe von Nebenprodukten handelte. Die Zielverbindung konnte nicht erhalten werden.

Scopolamin: Nach 4 Wochen war ein Niederschlag erkennbar, der abfiltriert und mit Diethylether gewaschen wurde. Das gebildete N-Ethylscopolamin **18b** konnte als weißer Feststoff in 71 %-iger Ausbeute isoliert werden.

##### *b) Umsetzung mit 1-Brompropan*

Atropin: Der Reaktionsansatz wurde nach zwei Wochen in eisgekühlten Diethylether getropft, wobei sich ein gelbes Öl bildete. Dieses ließ sich nicht filtrieren und auch nach mehrmaligem Waschen mit Diethylether entstand kein Feststoff. Das Lösungsmittel wurde entfernt und der Rückstand aus Acetonitril umkristallisiert. Es wurde erneut ein Öl erhalten, bei dem es sich nicht um die Zielverbindung handelte. In einem neuen Ansatz, durchgeführt bei 65 °C, war nach 27 Tagen ein leichter Niederschlag erkennbar, der jedoch bei einem Filtrationsversuch ein viskoses Öl bildete. Dieses Öl wurde in Methanol in der Hitze gelöst und versucht mit Diethylether auszufällen. Diese, sowie weitere Reinigungsversuche durch Umkristallisieren blieben erfolglos. <sup>1</sup>H-NMR-spektroskopische Untersuchungen zeigten eine Vielzahl von Nebenprodukten.

In einem weiteren Versuch wurde auf 70 °C erhitzt, zwar bildete sich hier die Zielverbindung, diese ließ sich allerdings auch durch mehrfaches Umkristallisieren nicht reinigen.

Schließlich wurde die Synthese im Druckreaktor der Mikrowelle durchgeführt. Hierzu wurde zunächst innerhalb von 4 Minuten auf 110 °C erhitzt und die Temperatur für 40 Minuten konstant gehalten. Da mittels DC-Kontrolle keine Umsetzung erkennbar war, wurde für weitere 40 Minuten auf 130 °C erhitzt. Auch hier war keine Umsetzung erkennbar. Nach 50 Minuten bei 150 °C und schließlich 60 Minuten bei 170 °C verfärbte sich die klare Lösung gelb und es bildete sich ein weißer Niederschlag, der sich jedoch aufgrund der geringen Menge nicht isolieren ließ. In einem weiteren Versuch wurde dreimal für je 50 Minuten auf 170 °C erhitzt. Auch hier entstand ein weißer Niederschlag. NMR-spektroskopische Untersuchungen zeigten, dass sich das Atropin-Gerüst gespalten hatte.

Scopolamin: Nach 34 Tagen zeigte sich eine Umsetzung ( $R_f = 0.69$ ) und es wurde portionsweise in Diethylether getropft und so lange mit Diethylether gewaschen bis N-Propylscopolamin (**18c**) als weißer Feststoff erhalten wurde.

*c) Umsetzung mit 1-Brombutan*

Im Falle der Umsetzung von Atropin mit 1-Brombutan konnte zunächst keine Umsetzung beobachtet werden. Es wurden weitere 4 Äquivalente des Bromalkans zugegeben und nach 4 Tagen bildete sich ein hoch-viskoser, öliges Niederschlag. Es wurde von der Lösung abdekantiert und der ölige Niederschlag in Chloroform erhitzt, so dass sich der ölige Bestandteil im Lösungsmittel löst und der Feststoff somit abfiltriert werden konnte. Es wurde mehrmals mit Petrolether gewaschen bis ein weißer sehr feiner Feststoff (**17d**) in 58 %-iger Ausbeute erhalten wurde.

*d) Umsetzung mit 1-Brompentan*

Atropin: Es bildete sich nach 14 Tagen ein weißes Öl, das nach Abkühlen auf Raumtemperatur fest wurde. Dieses wurde fein verrieben und mehrmals mit Diethylether gewaschen, um die Zielverbindung **17e** in 76 %-iger Ausbeute zu erhalten.

Scopolamin: Aufgrund der nach 3 Tagen detektierten Umsetzung ( $R_f = 0.69$ ) wurde das Reaktionsgemisch portionsweise in Diethylether getropft und das entstandene N-Pentylscopolamin **18e** in 62 %-iger Ausbeute als weißer, sehr hygroskopischer Feststoff abfiltriert und mit Diethylether gewaschen.

*e) Umsetzung mit 1-Bromhexan*

Atropin: In diesem Ansatz trat nach 3 Tagen eine Trübung auf, die sich bis zum fünften Tag verstärkte und schließlich abfiltriert werden konnte. Der weiße Feststoff wurde mit Diethylether gewaschen und **17f** in 77 %-iger Ausbeute erhalten.

Scopolamin: Nach 2 Tagen verfärbte sich die Lösung violett und ein orange-farbenes Öl wurde erhalten, das versucht wurde, mit Diethylether zu waschen sowie durch Umkristallisation mit Ethanol und Methanol zu reinigen. Diese Reinigungsschritte führten jedoch nicht zur Zielverbindung. In einem

erneuten Ansatz war nach 14 Tagen eine Umsetzung erkennbar ( $R_f = 0.67$ ) und die Reaktionslösung wurde portionsweise in Diethylether getropft. Der erhaltene Niederschlag wurde sofort ölig. Dieses Öl wurde in Methanol gelöst und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde mit Dichlormethan versetzt und das Lösungsmittel möglichst schnell im Vakuum entfernt, bis sich ein weißer Schaum bildete. Dieser wurde 4 Stunden im Vakuum getrocknet und N-Hexylscopolamin **18f** konnte als sehr hygroskopischer Schaum in 4 %-iger Ausbeute erhalten werden.

*f) Umsetzung mit 1-Bromheptan*

Atropin: Die nach zwei Tagen auftretende Trübung des Reaktionsgemisches verstärkte sich noch bis zum vierten Tag. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur bildeten sich zwei Phasen. Es wurde eisgekühlter Diethylether zugetropft bis ein weißer flockiger Niederschlag entstand. Da dieser jedoch eine ölige Konsistenz annahm, wurde so lange abfiltriert und mit Diethylether gewaschen bis sich ein weißer, amorpher Feststoff bildete und **17g** konnte in 97 %-iger Ausbeute erhalten werden.

Scopolamin: Nach 2 Wochen zeigte sich eine Ölbildung. Aus diesem Öl konnte weder durch Waschen mit Diethylether noch durch Umkristallisieren mit Ethanol oder Methanol die Zielverbindung isoliert werden. In einem weiteren Ansatz mit frisch hergestellter freier Scopolamin-Base war nach 15 Tagen eine Umsetzung erkennbar ( $R_f = 0.67$ ). Nun wurde portionsweise in Diethylether getropft, wobei sich ein öliges Niederschlag bildete. Dieser wurde in Methanol in der Hitze gelöst und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Schließlich wurde Dichlormethan zugegeben, die Lösung erwärmt und erneut das Lösungsmittel im Vakuum entfernt bis sich ein weißer Schaum bildete. Dieser wurde 4 Stunden im Vakuum getrocknet und N-Heptyl-Scopolamin **18g** wurde als stark hygroskopischer Schaum in 24 %-iger Ausbeute erhalten.

*g) Umsetzung mit 1-Bromoctan*

Atropin: der nach 5 Tagen gebildete Niederschlag wurde abfiltriert und so lange mit Diethylether gewaschen bis sich ein weißer amorpher Feststoff bildete. **17h** wurde so in 12 %-iger Ausbeute erhalten.

Scopolamin: Nach 34 Tagen war eine Umsetzung erkennbar ( $R_f = 0.67$ ) und die Lösung wurde portionsweise in Diethylether getropft. Erneut bildete sich ein Öl, das in Methanol aufgenommen und nach Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum in der Hitze mit Dichlormethan versetzt wurde. Nach Entfernen des Dichlormethans im Vakuum bildete sich ein weißer Schaum, der das stark hygroskopische N-Octyl-Scopolamin **18h** in 8 %-iger Ausbeute darstellte.

*h) Umsetzung mit 1,6-Dibromhexan*

Scopolamin-Base wurde in abs. Acetonitril gelöst und mit der zehnfachen Menge an 1,6-Dibromhexan versetzt. Nach Zugabe einer katalytischen Menge KI/K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> wurde im Glasbombenrohr auf 55 °C erhitzt. Im Falle dieser Reaktion war keine Umsetzung erkennbar.

## 2.4.2 NMR-Diskussion

Seit langem ist bekannt, dass Tropin-Alkaloide eine Inversion der Konfiguration am Stickstoffatom durchlaufen. 1959 ist es Closs gelungen, mithilfe von  $^1\text{H-NMR}$  Untersuchungen in saurer Deuteriumoxid-Lösung, bei tiefen Temperaturen zwei Diastereomere des Tropin-Hydrochlorids zu charakterisieren. Dabei zeigte sich eine Präferenz der äquatorialen Stellung der Methylgruppe am Stickstoffatom gegenüber der axialen Stellung in einem Verhältnis von 16:1.<sup>128</sup> Ähnliche Verhältnisse gelten für verschieden substituierte Tropin-Derivate wie Atropin. Im Scopolamin ist die Stellung der Methylgruppe vorwiegend axial, was auf die abstoßende und raumfordernde Wirkung der Epoxid-Gruppe zurückzuführen ist.<sup>129</sup> Man sollte annehmen, dass aus diesen unterschiedlichen räumlichen Anordnungen der nukleophile Angriff von Atropin durch Umsetzung mit einem Bromalkan in axialer und von Scopolamin in äquatorialer Richtung erfolgt. Dies würde bedeuten, dass in den alkylierten Produkten die Methylgruppe der Atropin-Derivate nach wie vor äquatorial und der größere Alkylrest axial steht und sich die Scopolamin-Derivate umgekehrt verhalten. Da es für die räumliche Anordnung eines Liganden in der Bindungstasche wichtig ist zu wissen, welche Stereochemie der Ligand aufweist, wurden die oben beschriebenen Derivate hinsichtlich der räumlichen Anordnung der Methyl- bzw. Alkylgruppe am Tropin-Stickstoffatom untersucht. Hierzu wurden die Verbindungen zunächst NMR-spektroskopisch untersucht, die Signale den jeweiligen Protonen zugeordnet und schließlich mithilfe von NOESY-Experimenten untersucht. **Abb. 57** zeigt exemplarisch zwei  $^1\text{H-NMR}$ -Spektren von N-Hexyl-Atropin **17f** und N-Propyl-Scopolamin **18c**, gemessen in deuteriertem DMSO. Die hier beschriebenen Charakteristika gelten ebenso für die übrigen Derivate, mit Ausnahme des Scopolamin-Hexamethonium-Derivats **16**, bei dem keine eindeutige Zuordnung der Stellung der Methylgruppe möglich war. Zu erkennen ist zum einen das Signal im Bereich zwischen  $\delta = 3.00$  bis  $3.50$  ppm, das mit seinem Kopplungsmuster charakteristisch ist für eine Methylengruppe, die sich in direkter Nachbarschaft zu einem quartären Stickstoff-Atom befindet. Zum anderen zeigt sich in beiden Derivaten die Aufspaltung der axialen bzw. äquatorialen Protonen an C-2 und C-4. Die äquatorialen Protonen findet man bei  $\delta = 1.65$ -  $1.70$  und  $1.79$ - $1.81$  ppm (**17f**) bzw. bei  $\delta = 1.77$  und  $1.92$  ppm (**18c**), die axialen Protonen sind nahe des Lösungsmittel-Signals bei  $\delta = 2.53$ - $2.58$  ppm (**17d**) bzw. bei  $\delta = 2.58$ - $2.67$  (**18c**) ppm zu finden. Die relative Lage der axialen und äquatorialen Protonen entspricht den von Chazin *et al.* publizierten Daten.<sup>130</sup> Im Falle der Atropin-Derivate zeigen sich sowohl für axiale wie auch äquatoriale Protonen an C2 und C4 Multipletts, die äquatorialen Protonen in Scopolamin-Derivaten hingegen zeigen eine klar erkennbare Aufspaltung mit einer geminalen Kopplungskonstante im Bereich von 17 Hz. Die Protonen an C6 und C7 lassen sich im Atropin-Derivat **17f** als zwei Multipletts bei  $\delta = 1.84$ - $1.87$  und  $2.07$ - $2.21$  ppm identifizieren. In Scopolamin-Derivaten sind diese durch den Einfluss des Epoxids tieffeldverschoben und als Multiplett bei  $\delta = 3.76$ - $3.80$  ppm zu finden.

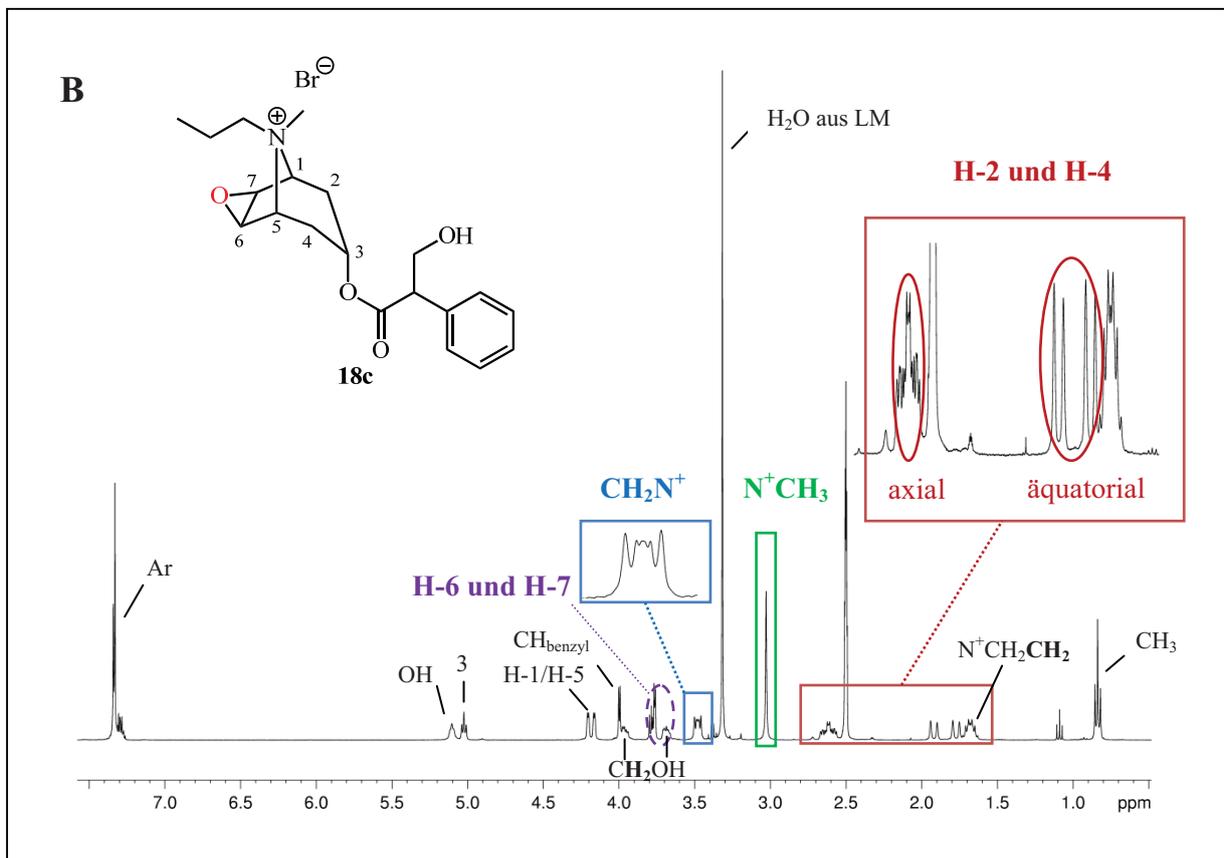
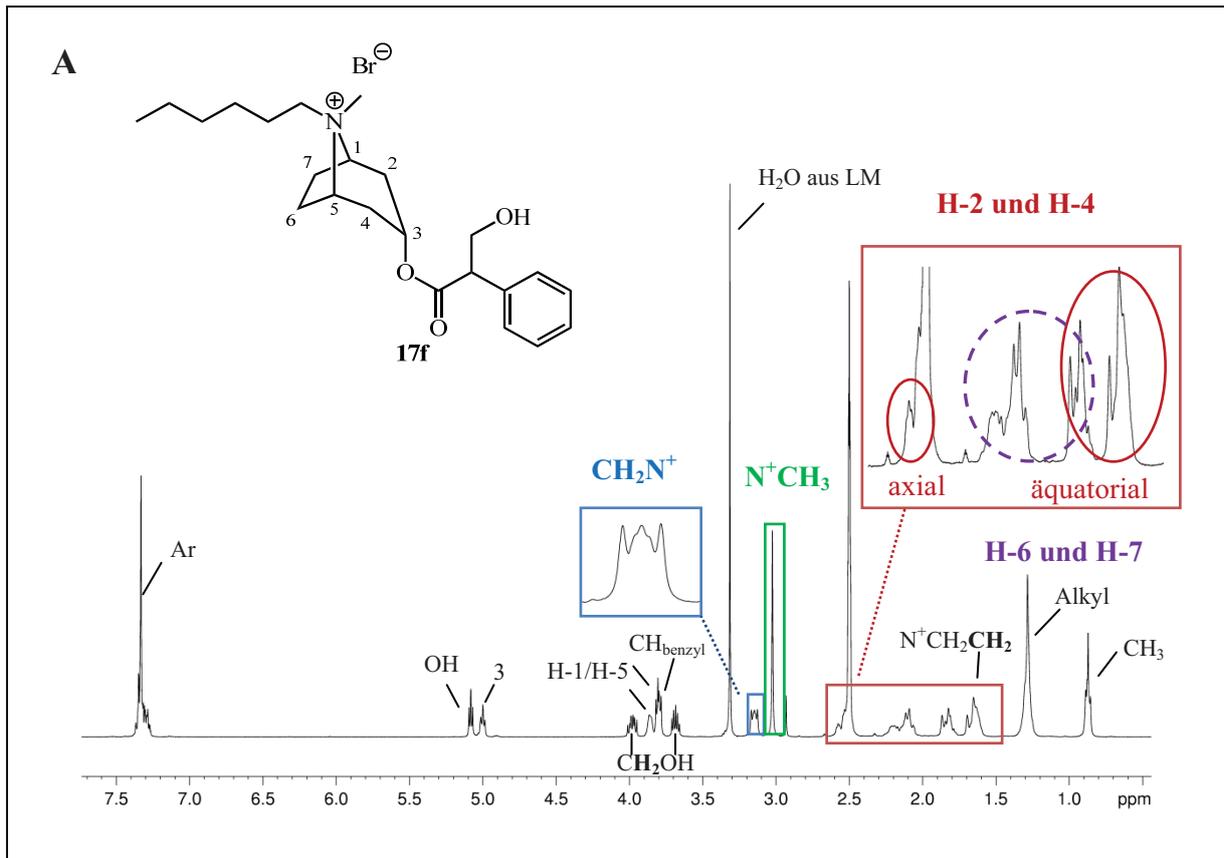


Abb. 57:  $^1\text{H}$ -NMR-Spektren von N-Hexylatropin **17f** und N-Propylscopolamin **18c**

Um die Position der Alkylreste feststellen zu können, wurde sich des Kern-Overhauser-Effekts (nuclear overhauser effect, kurz NOE-Effekt) bedient, welcher Erkenntnisse über die räumliche Nähe zweier Protonen liefert. Hierbei kommt es durch Einstrahlen in den Frequenzbereich eines Kerns zu einer veränderten, zumeist verstärkten Relaxation räumlich benachbarter Protonen.<sup>131</sup> In **Abb. 58** sind die NOE-Spektren der beiden Derivate dargestellt. In beiden Fällen lässt sich ein deutlicher NOE-Effekt zwischen der Methylgruppe im Bereich von 3 ppm und den axialen Protonen H2 und H4 erkennen. Kreuzsignale zu den entsprechenden äquatorialen Signalen treten nicht auf. Dieses Wechselwirkungsmuster widerlegt die These des nukleophilen Angriffs von Atropin und Scopolamin aus der jeweils anderen Konformation. Zwar liegen Atropin und Scopolamin in unterschiedlichen Konformationen vor, durch die in Lösung mögliche Inversion am Stickstoffatom reagiert aber offensichtlich jeweils das Konformer, das die Methylgruppe in axialer Stellung beherbergt. Diese Tatsache könnte eine mögliche Erklärung dafür sein, dass die Umsetzungen mit Scopolamin meist schneller und zielführender ablaufen als die Reaktionen mit Atropin, da in Scopolamin ein größerer Anteil an den Konformeren mit axialer Methylgruppe vorliegt und somit möglicherweise die Reaktion beschleunigt. Die sterische Hinderung der Epoxid-Gruppe in Scopolamin scheint auf den nukleophilen Angriff an Bromalkanen keinen Einfluss zu haben. Denkbar wäre darüber hinaus ein NOE-Effekt im Atropin-Derivat zwischen der Methylengruppe in direkter Nachbarschaft zum quartären N-Zentrum und den axialen Protonen H6 und H7. Dieses lässt sich jedoch nicht erkennen.

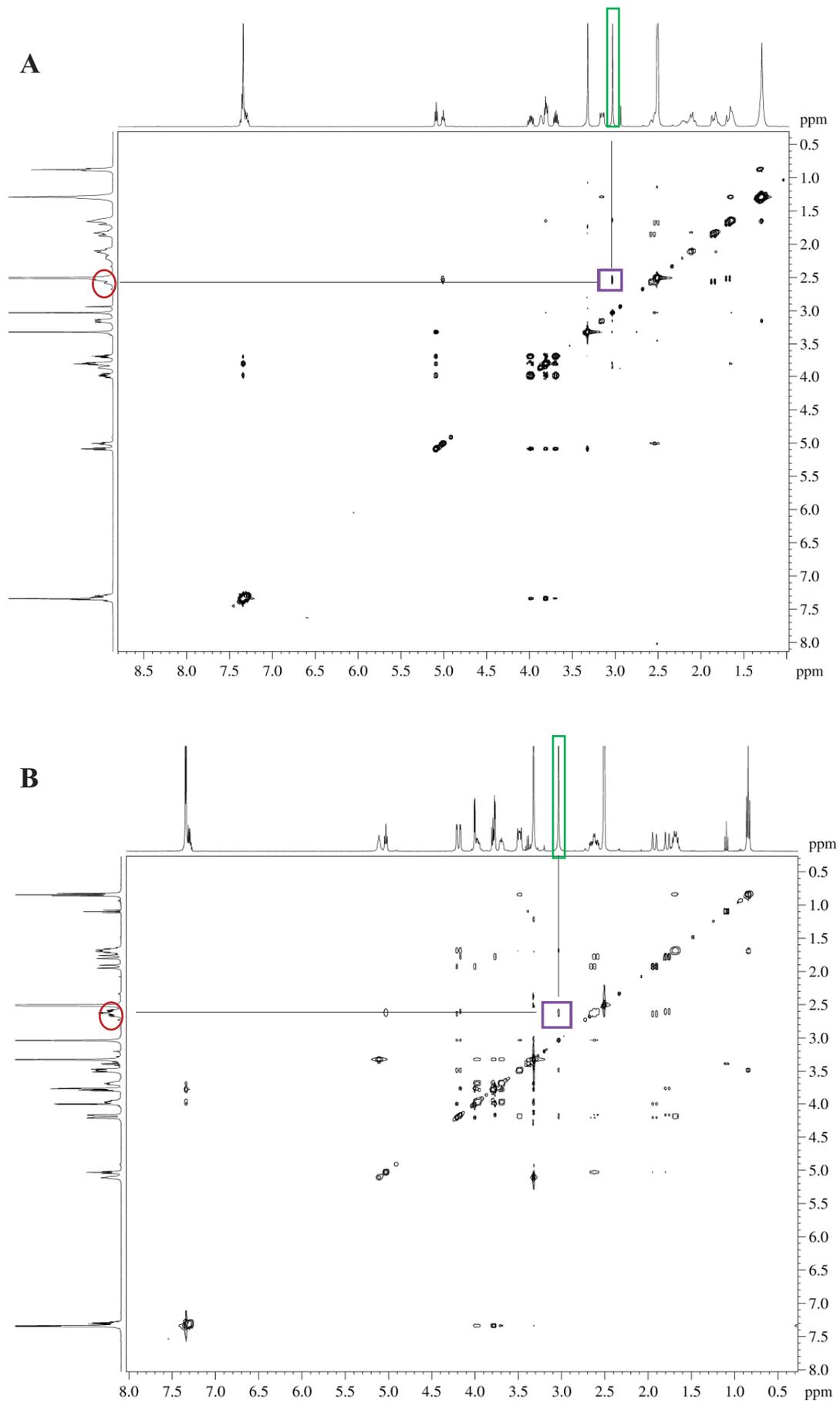
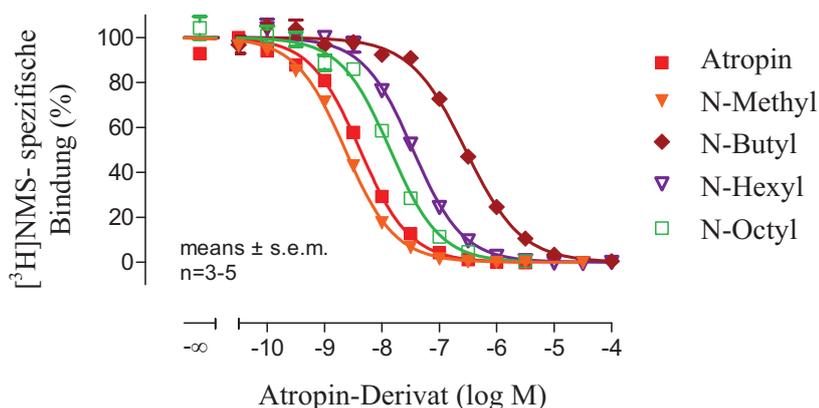


Abb. 58: NOE-Spektren des N-Hexylatropin **17f** (A) und des N-Propylscopolamins **18c** (B)

### 2.4.3 Pharmakologische Untersuchungen

#### 2.4.3.1 Theoretische Grundlagen des Testsystems

Die im Folgenden beschriebenen Untersuchungen wurden mithilfe von Radioligand-Bindungsstudien erhalten. Die theoretischen Grundlagen sowie die Durchführung wurden in **Kapitel 2.3.2.1** erläutert und ebenfalls am Institut für Pharmakologie der Universität Bonn durchgeführt..



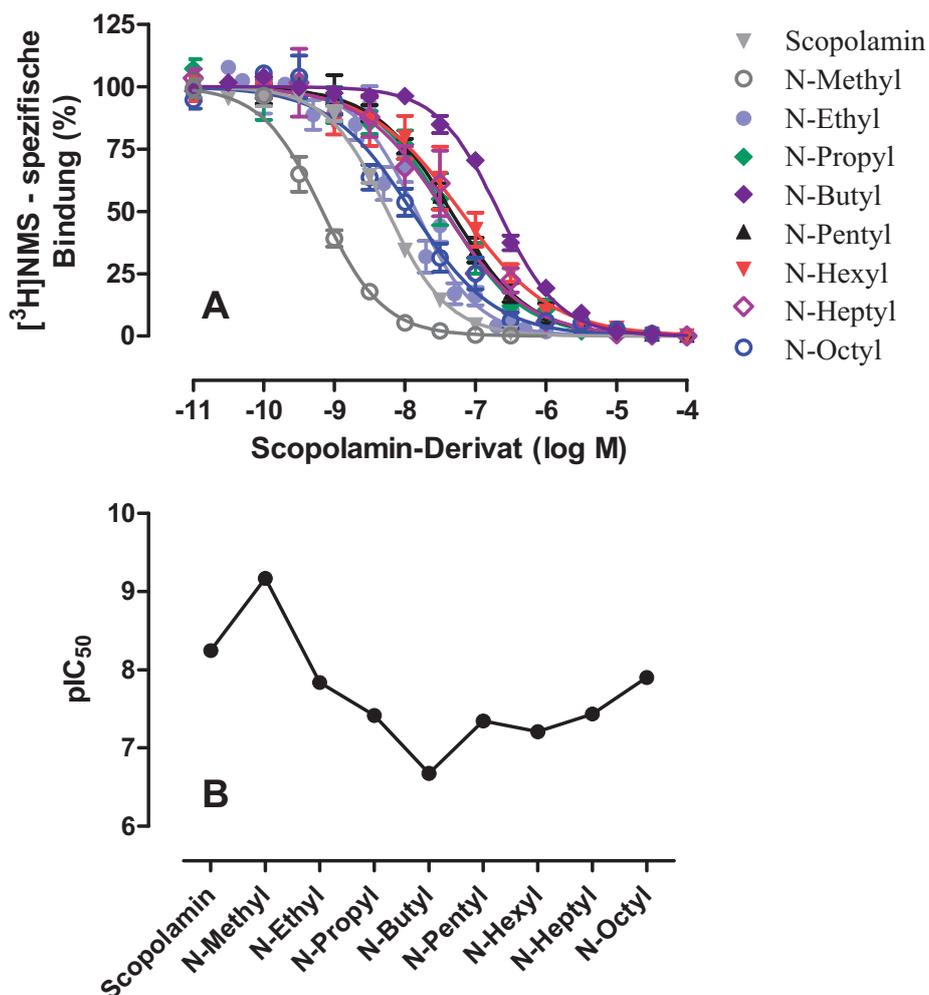
**Abb. 59:** Inhibition der [<sup>3</sup>H]NMS-Gleichgewichtsbindung durch unterschiedlich N-substituierte Atropin-Derivate im Vergleich zu Atropin an hM<sub>2</sub>-Rezeptoren.

Man erkennt eine leichte Zunahme der Affinität von Atropin zum N-methylierten Derivat. Dieser Affinitätsanstieg ist möglicherweise auf die durch Alkylierung generierte positive Ladung am Stickstoffatom zurückzuführen. Somit kann der Antagonist in analoger Weise wie der endogene Ligand Acetylcholin an die orthostere Bindungsstelle binden. Nach starker Abnahme der Affinität im Übergang zum N-Butylatropin erfolgt durch Verlängerung der Alkylkette eine Affinitätssteigerung.

Analog dazu verhalten sich die N-alkylierten Scopolamin-Derivate, deren Konzentrations-Wirkungskurven in **Abb. 60 A** dargestellt sind. Auch hier zeigt sich zunächst eine deutliche Zunahme der Affinität von Scopolamin zum N-methylierten Derivat. Durch kontinuierliche Verlängerung der Alkylkette kommt es zu einer Abnahme der Affinität. Diese findet mit N-Butyl-Scopolamin ihr Minimum und die Derivate Pentyl bis Octyl zeigen erneut einen Affinitätsanstieg.

Der initiale Verlust an Affinität ist auf die zunehmende sterische Hinderung durch die Alkylkette zurückzuführen. Der folgende Anstieg der Affinität deutet auf eine Wechselwirkung der längeren Alkylkette mit einer weiteren (allosteren) Bindungsstelle hin.

Die Ergebnisse der Scopolamin-Derivate sind in **Abb. 60 B** durch die Auftragung der pIC<sub>50</sub>-Werte (negative dekadische Logarithmen der Konzentration des Liganden, die eine halbmaximale Inhibition der [<sup>3</sup>H]NMS-Bindung verursachen) veranschaulicht.



**Abb. 60 A:** Inhibition der  $[^3\text{H}]$ NMS-Gleichgewichtsbindung durch unterschiedlich N-substituierte Scopolamin-Derivate im Vergleich zu Scopolamin an  $\text{hM}_2$ -Rezeptoren. **B:** Dargestellt sind  $\text{M.W} \pm \text{S.E.M.}$  aus 3-5 unabhängigen Experimenten, die als Dreifachbestimmungen ausgeführt wurden.

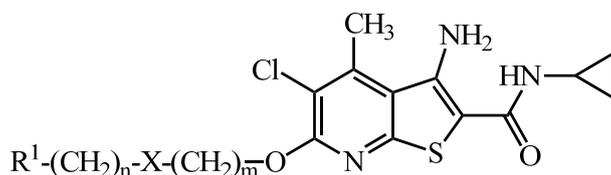
#### 2.4.4 Ergebnisse

In Anlehnung an die alkylierten Iperoxo-Derivate wurden auch Atropin und Scopolamin alkyliert. Es konnte eine Affinitätssteigerung durch die methylierten Atropin- und Scopolamin-Derivate im Vergleich zu den Antagonisten selbst beobachtet werden, was auf die generierte positive Ladung zurückzuführen ist. Durch Verlängerung der Kette kam es zunächst zu einem Affinitätsverlust und ab einer Kettenlänge von C5 schließlich zu einem Affinitätsanstieg, was auf die Wechselwirkung des Alkylrestes mit einer allosteren Bindungsstelle hindeutet. Interessant wäre in Zukunft noch die Aufklärung der Stereochemie der N-Alkyl-Derivate durch Kristallstrukturen, was bisher allerdings an der schlechten Kristallisation der Substanzen scheiterte.

Ein weiteres Projekt beschäftigte sich mit der Verknüpfung eines allosteren Bausteins nicht über den Tropin-Stickstoff, sondern über die Alkoholgruppe. Dies scheiterte bereits an der Einführung einer Schutzgruppe in der Tropasäure. Hier wären in Zukunft noch weitere Versuche durch Modifikation

der Reaktionsbedingungen denkbar. Darüber hinaus ist der Tropasäuremethylester kommerziell erhältlich, wenngleich nicht kostengünstig. So könnte mit diesem zunächst untersucht werden, ob die Reaktion durchführbar ist, bzw. ob die Verknüpfung des Allosters über den Alkohol zu einer gesteigerten Affinität führt.

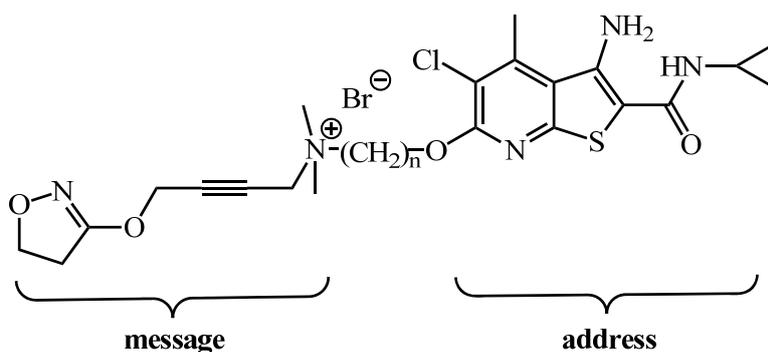
## 2.5 Dualstere Hybridverbindungen für den M<sub>4</sub>-Rezeptor



**Abb. 61:** Allgemeine Strukturformel der Thienopyridine

Das in **Abb. 61** dargestellte Grundgerüst der Thienopyridine wird von Esteban *et al.* als allosterer Potentiator der Achetylcholin-Wirkung am M<sub>4</sub>-Rezeptor beschrieben. Da der M<sub>4</sub>-Rezeptor an vielen physiologischen Vorgängen im Gehirn beteiligt ist, stellen Verbindungen, die die Wirkung an diesem Rezeptor selektiv verstärken eine interessante Zielstruktur dar. Als Beispiele derartiger Anwendungen werden Psychosen, kognitive- sowie Aufmerksamkeits-Störungen und Schmerzen genannt.<sup>132</sup>

Ausgehend von der Substanzklasse der Thienopyridine sollten in Analogie zu den dualsteren Verbindungen für den M<sub>2</sub>-Rezeptor Hybridsubstanzen synthetisiert werden. Gemäß des „message-address-Konzepts“ nach Schwyzer spiegelt Iperoxo hier erneut die Nachricht (message), der allosterische Modulator Thienopyridin die Adresse wider (siehe **Abb. 62**).



**Abb. 62:** Strukturformel des Hybrids aus Iperoxo und Thienopyridin

### 2.5.1 Synthese

In Anlehnung an Esteban *et al.*<sup>132</sup> sollte zunächst das Thienopyridin-Grundgerüst aufgebaut und im Anschluss über einen Spacer mit dem Agonisten Iperoxo gekoppelt werden. Der Aufbau des Grundkörpers besteht aus zwei unabhängigen Syntheserouten, deren Produkte N-Cyclopropyl-2-mercaptoacetamid (**21**) und 2,5,6-Trichlor-4-methylnicotinnitril (**23**) schließlich verknüpft werden. **Abb. 63** zeigt eine Übersicht über die Synthese.

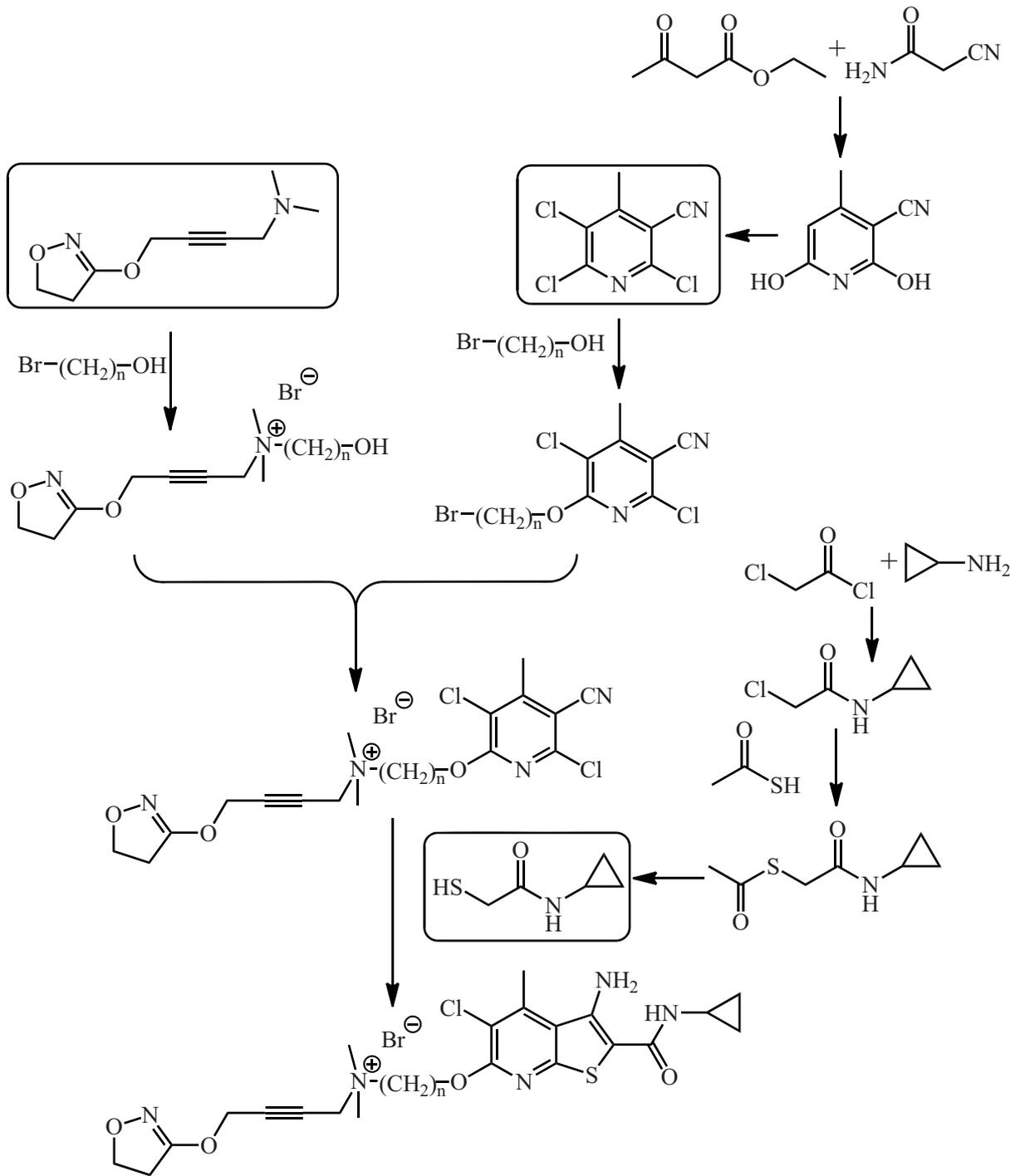


Abb. 63: Syntheschema zur Herstellung von Thienopyridin-Iperoxo-Hybriden

## 2.5.1.1 Synthese von N-Cyclopropyl-2-mercaptoacetamid

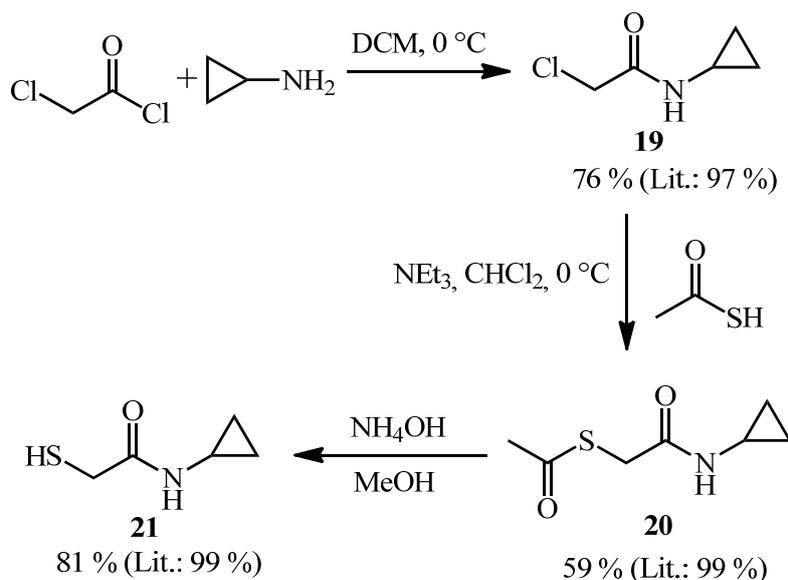


Abb. 64: Syntheschema zur Herstellung des N-Cyclopropyl-2-mercaptoacetamid

Zur Synthese des N-Cyclopropyl-2-mercaptoacetamid **21** wurde zu Beginn in Analogie zu Esteban *et al.*<sup>132</sup> Chloroacetylchlorid mit Cyclopropylamin bei 0 °C versetzt. Das erhaltene Amid **19** wurde wiederum bei 0 °C mit Thioessigsäure und Triethylamin zu S-(2-(Cyclopropylamin)-2-oxoethyl)-ethanthioat **20** umgesetzt. Hierbei wurde zunächst das Thiol deprotoniert, das nun das Chlorid im 2-Chlor-N-cyclopropylacetamid über eine S<sub>N</sub>2-Reaktion substituieren kann. Im letzten Schritt wurde der Thioester mit Ammoniumhydroxid verseift und das N-Cyclopropyl-2-mercaptoacetamid **21** erhalten (siehe Abb. 64).<sup>132</sup> Die Synthesen verliefen ohne Probleme, die von Esteban *et al.* beschriebenen Ausbeuten konnten jedoch in keiner Stufe erreicht werden.

## 2.5.1.2 Synthese von 2,5,6-Trichlor-4-methylnicotinnitril

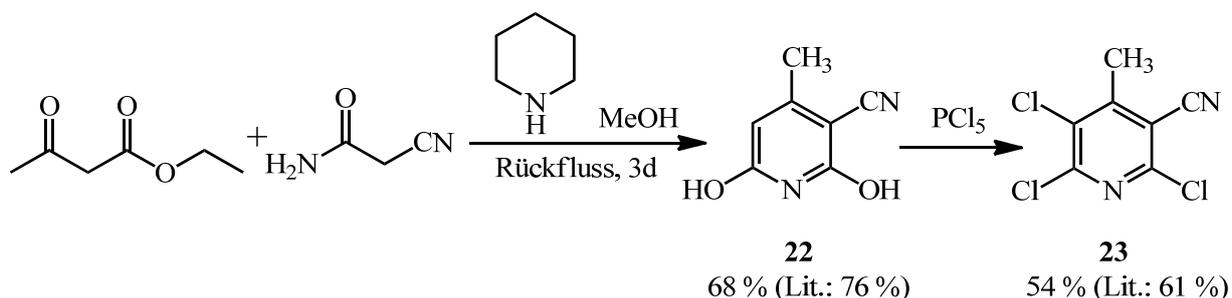
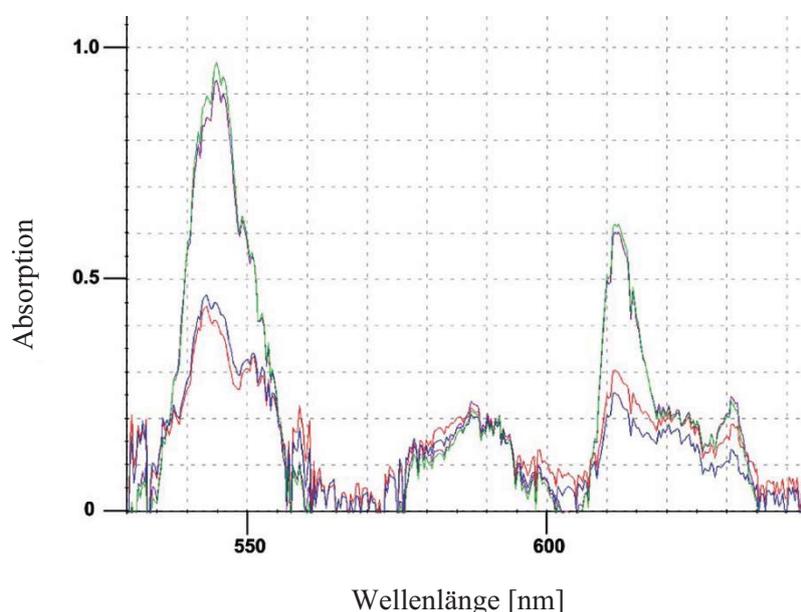


Abb. 65: Herstellung des 2,5,6-Trichlor-4-methylnicotinnitrils

Die Synthese des 2,6-Dihydroxy-4-methylnicotinnitrils **22** wurde in Anlehnung an die allgemeine Vorschrift zur Herstellung von 3-Cyano-2,4-dihydroxy-4-alkylpyridinen nach Lounasmaa *et al.*<sup>133</sup> durchgeführt. Hierbei wurde Ethylacetoacetat mit Cyanoacetamid und Piperidin umgesetzt. Nach 1-3 Tagen Erhitzen unter Rückfluss und Abkühlen auf Raumtemperatur wurde der erhaltene Feststoff mit

Methanol gewaschen, in heißem Wasser gelöst und mit Salzsäure gefällt. Die Ausbeuten an **22** variierten zwischen 40 bis 68 %. Auch die in der Literatur beschriebenen Synthesen variierten stark in Reaktionsdauer und Ausbeute (0.5 h/18 %<sup>134</sup>, 6h/65 %<sup>135</sup>, 8h/65 %<sup>136</sup>). Aus diesem Grund wurde die Reaktion analog zur klassischen thermischen Umsetzung mikrowellenunterstützt durchgeführt. Es wurde innerhalb von 3 Minuten auf 100 °C erhitzt und die Temperatur konstant gehalten. Der Reaktionsfortschritt wurde mittels eines UV/Vis-Sensors in Echtzeit kontrolliert. In **Abb. 66** sind die übereinander gelegten Absorptionsspektren der Reaktionslösung dieser Umsetzung dargestellt. Zu erkennen ist zunächst ein deutlicher Anstieg der Absorption in den Bereichen von 550 sowie 620 nm, was auf die Bildung des aromatischen Systems zurückzuführen ist. Weiterhin zeigt sich, dass nach 5 Minuten keine weitere Veränderung detektierbar, d.h. die Reaktion abgeschlossen ist. Das Produkt **22** konnte nach Aufarbeitung in 68 % Ausbeute isoliert werden.



**Abb. 66:** Absorptionsspektren der Reaktionslösung für die Synthese von **22**: 0 Min (rot), 3 Min (blau), 5 Min (violett) und 10 Min (grün)

Die weitere Umsetzung zu 2,5,6-Trichlor-4-methylnicotinnitril **23** wurde ebenfalls in Anlehnung an Lounasama *et al.* durchgeführt.<sup>133</sup> 2,6-Dihydroxy-4-methylnicotinnitril **22** wurde mit einem 3.7-fachen Überschuss an Phosphorpentachlorid verrieben und 24 h auf 160 °C erhitzt, wobei sich ab 140 °C eine braune Schmelze bildete. Das abgekühlte Reaktionsgemisch wurde vorsichtig auf Eis geschüttet und mit Dichlormethan extrahiert. Das erhaltene braune Öl wurde mittels Säulenchromatographie gereinigt (Kieselgel, Methanol), wobei ein gelber Feststoff in einem braunen Öl erhalten wurde. Nach Zugabe weniger Milliliter Methanol löste sich das Öl und der gelbe Feststoff konnte abfiltriert und getrocknet werden.

### 2.5.1.3 Versuche zur Einführung eines Spacers

Um Iperoxo an Thienopyridin koppeln zu können, sollte bereits im 2,5,6-Trichlor-4-methylnicotinnitril **23** ein Spacer eingeführt werden.

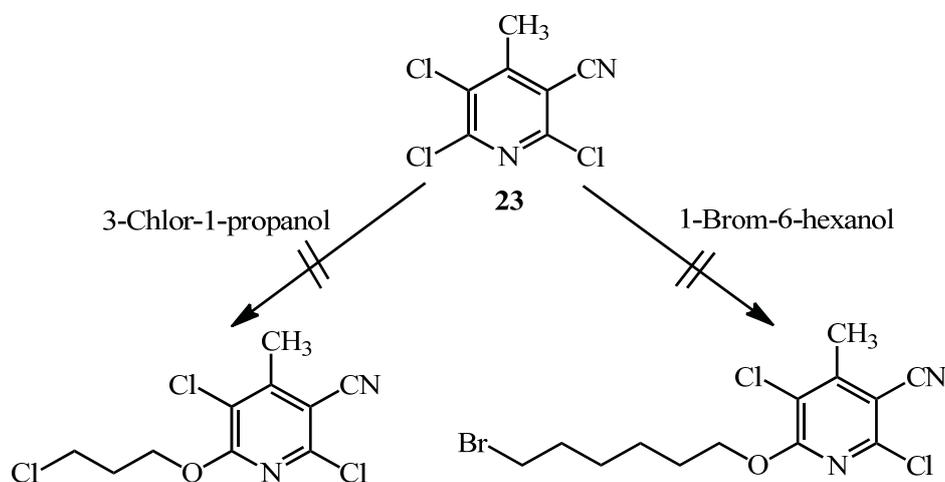


Abb. 67: Syntheschema zur Einführung eines Spacers

Zunächst wurde 3-Chlor-1-propanol auf 0 °C abgekühlt und langsam Natriumhydrid, das vorher mit *n*-Pentan gewaschen wurde, zugegeben. Bei Raumtemperatur wurde 2,5,6-Trichlor-4-methylnicotinnitril zugegeben und die Mischung 2 Tage unter Rückfluss erhitzt. Der entstandene weiße Farbstoff wurde abfiltriert und mit Petrolether gewaschen. <sup>1</sup>H-NMR-spektroskopische Untersuchungen zeigten jedoch, dass es sich hierbei um eine Reihe von Nebenprodukten handelte.

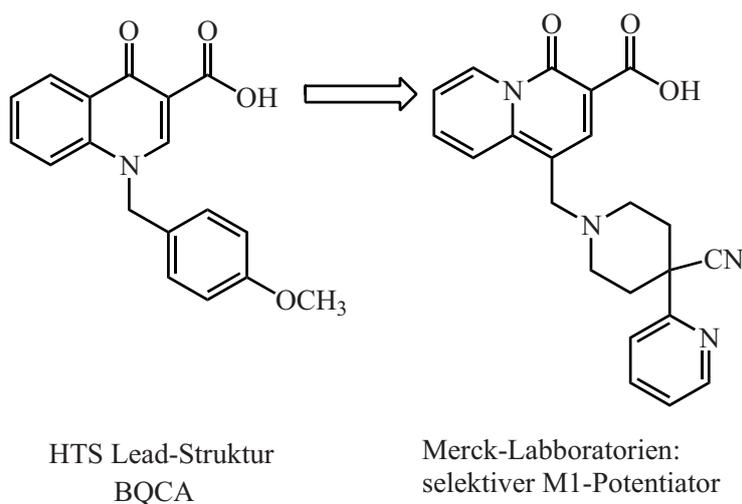
Parallel dazu wurde eine analoge Reaktion mit 1-Brom-6-hexanol durchgeführt. Hier musste zusätzlich abs. THF zugegeben werden, um eine homogene Durchmischung zu gewährleisten. Durch Zugabe des 2,5,6-Trichlor-4-methylnicotinnitrils (**23**) trat eine Rotfärbung auf. Nach 24 h Rühren wurde auf Raumtemperatur abgekühlt. Da kein Niederschlag entstanden war, wurde die Mischung auf Wasser geschüttet und mit Ethylacetat extrahiert. Die organischen Phasen wurden mit Kochsalzlösung gewaschen und das Lösungsmittel entfernt. Die Analyse des entstandenen braunen Öls zeigte eine Vielzahl von Verunreinigungen, die sich auch mittels Säulenchromatographie nicht trennen ließen.

## 2.5.2 Ergebnisse

Es konnten einige Vorstufen des Thienopyridin-Grundgerüsts hergestellt werden, wobei ein Syntheseschritt durch die Verwendung eines UV/Vis-Sensors im Hinblick auf Reaktionsdauer deutlich verbessert werden konnte. Da es nicht gelang einen Spacer einzuführen, konnte die Verknüpfung zum Thienopyridin sowie die anschließende Kopplung mit Iperoxo nicht durchgeführt werden. Somit war es nicht möglich, pharmakologische Untersuchungen durchzuführen.

## 2.6 Dualstere Hybridverbindungen für den M<sub>1</sub>-Rezeptor

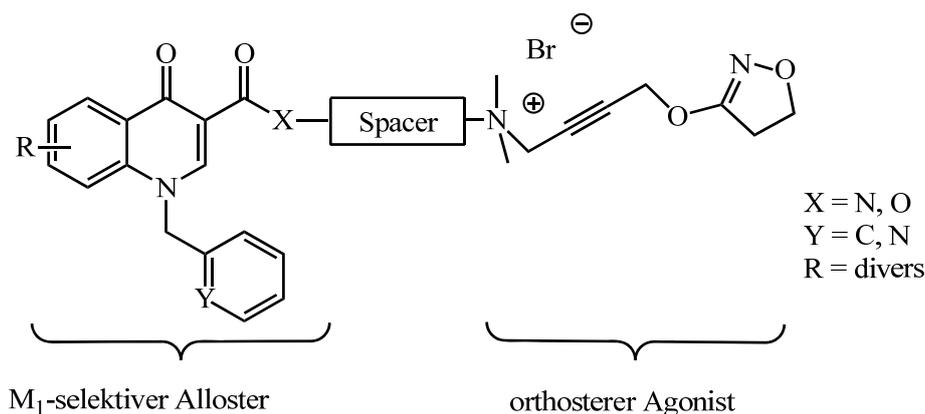
Zusätzlich zum enormen Leidensdruck für Betroffene und Angehörige stellt die Alzheimer-Krankheit auch einen beträchtlichen finanziellen Faktor für das Gesundheitswesen dar. Neben der Amyloid-Kaskade wird die  $\tau$ -Protein-Hyperphosphorylierungs-Hypothese als Ursache von Morbus Alzheimer vermutet.<sup>32,137</sup> Ein weiterer Befund zeigte, dass die Zahl der M<sub>1</sub>-Rezeptoren, die in Neuronen im Cortex wie auch im Hippocampus vorkommen bei Alzheimer-Patienten stark reduziert ist.<sup>25,138</sup> Aus dieser Erkenntnis entstand das Interesse an ACh-Esterase-Inhibitoren für die Behandlung der Alzheimer-Krankheit, da diese die Menge des Neurotransmitters ACh im synaptischen Spalt erhöhen. Der Einsatz dieser ACh-Esterase-Hemmer ist bis *dato* das Mittel der Wahl zur symptomatischen Behandlung dieser Krankheit.<sup>139,140</sup> Jedoch können durch gezielte Aktivierung des M<sub>1</sub>-Rezeptors kognitive Fähigkeiten moduliert werden. Interessanterweise ist auch bei Schizophrenie-Patienten die Expression der M<sub>1</sub>-Rezeptoren stark verringert.<sup>141</sup> Auf Basis dieser Erkenntnisse entwickelte sich der M<sub>1</sub>-Rezeptor zu einem interessanten Target für die Behandlung von Morbus Alzheimer wie auch der Schizophrenie und anderen psychotischen Erkrankungen. Erste Agonisten für den M<sub>1</sub>-Rezeptor zeigten zwar die gewünschte Verbesserung kognitiver Fähigkeiten, doch aufgrund der unselektiven Aktivierung ging diese mit starken Nebenwirkungen wie Übelkeit, Erbrechen und Diarrhö einher.<sup>32,142</sup> Aus diesem Grund wurde das Hauptaugenmerk auf allosterische Modulatoren gelegt, mit deren Hilfe ein orthosterer Agonist moduliert werden kann, und die im Gegensatz zu diesen eine eindeutige Präferenz für den M<sub>1</sub>-Rezeptor aufweisen und somit möglicherweise Nebenwirkungen minimieren. Ein erster allosterer Agonist ist AC-42. Ein weiterer Vertreter ist das von den Merck-Laboratorien entwickelte BQCA (1-(4-Methoxybenzyl)-4-oxo-1,4-dihydroquinoline-3-carboxylic acid), ein Chinolon-Derivat (siehe **Abb. 68**).



**Abb. 68:** Leitstruktur aus dem M<sub>1</sub>-PAM-HTS Screening von BQCA und dem selektiven M<sub>1</sub>-Potentiator der Merck Forschungs-Laboratorien<sup>143,144</sup>

Neben seiner ausgeprägten Subtypselektivität aktiviert es den  $M_1$ -Rezeptor im Vergleich zu Acetylcholin um den Faktor 130.<sup>143,144</sup> Radioligand-Bindungsstudien, Molecular Modeling sowie zielgerichtete Mutagenese-Studien deuteten darauf hin, dass diese Substanz an die allosterische Bindungsstelle des  $M_1$ -Rezeptors bindet. Weiterhin zeigte sich eine sehr hohe positive Kooperativität mit orthosteren Liganden wie Carbachol und Acetylcholin und eine negative Kooperativität mit dem inversen Agonist N-Methylscopolamin.<sup>32</sup>

Um das Konzept des dualsten Bindungsmodus auf den  $M_1$ -Rezeptor übertragen zu können, sollte untersucht werden, wie sich Hybrid-Verbindungen am  $M_1$ -Rezeptor verhalten, die sich aus einem hochselektiven Chinolon-Derivat und dem bereits mehrfach beschriebenen stark wirksamen Agonisten Iperoxo zusammensetzen. Zunächst sollte das Chinolon-Grundgerüst hergestellt und ein geeigneter Spacer eingeführt werden, über den schließlich Iperoxo gekoppelt werden kann. Wenn möglich sollten die Spacer-Kettenlängen variiert werden, um die Rolle der Alkylkette untersuchen zu können. Zu Beginn sollten ausgehend von verschiedenen substituierten Anilin-Derivaten Chinolone mit Benzyl-Rest am Stickstoffatom dargestellt werden. Da sich zeigte, dass auch Derivate mit Methyl-Pyridin-Resten eine gute Aktivität zeigten,<sup>145</sup> sollten Derivate mit dieser Substitution synthetisiert werden.

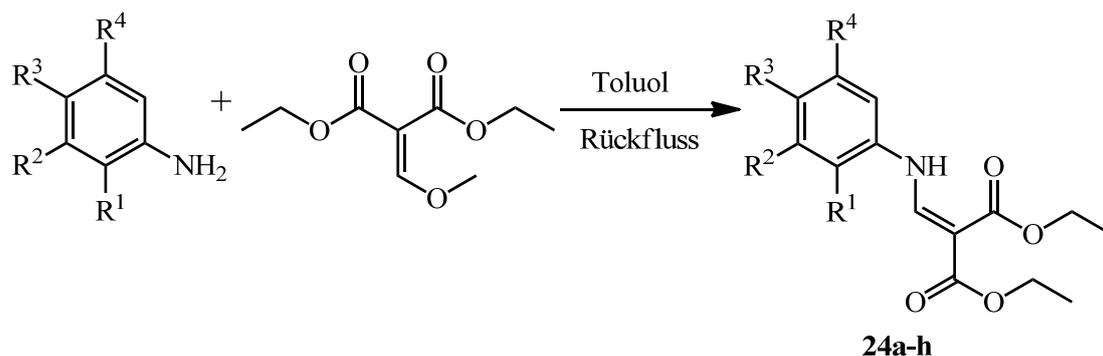


**Abb. 69:** Struktur eines potenziellen dualsten Liganden für den  $M_1$ -Rezeptor

## 2.6.1 Synthese

### 2.6.1.1 Synthese des 4-Chinolon-Grundkörpers

Um das Chinolon-Grundgerüst aufzubauen wurde zunächst gemäß der Gould-Jacobs-Reaktion in Anlehnung an Leyva *et al.*<sup>146</sup> verschieden substituierte Anilin-Derivate mit Diethylethoxymethylenmalonat in Toluol für 6 bis 12 Stunden unter Rückfluss erhitzt.

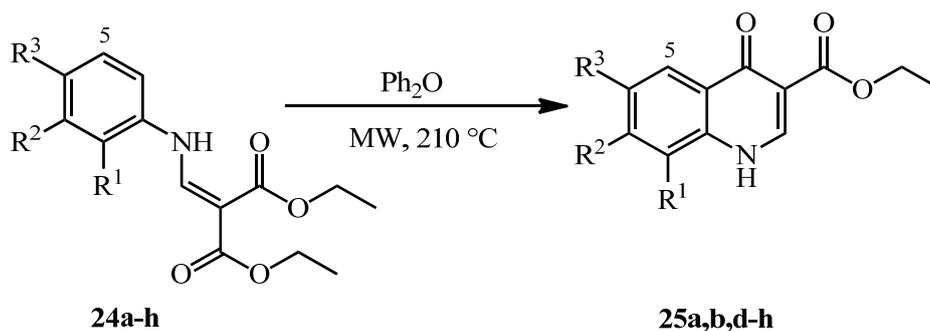


Verbindung	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	R <sup>3</sup>	R <sup>4</sup>	Ausbeute [%]
<b>24a</b>	F	H	H	H	95 (Lit.: 92 <sup>146</sup> )
<b>24b</b>	Cl	H	Cl	H	94 (Lit.: 86 <sup>147</sup> )
<b>24c</b>	Cl	H	H	Cl	65 (Lit.: 86 <sup>147</sup> )
<b>24d</b>	H	F	H	H	60 (Lit.: 65 <sup>146</sup> )
<b>24e</b>	H	Br	H	H	86 (Lit.: 40 <sup>148</sup> )
<b>24f</b>	H	Cl	F	H	85 (Lit.: 80 <sup>149</sup> )
<b>24g</b>	H	NO <sub>2</sub>	Cl	H	96 (Lit.: 97 <sup>150</sup> )
<b>24h</b>	H	H	F	H	89 (Lit.: 75 <sup>146</sup> )

**Abb. 70:** Syntheschema des ersten Schritts zur Herstellung des Chinolon-Grundgerüsts

Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurde Pentan zugegeben und das Gemisch für mehrere Stunden bei 4 °C gelagert. Der entstandene Niederschlag wurde abfiltriert und mit Pentan gewaschen. Es konnten überwiegend bessere Ausbeuten als in der Literatur angegeben erzielt werden.

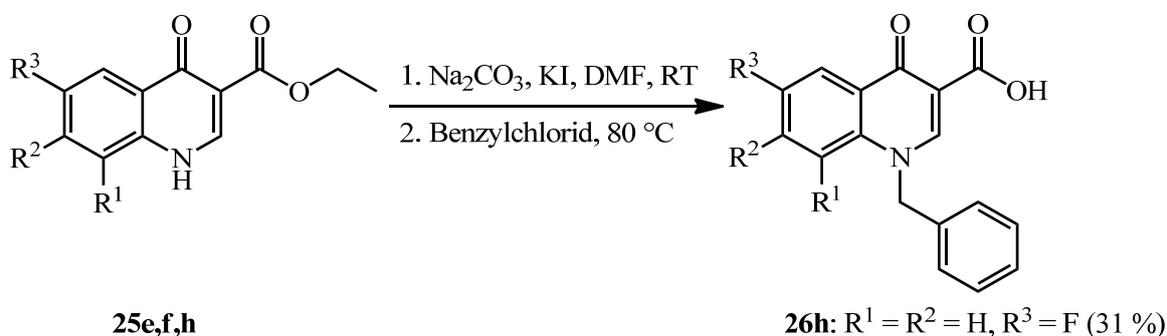
Der folgende Schritt bestand aus einer intramolekularen Cyclokondensation. Die Edukte **24a-h** wurden in inertem, hochsiedenden Diphenylether, erhitzt, wobei unter Ethanolabspaltung die 1,4-Dihydro-4-oxo-chinolin-3-carbonsäureethylester **25a,b,d-h** entstanden. Dieser Schritt wurde zunächst klassisch gemäß Chua *et al.*<sup>151</sup> durchgeführt. Da die entstandenen Verbindungen meist unlöslich in gängigen Lösungsmitteln waren, wurde auf eine Charakterisierung verzichtet und die 1,4-Dihydro-4-oxo-chinolin-3-carbonsäureethylester **25** direkt weiter umgesetzt. Es zeigte sich, dass die Derivate mit Substitutionen in C-5-Position keine Cyclokondensation eingingen. Die klassische Synthese lieferte meist braune Feststoffe, was auf einen hohen Verunreinigungsgrad hindeutete. Außerdem waren die Ausbeuten in der Folgereaktion nicht zufriedenstellend, was ebenfalls auf Verunreinigungen zurückzuführen war.



Verbindung	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	R <sup>3</sup>	Ausbeute [%] klassisch/MW
<b>25a</b>	F	H	H	- / 47
<b>25b</b>	Cl	H	Cl	59 / -
<b>25d</b>	H	F	H	15 / -
<b>25e</b>	H	Br	H	81 / 41
<b>25f</b>	H	Cl	F	75 / -
<b>25g</b>	H	NO <sub>2</sub>	Cl	93 / -
<b>25h</b>	H	H	F	50 / 28

**Abb. 71:** Syntheschema des zweiten Schritts zum Aufbau des Chinolon-Grundgerüsts

Aus diesem Grund wurde eine mikrowellenunterstützte Synthese durchgeführt. In diesem Fall wurden bis zu 5 Gramm des Eduktes in ca. 4 ml Diphenylether im Glasbehälter unter permanenter leichter Rotation für 40 Minuten auf 220 °C erhitzt. Diese Methode ergab etwas geringere Ausbeuten und hatte den Nachteil, dass dieser Schritt bei größeren Ansätzen mehrmals mit jeweils einem Teil der Substanz durchgeführt werden musste. Der entscheidende Vorteil der mikrowellenunterstützten Synthese bestand jedoch darin, dass die Produkte mittels DC-Kontrolle deutlich weniger Verunreinigungen aufwiesen und somit der folgende Syntheseschritt bessere Ausbeuten lieferte.



**Abb. 72** Syntheschema zur N-Alkylierung und simultaner Verseifung des Chinolons

Im folgenden Schritt sollte simultan das vinyloge Amid alkyliert und der Ester verseift werden. Zunächst wurde **25f** in DMF suspendiert, 5 Äquivalente Natriumcarbonat sowie eine Spatelspitze Kali-

umiodid zugegeben und die Mischung bei Raumtemperatur gerührt. Nach 30 Minuten wurden 6 Äquivalente zuvor destilliertes Benzylchlorid zugegeben und das Reaktionsgemisch im Glasbombenrohr auf 80 °C Ölbadtemperatur erhitzt. Nach einer Woche war in der gelben Lösung ein weißer Niederschlag entstanden. Das Lösungsmittel wurde entfernt, der Rückstand in Ethanol gelöst, mit einem großen Überschuss an 2 M Natronlauge versetzt und das Gemisch unter Rückfluss erhitzt. Nach 3 Stunden wurde auf Raumtemperatur abgekühlt und das Produkt mit konz. Salzsäure ausgefällt. Hierbei wurde die stark verunreinigte Zielverbindung **26h** isoliert, die sich jedoch durch Umkristallisieren nicht reinigen ließ.

Deshalb wurde erneut **25f** in DMF suspendiert, zwei Äquivalente Kaliumcarbonat, eine katalytische Menge Kaliumiodid sowie 1.6 Äquivalente Benzylchlorid zugegeben und im Glasbombenrohr auf 80 °C erhitzt. Nach 6 Stunden wurde auf Raumtemperatur abgekühlt und das Lösungsmittel entfernt. Um die Carbonsäure zu verseifen, wurde zum gelb-braunen Rückstand ein großer Überschuss an Kaliumhydroxid gegeben und die Mischung unter Rückfluss erhitzt. Da hierbei eine Suspension entstand, wurde so viel Ethanol zugegeben, bis die Lösung klar wurde. Nach 2 Tagen Erhitzen unter Rückfluss wurde auf Raumtemperatur abgekühlt, wobei sich ein hellgelber Niederschlag bildete. Dieser wurde abfiltriert und mit Pentan gewaschen. Da der erhaltene Feststoff erneut stark verunreinigt war, wurde dieser in Pentan erhitzt und erneut abfiltriert. Schließlich wurden zwei weitere Äquivalente Benzylchlorid zugegeben und nach Zugabe von Kaliumhydroxid und Ethanol unter Rückfluss erhitzt. Es bildeten sich zwei Phasen. Es wurde mit Dichlormethan extrahiert, über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel entfernt. Doch erneut konnte kein reines Produkt isoliert werden.

Die Umsetzung wurde analog durchgeführt, als Edukt wurde jedoch das Derivat **25e** eingesetzt. Auch hier konnte nach Umkristallisation mit Ethanol und Methanol nicht die Zielverbindung isoliert werden. NMR-spektroskopische Untersuchungen deuteten zwar darauf hin, dass eine Umsetzung erfolgt war, allerdings war ein Gemisch aus mehreren Verbindungen entstanden.

Mit **25h** und analoger Durchführung gelang schließlich die Herstellung der Zielverbindung **26h** in 31 %-iger Ausbeute. Es bildete sich nach Erhitzen mit Kaliumhydroxid ein weißer Niederschlag, der filtriert und mit Pentan gewaschen wurde. Für diese Reaktion wurden lediglich die drei Derivate **25e,f,h** eingesetzt, da sich später eine andere Strategie als geeignet herausstellte.

#### 2.6.1.2 Versuche zur Amidierung bzw. Veresterung der Säure-Gruppe

Um die Chinolon-Verbindungen mit Iperoxo koppeln zu können, musste ein Spacer in das Molekül eingeführt werden. Dies sollte mittels Amidierung geschehen.

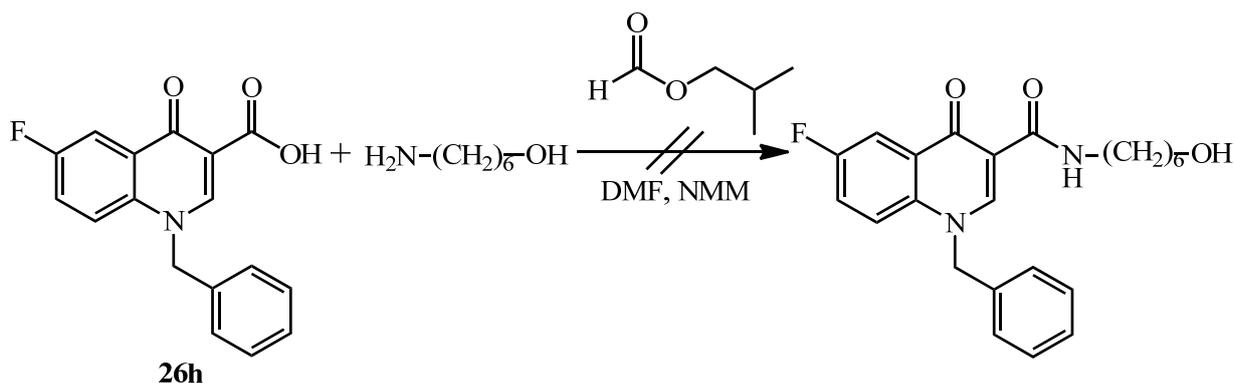


Abb. 73: Syntheschema zur Umsetzung des Chinolons **26h** mit 1,6-Aminohexanol

Chinolon **26** wurde in abs. DMF vorgelegt. Fünf Äquivalente N-Methylmorpholin, 4 Äquivalente Isobutylformiat sowie 4 Äquivalente Aminohexanol wurden zugegeben und die Mischung 5 Tage bei Raumtemperatur gerührt. Die dünnschichtchromatographische Reaktionskontrolle (Kieselgel, Chloroform/Methanol 9:1) ließ eine Umsetzung erkennen ( $R_f = 0.89$ , Anfärbereagenz: Dragendorff), weshalb eine säulenchromatographische Reinigung durchgeführt (Kieselgel, Chloroform/Methanol 9:1), die jeweiligen Fraktion isoliert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt wurde. Es wurde ein weißer Rückstand erhalten, der mit Diethylether gewaschen und getrocknet wurde. Hierbei handelte es sich jedoch um ein Gemisch aus verschiedenen Verbindungen. Aus diesem Grund wurde der Feststoff in dem. Wasser suspendiert und das Gemisch mit konz. Salzsäure stark angesäuert, um das überschüssige Amin zu protonieren. Nach einer Stunde Rühren bei Raumtemperatur wurde abfiltriert, mit Wasser gewaschen und der weiße Feststoff getrocknet. Obwohl lediglich ein DC-Fleck erkennbar war, zeigten  $^1\text{H-NMR}$ -spektroskopische Untersuchungen, dass es sich um ein Gemisch aus verschiedenen Verbindungen handelte.

In einer neuen Strategie sollte das Fluorchinolon **26h** mit 1,6-Dibromhexan verestert werden.

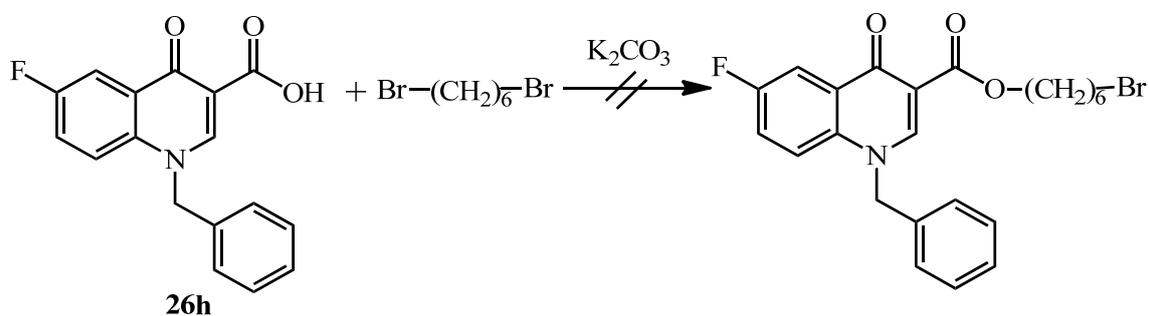


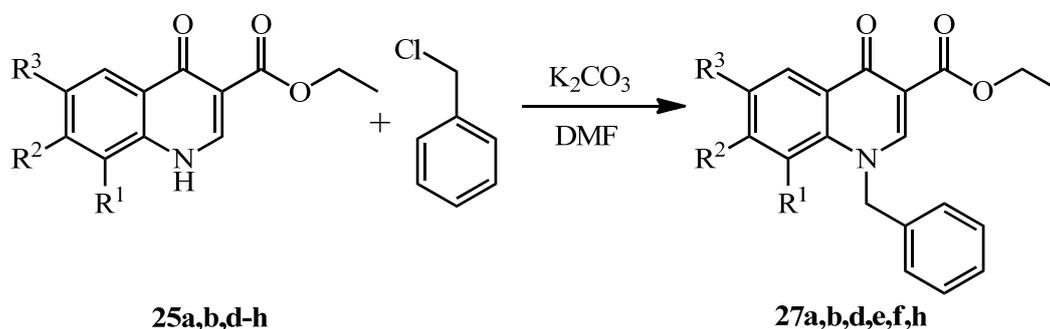
Abb. 74: Syntheschema zur Umsetzung des Chinolons mit 1,6-Dibromhexan

Chinolon **26h** wurde dazu in wenig DMF gelöst, ein großer Überschuss 1,6-Dibromhexan sowie 2 Äquivalente Kaliumcarbonat zugegeben. Es wurde auf 120 °C Ölbadtemperatur erhitzt, wobei sich eine klare Lösung bildete. Der Reaktionsfortschritt wurde dünnschichtchromatographisch verfolgt

(Aluminiumoxid, neutral, EA,  $R_f = 0.78$ ). Nach 12 Stunden Erhitzen wurde auf Raumtemperatur abgekühlt und eine Säulenchromatographie (Aluminiumoxid, neutral, EA,  $R_f = 0.78$ ) durchgeführt, um Reste des Edukts zu entfernen. Isoliert wurde schließlich ein gelbes Öl, das  $^1\text{H-NMR}$ -spektroskopisch untersucht wurde und nicht die Zielverbindung, sondern lediglich eine Reihe von Nebenprodukten enthielt.

### 2.6.1.3 N-Alkylierung der Chinolon-Ester

Da die Versuche zum Einführen eines Spacers als Ester oder Amid nicht erfolgreich waren, wurden zunächst die Produkte der Cyclokondensation (**25a,b,d-h**) mit Benzylchlorid umgesetzt, ohne - wie in **Abschnitt 2.6.1** beschrieben - eine Hydrolyse durchzuführen.



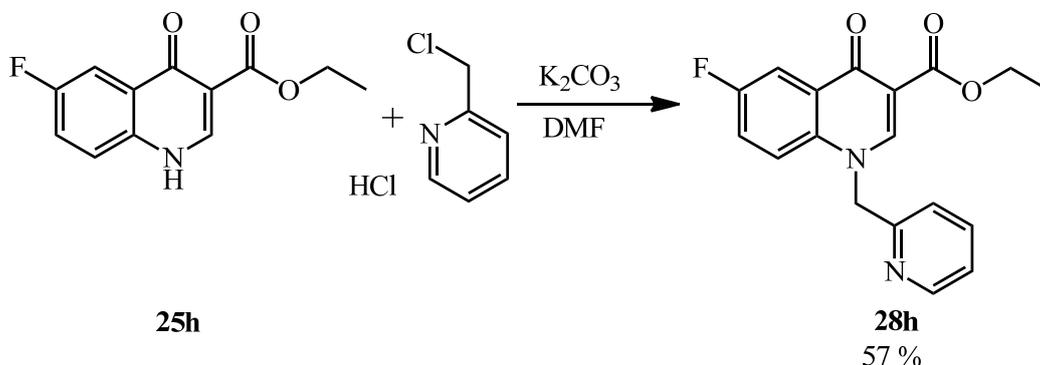
Verbindung	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	R <sup>3</sup>	Ausbeute [%]
<b>27a</b>	F	H	H	81
<b>27b</b>	Cl	H	Cl	46
<b>27d</b>	H	F	H	57
<b>27e</b>	H	Br	H	54
<b>27f</b>	H	Cl	F	62 (Lit.: 55 <sup>152</sup> )
<b>27h</b>	H	H	F	72

**Abb. 75:** Syntheschema zur N-Alkylierung Chinolon-Ester

Zunächst wurde **25h** in DMF suspendiert, 2.5 Äquivalente Kaliumcarbonat, sowie 5 Äquivalente Benzylchlorid zugegeben und das Reaktionsgemisch auf 80 °C erhitzt. Nach 20 Stunden wurde das überschüssige Kaliumcarbonat abfiltriert, das Lösungsmittel entfernt und der erhaltene gelb-orangefarbene Rückstand aus Ethanol umkristallisiert. Hierbei wurde der Ester **27h** in 72 % Ausbeute erhalten.

In Analogie zu dieser Synthese wurde mit den übrigen Derivaten **25** verfahren. Hierbei wurden weiß bis hellbraune Feststoffe von **27a,b,d-f** in Ausbeuten zwischen 46 und 81 % erhalten.

Da in der Literatur<sup>153</sup> zusätzlich gute Subtyp-selektive Eigenschaften an Chinolonen nachgewiesen wurden, die anstelle des Benzylrestes einen Methyl-Pyridin-Rest aufweisen, sollten auch derartige Derivate hergestellt werden. Hierzu wurde zunächst die Vorstufe **25h** hergestellt.



**Abb. 76:** Syntheschema zur Herstellung Methyl-pyridin-substituierter Chinolone

**25h** wurde in DMF suspendiert, 2.5 Äquivalente Kaliumcarbonat sowie 2 Äquivalente 2-(Chlormethyl)pyridin-Hydrochlorid zugegeben und auf 80 °C erhitzt. Die dünnschichtchromatographische Reaktionskontrolle (Kieselgel, CHCl<sub>3</sub>/MeOH 10:1) ließ nach 37 Stunden eine Umsetzung erkennen. Es wurde heiß abfiltriert, um das überschüssige Kaliumcarbonat zu entfernen. Durch Säulenchromatographie (Kieselgel, CHCl<sub>3</sub>/MeOH 10:1) konnte die Fraktion mit R<sub>f</sub> = 0.37 isoliert werden. Ein Großteil des Lösungsmittels wurde im Vakuum entfernt und über Nacht bei 4 °C gelagert, wodurch sich weiße Kristalle bildeten. Diese wurden isoliert, wiesen aber noch Verunreinigungen auf und wurden deshalb aus Methanol umkristallisiert, das erhaltene Produkt **28h** mit Diethylether gewaschen und getrocknet.

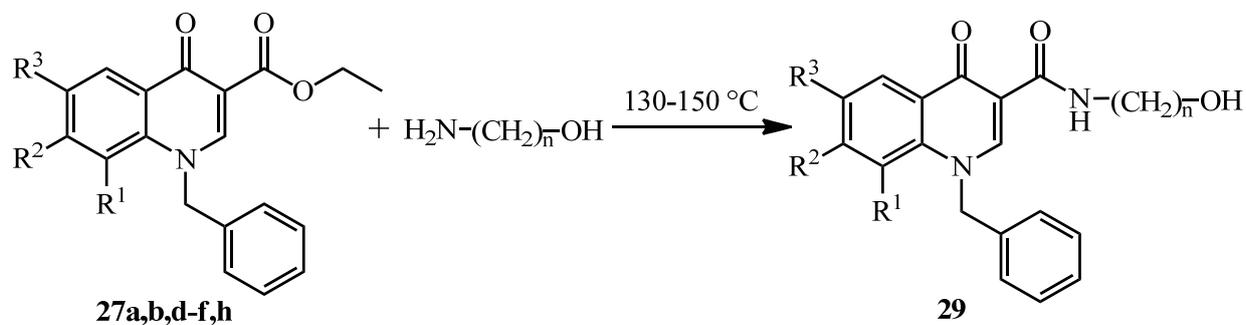
In Analogie zur oben beschriebenen Synthese sollten auch die übrigen Chinolon-Derivate **25** mit 2-Chlormethyl-pyridin-Hydrochlorid umgesetzt werden, was jedoch nicht gelang. Es wurde eine neue Charge des 2-Chlormethyl-pyridin-Hydrochlorids verwendet, das allerdings nicht weiß sondern braun war. Zwar waren mit Hilfe von NMR-spektroskopischen Untersuchungen keine Verunreinigungen des Eduktes erkennbar, aber die Umsetzung mit den verschiedenen Chinolonen führte nicht zu den Zielverbindungen. Aus diesem Grund wurde versucht, das 2-Chlormethylpyridin-Hydrochlorid zu reinigen. Zunächst wurden Umkristallisationsversuche mit verschiedenen Lösungsmitteln wie Ethanol, Methanol, Ethylacetat und Dichlormethan durchgeführt. Jedoch konnte jeweils nur ein braunes Öl erhalten werden. Auch Versuche, die Substanz durch Säulenchromatographie mit verschiedenen Fließmittelgemischen zu reinigen, scheiterten. Weiterhin wurde versucht, die freie Base des 2-Chlormethyl-pyridin zu erhalten. Dies geschah durch Lösen des Hydrochlorids in dem. Wasser, Zugabe von Natriumhydroxid und schließlich Extraktion mit Dichlormethan, hier wurde ein roter Feststoff erhalten, was auf eine Polymerisation des Edukts hindeutete. Da weder die Reinigungsversuche des 2-Chlormethyl-pyridin, noch die Verwendung von verschiedenen Chargen von unterschiedlichen Her-

stellern erfolgreich waren, wurde die Synthese dieser N-substituierten Chinolon-Derivate nicht weiter verfolgt.

#### 2.6.1.4 Einführen eines Spacers

##### a) Umsetzung der Chinolone mit Benzyl-Substituent

Im folgenden sollte das Amid-Spacer-Derivat aus den 3-Chinolonestern hergestellt werden.



Verbindung	n	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	R <sup>3</sup>	Ausbeute [%]
<b>29e-C2</b>	2	H	Br	H	46
<b>29h-C2</b>	2	H	H	F	54
<b>29h-C3</b>	3	H	H	F	60
<b>29a-C4</b>	4	F	H	H	88
<b>29e-C4</b>	4	H	Br	H	87
<b>29f-C4</b>	4	H	Cl	F	60
<b>29h-C4</b>	4	H	H	F	25
<b>29a-C6</b>	6	F	H	H	88
<b>29e-C6</b>	6	H	Br	H	26
<b>29f-C6</b>	6	H	Cl	F	57
<b>29h-C6</b>	6	H	H	F	33

**Abb. 77:** Syntheschema zur Umsetzung der Chinolon-Ester mit Aminoalkoholen

##### i. C6

Zunächst wurden die jeweiligen Chinolon-Ester **27** mit 5 Äquivalenten 6-Amino-1-hexanol verrieben und auf 170 °C Ölbadtemperatur erhitzt, wobei sich eine gelbe, klare Lösung bildete. Nach 4 Stunden wurde auf Raumtemperatur abgekühlt. Dabei wurde die Lösung zu einem festen, gelben Öl, das aus Ethanol umkristallisiert wurde. Der erhaltene Niederschlag wurde abfiltriert, mit Die-

thylether gewaschen und im Vakuum getrocknet. Die erhaltenen Substanzen wiesen noch Verunreinigungen auf und wurden mithilfe von Säulenchromatographie (Kieselgel,  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ , 10:1,  $R_f = 0.59-0.66$ ) gereinigt. Da die Ausbeuten bei nur 15 bis 35 % lagen, wurde versucht, die Reaktionsbedingungen zu optimieren. Es zeigte sich, dass sich die Ausbeuten durch Erhöhen der Temperatur um zehn Grad verschlechterten, da sich bei dieser Temperatur mehr Nebenprodukte bildeten bzw. teilweise Zersetzung eintrat. Aus diesem Grund wurde die Temperatur reduziert und es zeigte sich, dass für die Umsetzung mit 6-Amino-1-hexanol eine Temperatur von 150 °C am besten geeignet war. Bei dieser Temperatur bildete sich zunächst eine klare Lösung und bei einem Großteil der Umsetzungen wurde das Reaktionsgemisch fest, sobald die Reaktion abgeschlossen war. Daher wurde der Ansatz aufgearbeitet. In den übrigen Fällen stellte sich eine Reaktionsdauer von nicht mehr als 4,5 Stunden als geeignet heraus. Durch die Variation der Reaktionsbedingungen war es nicht mehr nötig, säulenchromatographische Reinigungen durchzuführen. Es wurde lediglich aus Ethanol umkristallisiert und, sofern der Feststoff noch Verunreinigungen aufwies, erneut mit Methanol umkristallisiert. So konnten die Chinolon-Derivate **29-C6 (a,e,f,h)** in Ausbeuten zwischen 26 und 88 % erhalten werden.

ii. C4

Neben den unterschiedlichen Substitutionsmustern der Chinolone sollten auch Iperoxo-Hybride mit verschiedenen Spacer-Kettenlängen hergestellt werden. Dazu wurden weitere Amino-Alkohole zur Umsetzung mit den Chinolon-Estern eingesetzt. Im Gegensatz zu 6-Amino-1-hexanol waren die übrigen Aminoalkohole in flüssiger Form erhältlich. Auch im Falle des 4-Amino-1-butanols wurden zunächst verschiedene Temperaturen zwischen 140 und 180 °C getestet. Die hohen Temperaturen führten auch hier zu stärkeren Verunreinigungen und erforderten eine säulenchromatographische Reinigung (Kieselgel,  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ , 10:1,  $R_f = 0.43-0.56$ ). Durch die Umsetzung bei 150 °C konnte auch hier auf diese Reinigung verzichtet werden, es wurden lediglich eine oder zwei Umkristallisationen mit Ethanol und Methanol durchgeführt, um die entsprechenden Chinolon-Derivate **29-C4 (a,e,f,h)** zu erhalten.

iii. C3

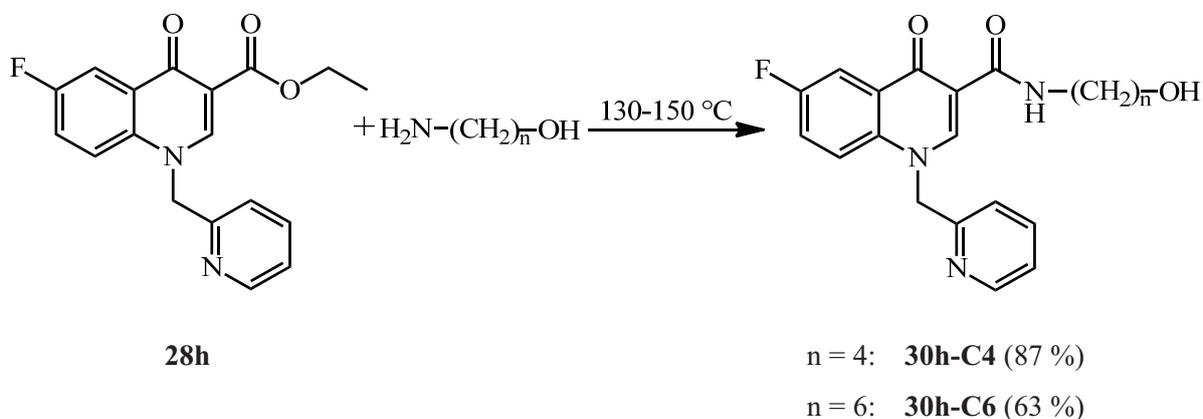
Auch das Propyl-Derivat **29a-C3** konnte auf diese Weise synthetisiert werden.

iv. C2

In der Umsetzung mit Ethanolamin wurde ein deutlicher Überschuss des Aminoalkohols eingesetzt (10-20 Äquivalente), da so eine homogene Durchmischung gewährleistet war. Hierbei wurde das jeweilige Chinolon in Ethanolamin suspendiert und es zeigte sich bereits bei 110 bis 130 °C die Bildung einer klaren Lösung. Da sich in den übrigen Fällen 150 °C als Temperatur der Wahl herausgestellt hatte, wurden zunächst Versuche mit Temperaturen zwischen 150-160 °C durchgeführt. Allerdings führten diese Umsetzungen zu stark verunreinigten Produkten, so dass erneut säulenchromatographische Reinigungen (Kieselgel,  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ , 10:1,  $R_f = 0.44-0.49$ ) erforder-

lich waren. Die Erniedrigung der Reaktionstemperatur auf 130 °C führte zu besseren Ausbeuten und größerer Reinheit, so dass nur eine Umkristallisation notwendig war. Allerdings konnten mit dieser Kettenlänge lediglich **29e-C2** und **29h-C2** isoliert werden.

#### b) Umsetzung der Chinolone mit Methyl-Pyridin-Substituent



**Abb. 78:** Umsetzung von **28** mit Aminoalkoholen

In Analogie zu den oben beschriebenen Synthesen wurde das Derivat **28h** mit den entsprechenden Aminoalkoholen umgesetzt. Da die Herstellung des Esters **28h** nur einmal die Zielverbindung lieferte, konnten lediglich 3 Ansätze durchgeführt werden. Hier fiel die Wahl auf die Umsetzung mit den Hexyl- und Butyl-Derivaten, für die eine Temperatur von 150 °C gewählt wurde und die Umsetzung mit Ethanolamin, die bei 130 °C durchgeführt wurde. Die Synthese des Ethyl-Derivats führte nicht zur Zielverbindung, die beiden übrigen Derivate **30h-C4** und **30h-C6** konnten nach Umkristallisieren mit Ethanol und Methanol als weiße Feststoffe isoliert werden.

#### 2.6.1.5 Substitution der Hydroxyl-Funktion

Um Iperoxo mit seinem tertiären Amin am eingeführten Spacer der Chinolon-Verbindungen angreifen lassen zu können, musste die Hydroxyl-Funktion in eine gute Abgangsgruppe überführt werden (siehe **Abb. 79**). Hierzu wurde zunächst die Bildung eines Mesylats gewählt. **29h-C6** wurde in abs. Dichlormethan gelöst, zur Deprotonierung des Alkohols Triethylamin zugegeben und die Lösung bei 0 °C gerührt. Schließlich wurden 3 Äquivalente des zuvor destillierten Methansulfonsäurechlorids zugegeben und die Mischung langsam auf Raumtemperatur erwärmt. Mithilfe von dünnschichtchromatographischer Reaktionsverfolgung (Kieselgel, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 10:1) war bereits nach 4 Stunden eine Umsetzung erkennbar, da jedoch noch unumgesetztes Edukt enthalten war, wurde für weitere 20 Stunden gerührt. Als sich keine weitere Umsetzung erkennen ließ, wurde das Lösungsmittel entfernt, wobei sich weiße Nadeln bildeten. Diese Kristalle wurden abfiltriert und mit Diethylether gewaschen, stellten sich jedoch als Verunreinigung (Ammoniumchlorid) heraus. Das Lösungsmittel der Mutterlauge wurde entfernt und der gelbe, ölige Rückstand wurde säulenchromatographisch gereinigt (Kieselgel, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 10:1). Die Zielverbindung konnte nicht isoliert werden. Diese Reaktion wurde

erneut durchgeführt, es wurden bis zu 10 Äquivalente Methansulfonsäurechlorid eingesetzt und die Temperatur auf bis zu 60 °C erhöht, es konnte jedoch in keinem der Fälle die Zielverbindung isoliert werden.

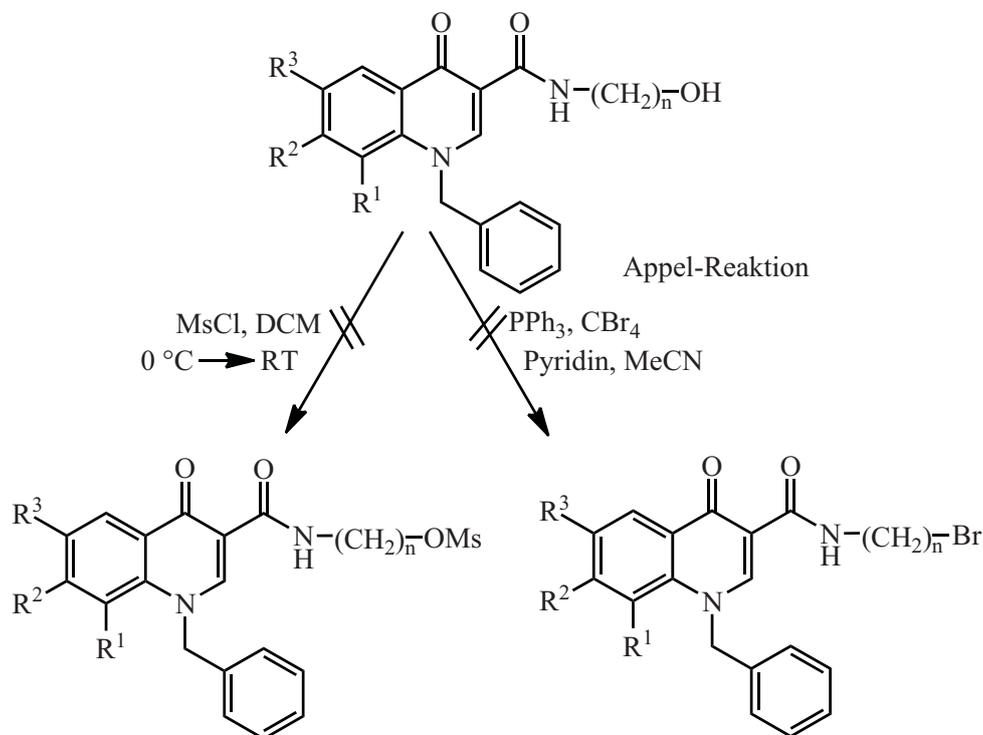
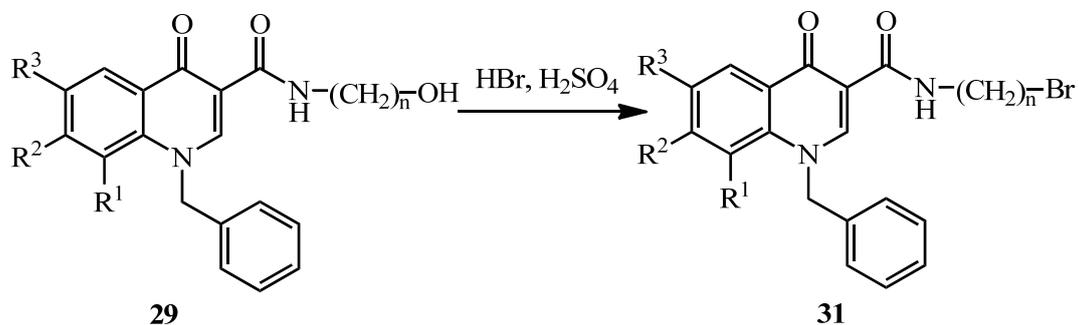


Abb. 79: Syntheschema zur Substitution der Hydroxyl-Gruppe

Da möglicherweise das Chinolon-Mesylat entstanden war, aber nicht isoliert werden konnte, wurde versucht, in einer Ein-Topf-Reaktion zunächst das Mesylat herzustellen und dieses direkt mit Iperoxo zu koppeln. Hierzu wurde analog der oben beschriebenen Syntheseverfahren, nach 24 Stunden Rühren bei Raumtemperatur wurden nun jedoch 2 Äquivalente Iperoxo-Base zugegeben und die Mischung auf 60 °C erhitzt. Die Reaktionskontrolle mittels Dünnschichtchromatographie zeigte hier eine Vielzahl von Substanzflecken. Es ließ sich keine reine Substanz isolieren.

In einer neuen Synthesestrategie wurde die Hydroxyl-Gruppe von **29e-C6** versucht mithilfe einer „Appel-Reaktion“ in ein Bromid zu überführen. In Anlehnung an Barros *et al.*<sup>154</sup> wurde das Chinolon-Derivat in abs. Acetonitril gelöst, Pyridin, 2 Äquivalente Triphenylphosphin sowie 3.5 Äquivalente Tetrabromkohlenstoff zugegeben und bei Raumtemperatur gerührt. Der Reaktionsverlauf wurde dünn-schichtchromatographisch (Kieselgel, EA/PE 1:1) verfolgt und nach 4 Tagen wurde der entstandene braune Niederschlag filtriert und mit Petrolether gewaschen. Da dieser deutliche Verunreinigungen aufzeigte, wurde mithilfe von Säulenchromatographie (Kieselgel, EA/PE 1:1) gereinigt. Es zeigte sich, dass sich das Chinolon während der Reaktion zersetzt hatte. Die gelbe Mutterlauge zeigte in dünn-schichtchromatographischer Kontrolle eine Ansammlung von sehr vielen Verbindungen, die sich mittels Säulenchromatographie nicht reinigen ließen.

Da diese Umsetzungen unter vergleichsweise milden Bedingungen nicht zur Zielverbindung führten, wurde mithilfe von Bromwasserstoff und Schwefelsäure versucht, die Hydroxyl-Funktion durch ein Bromid zu substituieren (siehe **Abb. 80**).



Verbindung	n	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	R <sup>3</sup>	Ausbeute [%]
<b>31a-C4</b>	4	F	H	H	37
<b>31e-C4</b>	4	H	Br	H	25
<b>31f-C4</b>	4	H	Cl	F	22
<b>31h-C4</b>	4	H	H	F	58
<b>31a-C6</b>	6	F	H	H	34
<b>31e-C6</b>	6	H	Br	H	28
<b>31f-C6</b>	6	H	Cl	F	41
<b>31h-C6</b>	6	H	H	F	78

**Abb. 80:** Syntheschema zur Umsetzung des Alkohols mit Bromwasserstoff

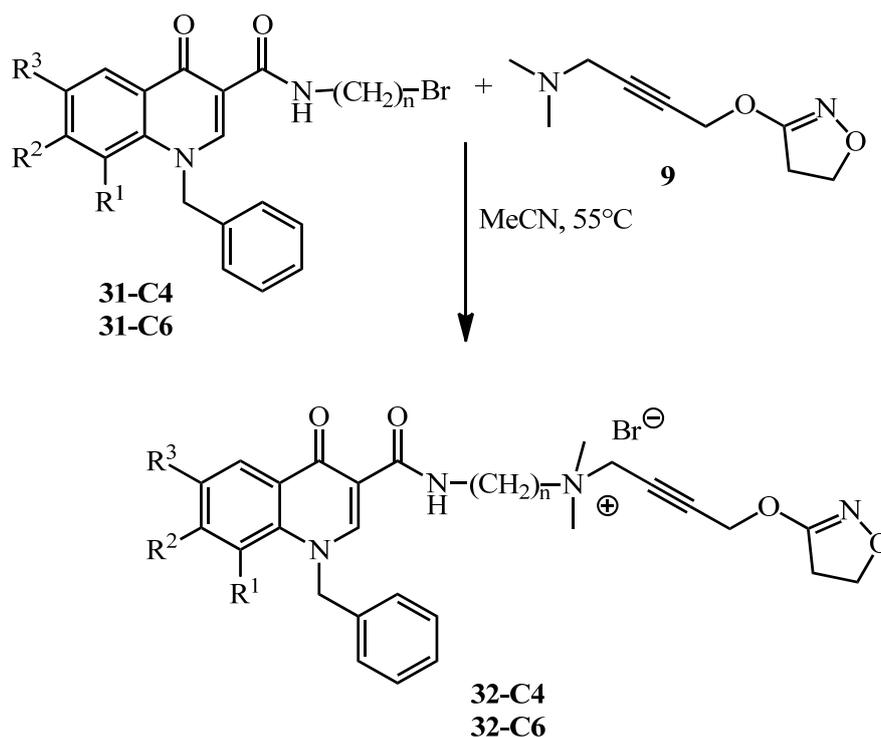
Hierzu wurden die jeweilige Chinolon-Derivate **29** in 5 Äquivalenten Bromwasserstoff gelöst, vorsichtig 1.5 Äquivalente konz. Schwefelsäure zugegeben und die Mischung für 7 Stunden unter Rückfluss erhitzt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurde auf Eiswasser gegossen und mit Ethylacetat extrahiert. Die organische Phase wurde mit Wasser gewaschen und über Kaliumcarbonat bis zur neutralen Reaktion gerührt. Schließlich wurde überschüssiges Kaliumcarbonat abfiltriert und das Lösungsmittel des Filtrats entfernt. Der erhaltene gelbe Feststoff wies deutliche Verunreinigungen auf, so dass eine Säulenchromatographie (Kieselgel, CHCl<sub>3</sub>, R<sub>f</sub> = 0.82) durchgeführt wurde. Doch das erhaltene Produkt zeigte noch immer Verunreinigungen, die sich nicht entfernen ließen, da sich die R<sub>f</sub>-Werte der Substanzflecken nur minimal unterschieden. In einem neuen Versuch wurde die doppelte Ansatzgröße verwendet und lediglich 5 Stunden unter Rückfluss erhitzt. So konnte nach Extraktion bereits die reine Zielverbindung erhalten werden, jedoch in geringer Ausbeute. Durch Modifikation der Reaktionsbedingungen wurde versucht, die Ausbeute zu steigern. Es zeigte sich, dass durch Sen-

ken der Temperatur auf unterhalb der Siedetemperatur (Ölbadtemperatur 90-100 °C) deutlich bessere Ausbeuten erzielt werden konnten. Schließlich wurden Versuche mit größerer Ansatzgröße durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass sich der Ansatz nach Extraktion nicht mit Kaliumcarbonat neutralisieren ließ. Die erhaltenen Produkte waren sehr stark verunreinigt und ließen sich nur schwer durch Säulenchromatographie (Kieselgel, CHCl<sub>3</sub>, R<sub>f</sub> = 0.82) reinigen, was schließlich zu sehr geringen Ausbeuten führte. Zu erkennen war jedoch ein starker Essig-Geruch, was darauf hindeutete, dass ab einer gewissen Ansatzgröße das Extraktionsmittel Ethylacetat zu Essigsäure gespalten wird. Aus diesem Grund wurde in weiteren Versuchen Chloroform anstelle des Ethylacetats eingesetzt und die Reaktionen verliefen ohne Probleme. Die nach Extraktion und Neutralisation erhaltenen Feststoffe wurden durch Umkristallisation mit Ethanol und ggf. durch eine weitere Umkristallisation mit Methanol gereinigt. Allerdings führten weder die Derivate mit Ethyl- noch die Derivate mit Propyl-Spacer zu den jeweiligen Produkten. Lediglich die Butyl-(**31-C4**) sowie die Hexyl-Derivate (**31-C6**) konnten isoliert werden.

#### 2.6.1.6 Synthese der Chinolon-Iperoxo-Hybrid-Verbindungen

Zunächst wurde **31h-C6** in abs. Acetonitril gelöst, 4 Äquivalente Iperoxo-Base sowie eine katalytische Menge KI/K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> zugegeben und das Reaktionsgemisch auf 60 °C Ölbadtemperatur im Glasbombenrohr erhitzt. Aus der zunächst gelben Lösung fiel nach 30 Minuten ein weißer Niederschlag aus. Nach 24 Stunden wurde dieser abfiltriert und mit Diethylether gewaschen, es handelte sich jedoch um eine Vielzahl von Verunreinigungen.

In einem weiteren Ansatz wurde ein noch größerer Überschuss Iperoxo-Base verwendet (8-10 Äquivalente), ansonsten wurde analog der beschriebenen Syntheseverfahren. Nach 12 Tagen zeigte sich ein leichter, brauner Niederschlag. Es wurde weitere 5 Tage gerührt, um eine vollständige Reaktion zu erzielen. Danach wurde das Reaktionsgemisch in sehr kleinen Portionen in Diethylether getropft und möglichst schnell filtriert. Der entstandene Niederschlag wurde braun und ölig. Das Lösungsmittel der gelben Mutterlauge wurde entfernt, hier konnte jedoch lediglich ein gelbes Öl erhalten werden, bei dem es sich um Iperoxo-Base handelte. Der braune, ölige Niederschlag wurde in Methanol aufgenommen, um die Substanz quantitativ aus der Glasfritte zu extrahieren und das Lösungsmittel wieder im Vakuum entfernen. Der erhaltene braune Rückstand wurde aus Ethanol umkristallisiert. Hierbei bildete sich ein gelber Feststoff, der durch Waschen mit Diethylether jedoch wieder eine ölige Konsistenz annahm. Aus diesem Grund wurde erneut aus Ethanol umkristallisiert. So wurde das Chinolon-Iperoxo-Hybrid **32h-C6** erhalten, was jedoch noch mit Ethanol verunreinigt war. Aufgrund der geringen Menge konnte keine weitere Reinigung durchgeführt werden.



Verbindung	n	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	R <sup>3</sup>	Ausbeute [%]
<b>32a-C4</b>	4	F	H	H	47
<b>32e-C4</b>	4	H	Br	H	51
<b>32f-C4</b>	4	H	Cl	F	22
<b>32h-C4</b>	4	H	H	F	37
<b>32a-C6</b>	6	F	H	H	47
<b>32e-C6</b>	6	H	Br	H	36
<b>32f-C6</b>	6	H	Cl	F	60
<b>32h-C6</b>	6	H	H	F	66

**Abb. 81** Syntheschema zur Herstellung von Chinolon-Hybrid-Substanzen

Bei mehreren Versuchen zur Optimierung der Reaktionsbedingungen zeigte sich, dass eine Reaktionstemperatur von 55-57 °C am besten geeignet ist für diese Art der Umsetzung. Aus diesem Grund wurden nun die jeweiligen Hexyl- und Butyl-Derivate der vier unterschiedlich substituierten Chinolone **31-C4 (a,e,f,h)** und **31-C6 (a,e,f,h)** in abs. Acetonitril gelöst und mit einem deutlichen Überschuss an Iperoxo-Base sowie einer Spatelspitze KI/K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> versetzt. Die Reaktionsgemische wurden jeweils in einem Glasbombenrohr bei 55 °C erhitzt. In den meisten Fällen bildete sich kein Niederschlag. Deshalb wurde der Reaktionsfortschritt dünnschichtchromatographisch verfolgt (Kieselgel, MeOH/0.2 M

$\text{NH}_4\text{NO}_3$ , 3:2,  $R_f = 0.54-0.68$ ). Nach beendeter Reaktion wurde auf Raumtemperatur abgekühlt, das Reaktionsgemisch in sehr kleinen Portionen in Diethylether getropft und der entstandene Niederschlag möglichst schnell filtriert. Der weiße Feststoff wurde mit Diethylether gewaschen und getrocknet. In manchen Fällen war eine Umkristallisation aus Ethanol und, wenn nötig, zusätzlich aus Methanol erforderlich. In den meisten Fällen konnte der Diethylether nicht vollständig aus dem Feststoff entfernt werden. Daher wurde der Feststoff in Dichlormethan in der Hitze gelöst und das Lösungsmittel im Anschluss im Vakuum entfernt, bis sich ein weißer Schaum bildete. Zu beachten war hier, dass für die Reinigung nur Dichlormethan in HPLC-Reinheit verwendet werden durfte. Ein erster Versuch mit Dichlormethan für den Laborgebrauch hatte eine stark verunreinigte Substanz zu Folge, die sich nur durch mehrmaliges Umkristallisieren sowie Aufschäumen mit reinem Dichlormethan reinigen ließ. Dieser Schaum wurde für mehrere Stunden im Vakuum getrocknet. Schließlich konnten die Hybrid-Substanzen als weiße Feststoffe erhalten werden, wobei die Ausbeuten in der Butyl-Reihe zwischen 22 und 51 % bei Reaktionsdauern zwischen 6 und 30 Tagen und bei den Hexyl-Derivate zwischen 36 und 66 % mit Reaktionszeiten zwischen 17 und 56 Tagen variierten.

Im Falle dieses Reaktionstyps ist besonders auf eine konstante Temperatur zu achten. In einigen Fällen kam es durch Stromausfälle zu starken Temperaturschwankungen. In diesen Fällen konnte lediglich ein braunes Öl isoliert werden, das nicht zu reinigen war.

## 2.6.2 Pharmakologische Untersuchungen

### 2.6.2.1 Grundlagen des Testsystems

Die dargestellten Chinolon-Iperoxo-Hybride wurden mit Hilfe von [ $^{35}\text{S}$ ]GTP $\gamma$ S-Bindungsstudien untersucht. Die Grundlagen dieses Testsystems sind in **Kapitel 2.3.2.1** beschrieben.

### 2.6.2.2 Durchführung und Ergebnisse

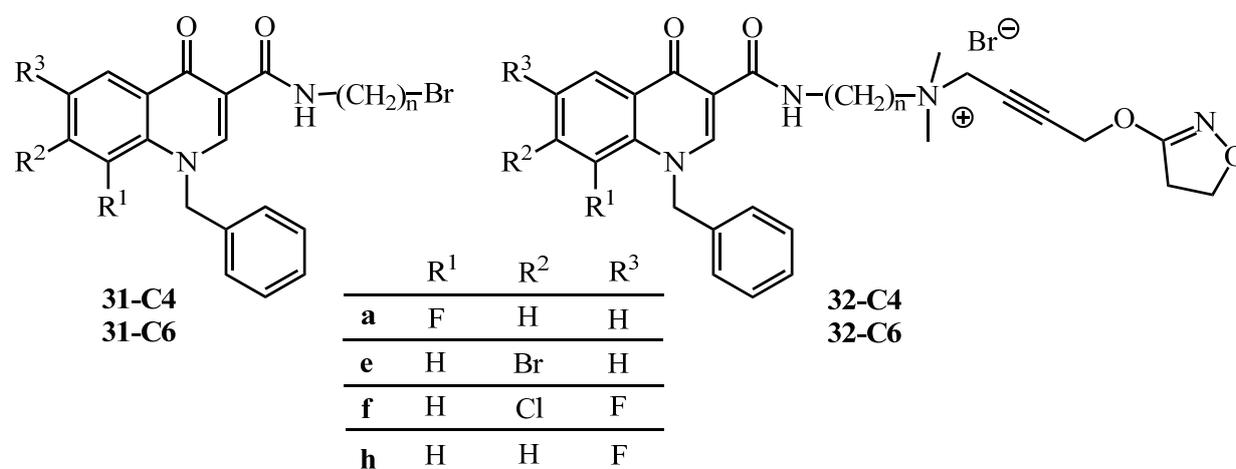
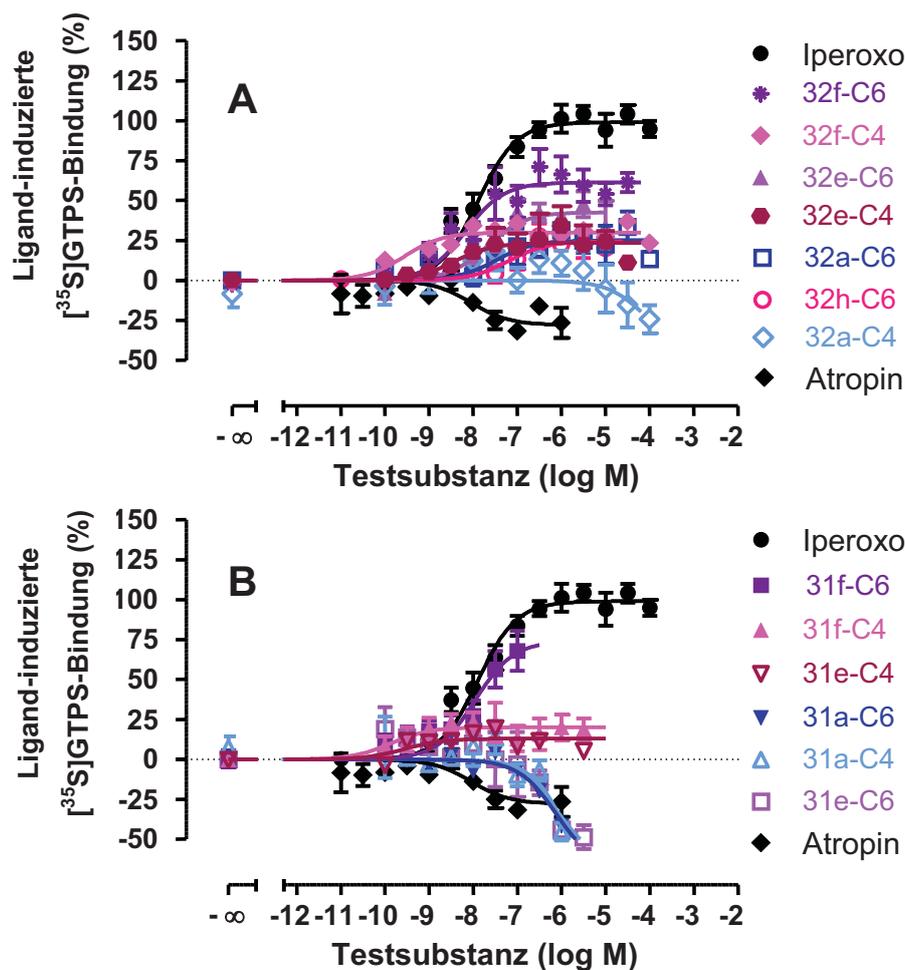


Abb. 82: Strukturformeln der untersuchten Substanzen



**Abb. 83:**  $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$  Bindungsexperimente (A) ausgewählter muskarinischer Hybridverbindungen sowie (B) ihrer allosterischen Molekülanteile im Vergleich zu Iperoxo und Atropin an  $\text{hM}_1$ -Rezeptoren in Membranen aus CHO-Zellen. Dargestellt sind  $\text{M.W} \pm \text{S.E.M.}$  aus 3-6 unabhängigen Experimenten, die als Dreifachbestimmungen ausgeführt wurden. (unveröffentlichte Daten von PD Dr. Christian Tränkle)

Bei den in **Abb. 83** dargestellten  $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ -Bindungsexperimenten handelt es sich lediglich um Rohdaten, weshalb eine detaillierte Interpretation der Daten bislang nicht möglich ist. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass die Chinolon-Iperoxo-Hybride tatsächlich den  $\text{M}_1$ -Rezeptor adressieren und eine Wirkung hervorrufen. Bemerkenswert ist vor allem das Hybrid-Allosteren-Paar **31f-C6** und **32f-C6**, da sich diese in Wirksamkeit kaum unterscheiden, was dafür spricht, dass die Wirkung allein durch den allosteren Teil hervorgerufen wird.

Erste Ergebnisse deuten auf eine Aktivierung des  $\text{G}_i$ -Signalwegs hin, was im Widerspruch zu der These steht, dass  $\text{M}_1$ -Rezeptoren bevorzugt eine  $\text{G}_q$ -Kopplung eingehen. Diese Befunde müssen jedoch in verschiedenen Assays untersucht und verifiziert werden.

**Tabelle 3:** Wirksamkeit ( $pEC_{50}$ ) und maximaler Ligand-Effekt ( $E_{max}$ ) der aufgeführten Liganden in [ $^{35}$ S]GTP $\gamma$ S Bindungsexperimenten an Membranen von CHO-hM1 Zellen.

	[ $^{35}$ S]GTP $\gamma$ S Bindungsparameter	
<b>Hybride</b>	$pEC_{50} \pm$ S.E.M	$\%E_{max}$ M.W. $\pm$ S.E.M.
Butylkette		
<b>32a-C4</b>	$4.05 \pm 1.33$	$-47 \pm 79$
<b>32e-C4</b>	$8.43 \pm 0.40$	$23 \pm 3$
<b>32f-C4</b>	$9.56 \pm 0.33$	$30 \pm 2$
Hexylkette		
<b>32a-C6</b>	$7.48 \pm 0.37$	$25 \pm 3$
<b>32e-C6</b>	$7.69 \pm 0.23$	$43 \pm 4$
<b>32f-C6</b>	$8.17 \pm 0.21$	$61 \pm 4$
<b>32h-C6</b>	$7.19 \pm 0.29$	$25 \pm 3$

	[ $^{35}$ S]GTP $\gamma$ S Bindungsparameter	
<b>Allostere Bausteine</b>	$pEC_{50} \pm$ S.E.M	$\%E_{max}$ M.W. $\pm$ S.E.M.
Butylkette		
<b>31a-C4</b>	$5.66 \pm 0.35$	$-124 \pm 54$
<b>31e-C4</b>	$9.55 \pm 0.59$	$13 \pm 3$
<b>31f-C4</b>	$9.87 \pm 0.47$	$20 \pm 3$
Hexylkette		
<b>31a-C6</b>	$6.11 \pm 0.34$	$-69 \pm 21$
<b>31e-C6</b>	$6.09 \pm 0.39$	$-65 \pm 21$
<b>31f-C6</b>	$7.96 \pm 0.22$	$74 \pm 11$
-	-	-

Liganden zum Vergleich		
Iperoxo	$7.89 \pm 0.09$	$99 \pm 3$
Atropin	$8.04 \pm 0.34$	$-28 \pm 5$
5-Nitro-isoxazolin	$8.46 \pm 3.53$	$5 \pm 5$

Maximale Effekte wurden normalisiert auf den maximalen Effekt von 100  $\mu$ M Acetylcholin (= 100%), basale Effekte, gemessen in Abwesenheit von Testsubstanz, auf 0%. Die Analyse der Daten erfolgte mit Hilfe einer Vier-Parameter-logistischen Gleichung mit den Kurvenparametern oberes Plateau, unteres Plateau (als Konstante = 0 behandelt),  $EC_{50}$  und dem Steigungsmaß  $n$ . Dargestellt sind M.W.  $\pm$  S.E.M. aus 3-6 unabhängigen Experimenten, die als Dreifachbestimmungen ausgeführt wurden.

### 2.6.3 Ergebnisse

Es konnte eine Synthese für allosterische Modulatoren mit einem Chinolon-Grundgerüst entwickelt werden. Hierbei wurden Derivate hergestellt, die sowohl am Aromat als auch am Stickstoffatom unterschiedliche Substitutionsmuster aufweisen und weiterhin über ein Amid mit Spacern unterschiedlicher Kettenlänge verbunden sind. Einige Chinolon-Iperoxo-Hybride zeigten in ersten Untersuchungen Affinität zum M<sub>1</sub>-Rezeptor.

Hier werden in Zukunft noch einige Untersuchungen durchgeführt, um auf Basis der dadurch erhaltenen Struktur-Wirkungs-Beziehungen gezielt weitere Hybride herstellen zu können.

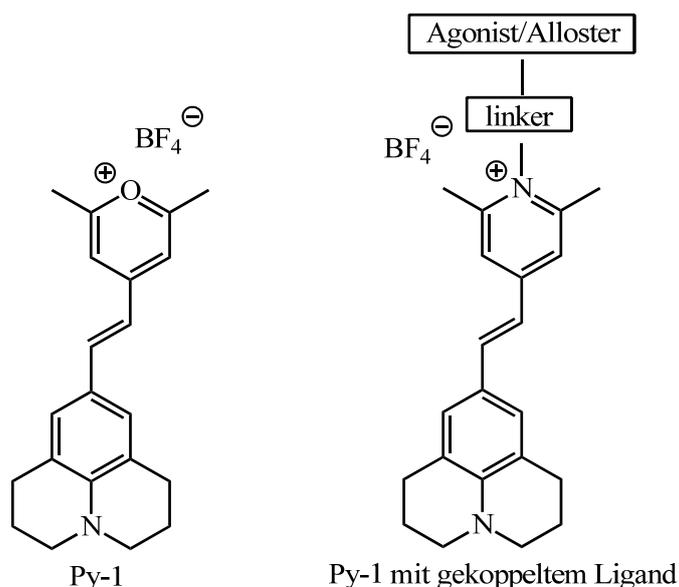
## 2.7 Fluoreszenz-Markierung

Neben den konventionellen Methoden die Affinität von GPCR-Liganden zu untersuchen, wie z. B. Radioligand-Bindungsstudien stellen Techniken, die auf Fluoreszenz basieren, eine gute Alternative dar. Diese haben gerade im Vergleich zu Radioligand-Bindungsstudien den Vorteil, dass keine besonderen Sicherheitsvorkehrungen getroffen werden müssen und weiterhin keine hohen Entsorgungskosten anfallen. Darüber hinaus kann die Fluoreszenzmarkierung eingesetzt werden, wo Radioliganden nicht verwendet werden können. So ist es beispielsweise möglich, multiparametrische Assays durchzuführen, indem Fluoreszenzfarbstoffe kombiniert werden, die bei verschiedenen Wellenlängen emittieren (siehe hierzu auch **Kapitel 2.1.2.1**). Allerdings bringt auch diese Methode Herausforderungen mit sich. Hierbei spielt vor allem die Größe eine entscheidende Rolle, da der meist kleine Ligand mit einem deutlich größeren Farbstoff-Molekül verlinkt werden muss. Darüber hinaus darf die Affinität zum Rezeptor nicht beeinflusst werden.<sup>155</sup>

Es gibt verschiedene Arten einen Liganden mit einem Fluoreszenzmarker zu versehen. Besonders geeignete Bausteine zur Kopplung mit Aminen, die gerade in der medizinischen Chemie eine Rolle spielen, sind Pyrylium-Salze, da sich ein primäres Amin in den Aromat unter Bildung eines Pyridinium-Salzes einbauen kann. Aus diesem Grund wurden Pyrylium-Einheiten mit kleinen aromatischen Einheiten verknüpft, wodurch einer der kleinsten blauen fluoreszierenden Chromophore entstand. Dieser tiefblaue Farbstoff Py-1 gehört zu der neuen Klasse der sogenannten „Chamäleon-Marker“. Diese Bezeichnung geht auf ausgeprägte Veränderung von Farbe und Fluoreszenz zurück, die durch Reaktion mit primären Amino-Gruppen in wässriger Lösung unter Bildung von rot gefärbten Konjugaten auftritt. Derartige Chamäleon-Marker weisen einige Vorteile auf, wie 1) die einfache Synthese, 2) einen deutlich sichtbaren Farbumschlag während der Umsetzung mit einem Amin, 3) den Übergang von einem nicht oder nur schwach fluoreszierenden Farbstoff zu einem stark fluoreszierenden Konjugat aus Farbstoff und Ligand sowie 4) die gleich bleibende Ladung bei Reaktion mit dem Farbstoff, d.h. an dieser Stelle keine signifikante Änderung der Polarität. Derartige Farbstoffe können

auch für die Aufklärung der Bindung eines Liganden an G-Protein gekoppelte Rezeptoren verwendet werden.<sup>156</sup>

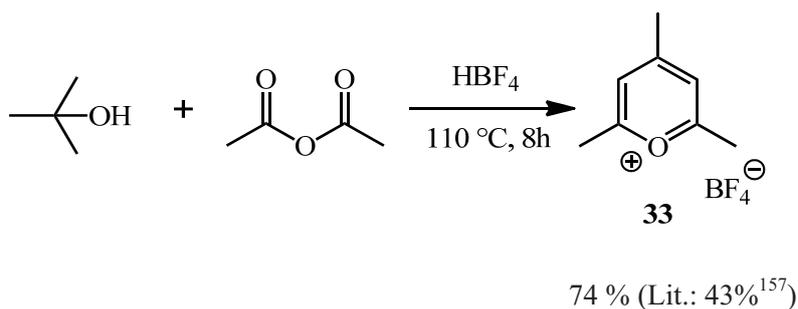
Der folgende Abschnitt beschäftigt sich mit dem etablierten Pyrylium-Farbstoff Py-1 (siehe **Abb. 84**). Zunächst sollte dieser hergestellt, die Synthese optimiert und der Farbstoff anschließend so modifiziert werden, dass sowohl der Agonist Iperoxo, als auch allosterische Modulatoren mit diesem verknüpft werden können.



**Abb. 84:** Fluoreszenzfarbstoff Py-1 und Kopplung mit Alloster/Orthoster

## 2.7.1 Synthese

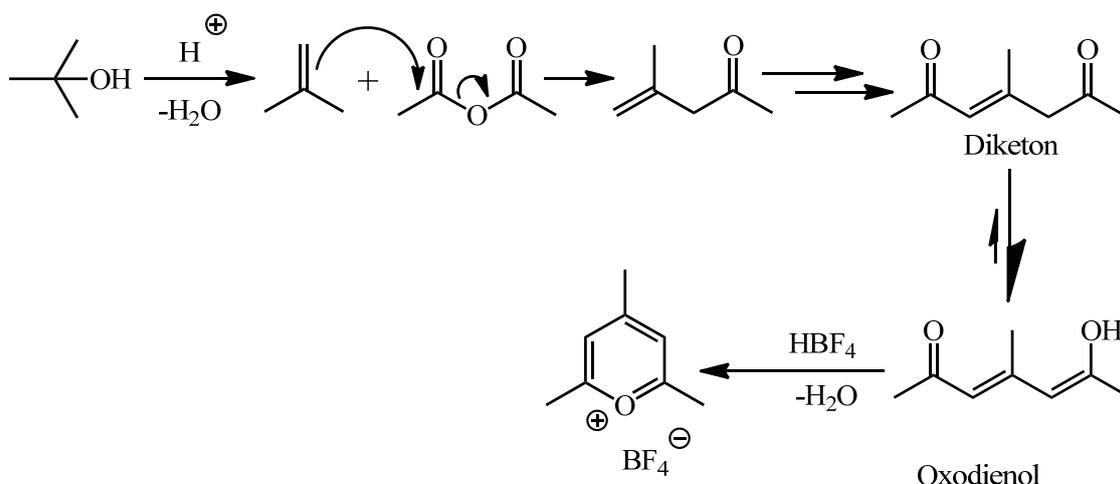
### 2.7.1.1 Synthese von 2,4,6-Trimethylpyrylium-tetrafluorborat



**Abb. 85:** Syntheschema zur Herstellung des 2,4,6-Trimethylpyrylium-tetrafluorborats

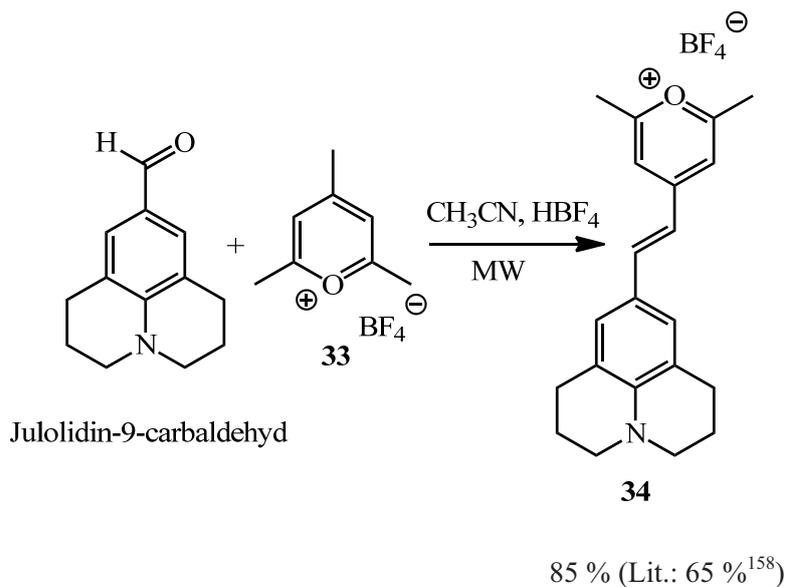
Die Synthese des Farbstoffs Py-1 beginnt mit der Herstellung des 2,4,6-Trimethylpyrylium-tetrafluorborats **33** nach Balaban *et al.*<sup>157</sup> Ein großer Überschuss Essigsäureanhydrid sowie ein Tropfen HBF<sub>4</sub> wurden bei 100 °C zu *tert*-Butanol gegeben und die Mischung für 90 Minuten mikrowellenunterstützt auf 110 °C erhitzt. Die katalytische Menge an Säure bewirkt zunächst die Eliminierung von Wasser unter Bildung von Isobuten. Nach zweifacher Acylierung durch Essigsäureanhydrid entsteht 4-

Methylhept-3-en-2,6-dion, das aufgrund dreier, in Konjugation stehender Doppelbindungen überwiegend in seiner tautomeren Form Oxodienol vorliegt (siehe **Abb. 86**). Die Hydroxyl-Funktion greift in einer intramolekularen Kondensationsreaktion am Carbonylkohlenstoff an. Dabei bildet sich unter Wasserabspaltung der Pirylium-Ring, wobei Tetrafluorborat als Gegenion fungiert. Die Reaktion wurde dünnschichtchromatographisch verfolgt (Kieselgel, EtOAc). Nach Abkühlen des Reaktionsgemisches auf Raumtemperatur wurde die Lösung eingengt und mit 100 ml Diethylether versetzt. Der entstandene Feststoff wurde abfiltriert und aus einem Ethanol/Methanol-Gemisch (1:1) mit einem Tropfen  $\text{HBF}_4$  umkristallisiert. Das Pirylium-Salz wurde als weißes bis leicht gelbes Pulver isoliert, wobei die Ausbeute im Vergleich zu Balaban *et al.*<sup>157</sup> von 43 auf 74 % gesteigert werden konnte.



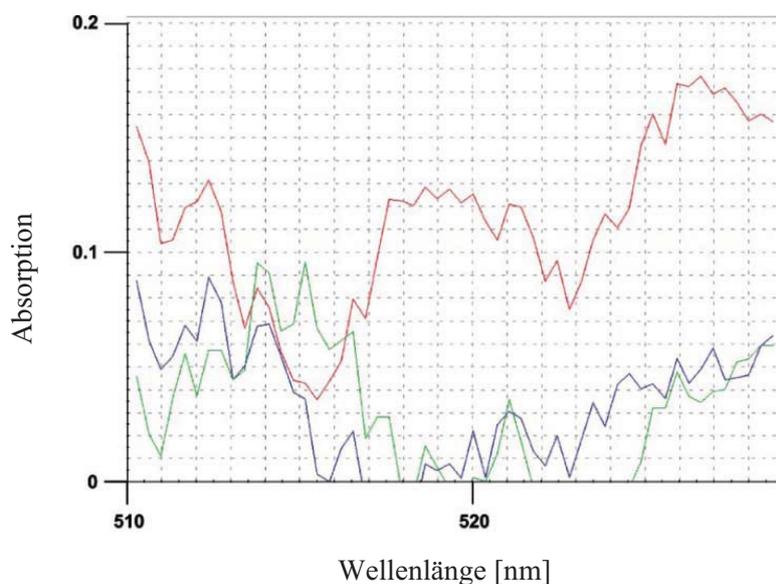
**Abb. 86:** Mechanismus der Bildung des Pirylium-Salzes

### 2.7.1.2 Synthese von Py-1



**Abb. 87:** Syntheschema der Reaktion zu Py-1

Um den Farbstoff Py-1 (**34**) herzustellen, wurde 2,4,6-Trimethylpyrylium-tetrafluorborat **33** mit 0.9 Äquivalenten Julolidin-9-carbaldehyd und einem Tropfen Tetrafluorborsäure in Acetonitril gelöst und anschließend im Glasgefäß mikrowellenunterstützt auf 100 °C erhitzt, wobei sofort eine tiefblaue Färbung erkennbar war. Die Reaktionskontrolle erfolgte UV-spektroskopisch im Bereich von 300-600 nm (siehe **Abb. 88**). Klassisch wurde diese Synthese von Höfelschweiger beschrieben und lieferte in 10-minütiger Reaktionszeit eine Ausbeute von 65 %.<sup>158</sup> Durch Einsatz von Mikrowellen sowie durch Verwendung eines UV-Sensors konnte gezeigt werden, dass die Reaktion bereits nach 5 Minuten abgeschlossen war (siehe Absorptionsdiagramm). Des Weiteren konnte die Ausbeute auf 85 % gesteigert werden.



**Abb. 88:** Absorptionsspektrum nach 0 Min (rot), 3 Min (blau) und 5 Min (grün).

Nach beendeter Reaktion wurde der Ansatz auf Raumtemperatur abgekühlt und das Lösungsmittel entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch gereinigt (Kieselgel, Chloroform / Methanol). Hierbei wurden zunächst Nebenprodukte mit Chloroform eluiert, das Hauptprodukt **34** (erkennbar an der tiefblauen Farbe) wurde schließlich mit einer Fließmittelmischung aus Chloroform und Methanol im Verhältnis 9:1 erhalten. Im Einklang zu Höfelschweiger zeigte sich, dass das Produkt in Lösung nicht stabil ist.<sup>158</sup> Dies ist an der grün-Verfärbung der Lösungen erkennbar. Zur Identifikation der Zersetzungsprodukte wurden diese NMR-spektroskopisch untersucht, konnten aber aufgrund von sehr vielen Verbindungen nicht charakterisiert werden.

## 2.7.1.3 Einführen des Spacers

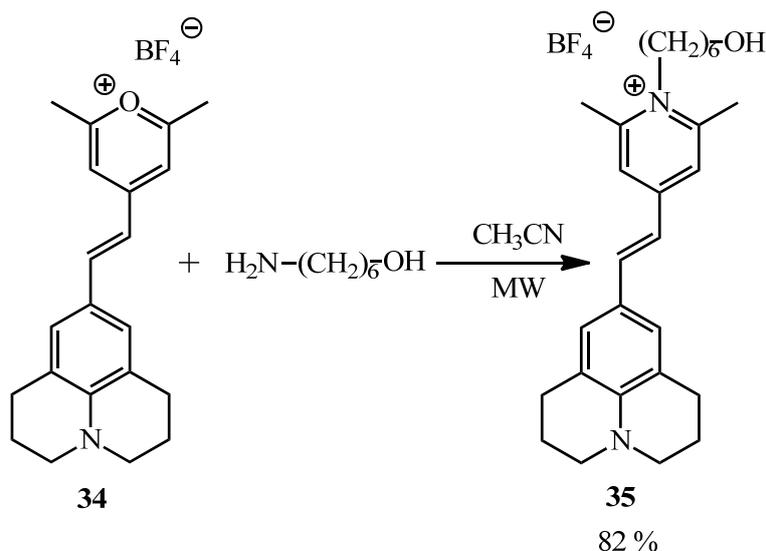


Abb. 89: Syntheschema zur Umsetzung des Farbstoffs Py-1 mit Aminohexanol

Um **34** mit einem Agonisten oder einem Alloster umsetzen zu können, musste der Farbstoff zunächst mit einem Spacer umgesetzt werden. Hierzu wurde die Tatsache genutzt, dass Pyrylium-Salze unter milden Bedingungen spezifisch mit primären Aminen reagieren, wobei ein Pyridinium-Ion gebildet wird. Diese Reaktion ist mechanistisch vollständig aufgeklärt.

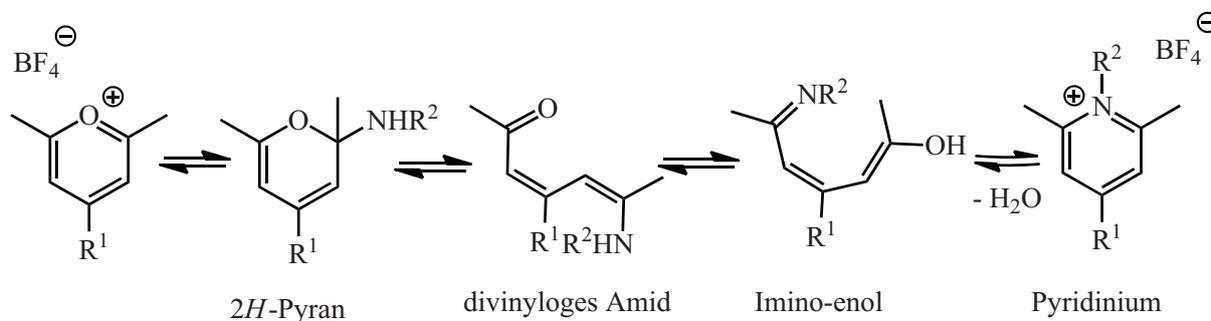
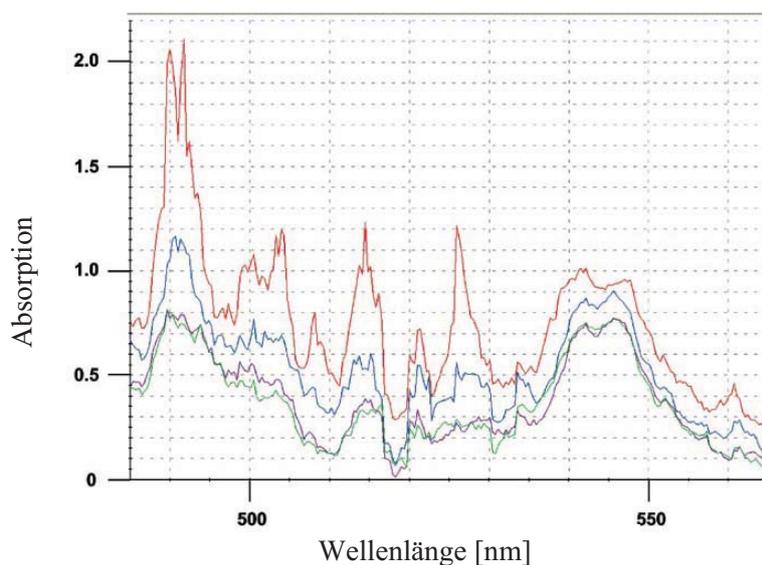


Abb. 90: Mechanismus der Reaktion von Pyrylium-Verbindungen mit primären Aminen<sup>159</sup>

Das Amin addiert sich hierbei in Position 2 bzw. 6 zum 2H-Pyran. Aufgrund der relativen Kurzlebigkeit dieses Intermediats kommt es zur spontanen Ringöffnung und es bildet sich ein divinyloges Amid, das wiederum zum Iminoenol tautomerisiert. Schließlich bildet sich der Ring zum Pyridinium unter Wasserabspaltung (siehe **Abb. 90**).<sup>159</sup>

Diese Reaktion wurde durchgeführt, indem Py-1 und 1-Amino-6-hexanol in Acetonitril gelöst und mikrowellenunterstützt im Glasgefäß innerhalb von 3 Minuten auf 100 °C erhitzt wurden. Auch hier konnte die Reaktionskontrolle mittels UV-Detektion durchgeführt werden. Anhand des Absorptionsspektrums wurde das Reaktionsende nach 8 Minuten festgestellt (siehe **Abb. 91**).

Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurde das Lösungsmittel entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch gereinigt (Kieselgel). Hierzu wurden zunächst die Nebenprodukte mit Chloroform und anschließend das Produkt **35** mit einem Gemisch aus Chloroform und Methanol ( $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$  25:1,  $R_f = 0.41$ ) eluiert, welches als tiefroter Feststoff erhalten wurde.

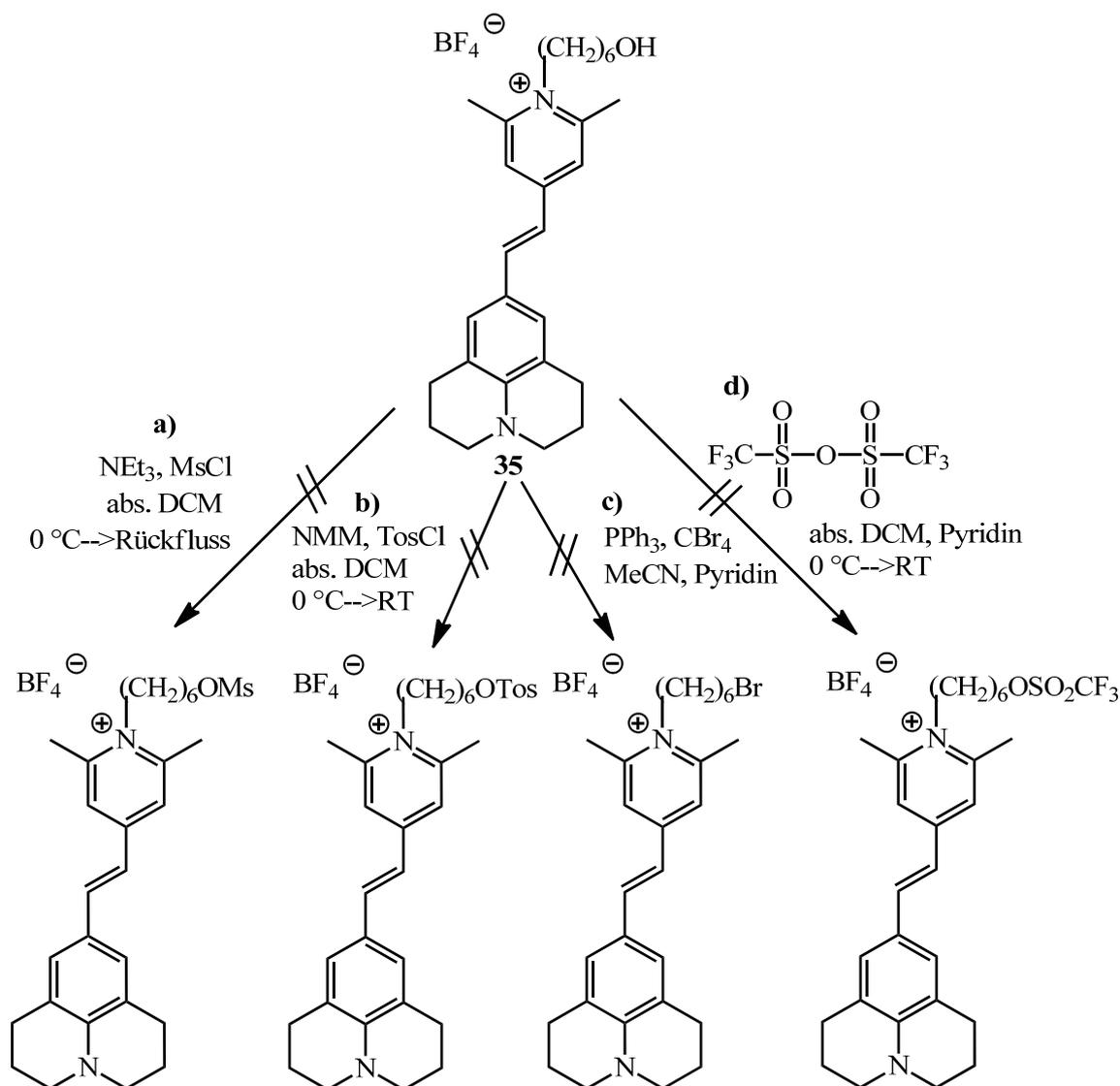


**Abb. 91:** Absorptionsspektrum nach 0 Min (rot), 3 Min (blau), 5 Min (violett) und 8 Min (grün).

#### 2.7.1.4 Versuche zur Umsetzung von **35**

Um den Farbstoff **35** mit Iperoxo verknüpfen zu können, wird bei einer der beiden Verbindungen ein Nukleophil, im anderen Molekül eine Abgangsgruppe benötigt. Da Iperoxo-Base als tertiäres Amin bereits ein Nukleophil darstellt, sollte der Farbstoff so umgesetzt werden, dass er eine Abgangsgruppe birgt. Hierzu muss die Hydroxylfunktion zunächst in eine bessere Abgangsgruppe überführt werden. Dies wurde auf unterschiedlichen Wegen versucht (siehe **Abb. 92**)

a) Zu Beginn wurde eine Mesylierung durchgeführt. Hierzu wurde der rote Farbstoff **35** unter Argonatmosphäre in abs. Dichlormethan gelöst und auf 0 °C gekühlt. Es wurden Methansulfonsäurechlorid ( $\text{MsCl}$ ) sowie Triethylamin zugegeben. Die Reaktionskontrolle wurde dünnschichtchromatographisch durchgeführt ( $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ , 2:1, Anfärbereagenz: Kaliumpermanganat). Da sich nach 2 Tagen Rühren bei Raumtemperatur keine ausreichende Umsetzung erkennen ließ, wurden erneut Triethylamin und  $\text{MsCl}$  zugegeben. Nach weiteren 24 Stunden ohne Umsetzung wurde die Mischung für 4 Stunden unter Rückfluss erhitzt. Im Anschluss wurde die Mischung auf Wasser geschüttet, 2N Salzsäure zugegeben und mit Dichlormethan extrahiert. Der Farbstoff wurde versucht säulenchromatographisch zu reinigen, das erwartete Produkt konnte jedoch nicht isoliert werden.

Abb. 92: Syntheschema zur Umsetzung von **35**

b) Um eine Tosylierung durchzuführen, wurde **35** in abs. Dichlormethan vorgelegt und die Lösung auf  $0\text{ }^\circ\text{C}$  gekühlt. Es wurden N-Methylmorpholin sowie p-Toluolsulfonsäurechlorid zugegeben und eine halbe Stunde bei  $0\text{ }^\circ\text{C}$  gerührt. Anschließend wurde die Reaktion auf Raumtemperatur erwärmt und 24 Stunden gerührt. Die dünnschichtchromatographische Reaktionskontrolle (Kieselgel,  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ , 1:2) zeigte den roten Edukt-Fleck, der mit der Fließmittelfront mitlief und einen weiteren, gelben Fleck, mit einem  $R_f$ -Wert von 0.03. Es zeigte sich jedoch, dass sich auch der rote Fleck mit der Zeit gelb verfärbte, was darauf schließen lässt, dass es sich bei diesem um ein Abbauprodukt handelt. Es wurde dennoch eine Säulenchromatographie durchgeführt (Kieselgel,  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ , 1:2), ein Produkt konnte allerdings nicht isoliert werden.

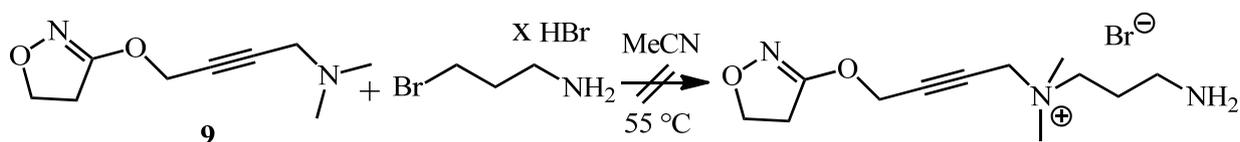
c) Mittels einer Appel-Reaktion sollte die Hydroxyl-Gruppe durch ein Bromid ausgetauscht werden. Hierzu wurde **35** in Anlehnung an Barros *et al.*<sup>154</sup> in abs. Acetonitril gelöst, Triphenylphosphin, Tetrabromkohlenstoff, sowie Pyridin zugegeben und die Mischung bei Raumtemperatur gerührt. Hier-

bei zeigte sich zunächst eine hellorange Färbung der Lösung (bei Zugabe des Tetrabromkohlenstoffs), bei Zugabe von Pyridin erneut ein Farbumschwung zu dunkelrot. Es wurde 24 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionskontrolle mittels Dünnschichtchromatographie (Kieselgel, MeOH/CHCl<sub>3</sub>, 2:1) zeigte zwei getrennte Flecken,  $R_{f1}=0.85$  und  $R_{f2}=0.02$ . Durch säulenchromatographische Reinigung konnte allerdings keine vollständige Trennung der beiden Substanzen erreicht werden. Die <sup>1</sup>H-NMR-spektroskopische Analyse der Mischfraktionen zeigte nicht die Zielverbindung.

d) Eine weitere mögliche Aktivierung eines Alkohols erfolgt über die Bildung eines Triflats. Hierzu wurde der Farbstoff **35** in abs. Dichlormethan gelöst, die Lösung auf 0 °C gekühlt, Pyridin sowie Trifluormethansulfonsäureanhydrid zugegeben, die Mischung langsam auf Raumtemperatur erwärmt und 24 Stunden gerührt. Es wurde auf Wasser gegossen und mit Dichlormethan extrahiert. Der erhaltene rot-braune Feststoff wies viele Verunreinigungen im Dünnschichtchromatogramm auf, die auch mit einer säulenchromatographischen Reinigung nicht abtrennbar waren.

Zur Überführung der Hydroxylgruppe in eine Abgangsgruppe wäre darüber hinaus die Umsetzung mit PBr<sub>3</sub> denkbar. Diese Variante sollte in künftigen Versuchen auf diesem Gebiet untersucht werden.

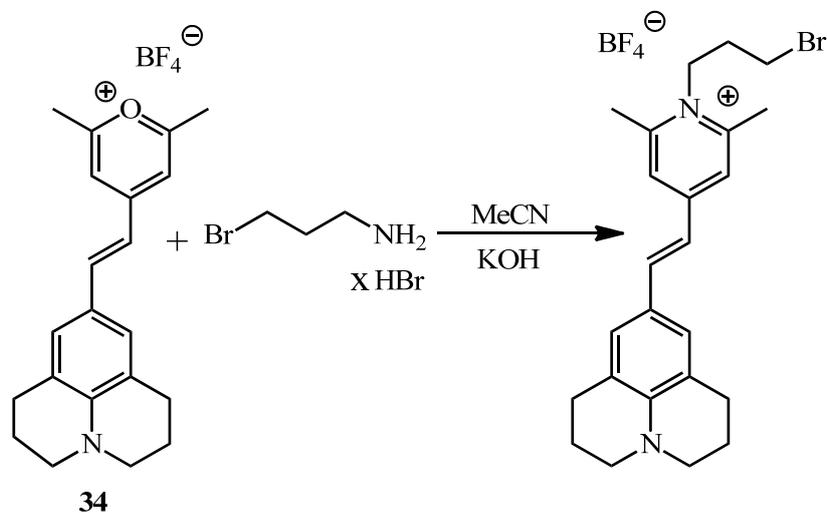
Da die Versuche, die Hydroxyl-Funktion im funktionalisierten Farbstoff-Molekül **35** in eine gute Abgangsgruppe zu überführen, scheiterten, wurde ein alternativer Weg gesucht. Hierzu sollte der Agonist, der mit dem Farbstoff markiert werden sollte, hier Iperoxo, so umgesetzt werden, dass er zum einen bereits eine Alkyl-Kette als Spacer aufweist und zum anderen ein primäres Amin trägt, das sich nach dem oben beschriebenen Mechanismus in den Pyrylium-Ring einbauen kann (siehe **Abb. 93**).



**Abb. 93:** Syntheschema zur Umsetzung von Iperoxo-Base mit 3-Brompropylamin-Hydrobromid

Iperoxo-Base **9** wurde in einem Acetonitril-Chloroform-Gemisch im Verhältnis 5:1 vorgelegt und 3 Äquivalente 3-Brompropylamin-Hydrobromid sowie eine katalytische Menge KI/K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> zugegeben und die Mischung im Glasbombenrohr bei 55 °C gerührt. Nach einer Woche bildete sich in der gelben überstehenden Lösung ein rotbraunes Öl. Es wurde dekantiert, das Öl in Methanol aufgenommen und versucht mit Diethylether auszufällen. Es wurde 24 Stunden bei 4 °C gelagert und der entstandene Feststoff abfiltriert. Dabei bildete sich wiederum ein Öl, das sich auch durch Umkristallisieren mit Ethanol und Methanol nicht reinigen ließ. Die Reaktion wurde erneut bei einer Temperatur von 65 °C durchgeführt, doch auch hier konnte die Zielverbindung nicht dargestellt werden.

Da sich Iperoxo-Base **9** nicht mit 3-Brompropylamin umsetzen ließ, wurde versucht Py-1 mit diesem Amin umzusetzen, um somit ein Farbstoff-Molekül zu erhalten, das bereits einen Spacer sowie eine Abgangsgruppe trägt (siehe **Abb. 94**).



**Abb. 94:** Umsetzung von Py-1 mit 3-Brompropylamin-Hydrobromid

Zu Beginn wurde aus 3-Brompropylamin-Hydrochlorid die freie Base isoliert. Hierzu wurde das Salz in dem. Wasser gelöst, der pH-Wert der Lösung mittels 1 M Natriumhydroxid-Lösung auf 11 eingestellt und mit Dichlormethan extrahiert. Nach Trocknen der organischen Phase über Magnesiumsulfat wurde das Lösungsmittel entfernt. Es konnte lediglich eine stark verunreinigte freie Base erhalten werden. Aus diesem Grund wurde die folgende Umsetzung mit dem Hydrobromid durchgeführt. Py-1 wurde in Acetonitril gelöst und 3 Äquivalente 3-Brompropylamin-Hydrobromid zugegeben. Da keine Farbveränderung erkennbar war, die auf die Bildung des Pyridinium-Ions schließen lassen könnte, wurden 3 Tropfen 2 M Kaliumhydroxid-Lösung zugetropft. Bereits nach wenigen Minuten zeigte sich ein Farbumschwung von blau nach violett und schließlich zu rot. Die dünnschichtchromatographische Reaktionskontrolle (Kieselgel, n-Butanol/Wasser/Eisessig 70:15:15) zeigte einige Verbindungen, weshalb eine Reinigung mittels Säulenchromatographie durchgeführt wurde. Die erhaltenen Fraktionen zeigten allerdings ein Gemisch aus einer gelben ( $R_f = 0.72$ ) und einer roten Verbindung ( $R_f = 0.55$ ), bei der es sich um die Zielverbindung handelte. NMR-spektroskopische Untersuchungen zeigten ebenfalls, dass das Produkt entstanden war, allerdings war die Reinheit nicht zufriedenstellend. Aufgrund der geringen Menge konnte keine weitere Reinigung vorgenommen werden, weshalb ein neuer Versuch mit vierfacher Ansatzgröße durchgeführt wurde. Da auch hierbei die säulenchromatographische Reinigung verunreinigtes Produkt lieferte wurde der erhaltene rote, leicht ölige Feststoff zunächst mit Diethylether gewaschen. Da auch dies keine zufriedenstellende Reinigung bewirkte, wurde erneut eine Säulenchromatographie unter gleichen Bedingungen, jedoch mit einer verdoppelten Säulenhöhe durchgeführt. Die dabei erhaltene Fraktion war erneut verunreinigt, wurde zunächst mit Dichlormethan gewaschen und aus Methanol umkristallisiert. Da auch dies nicht zum Ziel führte,

wurde erneut eine Säulenchromatographie durchgeführt, jedoch mit variiertem Fließmittelgemisch (Kieselgel, CHCl<sub>3</sub>/MeOH 2:1). Zwar konnte mit diesem Schritt eine deutliche Verbesserung der Reinheit erzielt werden, es waren jedoch noch immer Verunreinigungen erkennbar, so dass nach einer optimierten Reinigungsmethode gesucht werden muss.

### 2.7.2 Ergebnisse

Der Farbstoff Py-1 konnte erfolgreich synthetisiert werden und die Synthese mithilfe von UV/Vis-Detektion mikrowellenunterstützt optimiert werden. Die Umsetzung des Farbstoffes mit 1-Amino-6-hexanol lieferte einen tief-roten Farbstoff **35** in zufriedenstellenden Ausbeuten. Die Überführung der Hydroxyl-Funktion in eine gute Abgangsgruppe gelang weder durch Bildung eines Mesylats, Tosylats oder Triflats noch mit Hilfe einer Appel-Reaktion. Eine neue Strategie, die eine Umsetzung des Agonisten beinhaltete, der schließlich mit dem Farbstoff verknüpft werden sollte, führte ebenfalls nicht zur Zielverbindung. Schließlich konnte durch Umsetzung des Farbstoffs Py-1 mit 3-Brompropylamin-Hydrobromid die Bildung des Produktes erwirkt, bislang jedoch keine geeignete Reinigungsmethode entwickelt werden. Da dieser Syntheseschritt am vielversprechendsten ist, sollten auf diesem Gebiet weitere Versuche durchgeführt werden.

### 3 Zusammenfassung

Die Subtypselektivität von Liganden für einzelne Rezeptoren, deren Aktivierung und die anschließende Signalweiterleitung sind bis heute weitestgehend ungeklärt. Die hier synthetisierten Liganden-Gruppen sollen helfen, die verschiedenen Prozesse am muskarinischen Rezeptor und seinen Subtypen zu verstehen. Die Einzelprojekte werden im Folgenden vorgestellt.

1) Um mittels FRET-Mikroskopie den Einfluss von allosteren Modulatoren, die sich von W84 bzw. Naphmethonium ableiten, in Bezug auf die Konformationsänderung aktivierter Rezeptoren untersuchen zu können, wurden die bekannten allosteren Bausteine sowie eine Reihe neuer Derivate synthetisiert. Alle untersuchten Substanzen zeigten einen hemmenden Effekt auf die mit dem Agonisten Iperoxo vorstimulierten Rezeptoren. Das heißt, die Verbindungen ließen sich als negative allosterische Modulatoren charakterisieren.

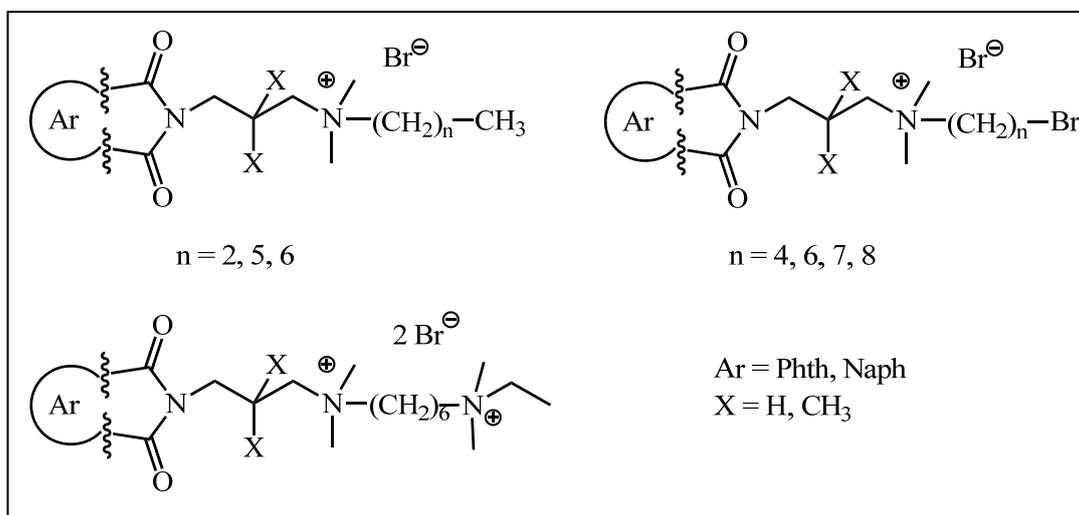


Abb. 95: Synthetisierte allosterische Modulatoren

2) Da Iperoxo aufgrund seiner großen agonistischen Aktivität ein interessantes Werkzeug für die Grundlagenforschung darstellt, war es von großer Bedeutung, eine schnelle und reproduzierbare Synthese zu gewährleisten. Ausgehend von Propargylalkohol wurde in einer Mannich-Reaktion 4-Dimethylamino-but-2-en-1-ol **10** gebildet, was mit dem zuvor hergestellten 3-Nitro- $\Delta^2$ -isoxazolin **6** zur Iperoxo-Base **9** umgesetzt wurde. Neben einer deutlichen Ausbeutesteigerung ist nun die Reproduzierbarkeit im Gegensatz zu der von Dallanoce *et al.*<sup>109</sup> publizierten Synthese gewährleistet.

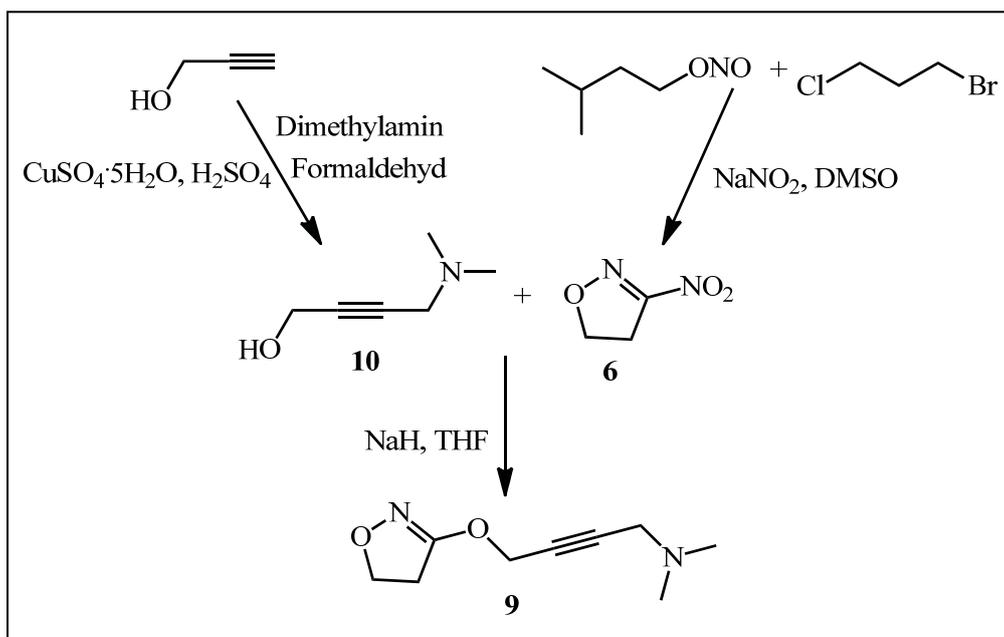


Abb. 96: Syntheschema zur Herstellung von Iperoxo-Base

3) Um den Einfluss der Kettenlänge der Hybride Iper-6-Phth und Iper-6-Naph auf die agonistische Aktivität und Subtypselektivität der Substanzen untersuchen zu können, wurde versucht, Hybride verschiedener Kettenlängen herzustellen. Dabei konnte Iper-4-Phth erhalten werden.

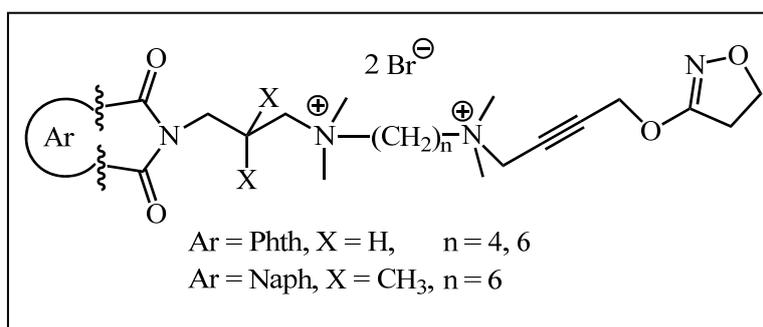


Abb. 97: Strukturformeln der synthetisierten Hybride

4) Weiterhin sollte der Einfluss der Alkylkette am Stickstoff-Atom auf die Wirksamkeit in Bezug auf Affinität und Zellantwort des Iperoxo-Moleküls ohne allosteren Modulator analysiert werden. Hierzu wurden die N-alkylierten Iperoxo-Derivate mit den Kettenlängen C2 bis C10 synthetisiert (siehe Abb. 98).

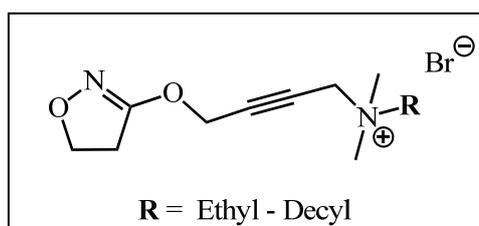


Abb. 98: Synthetisierte N-alkylierte Iperoxo-Derivate

Mithilfe von Radioligand-Bindungsstudien und der dynamischen Massenumverteilung sollte die konformative Änderung des Rezeptors durch Aktivierung und die Signalweiterleitung untersucht werden. Durch Verlängerung der N-Alkylkette zeigte sich ein Wirksamkeitsverlust, d. h. die Dosis-Wirkungs-Kurven der prozentualen Zellantwort wurden im Vergleich zu denen des Iperoxos nach rechts verschoben. In Untersuchungen an der Rezeptor-Mutante CHO-hM<sub>2</sub>-Y104<sup>3,33</sup>A zeigte sich zudem, dass für den maximalen Effekt eine deutlich höhere Konzentration der Iperoxo-Derivate benötigt wird, wobei dieser Wirksamkeitsverlust im Vergleich zum Rezeptor-Wildtyp für Iperoxo selbst am stärksten ausgeprägt ist. Allerdings weisen Iperoxo und seine N-alkylierten Derivate an dieser Mutante eine höhere intrinsische Aktivität auf als die Kontrollverbindungen Oxotremorin M, C1-IP-C1 und Acetylcholin.

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass Iperoxo ebenso wie Oxotremorin, Acetylcholin, aber auch die kurzkettigen Iperoxo-Derivate neben dem G<sub>i</sub>-Signalweg auch den G<sub>s</sub>-Weg aktivieren können, wohingegen die langkettigen Derivate eine G<sub>i</sub>-Signalwegs-Selektivität aufweisen.

5) In Analogie zu den N-alkylierten-Iperoxo-Derivaten sollten Untersuchungen mit den Antagonisten N-Alkyl-Atropin und -Scopolamin durchgeführt werden. In beiden Fällen zeigte das N-Methyl-Derivat eine höhere Affinität zum Rezeptor als der jeweilige Antagonist selbst, was auf die durch Alkylierung generierte positive Ladung zurückzuführen ist. Durch Verlängerung der Alkylketten ist jeweils eine Abnahme der Affinität zu beobachten. Die Affinität findet ebenfalls in beiden Fällen mit dem Butyl-Derivat ihr Minimum. Der anfängliche Affinitätsverlust lässt sich durch die zunehmende sterische Hinderung des Moleküls erklären, der spätere Anstieg bei einer Alkylkette länger als C4 deutet auf eine Wechselwirkung dieser langen Alkylkette mit einer weiteren (allosteren) Bindungsstelle hin.

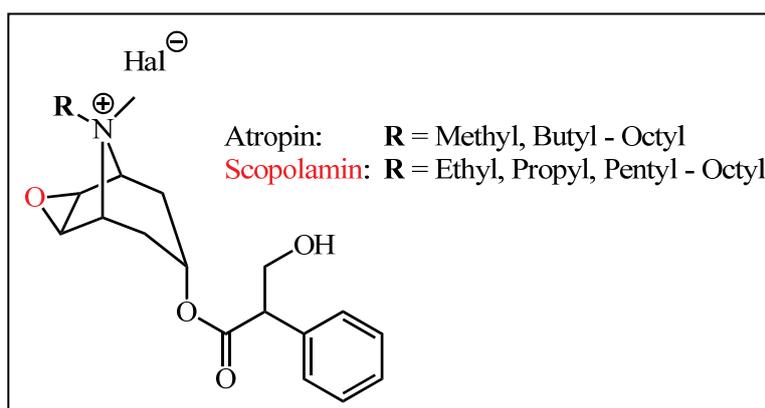


Abb. 99: Synthetisierte N-alkylierten Antagonisten

Da für die räumliche Anordnung der Liganden in einer Bindungstasche die genaue Konformation des Moleküls entscheidend ist, wurden die Antagonist-Derivate NMR-spektroskopisch untersucht, um mithilfe des NOE-Effekts die Konfiguration am Stickstoff-Atom, d. h. die Stellung der Alkylkette,

feststellen zu können. Anders als zunächst erwartet, liegen in allen hier hergestellten Derivaten die Methylgruppen in axialer und die Alkylketten in äquatorialer Lage vor.

6) Ausgehend von Iperoxo sollten dualstere Liganden entwickelt werden, die durch geeignete allosterische Modulatoren selektiv nur einen Rezeptor-Subtyp adressieren und diesen durch Iperoxo aktivieren sollten. Hier fiel die Wahl zunächst auf die von Esteban *et al.*<sup>132</sup> als selektive allosterische Modulatoren des M<sub>4</sub>-Rezeptors beschriebene Substanzklasse der Thienopyridine. Einige Vorstufen des Thienopyridin-Grundgerüsts konnten hergestellt sowie eine Stufe durch mikrowellenunterstützte Synthese unter Anwendung von Echtzeit-UV/Vis-Kontrolle optimiert werden. Da jedoch das Einführen eines Spacers in die Vorstufe 2,4,6-Dihydroxy-4-methylnicotinnitril nicht gelang, konnte der Thienopyridin-Grundkörper nicht vollständig aufgebaut werden und somit keine Verknüpfung mit Iperoxo erfolgen.

7) Ein weiterer Ansatz zur Herstellung dualsterer Liganden befasste sich mit den von Kuduk *et al.*<sup>144</sup> als selektive allosterische Modulatoren des M<sub>1</sub>-Rezeptors beschriebenen 1-Benzyl-4-oxo-1,4-dihydrochinolin-3-carbonsäuren. Hierfür wurde ausgehend von verschiedenen substituierten Anilin-Derivaten das Chinolon-Grundgerüst aufgebaut, ein Benzyl- bzw. Methylene-pyridin-Rest und schließlich Spacer mit verschiedenen Kettenlängen eingeführt. Abschließend wurden die Chinolon-Derivate mit der Iperoxo-Base umgesetzt. Ergebnisse der ersten pharmakologischen Untersuchung zeigten, dass die Hybride tatsächlich an den M<sub>1</sub>-Rezeptor binden. Allerdings deuten einige Ergebnisse auf eine Aktivierung des G<sub>i</sub>-Signalwegs hin, was im Widerspruch zu der von M<sub>1</sub>-Rezeptoren bevorzugten G<sub>q</sub>-Kopplung steht. Diese Befunde ebenso wie die Selektivität der Substanzen zum M<sub>1</sub>-Rezeptor müssen in weiterführenden Studien überprüft werden.

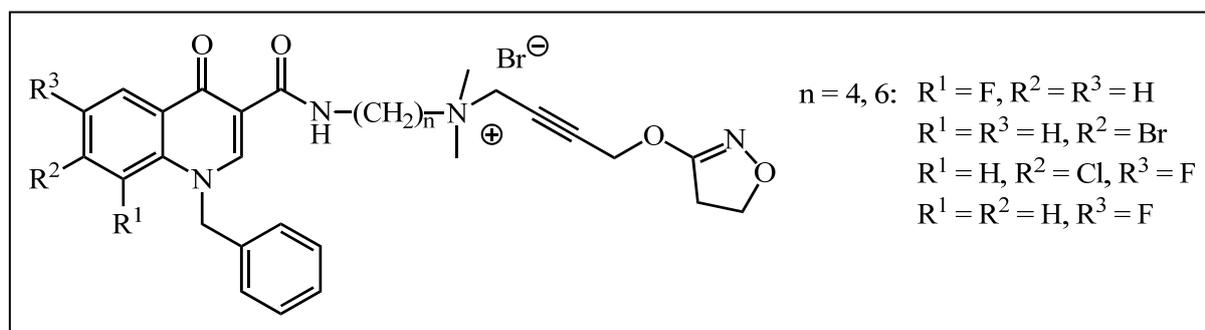


Abb. 100: Synthetisierte Iperoxo-Chinolon-Hybride

8) Neben Radioligand-Bindungsstudien stellen Fluoreszenzmarkierungen eine Alternative dar, die Affinität von GPCR-Liganden zu untersuchen. Hierfür sollte Iperoxo mit dem Fluoreszenzmarker Py-1 gekoppelt werden. Die Herstellung des Farbstoffs gelang, wobei die Synthese hinsichtlich Ausbeute und Zeitersparnis mikrowellenunterstützt unter Verwendung eines UV/Vis-Sensors optimiert werden konnte. Darüber hinaus konnte ein Spacer in das Farbstoffmolekül eingeführt werden. Verschiedene Versuche den Farbstoff so umzusetzen, dass er mit Iperoxo gekoppelt werden kann, scheiterten jedoch.

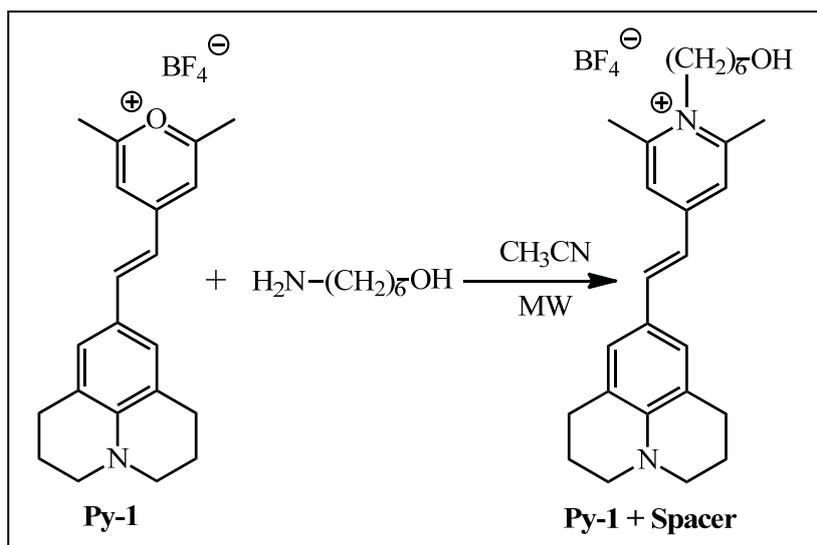
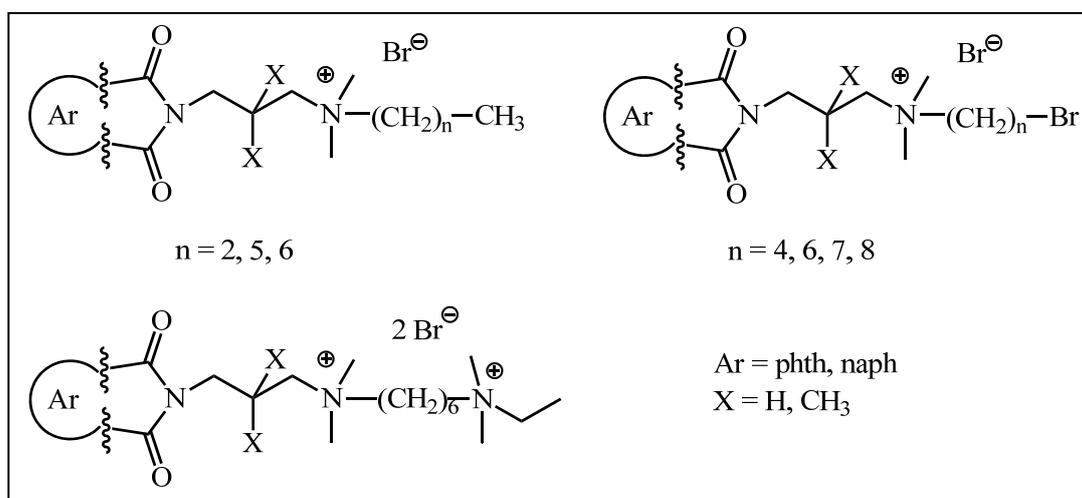


Abb. 101: Strukturformeln des Farbstoffs Py-1 und Py-1 mit verknüpftem Spacer

## 4 Summary

The subtype-selectivity of ligands for receptors and the corresponding subtypes, their activation and the subsequent signalling is still largely unknown. The synthesized groups of ligands, described here were designed to understand the various processes at the muscarinic receptor subtypes. The single projects will be discussed below.

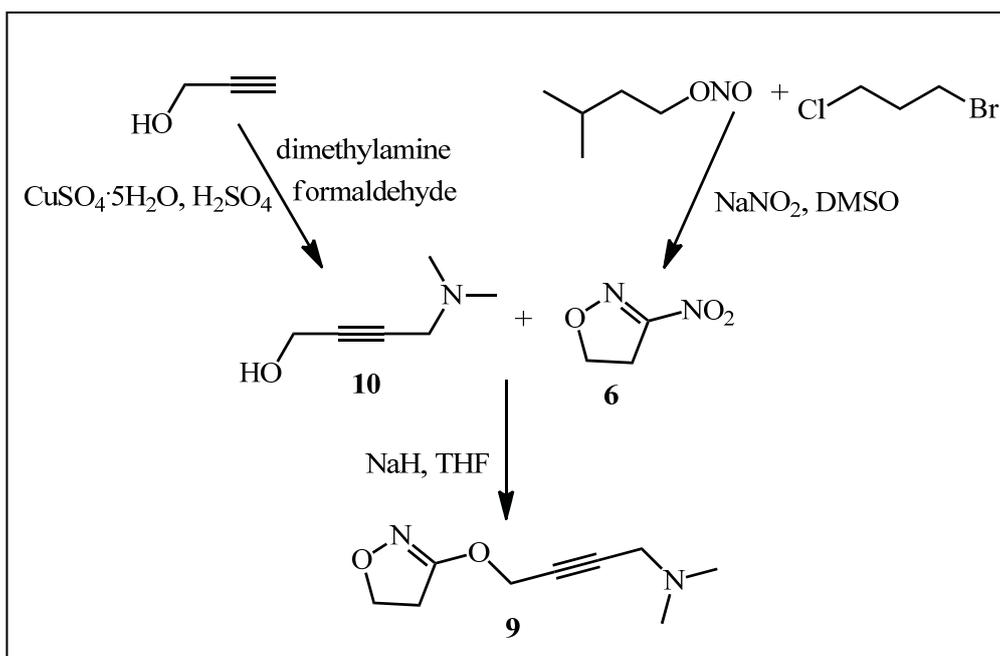
1) In order to examine the influence of allosteric modulators derived from W84 and Naphmethonium on the conformation of an activated receptor by means of FRET-microscopy, the allosteric building blocks were synthesized.



**Abb. 102:** Structure of the synthesized allosteric modulators

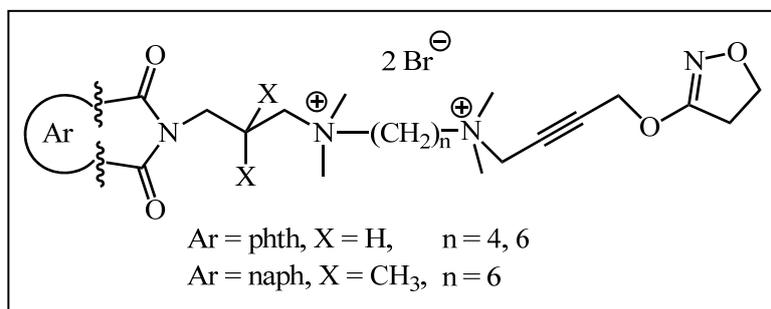
All substances showed an inhibitory effect on the receptors pre-treated with the agonist iperoxo. That is to say that they behave as negative allosteric modulators.

2) Due to its high potency iperoxo is an important tool for basic research. In the past the availability of this compound was limited because of the elaborate chromatography and low reproducibility of the existing synthesis developed by Dallanoce *et al.*<sup>109</sup> Thus a new synthesis pathway was established. By means of a Mannich reaction and using 2-propyn-1-ol alcohol as a starting material the amino-butanol **10** was obtained. Product **10** was converted to iperoxo-base **9** by the reaction with 3-nitro- $\Delta^2$ -isoxazolin **6** (see **Abb. 103**). Besides reducing the reaction time and increasing the overall yield - compared to the known synthesis of Dallanoce *et al.*<sup>109</sup> - the reproducibility was now ensured.



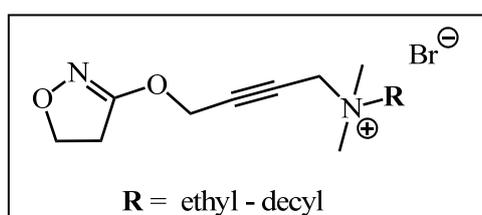
**Abb. 103:** New synthesis pathway to iperoxo-base

3) To investigate the influence of the chain-length in the hybrid compounds iper-6-phth and iper-6-naph on the agonistic activity and the subtype-selectivity, efforts were made to develop derivatives with different N-alkyl-chains. The synthesis of iper-4-phth was successful.



**Abb. 104:** Structure of the synthesized hybrid-compounds

4) Furthermore the influence of the N-alkyl-chain-length on the potency of iperoxo having no allosteric building block was to be examined. Therefore the iperoxo-base was N-alkylated with different bromoalkanes (ethyl-decyl).

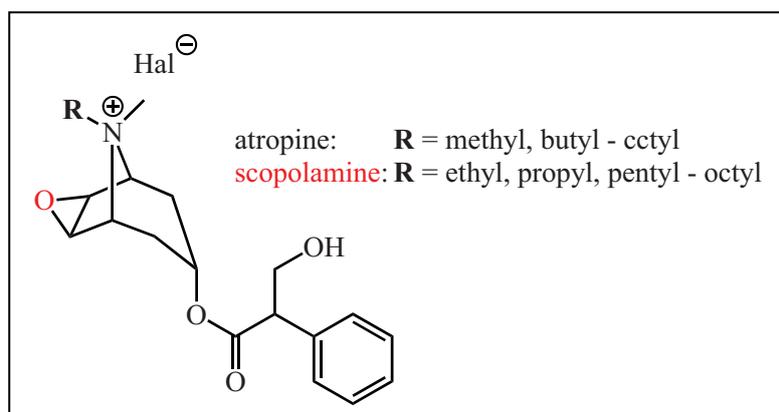


**Abb. 105:** Synthesized N-alkylated iperoxo-derivatives

It was aimed to study the change of the conformation on receptor activation and signalling by means of radioligand binding studies und dynamic mass redistribution. The elongation of the N-alkyl-chain length resulted in a loss of potency compared to iperoxo. All iperoxo derivatives lose potency at the CHO-hM<sub>2</sub>-Y104<sup>3,33</sup>A-receptor-mutant compared to the receptor wildtype, which was especially pronounced with iperoxo itself. However, for this receptor-mutant iperoxo and its N-alkylated derivatives had a higher intrinsic activity than the control compounds oxotremorine-M, C1-IP-C1 and acetylcholine.

Beyond this, it could be demonstrated that iperoxo, as well as oxotremorine M, acetylcholine and the short-chain derivatives have the ability to activate not only the G<sub>i</sub>-, but also the G<sub>s</sub>-signal-pathway, whereas the long-chain derivatives show selectivity for the G<sub>i</sub>-pathway.

5) In analogy to these agonistic derivatives the antagonists atropine and scopolamine were N-alkylated. In both cases radioligand binding studies revealed that the methyl derivatives had a higher affinity to the receptor than both antagonists themselves. This might be caused by the generated positively charged nitrogen atom. The extension of the chain length leads to a loss of affinity, which has a minimum at the butyl-derivatives in both antagonists. The initial loss of affinity is ascribed to the steric hindrance and the subsequent gain of affinity for derivatives with a longer chain length indicates an interaction of this alkyl-chain with a second (allosteric) binding-site.



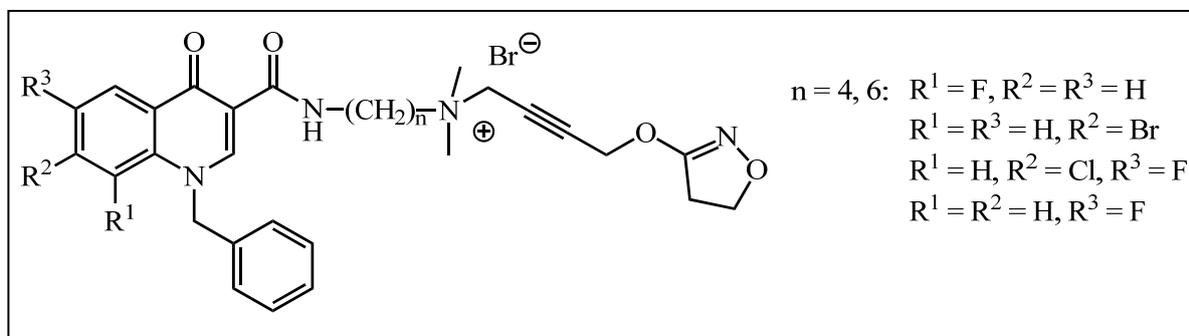
**Abb. 106:** Synthesized N-alkylated antagonist-derivatives

For the special arrangement in the binding pocket it is essential to know the exact configuration of the ligand. The synthesized N-alkylated antagonists were examined via NMR-spectroscopy. By using the NOE-effect, the position of the methyl-groups and the alkyl-chains, respectively, were revealed. Contrary to expectations all derivatives bear their methyl-group in axial position.

6) On the basis of iperoxo, dualsteric ligands should be developed which selectively address only one muscarinic subtype, using a suitable allosteric modulator and simultaneously activate the receptor via iperoxo. The first allosteric building block used was the substance class of thienopyridines, which were described as selective allosteric modulators of the M<sub>4</sub>-receptor-subtype (Esteban *et al.*<sup>132</sup>). Precursors of this compound were synthesized and one step could be optimized in a microwave enhanced

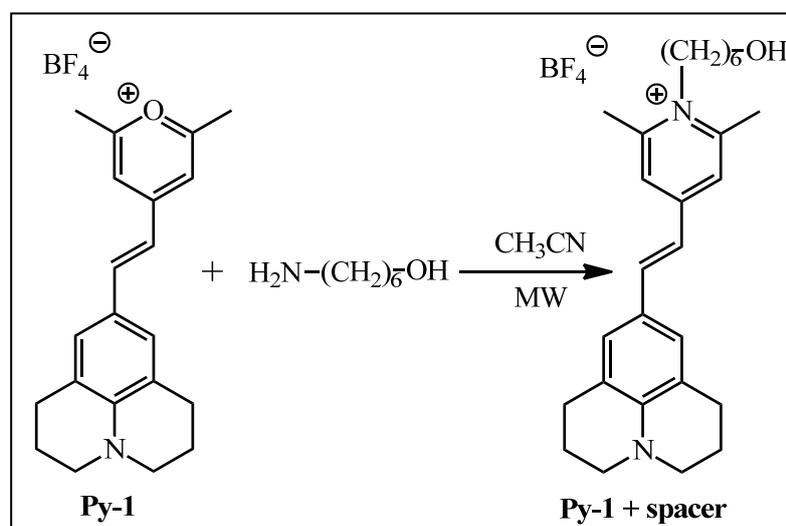
reaction using a UV/Vis-sensor. Since no spacer could be inserted in the precursor 2,4,6-dihydroxymethylnicotinonitrile, the thienopyridine skeleton could not be completely established and for this no coupling with iperoxo-base was accomplished.

7) A further building block for the design of dualsteric hybrid compounds was the 1-benzyl-4oxo-1,4-dihydroquinoline-3-carboxylate, described as selective allosteric modulators of the  $M_1$ -receptor (Kuduk *et al.*<sup>144</sup>). Starting from differently substituted anilines the quinolone skeleton was built up, the nitrogen-atom was alkylated with benzyl- or methylpyridine-residues, respectively, and finally spacers in various chain-lengths were added to the carboxylate. Subsequently the derived quinolones were coupled with iperoxo-base. In fact preliminary pharmacological results revealed the synthesized hybrids to address the  $M_1$ -receptor-subtype. However, findings indicate, that the substances activate the  $G_i$ -signal pathway, which stands in contradiction to the thesis, that  $M_1$ -receptors preferably undergo a  $G_q$ -coupling. These results as well as the  $M_1$ -subtype selectivity have to be verified in further studies.



**Abb. 107:** Synthesized quinolone-iperoxo-hybrid-compounds

8) Besides radioligand binding studies the introduction of fluorescence markers provides an alternative to investigate the affinity of GPCR ligands. For this reason iperoxo should be coupled with the fluorescence marker py-1. While attempts to activate the dye in order to enable the reaction with iperoxo base failed, the synthesis of this dye was optimized by microwave enhanced reaction using an UV/Vis-sensor and also a spacer was inserted.



**Abb. 108:** Structures of the dye Py-1 and Py-1 bearing a spacer

## 5 Experimenteller Teil

### 5.1 Allgemeine Angaben

#### 5.1.1 Verwendete Geräte

##### Schmelzpunkte:

Schmelzpunktapparatur MPD350:BM 3.5, Fa. Sanyo Gallenkamp BV, Holland. Alle angegebenen Schmelzpunkte sind unkorrigiert.

##### IR-Spektren:

Jasco FT-IR-Spektrometer 6100, Fa. Jasco GmbH, Gross-Umstadt, Deutschland. Alle Spektren wurden mit einer Diamant-ATR-Einheit aufgenommen. Die Banden sind in  $\text{cm}^{-1}$  angegeben.

##### $^1\text{H}$ -NMR-Spektren:

Bruker Kernresonanzspektrometer AV 400 (400.132 MHz), Fa. Bruker BioSpin MRI GmbH, Ettlingen, Deutschland. Als interner Standard werden die Mittelpunkte der Restsignale der deuterierten Lösungsmittel verwendet (DMSO- $d_6$ : 2.50 ppm).

##### $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektren:

Bruker Kernresonanzspektrometer AV 400 (100.613 MHz), Fa. Bruker BioSpin MRI GmbH, Ettlingen, Deutschland. Als interner Standard werden die Mittelpunkte der Restsignale der deuterierten Lösungsmittel verwendet (DMSO- $d_6$ : 39.52 ppm). Zur Beschreibung der Multiplizität (M) der spektroskopischen Daten werden folgende Abkürzungen verwendet: s = Singulett, d = Dublett, dd = Dublett vom Dublett, dt = Dublett vom Triplett, t = Triplett, quar = Quartett, quin = Quintett, m = Multiplett, bs = breites Signal.

##### Mikrowelle:

Milestone MLS-Ethos 1600, Mikrowellen-Laborsysteme, Leutkirch, Deutschland. Reaktionen im offenen System wurden in Dreihalskolben durchgeführt. Reaktionen im geschlossenen System wurden in einem Bombenrohr aus Polytetrafluorethylen (PTFE, 3.0 cm Innendurchmesser, 18 cm Länge) ummantelt mit einem Polyetheretherketon-Rohr (PEEK) durchgeführt.

## 5.1.2 Chromatographie

### Dünnschichtchromatographie:

DC-Alufolien Kieselgel 60 F<sub>254</sub>, Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland. DC-Fertigplatten SIL 625 UV<sub>254</sub>, Fa. Macherey-Nagel, Düren, Deutschland.

Säulenchromatographie: Kieselgel 60, 0.063-0.2 mm (70-320 mesh), Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland.

## 5.1.3 Chemikalien und Lösungsmittel

Die Chemikalien und Lösungsmittel wurden von folgenden Firmen bezogen:

Acros Organics, Geel, Belgien

Lancaster, Frankfurt / Main, Deutschland

Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland

VWR International, Darmstadt, Deutschland

### Trocknungsprotokoll:

Aceton wurde über CaSO<sub>4</sub> x 0.5 H<sub>2</sub>O abdestilliert. Ethanol und Methanol wurden chemisch mit Magnesiumspänen getrocknet und nachfolgend abdestilliert. DMF wurde über Phosphorpentoxid refluxiert und bei 40 mbar destilliert. THF wurde zwei Stunden über einer Na/K-Legierung refluxiert und anschließend im Vakuum abdestilliert. Alle oben aufgeführten Lösungsmittel wurden im Anschluss über Molekularsieb unter Argonatmosphäre aufbewahrt. Für die Reaktionen wurde ausschließlich demineralisiertes Wasser verwendet.

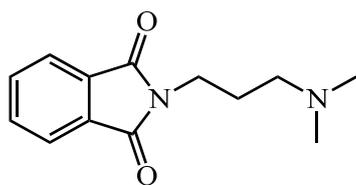
## 5.1.4 Abkürzungsverzeichnis

abs.:	absolutiert	konz.:	konzentriert
Äq.:	Äquivalente	MeOH:	Methanol
d:	Tag(e)	Mr:	molare Masse
dem.:	demineralisiert	MeCN:	Acetonitril
DCM:	Dichlormethan	PE:	Petrolether
DMF:	Dimethylformamid	Ph <sub>2</sub> O:	Diphenylether
DMSO:	Dimethylsulfoxid	R <sub>f</sub> :	Retentionsfaktor
Et <sub>2</sub> O:	Diethylether	Smp:	Schmelzpunkt
EA:	Ethylacetat	THF:	Tetrahydrofuran
EtOH:	Ethanol		
FS:	Feststoff		
h:	Stunde(n)		

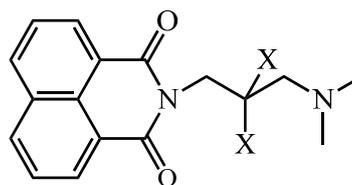
## 5.2 Synthesevorschriften und analytische Daten

### 5.2.1 Synthese allosterer Modulatoren und ihrer Vorstufen

5.2.1.1 Synthese der N-[3-(N',N'-Dimethylamin)propylphthalimid- bzw. naphthalimid-Derivate **1a-1c**



**1a**



**1b:** R = H, X = H

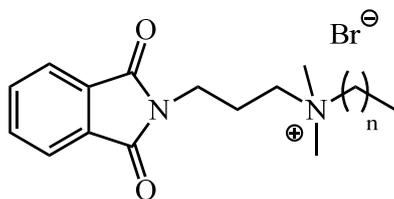
**1c:** R = H, X = CH<sub>3</sub>

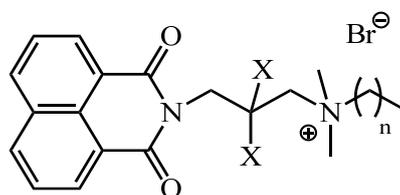
Die Synthese der Verbindungen **1a-1c** wird analog der Vorschrift von Schmitz *et al.*<sup>89</sup> durchgeführt.

**Tabelle 4:** Allgemeine Daten

Verb	Summenformel	Mr [g/mol]	Smp [°C]	Dauer [h]	Ausbeute [%]	Aussehen
<b>1a</b> <sup>89</sup>	C <sub>13</sub> H <sub>16</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	232.3	39 (Lit.:39 <sup>89</sup> )	0.5	82 (Lit.: 91 <sup>89</sup> )	weißer FS
<b>1b</b> <sup>89</sup>	C <sub>17</sub> H <sub>18</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	282.3	119 (Lit.:119 <sup>89</sup> )	3	89 (Lit.: 90 <sup>89</sup> )	hellbrauner FS
<b>1c</b> <sup>89</sup>	C <sub>19</sub> H <sub>22</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	310.4	111 (Lit.:112 <sup>89</sup> )	2.5	83 (Lit.: 86 <sup>89</sup> )	hellbrauner FS

Die spektroskopischen Daten entsprechen den in der Literatur mitgeteilten Daten.<sup>88, 92, 96,160</sup>

5.2.1.2 Synthese der verkürzten allosteren Bausteine **2a-2e**

**2a:** n = 2

**2b:** n = 5

**2c:** n = 2, X = H

**2d:** n = 6, X = H

**2e:** n = 2, X = CH<sub>3</sub>

1.00 - 4.00 mmol des jeweiligen Phthal- bzw. Naphthalimidis werden in 5 ml abs. Acetonitril gelöst, mit einem 10- bis 15-fachen Überschuss des entsprechenden 1-Bromalkans um die Reaktionswahrscheinlichkeit zu erhöhen sowie einer Spatelspitze KI/K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> versetzt und die Mischung im Glasbombenrohr bei 60 °C erhitzt. Der sich bildende Niederschlag wird abfiltriert, mit Et<sub>2</sub>O gewaschen und über Phosphorpentoxid im Vakuum getrocknet.

**Tabelle 5:** Allgemeine Daten

Verb	Summenformel	Mr [g/mol]	Smp [°C]	Dauer	Ausbeute [%]	Aussehen
<b>2a</b> <sup>90</sup>	C <sub>16</sub> H <sub>23</sub> BrN <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	355.3	209-212 (Lit.:199-200 <sup>90</sup> )	24 h (Lit.: 16 h <sup>90</sup> )	99 (Lit.: 56 <sup>90</sup> )	weißer FS
<b>2b</b> <sup>90</sup>	C <sub>19</sub> H <sub>29</sub> BrN <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	397.4	185 (Lit.:187-189 <sup>90</sup> )	24 h (Lit.: 20 h <sup>90</sup> )	73 (Lit.: 59 <sup>90</sup> )	weißer FS
<b>2c</b>	C <sub>20</sub> H <sub>25</sub> BrN <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	405.3	219-224	40 d	66	weißer FS
<b>2d</b>	C <sub>24</sub> H <sub>33</sub> BrN <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	461.4	198-200	2 d	41	weißer FS
<b>2e</b> <sup>91</sup>	C <sub>22</sub> H <sub>29</sub> BrN <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	433.4	195-196 (Lit.: 196 <sup>91</sup> )	3 (Lit.: 8d <sup>91</sup> )	43 (Lit.: 71 <sup>91</sup> )	weißer FS

Die spektroskopischen Daten der Verbindungen **2a**, **2b** und **2e** entsprechen den in der Literatur<sup>90,91</sup> mitgeteilten Daten.

**Tabelle 6:** IR [cm<sup>-1</sup>]

<b>2c</b>	739, 887, 1587, 1650, 1693, 2966, 3008, 3364
<b>2d</b>	728, 895, 1584, 1652, 1693, 2922, 3039

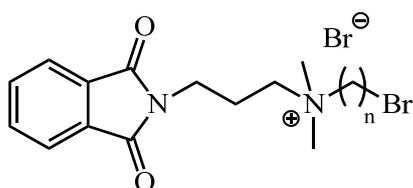
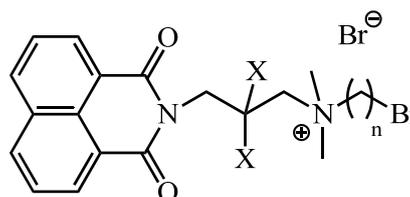
**Tabelle 7:**  $^1\text{H-NMR}$  (DMSO- $d_6$ ,  $\delta$  [ppm],  $J$  [Hz])

Verb	H <sub>arom.</sub>	NCH <sub>2</sub>	NCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub>	CH <sub>2</sub> N <sup>+</sup>	N <sup>+</sup> (CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	Alkyl
<b>2c</b>	7.90 (2H, dd, $J=8.3/7.3$ ), 8.49 (2H, dd, $J=8.3/0.9$ ), 8.52 (2H, dd, $J=7.3/1.0$ )	4.14 (2H, t, $J=6.4$ )	2.08-2.16 (2H, m)	3.18-3.22 (2H, m), 3.38-3.43 (2H, m)	2.98 (6H, s)	0.88 (3H, t, $J=7.3$ ), 1.60-1.70 (2H, m)
<b>2d</b>	7.90 (2H, dd, $J=8.2/7.3$ ), 8.48-8.52 (4H, m)	4.14 (2H, t, $J=6.4$ )	2.08-2.16 (2H, m)	3.21-3.25 (2H, m), 3.37-3.42 (2H, m)	2.99 (6H, s)	0.85 (3H, t, $J=6.9$ ), 1.23 (8H, br), 1.56-1.65 (2H, m)

**Tabelle 8:**  $^{13}\text{C-NMR}$  (DMSO- $d_6$ ,  $\delta$  [ppm])

Verb	C <sub>qAmid</sub>	CH <sub>arom</sub>	C <sub>qarom.</sub>	NCH <sub>2</sub>	NCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub>	CH <sub>2</sub> N <sup>+</sup>	N <sup>+</sup> (CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	Alkyl
<b>2c</b>	163.7	127.2, 130.7, 134.3	122.1, 131.3	36.9	21.2	61.1, 64.4	49.8	10.4, 15.3
<b>2d</b>	163.6	127.1, 130.7, 134.3	122.0, 127.4, 131.2	36.8	21.2	60.8, 62.9	49.8	13.8, 21.5, 21.8, 25.6, 28.0, 30.8

### 5.2.1.3 Synthese der Zwischenstufe zur Herstellung unsymmetrischer Mono- bzw. Bis-(ammonium)alkan-Derivate **3a-3h**


**3a:**  $n = 4$ 
**3b:**  $n = 6$ 
**3c:**  $n = 7$ 
**3d:**  $n = 8$ 

**3e:**  $n = 6$ ,  $X = \text{H}$ 
**3f:**  $n = 4$ ,  $X = \text{CH}_3$ 
**3g:**  $n = 6$ ,  $X = \text{CH}_3$ 
**3h:**  $n = 8$ ,  $X = \text{CH}_3$ 

10 mmol der entsprechenden Verbindung **1a-1c** werden mit einem 5-10-fachen Überschuss der verschiedenen Dibromalkane in abs. Acetonitril sowie einer Spatelspitze KI/ $\text{K}_2\text{CO}_3$  in einem Glasbom

benrohr auf 60 °C Ölbadtemperatur erhitzt. Der Reaktionsverlauf wird dünnschichtchromatographisch verfolgt (Kieselgel, MeOH/0.2 M NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>-Lösung 3:2, R<sub>f</sub> = 0.7-0.8). Nach beendeter Reaktion wird der entstandene Feststoff abfiltriert, mehrmals mit Et<sub>2</sub>O gewaschen und der Feststoff über Phosphor-pentoxid im Vakuum getrocknet. Wenn sich kein Niederschlag bildet, wird die Reaktionslösung portionsweise in Et<sub>2</sub>O getropft und der dabei erhaltene Feststoff abfiltriert, ebenfalls gewaschen und getrocknet.

**Tabelle 9:** Allgemeine Daten

Verb	Summenformel	Mr [g/mol]	Smp [°C]	Dauer	Ausbeute [%]	Aussehen
<b>3a</b>	C <sub>17</sub> H <sub>24</sub> Br <sub>2</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	448.2	183-188	24 h	83	weißer FS
<b>3b</b> <sup>93</sup>	C <sub>19</sub> H <sub>28</sub> Br <sub>2</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	476.3	208-211 (Lit.: 189-190 <sup>93</sup> )	24 h	70 (Lit.: 63 <sup>93</sup> )	weißer FS
<b>3c</b> <sup>94</sup>	C <sub>20</sub> H <sub>30</sub> Br <sub>2</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	490.3	156-161 (Lit.: 144-146 <sup>94</sup> )	24 h	77 (Lit.: 41 <sup>94</sup> )	weißer FS
<b>3d</b> <sup>95</sup>	C <sub>21</sub> H <sub>32</sub> Br <sub>2</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	504.3	189-192 (k. A.)	7 d	88	weißer FS
<b>3e</b> <sup>96</sup>	C <sub>23</sub> H <sub>30</sub> Br <sub>2</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	526.3	190-191 (Lit.: 189 <sup>96</sup> )	24 h (Lit.: 8h <sup>96</sup> )	80 (Lit.: 65 <sup>96</sup> )	weißer FS
<b>3f</b> <sup>92</sup>	C <sub>23</sub> H <sub>30</sub> Br <sub>2</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	526.3	173-174 (Lit.: 173 <sup>92</sup> )	24 h (Lit.: 7 d <sup>92</sup> )	41 (Lit.: 90 <sup>92</sup> )	weißer FS
<b>3g</b> <sup>88</sup>	C <sub>25</sub> H <sub>34</sub> Br <sub>2</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	554.4	178-179 (Lit.: 178-180 <sup>88</sup> )	24 h (Lit.: 11 d <sup>88</sup> )	65 (Lit.: 55 <sup>88</sup> )	weißer FS
<b>3h</b> <sup>92</sup>	C <sub>27</sub> H <sub>38</sub> Br <sub>2</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	582.4	152-154 (Lit.: 141 <sup>92</sup> )	24 h (Lit.: 7d <sup>92</sup> )	11 (Lit.: 34 <sup>92</sup> )	weißer FS

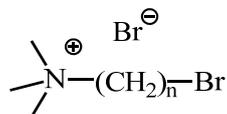
Die spektroskopischen Daten der Verbindungen **3b-3h** entsprechen den in der Literatur<sup>88,92,93,94,96</sup> mitgeteilten Daten.

**3a:**

**IR** [cm<sup>-1</sup>]: 722, 891, 1036, 1394, 1700, 1765, 2928, 3009

**<sup>1</sup>H-NMR** (DMSO-d<sub>6</sub>, δ [ppm], *J* [Hz]): 1.70-1.86 (4H, m, Butylkette); 2.01-2.08 (2H, m, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>); 3.00 (6H, s, N<sup>+</sup>(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>); 3.27-3.31 (2H, br, N<sup>+</sup>CH<sub>2</sub>); 3.34-3.38 (2H, m, N<sup>+</sup>CH<sub>2</sub>), 3.56 (2H, t, *J*=6.3, CH<sub>2</sub>Br); 3.66 (2H, t, *J*=6.3, NCH<sub>2</sub>); 7.85-7.91 (4H, m, H<sub>arom.</sub>)

**<sup>13</sup>C-NMR** (DMSO-d<sub>6</sub>, δ [ppm]): 20.5 (CH<sub>2</sub>); 21.5 (CH<sub>2</sub>); 28.9 (CH<sub>2</sub>); 33.8 (CH<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>-Br); 34.5 (NCH<sub>2</sub>); 49.9 (2xCH<sub>3</sub>, N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>); 60.8 (CH<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>N<sup>+</sup>); 62.0 (N<sup>+</sup>CH<sub>2</sub>); 123.0 (2xCH<sub>arom.</sub>)

5.2.1.4 Synthese der Bromalkyl-trimethylammonium-Bromide **4a** und **4b**


**4a:** n = 6

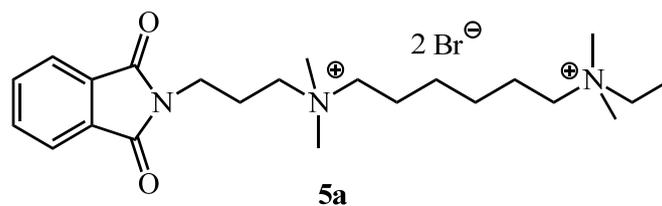
**4b:** n = 8

Die Synthese der Verbindungen erfolgt analog der Vorschrift von Schmitz.<sup>96</sup>

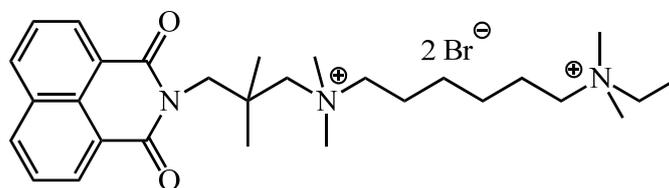
**Tabelle 10:** Allgemeine Daten

Verb	Summenformel	Mr [g/mol]	Smp [°C]	Ausbeute [%]	Aussehen
<b>4a</b> <sup>97</sup>	C <sub>9</sub> H <sub>21</sub> Br <sub>2</sub> N	303.1	112 (Lit.: 110-112 <sup>97</sup> )	75 (Lit.: 14 <sup>97</sup> )	weißer FS
<b>4b</b> <sup>97</sup>	C <sub>11</sub> H <sub>25</sub> Br <sub>2</sub> N	331.1	113 (Lit.: 78-80 <sup>97</sup> )	43 (Lit.: 30 <sup>97</sup> )	weißer FS

Die spektroskopischen Daten der Verbindungen **4a** und **4b** entsprechen den in der Literatur<sup>97</sup> mitgeteilten Daten.

 5.2.1.5 Synthese von verkürzten Bis-(ammonium)alkan-Bausteinen **5a** und **5b**


**5a**



**5b**

Ein mmol der entsprechenden Verbindung **3b** bzw. **3g** wird in 20 ml abs. Acetonitril gelöst, 10 Äquivalente N,N-Dimethylethylamin sowie eine Spatelspitze KI/K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> zugegeben und die Mischung im Glasbombenrohr bei 60 °C Ölbadtemperatur erhitzt. Der sich bildende Niederschlag wird abfiltriert, mit Et<sub>2</sub>O gewaschen und über Phosphorpentoxid im Vakuum getrocknet.

**Tabelle 11:** Allgemeine Daten

Verb	Summenformel	Mr [g/mol]	Smp [°C]	Dauer	Ausbeute [%]	Aussehen
<b>5a</b> <sup>161</sup>	C <sub>23</sub> H <sub>39</sub> Br <sub>2</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub>	549.4	221 (Lit.:213-215 <sup>161</sup> )	2 d	95 (Lit.: 18 <sup>161</sup> )	weißer FS
<b>5b</b> <sup>73</sup>	C <sub>29</sub> H <sub>45</sub> Br <sub>2</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub>	627.5	259-261 (Lit.: 260 <sup>73</sup> )	24 h	53 (Lit.: 93 <sup>73</sup> )	weißer FS

Die spektroskopischen Daten entsprechen den in der Literatur<sup>73,161</sup> mitgeteilten Daten.

## 5.2.2 Synthese von Iperoxo

### 5.2.2.1 Synthese von 4-Dimethylamino-but-2-en-1-ol **10**



**10**

8.72 g (0.11 mol) Dimethylammonium-Hydrochlorid werden in dem. Wasser gelöst und der pH-Wert der Lösung mit 2 M wässriger Natronlauge auf 9 eingestellt. 11.6 g (0.15 mol) 40 %-ige wässrige Formaldehyd-Lösung, 2-Propin-1-ol (5.00 g, 89.0 mmol) sowie vorsichtig eine Lösung von 0.69 g Kupfersulfat-Pentahydrat in 4.46 ml dem. Wasser werden zugegeben und der pH-Wert der Lösung erneut mit 2 M wässriger Natronlauge auf 8 eingestellt. Die Lösung wird für eine Stunde auf 80 °C erhitzt und anschließend auf 30 ml 25 %-ige wässrige Ammoniak-Lösung gegossen. Nach 12 Stunden kontinuierlicher flüssig-flüssig-Extraktion mit Diethylether wird die organische Phase über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt um **8** als gelbes Öl zu erhalten.

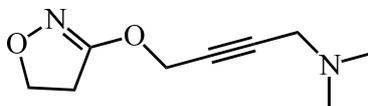
Summenformel: C<sub>6</sub>H<sub>11</sub>NO

M<sub>r</sub>: 113.1 g/mol

Ausbeute: 3.73 g (30 %)

Aussehen: gelbes-oranges Öl

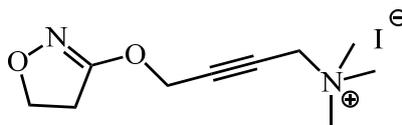
Die spektroskopischen Daten entsprechen den in der Literatur<sup>162</sup> angegebenen Daten.

5.2.2.2 Synthese von 4-((4,5-Dihydroisoxazol-3-yl)oxy)-N,N-dimethylbut-2-yn-1-amin  
 (Iperoxo-Base) **9**

**9**

3.60 g (31.8 mmol) 4-Dimethylamino-but-2-en-1-ol **10** werden unter Argonatmosphäre in 35 ml abs. THF gelöst, langsam 1.40 g Natriumhydrid (60 %-ige Suspension in Paraffin) zugegeben und die Mischung eine Stunde bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend werden 4.00 g (34.5 mmol) 5-Nitroisoxazolin **6** in 3 ml abs. THF langsam zutropft und die Reaktionsmischung 6 Stunden unter Rückfluss erhitzt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wird die Mischung auf Wasser gegossen, mit Chloroform extrahiert, die vereinigten organischen Phasen über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt.

Summenformel:  $C_9H_{14}N_2O_2$   
 $M_r$ : 182.2 g/mol  
 Ausbeute: 4.64 g (80 %, Lit.: 64 %<sup>109</sup>)  
 Aussehen: gelb/orange-farbenes Öl

Die spektroskopischen Daten entsprechen den in der Literatur<sup>109</sup> mitgeteilten Daten.

 5.2.2.3 Synthese von Iperoxo **11**

**11**

10.4 g (2.31 mmol) Iperoxo-Base **10** werden gemäß Dallanoce *et al.*<sup>109</sup> unter Argonatmosphäre in 7 ml abs. Chloroform suspendiert, 0.82 g (5.76 mmol) Methyljodid zugegeben und bei Raumtemperatur gerührt. Bereits bei Zutropfen tritt eine leichte Trübung auf, die sich bis zum vierten Tag Rühren verstärkt. Der erhaltene Niederschlag wird abfiltriert, mehrmals mit Et<sub>2</sub>O gewaschen und über Phosphor-pentoxid im Vakuum getrocknet.

Summenformel:  $C_{10}H_{17}IN_2O_2$   
 $M_r$ : 324.0 g/mol

Ausbeute: 0.74 g (99 %, Lit.: k.A.<sup>109</sup>)

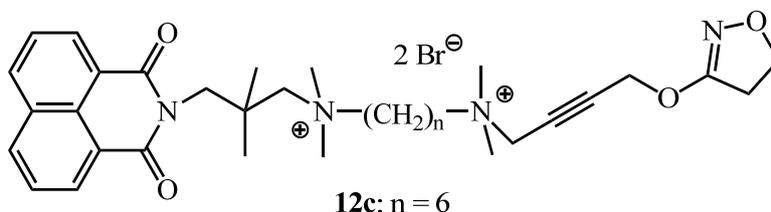
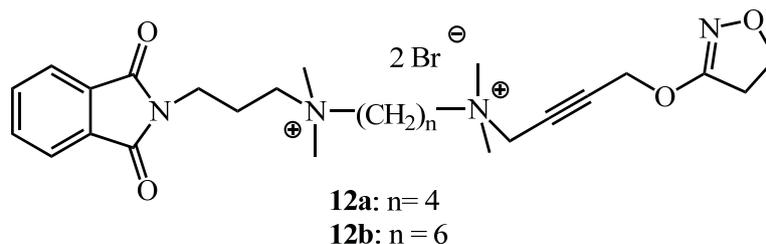
Schmelzpunkt: 212-213 (Lit.: 212-213 °C<sup>109</sup>)

Aussehen: weißer Feststoff

Die spektroskopischen Daten entsprechen den in der Literatur<sup>109</sup> mitgeteilten Daten.

### 5.2.3 Agonistische Hybridverbindungen und verkürzte Derivate

#### 5.2.3.1 Synthese der Alloster-Iperoxo-Hybrid-Verbindungen **12a-c**



In Anlehnung an Antony *et al.*<sup>73</sup> werden 0.50-1.50 mmol der entsprechenden monoquartären Phthal- bzw. Naphthal-Verbindung **3a**, **3b** oder **3g** in abs. Acetonitril gelöst, 2 Äquivalente Iperoxo-Base **10** sowie eine Spatelspitze KI/K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> zugegeben und die Mischung im Glasbombenrohr auf 60 °C Ölbadtemperatur erhitzt. Die Reaktion wird dünnschichtchromatographisch verfolgt (Kieselgel, MeOH/NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> 3:2, R<sub>f</sub> = 0.3-0.4). Nach Beenden der Reaktion wird die Reaktionslösung portionsweise in Et<sub>2</sub>O getropft, der entstehende Niederschlag abfiltriert, mit Et<sub>2</sub>O gewaschen und über Phosphorpentoxid im Vakuum getrocknet

**Tabelle 12:** Allgemeine Daten

Verb	Summenformel	Mr [g/mol]	Smp [°C]	Dauer	Ausbeute [%]	Aussehen
<b>12a</b>	C <sub>26</sub> H <sub>38</sub> Br <sub>2</sub> N <sub>4</sub> O <sub>4</sub>	630.4	177-180	14 d	74	weißer FS
<b>12b</b> <sup>73</sup>	C <sub>28</sub> H <sub>42</sub> Br <sub>2</sub> N <sub>4</sub> O <sub>4</sub>	658.5	188-191 (Lit.: 200 <sup>73</sup> )	7 d	69 (Lit.: 65 <sup>73</sup> )	weißer FS
<b>12c</b> <sup>73</sup>	C <sub>32</sub> H <sub>44</sub> Br <sub>2</sub> N <sub>4</sub> O <sub>4</sub>	708.5	197-199 (Lit.: 191 <sup>73</sup> )	7 d	46 (Lit.: 59 <sup>73</sup> )	weißer FS

Die spektroskopischen Daten der Verbindungen **12b** und **12c** entsprechen den in der Literatur mitgeteilten Daten.<sup>73</sup>

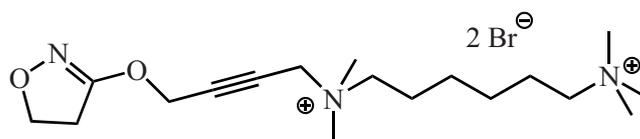
**12a:**

**IR** [ $\text{cm}^{-1}$ ]: 3011, 1769, 1703, 1398, 720

**$^1\text{H-NMR}$**  (DMSO- $d_6$ ,  $\delta$  [ppm],  $J$  [Hz]): 1.71 (4H, br,  $\text{CH}_2$ ), 2.07 (2H, br,  $\text{N}^+\text{CH}_2\text{CH}_2$ ), 3.01 (6H, s,  $\text{N}^+(\text{CH}_3)_2$ ), 3.02 (2H, t,  $J=9.6$ ,  $\text{H-4}_{2\text{isox}}$ ), 3.11 (6H, s,  $\text{N}^+(\text{CH}_3)_2$ ), 3.36-3.43 (6H, m,  $3 \times \text{N}^+\text{CH}_2$ ), 3.67 (2H, t,  $J=6.3$ ,  $\text{NCH}_2$ ), 4.32 (2H, t,  $J=9.6$ ,  $\text{H-5}_{2\text{isox}}$ ), 4.50 (2H, s,  $\text{N}^+\text{CH}_2\text{C}\equiv$ ), 4.95 (2H, s,  $\equiv\text{CCH}_2\text{O}$ ), 7.85-7.91 (4H, m,  $\text{H}_{\text{arom.}}$ ).

**$^{13}\text{C-NMR}$**  (DMSO- $d_6$ ,  $\delta$  [ppm]): 18.9 und 19.1 ( $\text{CH}_2$ ), 21.5 ( $\text{NCH}_2\text{CH}_2$ , C-1b), 32.2 ( $\text{CH}_2$ , C-4 $_{2\text{isox}}$ ), 34.5 ( $\text{CH}_2$ ,  $\text{NCH}_2$ ), 49.8 ( $2 \times \text{N}^+(\text{CH}_3)_2$ ), 53.5 ( $\text{N}^+\text{CH}_2\text{C}\equiv$ ), 57.2 ( $\text{CH}_2$ ,  $\equiv\text{CCH}_2\text{O}$ ), 62.2 ( $3 \times \text{N}^+\text{CH}_2$ ), 69.5 ( $\text{CH}_2$ , C-5 $_{2\text{isox}}$ ), 76.0 und 86.0 (je Cq,  $\text{C}\equiv\text{C}$ ), 123.0 und 134.4 (je  $2 \times \text{CH}_{\text{arom.}}$ ), 131.6 ( $2 \times \text{Cq}_{\text{arom.}}$ ), 166.7 (Cq, C-3 $_{2\text{isox}}$ ), 167.9 ( $2 \times \text{Cq}_{\text{Amid}}$ ).

5.2.3.2 Synthese des Iperoxo-Hexamethonium-Derivats **13**



**13**

0.60 g (3.29 mmol) Iperoxo-Base **10** werden zusammen mit 1.00 g (3.29 mmol) der monoquartären Verbindung **4a** in abs. Acetonitril gelöst, eine Spatelspitze  $\text{KI}/\text{K}_2\text{CO}_3$  zugegeben und die Mischung im Glasbombenrohr bei  $55^\circ\text{C}$  Ölbadtemperatur erhitzt. Die Reaktion wird dünnschichtchromatographisch verfolgt (Kieselgel,  $\text{CH}_3\text{OH}/0.2 \text{ M } \text{NH}_4\text{NO}_3$ -Lösung 3:2,  $R_f = 0.3-0.4$ ).<sup>163</sup> Nach beendeter Reaktion wird der erhaltene Niederschlag abfiltriert, mehrmals mit  $\text{Et}_2\text{O}$  gewaschen und über Phosphorpentoxid im Vakuum getrocknet.

Summenformel:  $\text{C}_{18}\text{H}_{35}\text{Br}_2\text{N}_3\text{O}_2$

$M_r$ : 485.3 g/mol

Ausbeute: 0.56 g (35%)

Schmelzpunkt:  $128^\circ\text{C}$

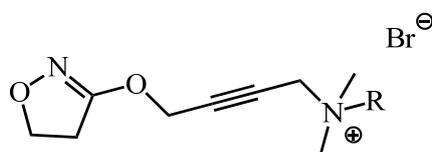
Aussehen: weißer Feststoff

**IR** [ $\text{cm}^{-1}$ ]: 928, 971, 1174, 1338, 1629, 2332, 2911, 3022

**<sup>1</sup>H-NMR** (DMSO-d<sub>6</sub>, δ [ppm], *J* [Hz]): 1.33 (4H, br, Alkyl); 1.70 (4H, br, N<sup>+</sup>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub> × 2); 3.02 (2H, H-4<sub>2-Isiox</sub>, t, *J*=11.0); 3.07 (9H, s, N<sup>+</sup> (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>); 3.10 (6H, s, N<sup>+</sup> (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>); 3.28-3.40 (4H, N<sup>+</sup>CH<sub>2</sub> × 2); 4.32 (2H, H-5<sub>2-Isiox</sub>, *J*=11.0); 4.51 (s, 2H, N<sup>+</sup>CH<sub>2</sub>C≡); 4.94 (s, 2H, OCH<sub>2</sub>C≡).

**<sup>13</sup>C-NMR** (DMSO-d<sub>6</sub>, δ [ppm]): 21.7, 21.8 (N<sup>+</sup>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub> × 2); 25.2 (N<sup>+</sup> (CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CH<sub>2</sub> × 2); 32.3 (C-4<sub>2-Isiox</sub>); 49.8 (N<sup>+</sup> (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>); 52.2 (N<sup>+</sup> (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>); 53.4 (N<sup>+</sup>CH<sub>2</sub>C≡); 57.3 (OCH<sub>2</sub>C≡); 63.0, 65.1 ((CH<sub>2</sub>N<sup>+</sup>CH<sub>2</sub>(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>N<sup>+</sup> (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 69.6 (C-5<sub>2-Isiox</sub>); 76.2 (≡CCH<sub>2</sub>O); 86.0 (N<sup>+</sup>CH<sub>2</sub>C≡); 166.7 (C3<sub>2-Isiox</sub>).

### 5.2.3.3 Verkürzte Iperoxo-Derivate **14** und **15a-j**



**14, 15a-j**

0.45 g (2.47 mmol) Iperoxo-Base **10** werden in ca. 10 ml Acetonitril bzw. Chloroform vorgelegt, 5-10 Äquivalente des entsprechenden 1-Bromalkans, bzw. des 1,6-Dibromhexans sowie eine Spatelspitze KI/K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> zugegeben und die Mischung im Glasbombenrohr auf eine Temperatur zwischen 55 und 70 °C Ölbadtemperatur erhitzt. Der auftretende Niederschlag wird abfiltriert bzw. mit Et<sub>2</sub>O zur Vollständigkeit ausgefällt, mehrmals mit Et<sub>2</sub>O gewaschen und über Phosphorpentoxid im Vakuum getrocknet.

Tabelle 13: Allgemeine Datam

Verb	R	Summenformel	Mr [g/mol]	Smp [°C]	Ausbeute [%]	T [°C]	LM	Dauer [d]	Aussehen	IR [cm <sup>-1</sup> ]
<b>14</b>	6-Bromhexyl	C <sub>15</sub> H <sub>26</sub> BrN <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	426.2	132-135	42	55	MeCN	2	beige- farbener FS	710, 974, 1346, 1402, 1628, 2868, 2926, 2953
<b>15a</b>	Ethyl	C <sub>11</sub> H <sub>19</sub> BrN <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	291.2	108-110	89	60	MeCN	14	beige- farbener FS	925, 941, 1171, 1336, 1629, 2921, 3019
<b>15b</b>	Propyl	C <sub>12</sub> H <sub>21</sub> BrN <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	305.2	113-115	88	60	MeCN	58	beige- farbener FS	924, 938, 1162, 1337, 1626, 2935, 3007
<b>15c</b>	Butyl	C <sub>13</sub> H <sub>23</sub> BrN <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	319.2	110-112	65	55 nach 21 Tagen 70	MeCN	32	weißer FS	917, 965, 1161, 1342, 1647, 2335, 2960, 3034
<b>15d</b>	Pentyl	C <sub>14</sub> H <sub>25</sub> BrN <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	333.4	159-163	78	60	CHCl <sub>3</sub>	1	weißer FS	916, 966, 1159, 1340, 1627, 2330, 2931, 3002
<b>15e</b>	Hexyl	C <sub>15</sub> H <sub>27</sub> BrN <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	347.3	121-122	85	57	MeCN+ 2 ml CHCl <sub>3</sub>	17	weißer FS	929, 971, 1173, 1336, 1629, 2333, 2911, 3021
<b>15f</b>	Heptyl	C <sub>16</sub> H <sub>29</sub> BrN <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	361.3	121-122	74	55	MeCN+2 ml CHCl <sub>3</sub>	20	weißer FS	929, 972, 1173, 1337, 1629, 2356, 2911, 3002
<b>15g</b>	Octyl	C <sub>17</sub> H <sub>31</sub> BrN <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	375.3	130-133	48	55	MeCN+2 ml CHCl <sub>3</sub>	21	weißer FS	929, 972, 1173, 1336, 1629, 2342, 2912, 3002
<b>15h</b>	Nonyl	C <sub>18</sub> H <sub>33</sub> BrN <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	389.2	130-132	80	55	MeCN+2 ml CHCl <sub>3</sub>	7	weißer FS	929, 972, 1173, 1336, 1629, 2362, 2912, 3002
<b>15i</b>	Decyl	C <sub>19</sub> H <sub>35</sub> BrN <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	403.4	135-137	83	55	MeCN+2 ml CHCl <sub>3</sub>	15	weißer FS	929, 972, 1173, 1336, 1629, 2353, 2912, 3002

**Tabelle 15:** <sup>1</sup>H-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>, δ [ppm], J [Hz]):

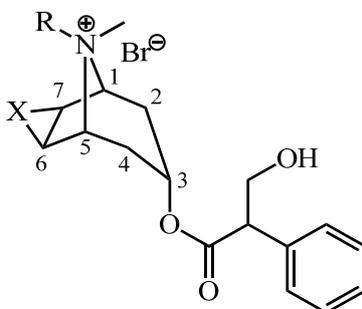
Verb	H-5 <sub>2-Isox</sub>	H-4 <sub>2-Isox</sub>	O-CH <sub>2</sub> C≡	≡C-CH <sub>2</sub> -N <sup>+</sup>	N <sup>+</sup> (CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	N <sup>+</sup> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub>	Alkyl	CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>
<b>14</b>	4.32 (2H, t, J=9.6)	3.01 (2H, t, J=9.6)	4.93 (2H, s)	4.48 (2H, s)	3.07 (6H, s)	3.34-3.37 (2H, m)	1.25-1.33 (4H, br), 1.63-1.85 (4H, m)	3.52 (2H, t, J=6.7) (CH <sub>2</sub> Br)
<b>15a</b>	4.32 (2H, t, J=9.6)	3.02 (2H, t, J=9.6)	4.93 (2H, s)	4.50 (2H, s)	3.08 (6H, s)	3.45 (2H, m)	-	1.26 (3H, t, J=7.2)
<b>15b</b>	4.32 (2H, t, J=9.6)	3.02 (2H, t, J=9.6)	4.94 (2H, s)	4.49 (2H, s)	3.09 (6H, s)	3.33-3.35 (2H, m)	1.66-1.75 (2H, m)	0.91 (3H, t, J=7.3)
<b>15c</b>	4.32 (t, 2H, J=9.47)	3.02 (2H, t, J=9.5)	4.93 (s, 2H)	4.49 (s, 2H)	3.09 (6H, s)	3.36-3.39 (2H, m)	1.27-1.36, 1.62-1.70 (je m, 2H)	0.93 (3H, t, J=7.5)
<b>15d</b>	4.32 (2H, t, J=9.6)	3.02 (2H, t, J=9.6)	4.93 (2H, s)	4.47 (2H, s)	3.08 (6H, s)	3.33-3.37 (2H, m)	1.23-1.36, 1.35-1.42, 1.64-1.72 (je 2H, m)	0.90 (3H, t, J=7.1)
<b>15e</b>	4.32 (2H, t, J=9.6)	3.01 (2H, t, J=9.6)	4.93 (2H, s)	4.48 (2H, s)	3.09 (6H, s)	3.33-3.38 (2H, m)	1.30 (6H, br), 1.62-1.73 (2H, m)	0.88 (3H, t, J=6.6)
<b>15f</b>	4.32 (2H, t, J=9.6)	3.01 (2H, t, J=9.6)	4.93 (2H, s)	4.45 (2H, s)	3.07 (6H, s)	3.34-3.37 (2H, m)	1.25-1.33 (8H, br), 1.63-1.72 (2H, m)	0.87 (3H, t, J=6.8)
<b>15g</b>	4.32 (2H, t, J=9.6)	3.01 (2H, t, J=9.6)	4.93 (2H, s)	4.45 (2H, s)	3.07 (6H, s)	3.33-3.37 (2H, m)	1.23-1.33 (10H, br), 1.63-1.71 (2H, m)	0.87 (3H, t, J=6.9)
<b>15h</b>	4.32 (2H, t, J=9.6)	3.01 (2H, t, J=9.6)	4.93 (2H, s)	4.48 (2H, s)	3.08 (6H, s)	3.33-3.37 (2H, m)	1.26 (12H, br), 1.62-1.71 (2H, m)	0.86 (3H, t, J=6.7)
<b>15i</b>	4.32 (2H, t, J=9.6)	3.01 (2H, t, J=9.6)	4.93 (2H, s)	4.47 (2H, s)	3.08 (6H, s)	3.33-3.37 (2H, m)	1.26 (14 H, br), 1.67 (2H, br)	0.86 (3H, t, J=6.9)

Tabelle 16:  $^{13}\text{C}$ -NMR (DMSO- $d_6$ ,  $\delta$  [ppm]):

Verb	C-5- $_{2\text{-ISOX}}$	C-4- $_{2\text{-ISOX}}$	C-3- $_{2\text{-ISOX}}$	O-CH $_2$ C $\equiv$	-C $\equiv$ C-	$\equiv$ C-CH $_2$ -N $^+$	N $^+$ (CH $_3$ ) $_2$	N $^+$ CH $_2$ CH $_2$	Alkyl	CH $_2$ CH $_3$
<b>14</b>	69.5	32.1	166.6	57.1	76.1, 85.9	53.1	49.7	63.1	21.5, 21.7, 25.3, 30.5	35.1 (CH $_2$ Br)
<b>15a</b>	69.5	32.1	166.6	57.1	76.1, 85.7	52.8	49.1	58.7	-	7.8
<b>15b</b>	69.5	32.2	166.6	57.1	76.1, 85.9	53.3	49.7	64.5	15.4	10.3
<b>15c</b>	69.6	32.2	166.7	57.2	76.2, 86.0	53.3	49.8	63.0	19.1, 23.8	13.4
<b>15d</b>	69.5	32.1	166.6	57.1	76.1, 85.9	53.1	49.7	63.0	21.4, 21.5, 27.7	13.6
<b>15e</b>	69.5	32.1	166.6	57.1	76.1, 85.8	53.1	49.7	63.1	21.6, 21.7, 25.2, 30.5	13.7
<b>15f</b>	69.5	32.2	166.6	57.1	76.1, 85.9	53.2	49.7	63.1	21.7, 21.9, 25.5, 28.0, 20.8	13.8
<b>15g</b>	69.5	32.1	166.6	57.1	76.1, 85.9	53.2	49.7	63.1	21.7, 21.9, 25.6, 28.3, 31.0	13.8
<b>15h</b>	69.5	32.1	166.6	57.1	76.1, 85.8	53.2	49.7	63.1	21.7, 22.0, 25.6, 28.3, 28.6, 31.1	13.8
<b>15i</b>	69.5	32.1	166.6	57.1	76.1, 85.8	53.1	49.7	63.1	21.7, 22.0, 25.6, 28.3, 28.5, 28.6, 28.7, 31.2	13.8

## 5.2.4 Antagonistische Hybridverbindungen und verkürzte Derivate

### 5.2.4.1 Umsetzung von Scopolamin mit **4a** zu **16** und Synthese von verkürzten Atropin- bzw. Scopolamin-Derivaten **17a-h** und **18b-h**



X = - : **17a-h**

X = O **16, 18 b-h**

#### Synthese der Scopolamin-Base

Zur Herstellung der verkürzten Scopolamin-Derivate wird zunächst Scopolamin-Base freigesetzt. Hierzu wird 1.00 g (3.30 mmol) Scopolamin in dem. Wasser gelöst und der pH-Wert der Lösung mit Hilfe von 1 M NaOH-Lösung auf 11 eingestellt. Es wird fünfmal mit Chloroform extrahiert, die organischen Phasen über Natriumsulfat getrocknet, das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und die freie Base als weißes, viskoses Öl erhalten.

#### Allgemeine Vorschrift zur Herstellung der Verbindungen **16, 17a-h** und **18b-h**

0.5-0.6 g (1.70-2.10 mmol) Atropin bzw. Scopolamin-Base werden in Chloroform bzw. einer Mischung aus Chloroform und Acetonitril gelöst, das entsprechende 1-Bromalkan bzw. Verbindung **4a** in unterschiedlichen Molverhältnissen sowie eine Spatelspitze KI/K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> zugegeben und die Mischung im Glasbombenrohr auf 55-95 °C Ölbadtemperatur erhitzt. Bildet sich ein Niederschlag, wird dieser abfiltriert, mehrmals mit Et<sub>2</sub>O gewaschen und über Phosphorpentoxid im Vakuum getrocknet. Bildet sich kein Niederschlag, wird die Reaktionslösung portionsweise in kleine Mengen Et<sub>2</sub>O getropft und unter Rühren abfiltriert. Wird dabei anstelle eines Feststoffes ein Öl erhalten, wird dieses in Methanol gelöst, das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und anschließend mehrmals aus Ethanol, Methanol oder anderen polaren Lösungsmitteln umkristallisiert. Wird noch immer kein Feststoff erhalten, wird in der Hitze in Dichlormethan gelöst und das Lösungsmittel möglichst schnell im Vakuum entfernt, bis sich ein Schaum bildet. Dieser wird für mehrere Stunden im Vakuum getrocknet. Alle Derivate werden als weißer Feststoff isoliert.

Die hergestellten Verbindungen werden in der Literatur beschrieben. Da jedoch eine andere Synthesestrategie verfolgt wurde und darüber hinaus die analytischen Daten zum Teil fehlen bzw. sich von den erhaltenen unterscheiden, werden die Daten im Folgenden aufgeführt.

## Atropin-Derivate (X = /)

Tabelle 17: Allgemeine Daten

Verb	Atropin [mmol]	Bromalkan [mmol]	Summenformel	Mr [g/mol]	Smp [°C]	Ausbeute [%]	T [°C]	LM	Dauer [d]	Aussehen	IR [cm <sup>-1</sup> ]
<b>17a</b> <sup>164</sup>	2.07	Methyl 4.93	C <sub>18</sub> H <sub>26</sub> INO <sub>3</sub>	431.3	188-188 (Lit.: 128-130/151-153 <sup>164</sup> )	99 (k. A.)	RT	CHCl <sub>3</sub>	2	weißer FS	921, 1039, 1165, 1342, 1705, 2162, 3008
<b>17d</b> <sup>164</sup>	2.07	Butyl 36	C <sub>21</sub> H <sub>32</sub> BrNO <sub>3</sub>	426.4	159-160 (Lit.: 105-109 <sup>164</sup> )	58 (k. A.)	55	CHCl <sub>3</sub>	3	weißer FS	919, 1023, 1164, 1341, 1632, 2162, 3008
<b>17e</b> <sup>165</sup>	2.1	Pentyl 20.7	C <sub>22</sub> H <sub>34</sub> BrNO <sub>3</sub>	440.4	193-194 (k. A.)	76 (k. A.)	55	CHCl <sub>3</sub> / MeCN	14	weißer FS	920, 1162, 1336, 1626, 1705, 2163, 2925
<b>17f</b> <sup>166</sup>	2.1	Hexyl 20.7	C <sub>23</sub> H <sub>36</sub> BrNO <sub>3</sub>	454.4	159-161 (k. A.)	77 (k. A.)	55	CHCl <sub>3</sub>	5	weißer FS	727, 855, 891, 1162, 1347, 1386, 1700, 3009
<b>17g</b> <sup>125</sup>	2.1	Heptyl 20.7	C <sub>24</sub> H <sub>38</sub> BrNO <sub>3</sub>	468.5	92-94 (hygr.) (Lit.: 133-136 <sup>125</sup> )	97 (Lit.: 50 <sup>125</sup> )	55	CHCl <sub>3</sub>	2	weißer FS	723, 1029, 1163, 1395, 1607, 1700, 2161, 2929
<b>17h</b> <sup>166</sup>	1.7	Octyl 17.3	C <sub>25</sub> H <sub>40</sub> BrNO <sub>3</sub>	482.5	142-146 (k. A.)	12 (k. A.)	55	CHCl <sub>3</sub>	5	weißer FS	919, 1007, 1164, 1342, 1631, 2162, 2963

Die spektroskopischen Daten der Verbindungen **17a** und **17d** entsprechen den in der Literatur<sup>164</sup> angegebenen Daten.

**Tabelle 18:**  $^1\text{H-NMR}$  (DMSO- $d_6$ ,  $\delta$  [ppm],  $J$  [Hz]):

Verb	H-1,5	H-2,4	H-3	H-6,7	CH <sub>benzyl</sub>	H <sub>arom.</sub>	CH <sub>2</sub> OH	OH	N <sup>+</sup> CH <sub>3</sub>	N <sup>+</sup> CH <sub>2</sub>	Alkyl
<b>17e</b>	3.81-3.87 (2H, m)	eq: 1.66-1.69 u. 1.79-1.82 (je 1H, m) ax: 2.52-2.58 (2H, m)	5.00 (1H, t, $J=5.4$ )	1.82-1.87 und 2.07-2.21 (4H, m)	3.79- 3.80 (1H, m)	7.28- 7.35 (5H, m)	3.68 (1H, td, $J=9.5/5.5$ ), 3.98 (1H, t, $J=9.5$ )	5.08 (1H, br)	3.03 (3H, s)	3.13-3.17 (2H, br)	0.88 (3H, t, $J=7.06$ ), 1.24-1.35 (4H, m), 1.65 (2H, br)
<b>17f</b>	3.80-3.82, 3.84-3.86 (je 1H, m)	eq: 1.65-1.70 u. 1.79-1.81 (je 1H, m) ax: 2.53-2.58 (2H, m)	5.00 (1H, t, $J=5.5$ )	1.84-1.87, 2.07-2.21 (je 2H, m)	3.78- 3.81 (1H, m)	7.29- 7.37 (5H, m)	3.69 (1H, td, $J=10.2/5.2$ ), 3.95-4.01 (1H, m)	5.08 (1H, t, $J=5.2$ )	3.02 (3H, s)	3.13-3.17 (2H, br)	0.85-0.89 (3H, m), 1.28 (6H, br), 1.63 (2H, br)
<b>17g</b>	3.80-3.86 (2H, m)	eq: 1.65-1.69 u. 1.79-1.81 (je 1H, m) ax: 2.56-2.57 (2H, m)	4.99-5.01 (1H, m)	1.84-1.87, 2.06-2.21 (je 2H, m)	3.78- 3.80 (1H, m)	7.29- 7.35 (5H, m)	3.68 (1H, td, $J=10.2/5.1$ ), 3.95-4.01 (1H, m)	5.09 (1H, t, $J=5.1$ )	3.02 (3H, s)	3.12-3.16 (2H, br)	0.85-0.88 (3H, m), 1.27 (8H, br), 1.64-1.65 (2H, br)
<b>17h</b>	3.82-3.86 (2H, m)	eq: 1.65-1.69 u. 1.79-1.82 (je 1H, m) ax: 2.53-2.58 (2H, m)	5.00 (1H, t, $J=5.5$ )	1.84-1.87 (1H, m), 2.06-2.21 (3H, m)	3.78- 3.81 (1H, m)	7.29- 7.37 (5H, m)	3.68 (1H, td, $J=10.1/5.1$ ), 3.97-4.00 (1H, m)	5.09 (1H, t, $J=5.1$ )	3.02 (3H, s)	3.14 (2H, br)	0.86 (3H, t, $J=6.8$ ), 1.27 (10H, br), 1.63-1.65 (2H, m)

**Tabelle 19:**  $^{13}\text{C}$ -NMR (DMSO- $d_6$ ,  $\delta$  [ppm]):

Verb	C-1,5	C-2,4	C-3	C-6,7	C <sub>Ester</sub>	CH <sub>benzyl</sub>	C <sub>qarom</sub>	CH <sub>arom.</sub>	CH <sub>2</sub> OH	N <sup>+</sup> CH <sub>3</sub>	N <sup>+</sup> CH <sub>2</sub> -R	Alkyl
<b>17e</b>	64.5, 64.8	31.5	63.4	24.0, 24.2	171.1	54.1	136.0	127.3, 128.0, 128.5	62.9	40.1	60.3	13.6, 21.2, 21.6, 27.8
<b>17f</b>	64.5, 64.8	31.5	63.4	24.0, 24.2	171.1	54.1	136.0	127.3, 128.0, 128.5	62.9	40.1	60.3	13.7, 21.5, 21.8, 25.4, 30.6
<b>17g</b>	64.6, 64.8	31.5	63.4	24.0, 24.2	171.1	54.1	136.0	127.3, 128.0, 128.5	62.9	39.9	60.3	13.8, 21.5, 21.9, 25.7, 28.1, 30.9
<b>17h</b>	64.5, 64.8	31.5	63.4	25.7	171.1	54.1	136.0	127.3, 128.0, 128.5	62.8	40.1	60.3	13.8, 21.5, 21.9, 28.3, 28.4, 31.0, 31.1

## Scopolamin-Derivate (X = O)

Tabelle 20: Allgemeine Daten

Verb	Scopolamin [mmol]	Bromalkan [mmol]	Summenformel	Mr [g/mol]	Smp [°C]	Ausbeute [%]	T [°C]	LM	Dauer [d]	Aussehen	IR [cm <sup>-1</sup> ]
<b>16</b>	2.23	<b>4a</b> 2.31	C <sub>26</sub> H <sub>42</sub> Br <sub>2</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	606.4	216-217	31	55	MeCN	4	weißer FS	736, 1043, 1386, 1725, 2162, 2927
<b>18b</b> <sup>167</sup>	0.89	Ethyl 0.92	C <sub>19</sub> H <sub>26</sub> BrNO <sub>4</sub>	412.3	202-202 (k.A)	71	55	MeCN	28	weißer FS	735, 1056, 3009, 3678
<b>18c</b> <sup>168</sup>	0.99	Propyl 1.5	C <sub>20</sub> H <sub>28</sub> BrNO <sub>4</sub>	426.3	137-139 (k.A)	60	55	MeCN	34	weißer FS	736, 1026, 1043, 1164, 1343, 1724, 2970, 3058, 3309
<b>18e</b> <sup>168</sup>	1.39	Pentyl 2.00	C <sub>22</sub> H <sub>32</sub> BrNO <sub>4</sub>	454.4	61-66 (hygr.) (k.A)	62	55	MeCN	3	weißer FS	733, 1037, 1071, 1163, 1342, 1725, 3056, 3306
<b>18f</b> <sup>168</sup>	1.02	Hexyl 1.5	C <sub>23</sub> H <sub>34</sub> BrNO <sub>4</sub>	468.4	62-64 (hygr.) (k.A)	4	55	MeCN	14	weißer FS	736, 1026, 1043, 1164, 1343, 1724, 2970, 3058, 3309
<b>18g</b> <sup>169</sup>	0.56	Heptyl 1.5	C <sub>24</sub> H <sub>36</sub> BrNO <sub>4</sub>	482.5	74-81 (hygr.) (k.A)	24	55	MeCN	15	weißer FS	736, 1026, 1043, 1164, 1342, 1724, 2971, 3058, 3308
<b>18h</b> <sup>168</sup>	1.02	Octyl 1.5	C <sub>25</sub> H <sub>38</sub> BrNO <sub>4</sub>	496.5	83-89 (hygr.) (k.A)	8	55	MeCN	33	weißer FS	735, 1025, 1044, 1164, 1343, 1724, 2972, 3059, 3307

Tabelle 21:  $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{DMSO-d}_6$ ,  $\delta$  [ppm],  $J$  [Hz]):

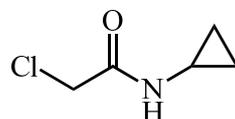
Verb	H-1,5	H-2,4	H-3	H-6,7	$\text{CH}_{\text{benzyl}}$	$\text{H}_{\text{arom.}}$	$\text{CH}_2\text{OH}$	OH	$\text{N}^+\text{CH}_3$	$\text{N}^+\text{CH}_2$	Alkyl
<b>16</b>	4.21, 4.26 (je 1H, d, $J=2.4$ )	eq: 1.78, 1.93 (je 1H, d, $J=17.3$ ) ax: 2.58-2.68 (2H, m)	5.04 (1H, t, $J=5.9$ )	3.76 und 4.01 (je 1H, m)	3.78-3.80 (1H, m)	7.28-7.34 (5H, m)	3.65-3.71 u. 3.94-3.98 (je 1H, m)	5.11 (1H, t, $J=\text{OH}$ )	3.07 (12 H, s)	3.30 (2H, br), 3.52-3.56 (2H, m)	1.28 (4H br), 1.70 (4H, br),
<b>18b</b>	4.16, 4.20 (je 1H, dd, $J=3.8/1.4$ )	eq: 1.78, 1.93 (je 1H, d, $J=17.3$ ) ax: 2.56-2.66 (2H, m)	5.03 (1H, t, $J=6.0$ )	3.76, 4.00 (je 1H, d, $J=3.8$ )	3.78-3.80 (1H, m)	7.29-7.34 (5H, m)	3.69 (1H, dd, $J=4.7/10.2$ ), 3.94-3.98 (1H, m)	5.11 (1H, dd, $J=5.8/4.7$ )	3.00 (3H, s)	3.60-3.66 (2H, m)	1.22 (3H, t, $J=7.3$ )
<b>18c</b>	4.16, 4.20 (je 1H, d (br) $J=2.4$ )	eq: 1.77, 1.92 (je 1H, d, $J=17.3$ ) ax: 2.58-2.67 (2H, m)	5.02 (1H, t, $J=6.0$ )	3.76-3.80 (2H, m)	3.99-4.00 (1H, m)	7.31-7.34 (5H, m)	3.66-3.71 (1H, m), 3.94-3.98 (1H, m)	5.10 (1H, br)	3.02 (3H, s)	3.46-3.50 (2H, m)	0.84 (3H, t, $J=7.3$ ), 1.63-1.73 (2H, m)
<b>18e</b>	4.17, 4.21 (je 1H, d, $J=2.4$ )	eq: 1.78, 1.92 (je 1H, d, $J=17.4$ ) ax: 2.56-2.58 (2H, m)	5.03 (1H, t, $J=6.0$ )	3.75-3.81 (2H, m)	3.98-4.01 (1H, m)	7.28-7.35 (5H, m)	3.67-3.72 (1H, m), 3.75-3.81 (2H, m)	5.11 (1H, dd, $J=5.6/4.8$ )	3.03 (3H, s)	3.50-3.55 (2H, m)	0.89 (3H, t, $J=7.3$ ), 1.16-1.23 (2H, m), 1.27-1.36 (2H, m), 1.63-1.71 (2H, m)
<b>18f</b>	4.15, 4.19 (je 1H, br)	eq: 1.77, 1.91 (je 1H, d, $J=17.2$ ) ax: 2.56-2.67 (2H, m)	5.02 (1H, t, $J=5.7$ )	3.75-3.79 (2H, m)	3.98-4.00 (1H, m)	7.27-7.35 (5H, m)	3.66-3.71 (1H, m), 3.94-3.96 (1H, m)	5.10 (1H, t, $J=5.1$ )	3.01 (3H, s)	3.49-3.53 (2H, m)	0.87 (3H, t, $J=6.5$ ), 1.17-1.32 (6H, m), 1.61-1.70 (2H, m)
<b>18g</b>	4.16, 4.21 (je 1H, d, $J=2.4$ )	eq: 1.77, 1.91 (je 1H, d, $J=17.2$ ) ax: 2.56-2.66 (2H, m)	5.02 (1H, t, $J=5.9$ )	3.75-3.80 (2H, m)	3.98-3.99 (1H, m)	7.28-7.34 (5H, m)	3.66-3.71 (1H, m), 3.94-3.96 (1H, m)	5.10 (1H, dd, $J=5.7/4.8$ )	3.03 (3H, s)	3.50-3.54 (2H, m)	0.87 (3H, t, $J=6.7$ ), 1.17-1.32 (8H, m), 1.61-1.70 (2H, m)
<b>18h</b>	4.12, 4.16 (je 1H, d, $J=2.4$ )	eq: 1.77, 1.92 (je 1H, d, $J=17.2$ ) ax: 2.56-2.67 (2H, m)	5.03 (1H, t, $J=5.8$ )	3.75-3.80 (2H, m)	3.96-4.00 (1H, m)	7.30-7.35 (5H, m)	3.67-3.72 (1H, m), 3.95-3.97 (1H, m)	5.11 (1H, dd, $J=4.5$ )	3.02 (3H, s)	3.50-3.54 (2H, m)	0.87 (3H, t, $J=6.7$ ), 1.19-1.30 (10H, m), 1.62-1.70 (2H, m)

Tabelle 22:  $^{13}\text{C}$ -NMR (DMSO- $d_6$ ,  $\delta$  [ppm]):

Verb	C-1,5	C-2,4	C-3	C-6,7	C <sub>Ester</sub>	CH <sub>benzyl</sub>	C <sub>arom</sub>	CH <sub>arom.</sub>	CH <sub>2</sub> OH	N <sup>+</sup> CH <sub>3</sub>	N <sup>+</sup> CH <sub>2</sub> -R	Alkyl
<b>16</b>	62.9	28.2	62.1	53.5, 53.7	170.8	54.1	136.1	127.4, 128.2, 128.5	62.8	44.4, 52.1	65.0, 67.6	21.6, 21.8, 25.1, 25.3
<b>18b</b>	62.2, 62.3	28.1	62.1	53.4, 53.6	170.8	54.0	136.0	127.3, 128.1, 128.4	62.8	43.5	63.4	7.9
<b>18c</b>	62.7, 62.9	28.0	62.0	53.4, 53.6	170.8	54.0	136.0	127.3, 128.1, 128.4	62.8	44.3	69.2	10.3, 15.4
<b>18e</b>	62.7	28.0	62.0	53.4, 53.6	170.8	54.0	136.0	127.3, 128.1, 128.4	62.8	44.2	67.7	13.5, 21.3, 21.5, 27.6
<b>18f</b>	62.7, 62.9	28.0	62.0	53.4, 53.6	170.8	54.0	136.0	127.3, 128.2, 128.4	62.8	44.2	67.7	13.7, 21.6, 21.7, 25.1, 30.5
<b>18g</b>	62.8	28.1	62.0	53.4, 53.6	170.8	54.0	136.0	127.3, 128.2, 128.4	62.7	44.3	67.7	13.8, 21.6, 21.9, 25.4, 28.0, 30.8
<b>18h</b>	62.8, 62.9	28.1	62.1	53.5, 53.7	170.8	54.1	136.1	127.4, 128.2, 128.5	62.7	44.3	67.7	13.9, 21.7, 22.0, 25.5, 28.3, 31.1

## 5.2.5 Synthese der Vorstufen von Thienopyridin

### 5.2.5.1 Synthese von 2-Chlor-N-cyclopropylacetamid **19**

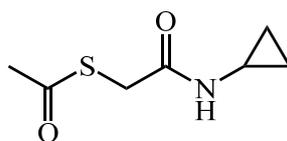
**19**

In Anlehnung an Esteban *et al.*<sup>132</sup> werden zu einer Lösung aus 3.00 g (52.6 mmol) Cyclopropylamin in 30 ml Dichlormethan bei 0 °C langsam 2.97 g (26.3 mmol) Chloracetylchlorid getropft. Nach 2 Stunden Rühren bei 0 °C wird über Celite filtriert und das Filtrat eingengt. Der erhaltene weiß-gelbe Feststoff wird in Hexan aufgeschlämmt, abfiltriert und über Phosphorpentoxid im Vakuum getrocknet.

Summenformel:	C <sub>5</sub> H <sub>8</sub> ClNO
Molekulargewicht:	133.6 g/mol
Schmelzpunkt:	90-93 °C (Lit.: 74-81 <sup>170</sup> )
Ausbeute:	2.66 (76 %, Lit.: 97 % <sup>170</sup> )
Aussehen:	gelber Feststoff

Die spektroskopischen Daten entsprechen den in der Literatur<sup>170</sup> mitgeteilten Daten.

### 5.2.5.2 Synthese von 2-(Cyclopropylamin)-2-oxoethyl)-ethanthioat **20**

**20**

Wie von Esteban *et al.*<sup>132</sup> beschrieben, werden zu einer Lösung von 2.66 g (20.0 mmol) 2-Chlor-N-cyclopropylacetamid **19** in 35 ml Dichlormethan bei 0 °C zunächst 2.28 g (30.0 mmol) Thioessigsäure zugegeben und anschließend sehr langsam 4.05 g (40.0 mmol) Triethylamin zugetropft. Nach 2 Stunden Rühren bei 0 °C wird die Mischung auf 50 ml dem. Wasser geschüttet und 20 Stunden bei RT gerührt. Der pH-Wert der wässrigen Phase wird mithilfe von konz. HCl auf 2 eingestellt und die Phasen getrennt. Die wässrige Phase wird mit Dichlormethan extrahiert, mit gesättigter Kochsalzlösung gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt um einen gelben Feststoff zu erhalten.

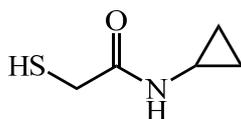
Summenformel:	C <sub>7</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>2</sub> S
Molekulargewicht:	173.2 g/mol
Schmelzpunkt:	74-79 °C (Lit.: k.A.)
Ausbeute:	2.04 g (59 %, Lit.: 99 % <sup>132</sup> )
Aussehen:	gelber Feststoff

IR [cm<sup>-1</sup>]: 1137, 1392, 1552, 1690, 2878, 3058, 3236

<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>, δ [ppm], J [Hz]): 0.36-0.40 (2H, m, CH<sub>2</sub>Cyclopropyl), 0.58-0.62 (2H, m, CH<sub>2</sub>Cyclopropyl), 2.34 (3H, s, CH<sub>3</sub>), 2.58-2.63 (1H, m, CH<sub>Cyclopropyl</sub>), 3.52 (2H, s, SCH<sub>2</sub>), 8.17 (1H, s, NH).

<sup>13</sup>C-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>, δ [ppm]): 5.5 (2xCH<sub>2</sub>Cyclopropyl), 22.5 (CH<sub>Cyclopropyl</sub>), 30.0 (CH<sub>3</sub>), 32.5 (SCH<sub>2</sub>), 167.7 (C<sub>q</sub>Amid), 194.4 (C<sub>q</sub>Thioester).

### 5.2.5.3 Synthese von N-Cyclopropyl-2-mercapto-acetamid **21**



**21**

In Anlehnung an Esteban *et al.*<sup>132</sup> werden 4.25 g (25.0 mmol) 2-(Cyclopropylamino)-2-oxoethyl-ethanthioat **20** in 80 ml Methanol gelöst, 11.5 ml konz. Ammoniak zugegeben und die Lösung 24 Stunden bei RT gerührt. Anschließend wird die Mischung auf ca. 200 ml dem. Wasser geschüttet, der pH-Wert der Lösung mithilfe von konz. HCl auf 2 eingestellt und mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über Natriumsulfat getrocknet, das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der erhaltene Feststoff über Phosphorpentoxid im Vakuum getrocknet.

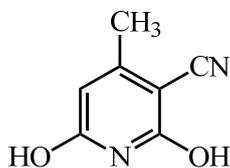
Summenformel:	C <sub>5</sub> H <sub>9</sub> NOS
Molekulargewicht:	131.2 g/mol
Schmelzpunkt:	140-144 °C (Lit.: k.A.)
Ausbeute:	2.66 g (81 %, Lit.: 99 % <sup>132</sup> )
Aussehen:	hellgelber Feststoff

IR [cm<sup>-1</sup>]: 3255.3, 3074.9, 2860.9, 2633.3, 1540.9, 1300.8

<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>, δ [ppm], J [Hz]): 0.39-0.43 (2H, m, CH<sub>2</sub>Cyclopropyl), 0.61-0.65 (2H, m, CH<sub>2</sub>Cyclopropyl), 2.60-2.67 (1H, m, CH<sub>Cyclopropyl</sub>), 3.40 (2H, s, SCH<sub>2</sub>), 8.16 (1H, br, NH).

$^{13}\text{C-NMR}$  (DMSO- $d_6$ ,  $\delta$  [ppm]): 5.6 ( $2 \times \text{CH}_2_{\text{Cyclopropyl}}$ ), 22.5 ( $\text{CH}_{\text{Cyclopropyl}}$ ), 41.9 ( $\text{SCH}_2$ ), 168.7 ( $\text{C}_{\text{qAmid}}$ ).

#### 5.2.5.4 Synthese von 3-Cyano-2,6-dihydroxy-4-methylpyridin **22**



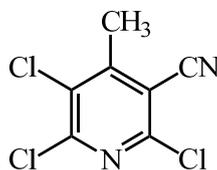
**22**

5.00 g (59.0 mmol) Cyanoacetamid werden zusammen mit 7.5 ml (59.0 mmol) Ethylacetoacetat, 5.95 ml (60.0 mmol) Piperidin und 50 ml Methanol im QS-Batch-Reaktor mikrowellenunterstützt erhitzt und die Reaktion mittels UV-Kontrolle verfolgt. Nach 6 Minuten ist die Reaktion abgeschlossen und der entstandene beige-farbene Feststoff wird abfiltriert, anschließend in heißem Wasser gelöst und mit konz. HCl ausgefällt. Der erhaltene weiße Feststoff wird erneut abfiltriert und mit Eiswasser gewaschen und über Phosphorpentoxid im Vakuum getrocknet.

Summenformel:	$\text{C}_7\text{H}_6\text{N}_2\text{O}_2$
Molekulargewicht:	150.1 g/mol
Schmelzpunkt:	$>323$ °C (Lit. 289-288 °C <sup>133</sup> , bzw. 295-300 °C <sup>171</sup> )
Ausbeute:	6.02 g (68 %) (Lit.: 76 % <sup>133</sup> )
Aussehen:	weißer amorpher Feststoff

Die spektroskopischen Daten entsprechen den in der Literatur<sup>172</sup> mitgeteilten Daten.

#### 5.2.5.5 Synthese von 3-Cyano-2,5,6-trichlor-4-methylpyridin **23**



**23**

In Anlehnung an Esteban *et al.*<sup>132</sup> werden 1.07 g (7.13 mmol) 3-Cyano-2,6-dihydroxy-4-methylpyridin **22** mit 5.49 g (27.0 mmol) Phosphorpentachlorid verrieben und auf 160 °C erhitzt. Nach 24 Stunden wird die Mischung auf Raumtemperatur abgekühlt und auf Eiswasser geschüttet. Es wird mit Dichlormethan extrahiert, die organischen Phasen mit Eiswasser gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet. Nach Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum wird das erhaltene Öl säulenchromatogra-

phisch gereinigt (Kieselgel, Methanol,  $R_f = 0.95$ ). Es wird ein braunes Öl mit gelbem Feststoff erhalten. Das Öl wird in Methanol gelöst, der Feststoff abfiltriert und über Phosphorpentoxid im Vakuum getrocknet.

Summenformel:	$C_7H_3Cl_3N_2$
Molekulargewicht:	221.5 g/mol
Schmelzpunkt:	127 - 128 °C (Lit.: 120-122 °C <sup>133</sup> )
Ausbeute:	0.85 g (54 %) (Lit.: 61 % <sup>133</sup> )
Aussehen:	hellgelber Feststoff

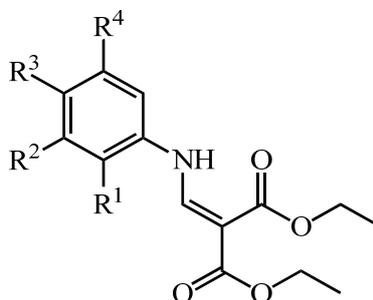
IR [ $cm^{-1}$ ]: 1336, 1386, 2163, 2927, 3009

<sup>1</sup>H-NMR (DMSO- $d_6$ ,  $\delta$  [ppm],  $J$  [Hz]): 2.63 (s, 3H,  $CH_3$ )

<sup>13</sup>C-NMR (DMSO- $d_6$ ,  $\delta$  [ppm]): 20.5 ( $CH_3$ ), 111.3 (Cq, C-CN), 113.4 (Cq, CN), 129.7 (Cq, C-Cl), 148.0 und 150.4 (je Cq, C-Cl), 155.3 (Cq, C- $CH_3$ ).

## 5.2.6 Synthese von Iperoxo-Chinolon-Hybridverbindungen

### 5.2.6.1 Synthese der Anilinmethylene malonsäurediethylester-Derivate **24a-h**



**24a-h**

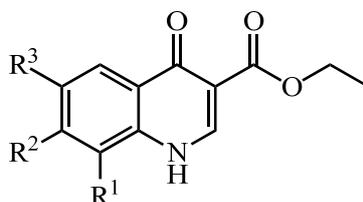
#### Allgemeine Vorschrift zur Synthese von Anilinmethylene malonsäurediethylester-Derivaten

In Anlehnung an Leyva *et al.*<sup>146</sup> werden 30.0 mmol des entsprechenden Anilins zusammen mit 36.0 mmol Diethylethoxymethylene malonat in Toluol suspendiert und 6-24 Stunden unter Rückfluss erhitzt. Anschließend wird das Lösungsmittel im Vakuum entfernt, 200 ml Pentan zugegeben und die Mischung einige Stunden bei 4 °C aufbewahrt. Der sich bildende Feststoff wird abfiltriert, mehrmals mit Pentan gewaschen und über Phosphorpentoxid im Vakuum getrocknet.

Tabelle 23: Allgemeine Daten

Verb	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	R <sup>3</sup>	R <sup>4</sup>	Summenformel	Mr [g/mol]	Smp [°C]	Ausbeute [%]	Aussehen
<b>24a</b> <sup>146</sup>	F	H	H	H	C <sub>14</sub> H <sub>16</sub> FNO <sub>4</sub>	281.3	81 (Lit.: 80-81 <sup>146</sup> )	95 (Lit.: 92 <sup>146</sup> )	weißer, kristalliner FS
<b>24b</b> <sup>147</sup>	Cl	H	Cl	H	C <sub>14</sub> H <sub>15</sub> Cl <sub>2</sub> NO <sub>4</sub>	332.2	113 (Lit.: 112-113 <sup>147</sup> )	94 (Lit.: 86 <sup>147</sup> )	beige-rosa- farbener FS
<b>24c</b> <sup>147</sup>	Cl	H	H	Cl	C <sub>14</sub> H <sub>15</sub> Cl <sub>2</sub> NO <sub>4</sub>	332.2	119 (Lit.: 119-120 <sup>147</sup> )	65 (Lit.: 86 <sup>147</sup> )	beige-farbener FS
<b>24d</b> <sup>146</sup>	H	F	H	H	C <sub>14</sub> H <sub>16</sub> FNO <sub>4</sub>	281.3	80 (Lit.: 44-45 <sup>146</sup> )	60 (Lit.: 65 <sup>146</sup> )	weißer, kristalliner FS
<b>24e</b> <sup>148</sup>	H	Br	H	H	C <sub>14</sub> H <sub>16</sub> BrNO <sub>4</sub>	342.2	74 (Lit.: 70-71 <sup>148</sup> )	86 (Lit.: 40 <sup>148</sup> )	hellbraune Nadeln
<b>24f</b> <sup>49</sup>	H	Cl	F	H	C <sub>14</sub> H <sub>15</sub> ClFNO <sub>4</sub>	315.7	73 (Lit.: 58-60 <sup>149</sup> )	85 (Lit.: 80 <sup>149</sup> )	hellbeige- farbene Nadeln
<b>24g</b> <sup>150</sup>	H	NO <sub>2</sub>	Cl	H	C <sub>14</sub> H <sub>15</sub> ClN <sub>2</sub> O <sub>6</sub>	342.7	132 (Lit.: 134 <sup>150</sup> )	96 (Lit.: 97 <sup>150</sup> )	hellbrauner FS
<b>24h</b> <sup>146</sup>	H	H	F	H	C <sub>14</sub> H <sub>16</sub> FNO <sub>4</sub>	281.3	73 (Lit.: 69-70 <sup>146</sup> )	89 (Lit.: 75 <sup>146</sup> )	weißer, kristalliner FS

Die spektroskopischen Daten entsprechen den in der Literatur<sup>146,148,149,150,147</sup> mitgeteilten Daten.

5.2.6.2 Synthese der Ethyl-4-oxo-1,4-dihydrochinolin-3-carboxylate **25a-g****25a-g**a) Klassischer Syntheseweg

40.0 mmol der Anilinmethylenmalonsäurediethylester-Derivate **24** werden in ca. 100 ml Diphenylether gelöst und zwei Stunden unter Rückfluss erhitzt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wird der entstehende Niederschlag abfiltriert, mehrmals mit Petrolether gewaschen und über Phosphorpentoxid im Vakuum getrocknet.<sup>151</sup>

b) Mikrowellenunterstützter Syntheseweg

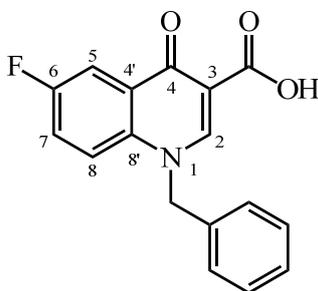
230 mmol der Anilinmethylenmalonsäurediethylester-Derivate **24** werden zusammen mit 5 ml Diphenylether und drei Weflonscheiben im Glasbehälter mikrowellenunterstützt mit einer Aufheizrate von 5 Minuten für 40 Min. auf 210 °C erhitzt. Der entstehende Niederschlag wird abfiltriert und mehrmals mit Petrolether gewaschen. Anschließend wird über Phosphorpentoxid im Vakuum getrocknet.

Da die erhaltenen Derivate nicht oder nur sehr schlecht löslich in den gängigen NMR-Lösungsmitteln sind und darüber hinaus meist noch Reste des Diphenylethers aufweisen, wird ohne weitere Charakterisierung fortgefahren.

**Tabelle 24:** Allgemeine Daten

Verb	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	R <sup>3</sup>	Summenformel	Mr [g/mol]	Ausbeute [%] klassisch/MW	Aussehen
<b>25a</b> <sup>173</sup>	F	H	H	C <sub>12</sub> H <sub>10</sub> FNO <sub>3</sub>	235.2	- / 47 (Lit.: k. A.)	hellbeige- farbener FS
<b>25b</b> <sup>174</sup>	Cl	H	Cl	C <sub>12</sub> H <sub>9</sub> Cl <sub>2</sub> NO <sub>3</sub>	286.1	59/- (Lit.: 74 <sup>174</sup> )	hellbeige- farbener FS
<b>25d</b> <sup>175</sup>	H	F	H	C <sub>12</sub> H <sub>10</sub> FNO <sub>3</sub>	235.2	15/- (Lit.: k. A.)	hellbeige- farbener FS
<b>25e</b> <sup>176</sup>	H	Br	H	C <sub>12</sub> H <sub>10</sub> BrNO <sub>3</sub>	296.1	81 / 41 (Lit.: k. A.)	hellbeige- farbener FS
<b>25f</b> <sup>149</sup>	H	Cl	F	C <sub>12</sub> H <sub>9</sub> ClFNO <sub>3</sub>	269.7	75/- (Lit.: 56 <sup>149</sup> )	hellbeige- farbener FS
<b>25g</b> <sup>150</sup>	H	NO <sub>2</sub>	Cl	C <sub>12</sub> H <sub>9</sub> ClN <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	296.7	93/- (Lit.: 82 <sup>150</sup> )	hellbeige- farbener FS
<b>25h</b> <sup>176</sup>	H	H	F	C <sub>12</sub> H <sub>10</sub> FNO <sub>3</sub>	235.2	50 / 28 (Lit.: k. A.)	hellbeige- farbener FS

### 5.2.6.3 Synthese des 1-Benzyl-6-fluor-4-oxo-1,4-dihydrochinolin-3-carbonsäure **26**



**26h**

16.2 mmol der Verbindung **25h** werden in abs. DMF gelöst, 32.4 mmol K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 2.43 mmol KI, sowie 24.3 mmol Benzylchlorid zugegeben und die Mischung bei Raumtemperatur gerührt. Nach 24 Stunden wird das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Zum Rückstand werden 100 ml 3N KOH-Lösung gegeben und unter Rückfluss erhitzt. Es werden wenige ml Ethanol zugegeben, bis eine klare Lösung entsteht. Diese wird 7 Stunden unter Rückfluss erhitzt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur bildet sich ein weißer Niederschlag, der abfiltriert, mehrmals mit Pentan gewaschen und über Phosphorpentoxid im Vakuum getrocknet wird.

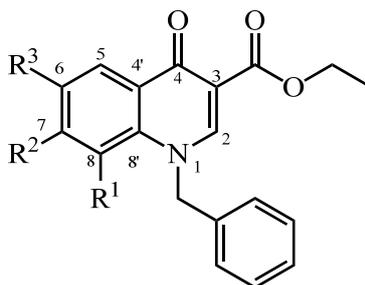
Summenformel:	C <sub>17</sub> H <sub>12</sub> FNO <sub>3</sub>
Molekulargewicht:	297.3 g/mol
Schmelzpunkt:	270 °C
Ausbeute:	1.49 g (31%)
Aussehen:	weißer Feststoff

IR [cm<sup>-1</sup>]: 696, 741, 824, 1227, 1331, 1358, 1599, 1618, 2962, 3061, 3279

<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>, δ [ppm], J [Hz]): 5.53 (2H, s, CH<sub>2</sub>benzyl), 7.14-7.30 (5H, m, CH<sub>phenyl</sub>), 7.39-7.42 (1H, m, H-7), 7.53 (1H, br, H-8), 7.80 (1H, br, H-5), 8.69 (1H, s, H-2).

<sup>13</sup>C-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>, δ [ppm]): 55.1 (CH<sub>2</sub>benzyl), 108.2 (Cq, C-3), 110.4 (CH, d, J<sub>CF</sub>=21.1, C-5), 119.5 (CH, d, J<sub>CF</sub>=25.5, C-7), 119.5 (CH, d, J<sub>CF</sub>=7.9, C-8), 126.2, 127.5 und 128.6 (CH<sub>phenyl</sub>), 129.7 (Cq, d, J<sub>CF</sub>=6.4, C-4'), 135.7 (Cq, C-8'), 136.5 (Cq<sub>phenyl</sub>), 147.9 (CH, C-2), 158.1 (Cq, d, J<sub>CF</sub>=242.3, C-6), 167.3 (Cq<sub>Säure</sub>), 174.2 (Cq, d, J<sub>CF</sub>=2.1, C-4).

#### 5.2.6.4 Synthese der Ethyl-1-benzyl-4-oxo-1,4-dihydrochinolin-carboxylate **27a-h**



**27a,b,d,e,f,h**

In Anlehnung an Koga *et al.*<sup>177</sup> werden 20.0 mmol der jeweiligen Substanz **25a-h** in ca. 150 ml DMF suspendiert, 48.0 mmol K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, sowie 100 mmol Benzylchlorid zugegeben und das Reaktionsgemisch 20 Stunden auf 80 °C erhitzt. Das überschüssige K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> wird abfiltriert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der ölige Feststoff wird aus Ethanol umkristallisiert, abfiltriert und über Phosphor-pentoxid im Vakuum getrocknet.

Die spektroskopischen Daten für Verb. **27f** entsprechen den in der Literatur<sup>152</sup> mitgeteilten Daten.

Tabelle 25: Allgemeine Daten

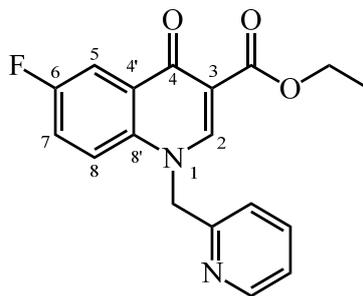
Verb	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	R <sup>3</sup>	Summenformel	Mr [g/mol]	Smp [°C]	Ausbeute [%]	Aussehen	IR [cm <sup>-1</sup> ]
<b>27a</b> <sup>178</sup>	F	H	H	C <sub>19</sub> H <sub>16</sub> FNO <sub>3</sub>	325.3	188-190 (Lit.: k.A.)	81 (Lit.: k.A.)	hellgelber FS	694, 723, 819, 1239, 1441, 1556, 1605, 2993, 3043,
<b>27b</b>	Cl	H	Cl	C <sub>19</sub> H <sub>15</sub> Cl <sub>2</sub> NO <sub>3</sub>	376.2	165-167	46	weiße Kristalle	738, 838, 1094, 1319, 1581, 1602, 2989, 3048
<b>27d</b> <sup>179</sup>	H	F	H	C <sub>19</sub> H <sub>16</sub> FNO <sub>3</sub>	325.3	201-205 (Lit.: k.A.)	57 (Lit.: k.A.)	weißer FS	707, 731, 821, 1248, 1302, 1557, 1609, 1707, 2980, 3049
<b>27e</b> <sup>180</sup>	H	Br	H	C <sub>19</sub> H <sub>16</sub> BrNO <sub>3</sub>	386.2	157 (Lit.: k.A.)	54 (Lit.: k.A.)	weißer, fein- kristalliner FS	710, 738, 1077, 1150, 1311, 1589, 1604, 1716, 2971, 3043
<b>27f</b> <sup>152</sup>	H	Cl	F	C <sub>19</sub> H <sub>15</sub> ClFNO <sub>3</sub>	359.8	211-213 (Lit.: 142 <sup>152</sup> )	62 (Lit.: 55 <sup>152</sup> )	weißer, kristalliner FS	3057, 2370, 1720, 1615
<b>27h</b>	H	H	F	C <sub>19</sub> H <sub>16</sub> FNO <sub>3</sub>	325.3	174	72	weißer FS	703, 729, 827, 1145, 1228, 1319, 1589, 1617, 1707, 2984, 3049

Tabelle 26:  $^1\text{H-NMR}$  (DMSO- $d_6$ ,  $\delta$  [ppm],  $J$  [Hz]):

Verb	H-2	$\text{CH}_{\text{arom.}}$	$\text{CH}_{2\text{benzyl}}$	$\text{CH}_{\text{phenyl}}$	$\text{CH}_{2\text{Ester}}$	$\text{CH}_3\text{Ester}$
<b>27a</b>	8.82 (1H, s)	H-5:8.11 (1H, dd, $J=8.0$ , $J=1.3$ ) H-6:7.44 (1H, ddd, $J=8.0$ , $J=8.0$ , $J_{\text{HF}}=4.4$ ) H-7:7.56 (1H, ddd, $J_{\text{HF}}=14.6$ , $J=7.9$ , $J=1.5$ )	5.72 (2H, d, $J_{\text{HF}}=3.3$ )	7.12 (2H, br), 7.26-7.36 (3H, m)	4.25 (2H, q, $J=7.1$ )	1.29 (3H, t, $J=7.1$ )
<b>27b</b>	8.78 (1H, s)	H-5:8.21 (1H, d, $J=2.7$ ) H-7:7.95 (1H, d, $J=2.7$ )	6.03 (2H, s)	7.07-7.09 (2H, m), 7.25-7.35 (3H, m)	4.24 (2H, q, $J=7.1$ )	1.28 (3H, t, $J=7.1$ )
<b>27d</b>	8.90 (1H, s)	H-5:8.29 (1H, dd, $J=9.0$ , $J_{\text{HF}}=6.6$ ) H-6:7.32-7.38 (1H, m) H-8:7.50 (1H, dd, $J_{\text{HF}}=11.2$ , $J=2.3$ )	5.66 (2H, s)	7.25-7.39 (5H, m)	4.24 (2H, q, $J=7.1$ )	1.29 (3H, t, $J=7.1$ )
<b>27e</b>	8.89 (1H, s)	H-5:8.14 (1H, d, $J=8.6$ ) H-6:7.59 (1H, dd, $J=1.6$ , $J=8.6$ ) H-8:7.87 (1H, d, $J=1.6$ )	5.70 (2H, s)	7.24-7.39 (5H, m)	4.24 (2H, q, $J=7.1$ )	1.29 (3H, t, $J=7.1$ )
<b>27h</b>	8.93 (1H, s)	H-5:7.89 (1H, dd, $J_{\text{HF}}=9.1$ , $J=3.1$ ) H-7:7.60 (1H, ddd, $J=9.3$ , $J_{\text{HF}}=7.9$ , $J=3.1$ ) H-8:7.72 (1H, dd, $J=9.3$ , $J_{\text{HF}}=4.4$ )	5.70 (2H, s)	7.23-7.38 (5H, m)	4.25 (2H, q, $J=7.1$ )	1.29 (3H, t, $J=7.1$ )

Tabelle 27:  $^{13}\text{C}$ -NMR (DMSO- $d_6$ ,  $\delta$  [ppm]):

Verb	C-2	C-3	C <sub>qKeton</sub> /C <sub>qEster</sub>	C <sub>qarom.</sub>	CH <sub>arom.</sub>	CH <sub>2benzyl</sub>	CH <sub>phenyl</sub>	C <sub>qphenyl</sub>	CH <sub>2Ester</sub>	CH <sub>3Ester</sub>
<b>27a</b>	151.9	110.5	164.1, 171.6 (d, $J_{\text{CF}}=2.5$ )	C-4*:128.3 (d, $J_{\text{CF}}=7.3$ ) C-8*:151.4 (d, $J_{\text{CF}}=250.4$ ) C-8*:130.9	C-5:122.6 (d, $J_{\text{CF}}=3.3$ ) C-6:125.6 (d, $J_{\text{CF}}=6.4$ ) C-7:119.9 (d, $J_{\text{CF}}=22.9$ )	59.6	125.5, 127.5, 128.7	137.0 (d, $J_{\text{CF}}=1.8$ )	59.9	14.2
<b>27b</b>	153.6	111.1	163.7, 170.8	C-4*:132.3 C-6:135.7 C-8*:123.0 C-8*:129.8	C-5:125.4 C-7:135.3	58.9	125.8, 127.5, 128.7	137	60.1	14.1
<b>27d</b>	150.4	110.7	164.3, 172.1	C-4*:125.2 (d, $J_{\text{CF}}=1.6$ ) C-7:164.2 (d, $J_{\text{CF}}=249.0$ ) C-8*:140.7 (d, $J_{\text{CF}}=11.9$ )	C-5:129.6 (d, $J_{\text{CF}}=10.7$ ) C-6:113.3 (d, $J_{\text{CF}}=23.1$ ) C-8:104.0 (d, $J_{\text{CF}}=27.1$ )	55.4	126.4, 127.8, 128.8	135.5	59.8	14.2
<b>27e</b>	150.4	110.8	164.2, 172.3	C-4*:127.2 C-7:140.0 C-8*: 127.3	C-5: 128.9 C-6:126.3 C-8: 120.2	55.3	127.9, 128.4, 128.9	140	59.8	14.2
<b>27h</b>	149.9	109.5	164.4, 172.0 (d, $J_{\text{CF}}=2.3$ )	C-4*:130.1 (d, $J_{\text{CF}}=6.6$ ) C-6*:159.1 (Cq, d, $J_{\text{CF}}=244.8$ ) C-8*:135.7	C-5:110.8 (CH, d, $J_{\text{CF}}=22.8$ ) C-7:120.8 (CH, d, $J_{\text{CF}}=24.8$ ) C-8:120.7 (CH, d, $J_{\text{CF}}=8.2$ )	55.9	126.3, 127.8, 128.9	135.7	59.8	14.2

5.2.6.5 Synthese des Ethyl-6-fluor-4-oxo-1-(pyridin-2-ylmethyl)-1,4-dihydrochinolin-3-carboxylats **28h**

**28h**

1.00 g (4.25 mmol) der Verbindung **25h** wird in 70 ml DMF suspendiert, 2.94 g (21.3 mmol)  $K_2CO_3$  sowie 1.39 g (8.50 mmol) 2-(Chlormethyl)pyridin-Hydrochlorid zugegeben und die Mischung auf 80 °C Ölbadtemperatur erhitzt. Die Reaktionskontrolle erfolgt mittels Dünnschichtchromatographie (Kieselgel,  $CHCl_3/MeOH$  10 : 1,  $R_f = 0.37$ ). Nach 37 Stunden wird heiß abfiltriert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Anschließend erfolgt eine säulenchromatographische Reinigung (Kieselgel,  $CHCl_3/MeOH$  10 : 1,  $R_f = 0.37$ ). Das Laufmittel wird im Vakuum abdestilliert und über Nacht bei 4 °C gelagert. Der entstehende weiße Niederschlag wird abfiltriert und aus Ethanol umkristallisiert.

Summenformel:  $C_{18}H_{15}FN_2O_3$   
 Molekulargewicht: 326.3 g/mol  
 Schmelzpunkt: 161 °C  
 Ausbeute: 0.79 g (57%)  
 Aussehen: weißer Feststoff

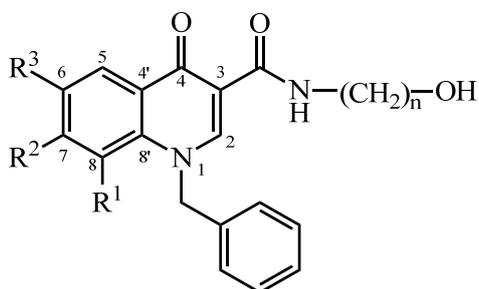
IR [ $cm^{-1}$ ]: 712, 733, 1229, 1317, 1594, 1617, 1718, 3056

$^1H$ -NMR (DMSO- $d_6$ ,  $\delta$  [ppm],  $J$  [Hz]): 1.30 (3H, t,  $J=7.1$ ,  $CH_{3Ester}$ ), 4.25 (2H, q,  $J=7.1$ ,  $CH_{2Ester}$ ), 5.77 (2H, s,  $CH_{2Py}$ ), 7.31 (1H, ddd,  $J=7.5$ ,  $J=4.9$ ,  $J=0.8$ ,  $CH_{Py}$ ), 7.48 (1H, br,  $CH_{Py}$ ), 7.58 (1H, ddd,  $J=9.3$ ,  $J_{HF}=8.0$ ,  $J=3.1$ ,  $H-7$ ), 7.69 (1H, dd,  $J=9.3$ ,  $J_{CF}=4.3$ ,  $H-8$ ), 7.82 (1H, ddd,  $J=7.7$ ,  $J=7.7$ ,  $J=1.8$ ,  $CH_{Py}$ ), 7.88 (1H, dd,  $J_{HF}=9.1$ ,  $J=3.1$ ,  $H-5$ ), 8.48 (1H, ddd,  $J=4.9$ ,  $J=1.8$ ,  $J=0.9$ ,  $CH_{Py}$ ), 9.06 (1H, s,  $H-2$ )

$^{13}C$ -NMR (DMSO- $d_6$ ,  $\delta$  [ppm]): 14.2 ( $CH_{3Ester}$ ), 59.0 ( $CH_{2Py}$ ), 59.8 ( $CH_{2Ester}$ ), 110.7 (CH, d,  $J_{CF}=22.8$ , C-5), 120.5 (CH, d,  $J_{CF}=7.9$ , C-8), 120.7 (CH, d,  $J_{CF}=24.8$ , C-8), 121.7 ( $CH_{Py}$ ), 123.1 ( $CH_{Py}$ ), 123.1 ( $CH_{Py}$ ), 129.8 (Cq, d,  $J_{CF}=6.6$ , C-4'), 135.9 (Cq, d,  $J_{CF}=1.3$ , C-8'), 137.3 ( $CH_{Py}$ ), 149.4 ( $CH_{Py}$ ), 150.7 (CH, C-2), 154.6 (Cq $_{Py}$ ), 159.0 (Cq, d,  $J_{CF}=244.7$ , C-6), 164.4 (Cq $_{Ester}$ ), 172.0 (Cq, d,  $J_{CF}=2.4$ , C-4)

## 5.2.6.6 Synthese der 1-Benzyl-N-hydroxyalkyl-4-oxo-1,4-dihydrochinolin-3-carboxamide

29


**29-C2 (e,h)**
**29h-C3**
**29-C4 (a,e,f,h)**
**29-C6 (a,e,f,h)**

2.00-5.00 mmol des entsprechenden Esters **27** werden mit einem zwei- bis achtfachem Überschuss des jeweiligen Amino-Alkohols verrieben und anschließend auf 130 °C (Ethanolamin) bzw. 150 °C (Propanol-, Butanol-, Hexanolamin) erhitzt. Hierbei bildet sich zunächst eine Schmelze, die schließlich zu einer klaren Lösung reagiert. Scheidet sich mit der Zeit ein Feststoff ab, wird die Mischung abgekühlt und der Feststoff aus Ethanol umkristallisiert. Entsteht während der Reaktion kein Feststoff, wird 6 Stunden lang erhitzt. Durch Abkühlen auf RT bildet sich ein Feststoff, der ebenfalls aus Ethanol umkristallisiert wird. In vielen Fällen ist es nötig, erneut umzukristallisieren. Dies wird nun aus Methanol durchgeführt. Die erhaltenen Produkte werden über Phosphorpentoxid im Vakuum getrocknet.

 a) Ethyl-Derivate (n = 2)
**Tabelle 28:** Allgemeine Daten

Verb	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	R <sup>3</sup>	Summenformel	Mr	Smp [°C]	Ausbeute [%]	Aussehen	IR [cm <sup>-1</sup> ]
<b>29e-C2</b>	H	Br	H	C <sub>19</sub> H <sub>17</sub> BrN <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	401.3	219-221	46	hellgelbe Kristalle	724, 1073, 1529, 1551, 1595, 2936, 3036, 3246
<b>29h-C2</b>	H	H	F	C <sub>19</sub> H <sub>17</sub> FN <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	340.4	205-207	54	weiße Kristalle	741, 1266, 1453, 1549, 1604, 2940, 3050, 3255

**Tabelle 29:**  $^1\text{H-NMR}$  (DMSO- $d_6$ ,  $\delta$  [ppm],  $J$  [Hz]):

Verb	<b>H-2</b>	<b>CH<sub>arom.</sub></b>	<b>CH<sub>2benzyl</sub></b>	<b>CH<sub>phenyl</sub></b>	<b>NH</b>	<b>NH-CH<sub>2</sub></b> und <b>CH<sub>2</sub>-OH</b>	<b>OH</b>
<b>29e-C2</b>	9.04 (1H, s)	<b>H-5:</b> 8.24 (1H, d, $J=8.6$ ) <b>H-6:</b> 7.66 (1H, dd, $J=8.6$ , $J=1.6$ ) <b>H-8:</b> 8.00 (1H, d, $J=1.6$ )	5.79 (2H, s)	7.22-7.24 (2H, m), 7.29-7.39 (3H, m)	9.94 (1H, t, $J=5.5$ )	3.41 (2H, dt, $J=5.6$ , $J=5.5$ ), 3.54 (2H, dt, $J=5.6$ , $J=5.3$ )	4.82 (1H, t, $J=5.3$ )
<b>29h-C2</b>	9.10 (1H, s)	<b>H-5:</b> 7.99 (1H, dd, $J_{\text{HF}}=9.1$ , $J=3.1$ ) <b>H-7:</b> 7.67 (1H, ddd, $J=9.4$ , $J_{\text{HF}}=8.0$ , $J=3.1$ ) <b>H-8:</b> 7.84 (1H, dd, $J=9.4$ , $J_{\text{HF}}=4.4$ )	5.80 (2H, s)	7.21-7.37 (5H, m)	9.98 (1H, t, $J=5.5$ )	3.42 (2H, dt, $J=5.7$ , $J=5.5$ ), 3.55 (2H, dt, $J=5.7$ , $J=5.3$ )	4.82 (1H, t, $J=5.2$ )

**Tabelle 29:**  $^{13}\text{C-NMR}$  (DMSO- $d_6$ ,  $\delta$  [ppm]):

Verb	<b>C-2</b>	<b>C-3</b>	<b>C<sub>Keton</sub></b> <b>C<sub>Amid</sub></b>	<b>C<sub>qarom.</sub></b>	<b>CH<sub>arom.</sub></b>	<b>CH<sub>2benzyl</sub></b>	<b>C<sub>qphenyl</sub></b>	<b>CH<sub>phenyl</sub></b>	<b>NHCH<sub>3</sub></b>	<b>CH<sub>2</sub>-OH</b>
<b>29e-C2</b>	149.2	111.8	163.7, 175.0	<b>C-4*:</b> 126.3 <b>C-7:</b> 140.0 <b>C-8*:</b> 126.7	<b>C-5, C-6:</b> 128.1, 128.2 <b>C-8:</b> 120.3	55.5	135.6	126.4, 127.9, 128.9	41.2	59.8
<b>29h-C2</b>	148.7	110.7	163.8, 174.6 (d, $J_{\text{CF}}=2.4$ )	<b>C-4*:</b> 128.9 <b>C-6:</b> 159.1 (d, $J_{\text{CF}}=245.1$ ) <b>C-8*:</b> 135.7	<b>C-5:</b> 110.4 (d, $J_{\text{CF}}=22.5$ ) <b>C-7:</b> 121.3 (CH, d, $J_{\text{CF}}=24.5$ ) <b>C-8:</b> 120.9 (d, $J_{\text{CF}}=8.4$ )	55.9	135.8	126.4, 127.8, 128.9	41.2	59.9

b) Propyl-derivat ( $n = 3$ )

Tabelle 30: Allgemeine Daten

Verb	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	R <sup>3</sup>	Summenformel	Mr [g/mol]	Smp [°C]	Ausbeute [%]	Aussehen	IR [cm <sup>-1</sup> ]
<b>29h-C3</b>	H	H	F	C <sub>20</sub> H <sub>19</sub> FN <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	354.4	164-165	60	weißer FS	723, 1248, 1538, 1594, 2951, 3020

 Tabelle 31: <sup>1</sup>H-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>, δ [ppm], J [Hz]):

Verb	H-2	CH <sub>arom.</sub>	CH <sub>2benzyl</sub>	CH <sub>phenyl</sub>	NH	NH-CH <sub>2</sub> und CH <sub>2</sub> -OH	Alkyl	OH
<b>29h-C3</b>	9.08 (1H, s)	<b>H-5:</b> 7.99 (1H, dd, $J_{\text{HF}}=9.1$ , $J=3.1$ ) <b>H-7:</b> 7.67 (1H, ddd, $J=9.4$ , $J_{\text{HF}}=7.9$ , $J=3.1$ ) <b>H-8:</b> 7.84 (1H, dd, $J=9.4$ , $J_{\text{HF}}=4.4$ )	5.80 (2H, s)	7.21-7.24 (2H, m), 7.27-7.37 (3H, m)	9.89 (1H, t, $J=5.8$ )	3.41 (2H, dt, $J=6.5$ , $J=5.8$ ), 3.50 (2H, dt, $J=6.5$ , $J=5.3$ )	1.69 (2H, tt, $J=6.5$ , $J=6.5$ )	4.55 (1H, t, $J=5.3$ )

 Tabelle 32: <sup>13</sup>C-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>, δ [ppm]):

Verb	C-2	C-3	C <sub>keton</sub> C <sub>Amid</sub>	C <sub>arom.</sub>	CH <sub>arom.</sub>	CH <sub>2benzyl</sub>	C <sub>qphe</sub> nyl	CH <sub>phenyl</sub>	NHCH <sub>2</sub>	Alkyl	CH <sub>2</sub> -OH
<b>29h-C3</b>	148.7	110.7	163.8, 174.7 (d, $J_{\text{CF}}=2.6$ )	<b>C-4'</b> : 128.9 (d, $J_{\text{CF}}=7.2$ ) <b>C-6:</b> 159.1 (d, $J_{\text{CF}}=245.2$ ) <b>C-8'</b> : 136.8 (d, $J_{\text{CF}}=1.2$ )	<b>C-5:</b> 110.4 (d, $J_{\text{CF}}=22.8$ ) <b>C-7:</b> 121.3 (d, $J_{\text{CF}}=24.9$ ) <b>C-8:</b> 120.9 (d, $J_{\text{CF}}=8.1$ )	56.0	136.7	126.4, 127.8, 128.8	36.5	32.4	58.3

c) Butyl-Derivate (n = 4)
**Tabelle 33:** Allgemeine Daten

Verb	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	R <sup>3</sup>	Summenformel	Mr [g/mol]	Smp [°C]	Ausbeute [%]	Aussehen	IR [cm <sup>-1</sup> ]
<b>29a-C4</b>	F	H	H	C <sub>21</sub> H <sub>21</sub> FN <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	368.4	161	74-88	weißer FS	728, 1247, 1438, 1541, 1603, 2935, 3050, 3226
<b>29e-C4</b>	H	Br	H	C <sub>21</sub> H <sub>21</sub> BrN <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	429.3	202-204	67-87	hellgelber FS	732, 1049, 1453, 1546, 1597, 2954, 3037, 3238
<b>29f-C4</b>	H	Cl	F	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> ClFN <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	402.9	191-197	60	hellgelber FS	727, 1053, 1226, 1542, 2949, 3039, 3241
<b>29h-C4</b>	H	H	F	C <sub>21</sub> H <sub>21</sub> FN <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	368.4	163-165	25	weiße Kristalle	734, 1241, 1437, 1554, 1604, 2933, 3049, 3286

**Tabelle 34:** <sup>1</sup>H-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>, δ [ppm], J [Hz]):

Verb	H-2	CH <sub>arom.</sub>	CH <sub>2benzyl</sub>	CH <sub>phenyl</sub>	NH	NH-CH <sub>2</sub> und CH <sub>2</sub> -OH	Alkyl	OH
<b>29a-C4</b>	8.97 (1H, s)	<b>H-5:</b> 8.21 (1H, dd, J=8.0, J=1.4) <b>H-6:</b> 7.49 (1H, ddd, J=8.0, J=8.0, J <sub>HF</sub> =4.4) <b>H-7:</b> 7.62 (1H, ddd, J=8.0, J <sub>HF</sub> =14.7, J=1.4)	5.82 (2H, d, J <sub>HF</sub> =2.9)	7.11 (2H, m), 7.26-7.35 (3H, m)	9.82 (1H, t, J=5.7)	3.36 (2H, dd, J=12.6, J=6.6), 3.44 (2H, dd, J=11.5, J=6.2,)	1.49-1.62 (4H, m)	4.42 (2H, t, J=5.2)
<b>29e-C4</b>	9.03 (1H, s)	<b>H-5:</b> 8.25 (1H, d, J=8.6) <b>H-6:</b> 7.66 (1H, dd, J=8.6, J=1.6) <b>H-8:</b> 8.00 (1H, d, J=1.6)	5.79 (2H, s)	7.22-7.24 (2H, m), 7.29-7.40 (3H, m)	9.84 (1H, t, J=5.6)	3.35 (2H, q, J=6.0), 3.43 (2H, dd, J=11.5, J=6.1,)	1.46-1.60 (4H, m)	4.42 (1H, t, J=5.2)
<b>29f-C4*</b>	9.05 (1H, s) [8.87]	<b>C-5:</b> 8.15 (1H, d, J <sub>HF</sub> =9.3) <b>C-8:</b> 8.11 (1H, d, J <sub>HF</sub> =5.0)	5.81 (2H, s) [5.72]	7.19-7.25 (2H, m), 7.29-7.40 (3H, m)	9.78 (1H, t, J=5.7) [10.07, (J=5.6)]	3.33-3.37 (2H, m), 3.41-3.45 (2H, m)	1.47 -1.58 (4H, m) [1.60-1.68]	4.42 (1H, t, J=5.1)
<b>29h-C4</b>	9.08 (1H, s)	<b>H-5:</b> 7.99 (1H, dd, J <sub>HF</sub> =9.1, J=3.1) <b>H-7:</b> 7.67 (1H, ddd, J=9.4, J <sub>HF</sub> =8.0, J=3.1) <b>H-8:</b> 7.84 (1H, dd, J=9.4, J <sub>HF</sub> =4.4)	5.80 (2H, s)	7.21-7.37 (5H, m)	9.88 (1H, t, J=5.8)	3.36 (2H, dt, J=6.5, J=5.8), 3.44 (2H, dt, J=6.3, J=5.3)	1.47-1.61 (4H, m)	4.42 (1H, t, J=5.2)

\* 2 Rotationsisomere im Verhältnis 1 : 0.37, Verschiebungen für Nebenisomer, sofern von Hauptisomer verschieden, werden in □ angegeben.

**Tabelle 35:**  $^{13}\text{C}$ -NMR (DMSO- $d_6$ ,  $\delta$  [ppm]):

Verb	C-2	C-3	C <sub>Keton</sub>	C <sub>Amid</sub>	C <sub>quatrom.</sub>	CH <sub>atom.</sub>	CH <sub>2benzyl</sub>	C <sub>qphenyl</sub>	CH <sup>phenyl</sup>	NHCH <sub>2</sub>	Alkyl	CH <sub>2</sub> OH
<b>29a-C4</b>	150.9	111.4	163.3, 174.5 (d, $J_{\text{CF}}=2.4$ )	163.3, 174.5 (d, $J_{\text{CF}}=7.5$ )	C-4 <sup>*</sup> :128.5 (d, $J_{\text{CF}}=7.5$ ) C-8:151.4 (d, $J_{\text{CF}}=250.5$ ) C-8 <sup>*</sup> :130.0	C-5: 122.4 (d, $J_{\text{CF}}=3.4$ ) C-6: 125.7 C-7:119.9 (d, $J_{\text{CF}}=22.7$ )	59.8 (d, $J_{\text{CF}}=14.2$ )	136.9 (d, $J_{\text{CF}}=1.4$ )	125.6, 127.5, 128.7	38.2	25.9, 29.9	60.3
<b>29e-C4</b>	149.2	111.8	163.5, 175.1	163.5, 175.1	C-4 <sup>*</sup> :126.2 C-7:140.0 C-8 <sup>*</sup> :126.7	C-5, C-6: 128.1,128.2 C-8:120.3	55.5	135.6	126.4, 127.9 128.9,	38.2	25.9, 29.9	60.3
<b>29f-C4*</b>	149.2 [141.9]	111.2 [109.7]	163.3, [164.1] 174.2	163.3, [164.1] 174.2	C-4 <sup>*</sup> :127.6 (d, $J_{\text{CF}}=5.8$ ) C-6:154.4 (d, $J_{\text{CF}}=247.7$ ) C-7:152.8 (d, $J_{\text{CF}}=27.4$ ) C-8 <sup>*</sup> :136.2 (d, $J_{\text{CF}}=1.4$ )	C-5:112.2 (d, $J_{\text{CF}}=21.5$ ) C-8:120.5	55.8	135.4	126.5, 128.0, 128.9	38.2	25.9, 29.9	60.3
<b>29h-C4</b>	148.7	110.7	163.6, 174.7 (d, $J_{\text{CF}}=2.6$ )	163.6, 174.7 (d, $J_{\text{CF}}=7.2$ )	C-4 <sup>*</sup> :129.0 (d, $J_{\text{CF}}=7.2$ ) C-6:159.1 (d, $J_{\text{CF}}=245.1$ ) C-8 <sup>*</sup> :135.8 (d, $J_{\text{CF}}=0.9$ )	C-5:110.4 (d, $J_{\text{CF}}=22.6$ ) C-7:121.3 (d, $J_{\text{CF}}=25.1$ ) C-8:120.9 (d, $J_{\text{CF}}=8.2$ )	56	135.7	126.4, 127.8, 128.9	38.2	25.9, 29.9	60.3

\* 2 Rotationsisomere im Verhältnis 1 : 0.37, Verschiebungen für Nebenisomer, sofern von Hauptisomer verschieden, werden in □ angegeben.

d) Hexyl-L-Kette (n = 6)

Tabelle 36: Allgemeine Daten

Verb	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	R <sup>3</sup>	Summenformel	Mr [g/mol]	Smp [°C]	Ausbeute [%]	Aussehen	IR [cm <sup>-1</sup> ]
<b>29a-C6</b>	F	H	H	C <sub>23</sub> H <sub>25</sub> FN <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	396.5	145-49	88	weißer FS	740, 1246, 1556, 1604, 2927, 3053, 3232
<b>29e-C6</b>	H	Br	H	C <sub>23</sub> H <sub>25</sub> BrN <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	457.4	172	26	hellbeige- farbener FS	728, 1056, 1455, 1533, 1596, 2928, 3038, 3240
<b>29f-C6</b>	H	Cl	F	C <sub>23</sub> H <sub>24</sub> ClFN <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	430.9	194-197	57	hellgelber FS	732, 1026, 1247, 1452, 1547, 1603, 2931, 3053,
<b>29h-C6</b>	H	H	F	C <sub>23</sub> H <sub>25</sub> FN <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	396.5	151-152	33	hellbeige- farbener FS	723, 1248, 1542, 1602, 2951, 3042

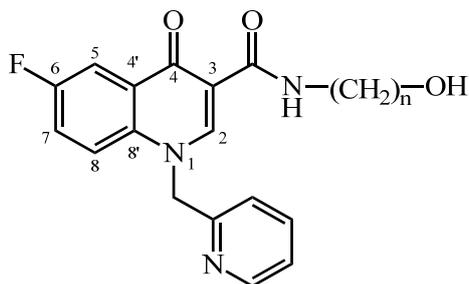
**Tabelle 37:**  $^1\text{H-NMR}$  (DMSO- $d_6$ ,  $\delta$  [ppm],  $J$  [Hz]):

Verb	H-2	CH <sub>atom.</sub>	CH <sub>2benzyl</sub>	CH <sub>phenyl</sub>	NH	NH-CH <sub>2</sub> und CH <sub>2</sub> -OH	Alkyl	OH
<b>29a-C6</b>	8.97 (1H, s)	<b>H-5:</b> 8.21 (1H, dd, $J=8.0$ , $J=1.4$ ) <b>H-6:</b> 7.49 (1H, ddd, $J=8.0$ , $J=8.0$ , $J_{\text{HF}}=4.3$ ) <b>H-7:</b> 7.62 (1H, ddd, $J_{\text{HF}}=14.7$ , $J=8.0$ , $J=1.4$ )	5.82 (2H, s)	7.11 (2H, m), 7.26-7.36 (3H, m)	9.81 (1H, t, $J=5.6$ )	3.34-3.41 (4H, m)	1.33-1.35 (4H, m), 1.40-1.47 (2H, m), 1.51-1.58 (2H, m)	4.33 (1H, t, $J=5.2$ )
<b>29e-C6</b>	9.03 (1H, s)	<b>C-5:</b> 8.24 (1H, d, $J=8.6$ ) <b>C-6:</b> 7.66 (1H, dd, $J=8.6$ , $J=1.6$ ) <b>C-8:</b> 8.00 (1H, d, $J=1.6$ )	5.79 (2H, s)	7.22-7.24 (2H, m), 7.30-7.39 (3H, m)	9.84 (1H, t, $J=5.6$ )	3.34-3.39 (4H, m)	1.32-1.36 (4H, m), 1.40-1.46 (2H, m), 1.50-1.57 (2H, m)	4.33 (1H, br)
<b>29f-C6</b>	9.04 (1H, s)	<b>H-5:</b> 8.15 (1H, d, $J_{\text{HF}}=9.3$ ) <b>H-8:</b> 8.10 (1H, d, $J_{\text{HF}}=6.0$ )	5.80 (2H, s)	7.23-7.25 (2H, m), 7.29-7.39 (3H, m)	9.77 (1H, t, $J=5.6$ )	3.36-3.41 (4H, m)	1.31 -1.36 (4H, m), 1.39-1.46 (2H, m), 1.50-1.57 (2H, m)	4.33 (1H, t, $J=5.2$ )
<b>29h-C6</b>	9.08 (1H, s)	<b>H-5:</b> 7.99 (1H, dd, $J_{\text{HF}}=9.1$ , $J=3.1$ ) <b>H-7:</b> 7.67 (1H, ddd, $J=9.4$ , $J_{\text{HF}}=8.0$ , $J=3.1$ ) <b>H-8:</b> 7.84 (1H, dd, $J=9.4$ , $J_{\text{HF}}=4.4$ )	5.80 (2H, s)	7.21-7.24 (2H, m), 7.24-7.38 (3H, m)	9.87 (1H, t, $J=5.7$ )	3.34-3.41 (2H, m)	1.33-1.37 (4H, m), 1.40-1.47 (2H, m), 1.51-1.58 (2H, m)	4.33 (1H, t, $J=5.2$ )

**Tabelle 38:**  $^{13}\text{C}$ -NMR (DMSO- $d_6$ ,  $\delta$  [ppm]):

Verb	C-2	C-3	C <sub>Keton</sub> C <sub>Amid</sub>	C <sub>arom.</sub>	CH <sub>arom.</sub>	CH <sub>2benzyl</sub>	C <sub>qphenyl</sub>	CH <sub>phenyl</sub>	NHCH <sub>2</sub>	Alkyl	CH <sub>2</sub> -OH
<b>29-C6a</b>	150.9	111.4	163.3, 174.5 (d, $J_{\text{CF}}=2.4$ )	C-4': 128.5 (d, $J_{\text{CF}}=7.4$ ) C-8: 151.4 (d, $J_{\text{CF}}=250.0$ ) C-8': 130.0	C-5: 122.4 (d, $J_{\text{CF}}=3.3$ ) C-6: 125.7 C-7: 119.9 (d, $J_{\text{CF}}=23.1$ )	59.8 (d, $J_{\text{CF}}=14.9$ )	136.9	125.6, 127.5, 128.7	38.3	25.1, 26.4, 29.2, 32.4	60.6
<b>29e-C6</b>	149.2	111.8	163.5, 175.1	C-4': 126.2 C-7: 140.0 C-8': 126.7	C-5, C-6: 128.1, 128.2 C-8: 120.3	55.5	135.6	126.4, 127.9	38.3	25.1, 26.4, 29.2, 32.4	60.5
<b>29f-C6</b>	149.2	111.2	163.3, 174.3 (d, $J_{\text{CF}}=2.6$ )	C-4': 127.6 (d, $J_{\text{CF}}=6.1$ ) C-6: 154.3 ( $J_{\text{CF}}=247.6$ ) C-7: 152.9 (d, $J_{\text{CF}}=27.6$ ) C-8': 136.2	C-5: 112.2 (d, $J_{\text{CF}}=22.2$ ) C-8: 120.5	55.8	135.4	126.5, 128.0, 128.9	38.3	25.1, 26.4, 29.2, 32.4	60.6
<b>29h-C6</b>	148.7	110.7	163.6, 174.7 (d, $J_{\text{CF}}=2.3$ )	C-4': 128.9 (d, $J_{\text{CF}}=7.2$ ) C-6: 159.1 (d, $J_{\text{CF}}=238.3$ ) C-8': 135.8	C-5: 110.5 (d, $J_{\text{CF}}=22.8$ ) C-7: 121.3 (d, $J_{\text{CF}}=24.2$ ) C-8: 120.9 (d, $J_{\text{CF}}=8.1$ )	56	135.7	126.4, 127.8, 128.9	38.3	25.1, 26.4, 29.2, 32.4	60.6

5.2.6.7 Synthese der N-Hydroxyalkyl-4-oxo-1-(pyrididin-2-ylmethyl)-1,4-dihydrochinolin-3-carboxamide **30h-C4**, **30h-C-6**



**30h-C4**

**30h-C6**

1.20 g (3.68 mmol) Verbindung **28** werden in 15.0 mmol 1-Amino-4-butanol suspendiert bzw. mit 1-Amino-6-hexanol verrieben und die Mischung jeweils auf 150 °C erhitzt. Das Gemisch wird zunächst flüssig und schließlich wieder fest. Nach Abkühlen auf RT wird der Feststoff aus Ethanol umkristallisiert und der erhaltene Feststoff im Vakuum über Phosphorpentoxid getrocknet.

a) Butyl-Derivat (n = 4) **30h-C4**

Summenformel:  $C_{20}H_{20}FN_3O_3$   
 Molekulargewicht: 369.4 g/mol  
 Schmelzpunkt: 213 °C  
 Ausbeute: 1.18 g (87%)  
 Aussehen: weißer Feststoff

**IR** [ $cm^{-1}$ ]: 715, 1240, 1434, 1550, 1603, 2936, 3051, 3231

**<sup>1</sup>H-NMR** (DMSO- $d_6$ ,  $\delta$  [ppm],  $J$  [Hz]): 1.47-1.61 (4H, m, Butylkette), 3.36-3.45 (4H, m,  $NHCH_2$  und  $CH_2OH$ ), 4.43 (1H, t,  $J=5.1$ , OH), 5.90 (2H, s,  $CH_2Py$ ), 7.31 (1H, ddd,  $J=7.5$ ,  $J=4.8$ ,  $J=0.86$ ,  $CH_{Py}$ ), 7.50 (1H, br,  $CH_{Py}$ ), 7.65 (1H, ddd,  $J_{HF}=9.4$ ,  $J=8.0$ ,  $J=3.1$ , H-7), 7.98 (1H, dd,  $J_{HF}=9.1$ ,  $J=3.1$ , H-5), 7.80-7.84 (2H, m,  $CH_{Py}$  und H-8), 8.44-8.46 (1H, m,  $CH_{Py}$ ), 9.06 (1H, s, H-2), 9.90 (1H, t,  $J=5.7$ , NH).

**<sup>13</sup>C-NMR** (DMSO- $d_6$ ,  $\delta$  [ppm]): 25.9, 29.9 (je  $CH_2$ , Butylkette), 38.2 ( $NHCH_2$ ), 57.3 ( $CH_2-Py$ ), 60.3 ( $CH_2-OH$ ), 110.1 (d,  $J_{CF}=22.8$ , C-5), 120.9 (Cq, C-3), 120.7 (d,  $J_{CF}=8.0$ , C-8), 121.3 (d,  $J_{CF}=24.8$ , C-7), 121.8, 123.1, 137.3, 149.4 (je  $CH_{Py}$ ), 128.7 (d,  $J_{CF}=7.1$ , C-4'), 136.1 (d,  $J_{CF}=1.1$ , C-8'), 149.6 (CH, C-2), 154.6 (Cq $_{Py}$ ), 159.0 (d,  $J_{CF}=244.9$ , C-6), 163.7 (Cq $_{Amid}$ ) 174.7 (d,  $J_{CF}=2.6$ , C-4)

b) Hexyl-Derivat (n = 6) 30h-C6

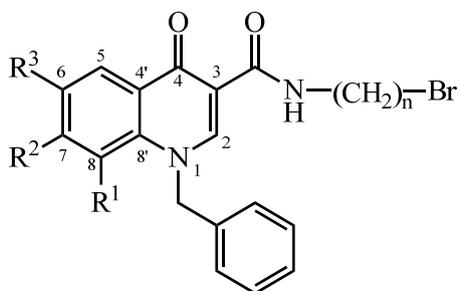
Summenformel: C<sub>22</sub>H<sub>24</sub>FN<sub>3</sub>O<sub>3</sub>  
 Molekulargewicht: 397.4 g/mol  
 Schmelzpunkt: 197-199 °C  
 Ausbeute: 0.92 g (63 %)  
 Aussehen: weißer Feststoff

IR [cm<sup>-1</sup>]: 734, 1239, 1432, 1552, 1604, 2933, 3047, 3230

<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>, δ [ppm], J [Hz]): 1.32-1.37 (4H, m, Hexylkette) 1.40-1.47 (2H, m, Hexylkette), 1.51-1.56 (2H, m, Hexylkette), 3.34-3.41 (4H, m, NHCH<sub>2</sub> und CH<sub>2</sub>OH), 4.33 (1H, t, J=5.1, OH), 5.89 (2H, s, CH<sub>2</sub>Py), 7.31 (1H, ddd, J=7.4, J=4.9, J=0.8, CH<sub>Py</sub>), 7.50 (1H, br, CH<sub>Py</sub>), 7.65 (1H, ddd, J<sub>HF</sub>=9.4, J=8.0, J=3.1, H-7), 7.80-7.84 (2H, m, CH<sub>Py</sub> und H-8), 7.98 (1H, dd, J<sub>HF</sub>=9.1, J=3.1, H-5), 8.44-8.46 (1H, m, CH<sub>Py</sub>), 9.06 (1H, s, H-2), 9.89 (1H, t, J=5.7, NH)

<sup>13</sup>C-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>, δ [ppm]): 25.1, 26.4, 29.3, 32.4 (je CH<sub>2</sub>, Hexylkette), 38.2 (NHCH<sub>2</sub>), 57.2 (CH<sub>2</sub>-Py), 60.6 (CH<sub>2</sub>OH), 110.1 (d, J<sub>CF</sub>=22.8, C-5), 120.9 (Cq, C-3), 120.7 (d, J<sub>CF</sub>=8.2, C-8), 121.2 (d, J<sub>CF</sub>=25.5, C-7), 121.8, 123.1, 137.3, 149.4 (je CH<sub>Py</sub>), 128.7 (d, J<sub>CF</sub>=7.1, C-4'), 136.1 (d, J<sub>CF</sub>=1.1, C-8'), 149.5 (CH, C-2), 154.4 (Cq<sub>Py</sub>), 159.0 (d, J<sub>CF</sub>=244.9, C-6), 163.7 (Cq<sub>Amid</sub>) 174.7 (C-4).

5.2.6.8 Synthese der 1-Benzyl-N-bromalkyl-4-oxo-1,4-dihydrochinolin-3-carboxamide **31**



**31-C4 (a,e,f,h)**

**31-C6 (a,e,f,h)**

1-74-5.57 mmol der entsprechenden Hydroxyl-Verbindung mit Butyl- (**29-C4**) bzw. Hexyl-Kette (**29-C6**) werden in einem großen Überschuss HBr (konz.) gelöst, vorsichtig ca. ein Zehntel dieser Menge H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (konz.) zugegeben und die Reaktionslösung für 4 bis 6 Stunden unter Rückfluss erhitzt. Nach Abkühlen des Reaktionsgemisches wird dieses auf Wasser gegossen und mehrmals mit Chloroform extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden bis zur neutralen Reaktion über K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> gerührt, das übrige K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> abfiltriert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der erhaltene Feststoff wird zunächst aus Ethanol umkristallisiert. In vielen Fällen ist es nötig, erneut aus Methanol umzukristallisieren. Das Produkt wird schließlich über Phosphorpentoxid im Vakuum getrocknet.

a) Butyl-Kette (n = 4)

Tabelle 39: Allgemeine Daten

Verb	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	R <sup>3</sup>	Summenformel	Mr [g/mol]	Smp [°C]	Ausbeute [%]	Aussehen	IR [cm <sup>-1</sup> ]
<b>31a-C4</b>	F	H	H	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> BrFN <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	431.3	202-204	37	weißer FS	773, 1081, 1246, 1438, 1494, 1653, 2951, 3053, 3223
<b>31e-C4</b>	H	Br	H	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> Br <sub>2</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	492.2	199-200	25	hellgelber FS	678, 726, 1055, 1461, 1538, 1595, 2946, 3036, 3217
<b>31f-C4</b>	H	Cl	F	C <sub>21</sub> H <sub>19</sub> BrClFN <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	465.7	205-206	22	hellgelber FS	667, 733, 1058, 1243, 1453, 1544, 1603, 2933, 3056, 3222
<b>31h-C4</b>	H	H	F	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> BrFN <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	431.3	172-173	58	hellbeiger FS	682, 737, 1228, 1448, 1541, 1605, 2940, 3045, 3224

Tabelle 40:  $^1\text{H-NMR}$  (DMSO- $d_6$ ,  $\delta$  [ppm],  $J$  [Hz]):

Verb	H-2	$\text{CH}_{\text{arom.}}$	$\text{CH}_{2\text{benzyl}}$	$\text{CH}_{\text{phenyl}}$	NH	NH- $\text{CH}_2$	Alkyl	$\text{CH}_2\text{-Br}$
<b>31a-C4</b>	8.97 (1H, s)	<b>H-5:</b> 8.21 (1H, dd, $J=8.0$ , $J=1.4$ ) <b>H-6:</b> 7.50 (1H, ddd, $J=8.0$ , $J=8.0$ , $J_{\text{HF}}=4.4$ ) <b>H-7:</b> 7.62 (1H, ddd, $J_{\text{HF}}=14.7$ , $J=8.0$ , $J=1.4$ )	5.82 (2H, d, $J_{\text{HF}}=2.8$ )	7.10-7.12 (2H, m), 7.26-7.36 (3H, m)	9.84 (1H, t, $J=5.7$ )	3.39 (2H, dt, $J=6.6$ , $J=6.1$ )	1.64-1.71 (2H, m), 1.85-1.92 (2H, m)	3.59 (2H, t, $J=6.7$ )
<b>31e-C4</b>	9.03 (1H, s)	<b>H-5:</b> 8.24 (1H, d, $J=8.6$ ) <b>H-6:</b> 7.66 (1H, dd, $J=8.6$ , $J=1.6$ ) <b>H-8:</b> 8.00 (1H, d, $J=1.6$ )	5.79 (2H, s)	7.22-7.25 (2H, m), 7.28-7.39 (3H, m)	9.86 (1H, t, $J=5.8$ )	3.36-3.39 (2H, m)	1.63-1.70 (2H, m), 1.84-1.91 (2H, m)	3.59 (2H, t, $J=6.7$ )
<b>31f-C4</b>	9.05 (1H, s)	<b>H-5:</b> 8.15 (1H, d, $J_{\text{HF}}=8.9$ ) <b>H-8:</b> 8.10 (1H, d, $J_{\text{HF}}=5.0$ )	5.80 (2H, s)	7.23-7.25 (2H, m), 7.29-7.39 (3H, m)	9.79 (1H, t, $J=5.6$ )	3.36-3.41 (2H, m)	1.63-1.70 (2H, m), 1.84-1.92 (2H, m)	3.58 (2H, t, $J=6.7$ )
<b>31h-C4</b>	9.08 (1H, s)	<b>H-5:</b> 7.99 (1H, dd, $J_{\text{HF}}=9.1$ , $J=3.1$ ) <b>H-7:</b> 7.67 (1H, ddd, $J=9.4$ , $J_{\text{HF}}=8.0$ , $J=3.1$ ) <b>H-8:</b> 7.84 (1H, dd, $J=9.4$ , $J_{\text{HF}}=4.4$ )	5.81 (2H, s)	7.22-7.37 (5H, m)	9.90 (1H, t, $J=6.0$ )	3.39 (2H, dt, $J=6.7$ , $J=6.0$ )	1.64-1.71 (2H, m), 1.85-1.92 (2H, m)	3.59 (2H, t, $J=6.7$ )

**Tabelle 41:**  $^{13}\text{C}$ -NMR (DMSO- $d_6$ ,  $\delta$  [ppm]):

Verb	C-2	C-3	C <sub>Keton</sub> C <sub>Amid</sub>	C <sub>quat.</sub>	CH <sub>arom.</sub>	CH <sub>2benzyl</sub>	C <sub>qphenyl</sub>	CH <sub>phenyl</sub>	NHCH <sub>2</sub>	Alkyl	CH <sub>2</sub> -Br
<b>31a-C4</b>	150.9	111.3	163.5, 174.5 (d, $J_{\text{CF}}=2.4$ )	C-4*: 128.5 (d, $J_{\text{CF}}=7.8$ ), C-8*: 130.0, C-9*: 149.0 (d, $J_{\text{CF}}=248.0$ )	C-5: 122.4 (d, $J_{\text{CF}}=3.1$ ) C-6*: 125.7 C-7*: 119.9 (d, $J_{\text{CF}}=22.8$ )	59.9	136.9	125.6, 127.5, 128.7	37.4	28.0, 29.8, 34.7	34.7
<b>31e-C4</b>	149.3	111.7	163.6, 175.1	C-4*: 126.2 C-8*: 126.7, C-7*: 140.0	C-5, C-6: 128.1, 128.9 C-8*: 120.3	55.6	135.6	126.4, 127.9, 128.9	37.4	28.0, 29.8	34.7
<b>31f-C4</b>	149.2	111.2	163.3, 174.3	C-4*: 127.6 (d, $J_{\text{CF}}=5.8$ ) C-8*: 136.2 (d, $J_{\text{CF}}=2.0$ ) C-6*: 153.7 C-7*: 153.0	C-5: 112.1 (d, $J_{\text{CF}}=22.3$ ) C-8*: 120.5	55.8	135.4	126.5, 128.0, 128.9	37.4	28.0, 29.8	34.7
<b>31h-C4</b>	148.7	110.6,	163.8, 174.7 (d, $J_{\text{CF}}=2.5$ )	C-4*: 128.9 (d, $J_{\text{CF}}=7.0$ ), C-6*: 159.1 (d, $J_{\text{CF}}=244.9$ ) C-8*: 135.8 (d, $J_{\text{CF}}=0.9$ )	C-5: 110.4 (d, $J_{\text{CF}}=23.6$ ) C-7*: 121.3 (d, $J_{\text{CF}}=25.1$ ) C-8*: 120.9 (d, $J_{\text{CF}}=8.3$ )	56.0	135.7	126.4, 127.8, 128.9	37.4	28.0, 29.8	34.7

## b) Hexyl-Derivate

Tabelle 42: Allgemeine Daten

Verb	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	R <sup>3</sup>	Summenformel	Mr [g/mol]	Smp [°C]	Ausbeute [%]	Aussehen	IR [cm <sup>-1</sup> ]
<b>31a-C6</b>	F	H	H	C <sub>23</sub> H <sub>24</sub> BrFN <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	459.4	197-199	34	weißer FS	665, 734, 1245, 1452, 1555, 1603, 2931, 3045, 3211
<b>31e-C6</b>	H	Br	H	C <sub>23</sub> H <sub>24</sub> BrI <sub>2</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	520.3	191-194	28	beige- farbener FS	678, 726, 1056, 1452, 1549, 1596, 2929, 3038, 3189
<b>31f-C6</b>	H	Cl	F	C <sub>23</sub> H <sub>23</sub> BrClFN <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	493.8	192-193	41	beige- farbener FS	667, 732, 1057, 1243, 1453, 1544, 1603, 2933, 3056, 3222
<b>31h-C6</b>	H	H	F	C <sub>23</sub> H <sub>24</sub> BrFN <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	459.4	179	78	hellgelber FS	684, 734, 1228, 1451, 1538, 1538, 1605, 2937, 3045

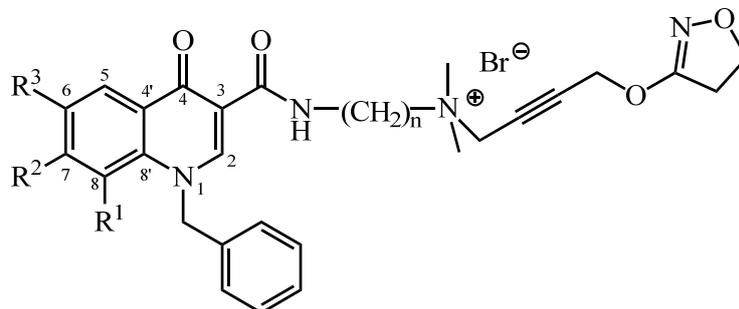
**Tabelle 43:**  $^1\text{H-NMR}$  (DMSO- $d_6$ ,  $\delta$  [ppm],  $J$  [Hz]):

Verb	H-2	CH <sub>arom.</sub>	CH <sub>2benzyl</sub>	CH <sub>phenyl</sub>	NH	NH-CH <sub>2</sub>	Alkyl	CH <sub>2</sub> -Br
<b>31a-C6</b>	8.97 (1H, s)	<b>H-5:</b> 8.21 (1H, dd, $J=8.0$ , $J=1.3$ ) <b>H-6:</b> 7.50 (1H, ddd, $J=8.0$ , $J=8.0$ , $J_{\text{HF}}=4.3$ ) <b>H-7:</b> 7.62 (1H, ddd, $J_{\text{HF}}=14.8$ , $J=8.0$ , $J=1.3$ )	5.82 (2H, d, $J_{\text{HF}}=2.7$ )	7.10-7.12 (2H, m), 7.26-7.36 (3H, m)	9.82 (1H, t, $J=5.6$ )	3.32-3.38 (2H, m)	1.35-1.48 (4H, m), 1.52-1.59 (2H, m), 1.79-1.86 (2H, m)	3.54 (2H, t, $J=6.7$ )
<b>31e-C6</b>	9.02 (1H, s)	<b>H-5:</b> 8.24 (1H, d, $J=8.6$ ) <b>H-6:</b> 7.66 (1H, dd, $J=8.6$ , $J=1.6$ ) <b>H-8:</b> 8.00 (1H, d, $J=1.6$ )	5.79 (2H, s)	7.22-7.24 (2H, m), 7.31-7.39 (3H, m)	9.84 (1H, t, $J=5.6$ )	3.33-3.37 (2H, m)	1.34 (4H, m), 1.51-1.58 (2H, m), 1.78-1.85 (2H, m)	3.53 (2H, t, $J=6.7$ )
<b>31f-C6</b>	9.05 (1H, s)	<b>H-5:</b> 8.15 (1H, d, $J_{\text{HF}}=9.3$ ) <b>H-8:</b> 8.11 (1H, d, $J_{\text{HF}}=6.1$ )	5.81 (2H, s)	7.23-7.25 (2H, m), 7.29-7.39 (3H, m)	9.77 (1H, t, $J=5.7$ )	3.32-3.36 (2H, m)	1.34-1.47 (4H, m), 1.51-1.58 (2H, m), 1.78-1.85 (2H, m)	3.53 (2H, t, $J=6.7$ )
<b>31h-C6</b>	9.08 (1H, s)	<b>H-5:</b> 7.99 (dd, $J_{\text{HF}}=9.1$ , $J=3.1$ ) <b>H-7:</b> 7.67 (ddd, $J=9.4$ , $J_{\text{HF}}=8.0$ , $J=3.1$ ) <b>H-8:</b> 7.84 (dd, $J=9.4$ , $J_{\text{HF}}=4.4$ )	5.80 (2H, s)	7.21-7.7.37 (5H, m)	9.88 (1H, t, $J=5.6$ )	3.32-3.37 (2H, m)	1.33-1.47 (4H, m), 1.52-1.59 (2H, m), 1.78-1.85 (2H, m)	3.53 (2H, t, $J=6.7$ )

Tabelle 44:  $^{13}\text{C}$ -NMR (DMSO- $d_6$ ,  $\delta$  [ppm]):

Verb	C-2	C-3	$\text{C}_{\text{Keton}}$ $\text{C}_{\text{Amid}}$	$\text{C}_{\text{arom.}}$	$\text{CH}_{\text{arom.}}$	$\text{CH}_2$ benzyl	$\text{C}_{\text{qphenyl}}$	$\text{CH}_{\text{phenyl}}$	NHCH $_2$	Alkyl	CH $_2$ -Br
<b>31a-C6</b>	150.9	111.4	163.3, 174.4	C-4*:128.5 (d, $J_{\text{CF}}=6.5$ ) C-8*:150.8 (d, $J_{\text{CF}}=243.6$ ) C-8*:130.0	C-5:122.4 (d, $J_{\text{CF}}=1.7$ ) C-6:125.7 C-7:120.0 (d, $J_{\text{CF}}=24.1$ )	59.7	136.9	125.6, 127.5, 128.7	38.2	25.6, 27.1, 29.0, 32.1	35.0
<b>31e-C6</b>	149.2	111.7	163.5, 175.1	C-4*:126.2 C-7:140.0 C-8*:126.7	C-5:128.3 C-6:128.1 C-8:120.3	55.5	135.6	126.4, 127.9, 128.9	38.2	25.6, 27.2, 29.0, 32.1	35.0
<b>31f-C6</b>	149.2	111.2	163.3, 174.3	C-4*:126.6 C-6:154.3 (d, $J_{\text{CF}}=245.9$ ) C-7:152.9 (d, $J_{\text{CF}}=24.4$ ) C-8*:136.2 (d, $J_{\text{CF}}=1.7$ )	C-5:112.1 (d, $J_{\text{CF}}=22.9$ ) C-8:120.5	55.8	135.4	126.5, 128.0, 128.9	38.2	25.5, 27.1, 29.0, 32.1	35.0
<b>31h-C6</b>	148.7	110.7	163.6, 174.7 (d, $J_{\text{CF}}=2.3$ )	C-4*:135.8 (d, $J_{\text{CF}}=1.1$ ) C-6:159.1 (d, $J_{\text{CF}}=245.1$ ) C-8*:135.7	C-5:110.4 (d, $J_{\text{CF}}=22.8$ ) C-7:121.3 (d, $J_{\text{CF}}=24.8$ ) C-8:120.9 (d, $J_{\text{CF}}=8.5$ )	56.0	135.7	126.4, 127.8, 128.8	38.2	25.6, 27.2, 29.0, 32.1	35.0

5.2.6.9 Synthese der Chinolon-Iperoxo-Hybridverbindungen **32**



**32-C4 (a,e,f,h)**

**32-C6 (a,e,f,h)**

0.33 – 0.40 mmol der entsprechenden Verbindung **31-C4** bzw. **31-C6** werden in 20 ml abs. Acetonitril gelöst, 2 bis 3 Äquivalente Iperoxo-Base **10**, sowie eine Spatelspitze KI/K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> zugegeben und die Mischung im Glasbombenrohr auf 55 °C Ölbadtemperatur erhitzt. Der Reaktionsverlauf wird dünn-schichtchromatographisch verfolgt (MeOH/NH<sub>4</sub>NO<sub>2</sub>, 3:2, R<sub>f</sub> = 0.54-0.68).

Nach beendeter Reaktion wird die Mischung portionsweise in Et<sub>2</sub>O getropft und der entstehende weiße Niederschlag über eine Glasfritte filtriert. Der erhaltene Feststoff wird mit Et<sub>2</sub>O gewaschen und über Phosphorpentoxid im Vakuum getrocknet. Zur weiteren Reinigung wird der Feststoff zunächst aus Methanol umkristallisiert. Der dabei entstehende Feststoff wird in Dichlormethan in der Hitze gelöst und anschließend das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Dieser Vorgang wird mehrmals wiederholt und das Produkt im Anschluss über Phosphorpentoxid im Vakuum getrocknet.

**a) Butyl-Kette (n = 4)**

Tabelle 45: Allgemeine Daten

Verb	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	R <sup>3</sup>	Summenformel	Mr [g/mol]	Smp [°C]	Ausbeute [%]	Dauer	Aussehen	IR [cm <sup>-1</sup> ]
<b>32a-C4</b>	F	H	H	C <sub>30</sub> H <sub>34</sub> BrFN <sub>4</sub> O <sub>4</sub>	613.5	166-167	47	6 d	weißer FS	731, 1026, 1249, 1454, 1556, 1602, 1655, 2952, 3030, 3246
<b>32e-C4</b>	H	Br	H	C <sub>30</sub> H <sub>34</sub> Br <sub>2</sub> N <sub>4</sub> O <sub>4</sub>	674.4	62-67	51	6 d	hellgelber FS	736, 1222, 1250, 1476, 1558, 1603, 1654, 2929
<b>32f-C4</b>	H	Cl	F	C <sub>30</sub> H <sub>33</sub> BrClFN <sub>4</sub> O <sub>4</sub>	648.0	135-140	22	21 d	hellbrauner FS	803.2, 1227.5, 1265.1, 1339.3, 1454.1, 1542.8, 1625.7, 1652.7, 2357.6, 2948.6, 3050.8, 3372.9
<b>32h-C4</b>	H	H	F	C <sub>30</sub> H <sub>34</sub> BrFN <sub>4</sub> O <sub>4</sub>	613.5	94-101	37	30 d	beige-farbener FS	731, 1026, 1211, 1248, 1454, 1555, 1607, 1630, 1648, 2933, 2976, 3048

**Tabelle 46:** <sup>1</sup>H-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>, δ [ppm], J [Hz]):

Verb	H-2	CH <sub>arom.</sub>	CH <sub>2benzyl</sub>	CH <sup>phenyl</sup>	NH	NH-CH <sub>2</sub> u. CH <sub>2</sub> -N <sup>+</sup>	Alkyl1	N <sup>+</sup> (CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	Iper
<b>32a-C4</b>	8.97 (1H, s)	<b>C-5:</b> 8.21 (1H, dd, J=8.0, J=1.4) <b>C-6:</b> 7.51 (1H, ddd, J=8.0, J=8.0, J <sub>HF</sub> =4.3) <b>C-7:</b> 7.64 (1H, ddd, J <sub>HF</sub> =14.8, J=8.0, J=1.4)	5.83 (2H, d, J <sub>HF</sub> =2.5)	7.10-7.12 (2H, m), 7.27-7.36 (3H, m)	9.87 (1H, t, J=5.7)	3.39-3.45 (2H, m)	1.59-1.64 (2H, m), 1.74-1.82 (2H, m)	3.09 (6H, s)	3.01 (2H, t, J=9.6), 4.31 (2H, t, J=9.6), 4.45 (2H, s), 4.94 (2H, s)
<b>32e-C4</b>	9.02 (1H, s)	<b>C-5:</b> 8.25 (1H, d, J=8.7) <b>C-6:</b> 7.68 (1H, dd, J=8.7, J=1.6) <b>C-8:</b> 8.02 (1H, d, J=1.6)	5.80 (2H, s)	7.22-7.24 (2H, m), 7.30-7.39 (3H, m)	9.02 (1H, s)	3.39-3.44 (4H, m)	1.55-1.63 (2H, m), 1.73-1.82 (2H, m)	3.08 (6H, s)	3.00 (2H, t, J=9.6), 4.31 (2H, t, J=9.6), 4.44 (2H, s), 4.94 (2H, s)
<b>32f-C4</b>	9.04 (1H, s)	8.13-8.16 (2H, m)	5.82 (2H, s)	7.23-7.39 (5H, m)	9.83 (1H, t, J=5.6)	3.37-3.44 (4H, m)	1.55-1.64 (2H, m), 1.73-1.81 (2H, m)	3.09 (6H, s)	3.01 (2H, t, J=9.6), 4.31 (2H, t, J=9.6), 4.45 (2H, s), 4.94 (2H, s)
<b>32h-C4</b>	9.07 (1H, s)	<b>H-5:</b> 7.99 (1H, dd, J <sub>HF</sub> =9.0, J=3.0) <b>H-7:</b> 7.69 (1H, ddd, J=9.3, J <sub>HF</sub> =8.0, J=3.1) <b>H-8:</b> 7.86 (1H, dd, J=9.5, J <sub>HF</sub> =4.3)	5.81 (2H, s)	7.21-7.23 (2H, m), 7.28-7.38 (3H, m)	9.93 (1H, t, J=5.7)	3.36-3.45 (4H, m)	1.57-1.63 (2H, m), 1.74-1.82 (2H, m)	3.09 (6H, s)	3.01 (2H, t, J=9.6), 4.31 (2H, t, J=9.6), 4.45 (2H, s), 4.94 (2H, s)

**Tabelle 47:**  $^{13}\text{C}$ -NMR (DMSO- $d_6$ ,  $\delta$  [ppm]):

Verb	C-2	C-3	C <sub>Keton</sub>	C <sub>Amid</sub>	C <sub>q,arom</sub>	CH <sub>arom</sub>	CH <sub>2</sub> benzyl	C <sub>q</sub> phenyl	CH phenyl	Alkyl	N <sup>+</sup> (CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	Iper
<b>32a-C4</b>	150.9	111.3	163.4, 174.5		C-4': 128.5 (d, $J_{\text{CF}}=7.2$ ) C-8: 151.7 (d, $J_{\text{CF}}=250.5$ ) C-8': 130.0	C-5: 122.3 (1H, d, $J_{\text{CF}}=1.9$ ) C-6: 125.7 C-7: 119.3 (d, $J_{\text{CF}}=24.2$ )	59.8	136.9	125.6, 127.6, 128.7	19.5, 26.1, 37.7, 62.8	49.8	32.1, 53.3, 57.1, 69.5, 76.0, 85.9, 166.6
<b>32e-C4</b>	149.2	111.7	163.8, 175.1		C-4': 126.2 C-7: 140.0 C-8': 126.8	C-5, C-6: 128.2 C-8: 120.4	55.5	135.6	126.5, 127.9, 128.9	19.5, 26.1, 37.6, 62.8	49.8	32.1, 53.2, 57.1, 69.5, 76.0, 85.9, 166.6
<b>32f-C4</b>	149.2	111.1	163.6, 174.2 (d, $J_{\text{CF}}=2.1$ )		C-4': 127.6 (d, $J_{\text{CF}}=5.8$ ), C-6: 154.3 (d, $J_{\text{CF}}=247.8$ ) C-7: 125.8 (d, $J_{\text{CF}}=20.2$ ) C-8': 136.2	C-5: 112.2 (d, $J_{\text{CF}}=22.2$ ) C-8: 120.6	55.8	135.4	126.5, 128.1, 128.9	19.5, 26.1, 37.7, 62.8	49.8	32.1, 53.3, 57.1, 69.5, 76.0, 86.0, 166.7
<b>32h-C4</b>	148.7	110.6	163.9, 175.4		C-4': 128.9 C-6: 159.1 (Cq, d, $J_{\text{CF}}=244.8$ ) C-8': 135.9	C-5: 110.4 (d, $J_{\text{CF}}=22.6$ ) C-7: 121.5 (d, $J_{\text{CF}}=24.8$ ) C-8: 121.1 (d, $J_{\text{CF}}=8.4$ )	56.0	135.6	126.4, 127.9, 128.8	19.5, 26.1, 37.6, 62.8	49.8	32.1, 53.3, 57.1, 69.5, 76.0, 86.0, 166.6

**b) Hexyl-Kette (n = 6)**
**Tabelle 48:** Allgemeine Daten

Verb	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	R <sup>3</sup>	Summenformel	Mr [g/mol]	Smp [°C]	Ausbeute [%]	Dauer [d]	Aussehen	IR [cm <sup>-1</sup> ]
<b>32a-C6</b>	F	H	H	C <sub>32</sub> H <sub>38</sub> BrFN <sub>4</sub> O <sub>4</sub>	641.6	165-171	47	20	weißer FS	740, 1026, 1249, 1439, 1557, 1603, 1656, 2930, 3050, 3225
<b>32e-C6</b>	H	Br	H	C <sub>32</sub> H <sub>38</sub> Br <sub>2</sub> N <sub>4</sub> O <sub>4</sub>	702.5	81-85	36	56	hellbeige- farbener Schaum	730, 1090, 1228, 1453, 1549, 1599, 1652, 2933, 3053
<b>32f-C6</b>	H	Cl	F	C <sub>32</sub> H <sub>37</sub> BrClFN <sub>4</sub> O <sub>4</sub>	676.0	155-157	60	21	hellbeige- farbener FS	733, 1025, 1228, 1266, 1454, 1547, 1604, 1655, 2934, 3052, 3230
<b>32h-C6</b>	H	H	F	C <sub>32</sub> H <sub>38</sub> BrFN <sub>4</sub> O <sub>4</sub>	641.6	179-186	43 - 66	17	beige-farbener Feststoff	739, 1059, 1227, 1268, 1451, 1550, 1605, 1655, 2974, 3047, 3236

**Tabelle 49:**  $^1\text{H-NMR}$  (DMSO- $d_6$ ,  $\delta$  [ppm],  $J$  [Hz]):

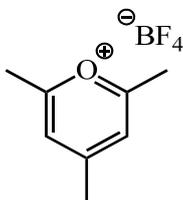
Verb	H-2	$\text{CH}_{\text{arom.}}$	$\text{CH}_2_{\text{benzyl}}$	$\text{CH}_{\text{phenyl}}$	NH	NH- $\text{CH}_2$ u. $\text{CH}_2\text{-N}^+$	Alkyl	$\text{N}^+(\text{CH}_3)_2$	Iper
<b>32a-C6</b>	8.96 (1H, s)	<b>C-5:</b> 8.21 (1H, dd, $J=8.0$ , $J=1.4$ ) <b>C-6:</b> 7.50 (1H, ddd, $J=8.0$ , $J=8.0$ , $J_{\text{HF}}=4.4$ ) <b>C-7:</b> 7.64 (1H, ddd, $J_{\text{HF}}=14.7$ , $J=8.0$ , $J=1.4$ )	5.82 (2H, s)	7.10-7.11 (2H, m), 7.28-7.36 (3H, m)	9.83 (1H, t, $J=5.3$ )	3.34-3.39 (4H, m)	1.33-1.42 (4H, m), 1.55-1.63 (2H, m), 1.67-1.76 (2H, m)	3.01 (6H, s)	3.00 (2H, t, $J=9.6$ ), 4.31 (2H, t, $J=9.6$ ), 4.46 (2H, s), 4.93 (2H, s)
<b>32e-C6</b>	9.03 (1H, s)	<b>H-5:</b> 8.25 (1H, d, $J=8.7$ ) <b>H-6:</b> 7.68 (1H, dd, $J=8.7$ , $J=1.4$ ) <b>H-8:</b> 8.03 (1H, d, $J=1.4$ )	5.80 (2H, s)	7.23-7.25 (2H, m), 7.30-7.40 (3H, m)	9.87 (1H, t, $J=5.5$ )	3.34-3.40 (4H, m)	1.32-1.44 (4H, m), 1.55-1.62 (2H, m), 1.68-1.76 (2H, m)	3.08 (6H, s)	3.01 (2H, t, $J=9.6$ ), 4.32 (2H, t, $J=9.6$ ), 4.45 (2H, s), 4.94 (2H, s)
<b>32f-C6</b>	9.04 (1H, s)	<b>H-5:</b> 8.13 (1H, br) <b>H-8:</b> 8.15 (1H, d, $J_{\text{HF}}=4.8$ )	5.82 (2H, s)	7.23-7.25 (2H, m), 7.30-7.39 (3H, m)	9.79 (1H, t, $J=5.5$ )	3.34-3.36 (4H, m)	1.32-1.45 (4H, m), 1.54-1.61 (2H, m), 1.67-1.75 (2H, m)	3.08 (6H, s)	3.01 (2H, t, $J=9.6$ ), 4.31 (2H, t, $J=9.6$ ), 4.46 (2H, s), 4.93 (2H, s)
<b>32h-C6</b>	9.07 (1H, s)	<b>H-5:</b> 7.98 (1H, dd, $J_{\text{HF}}=9.0$ , $J=3.1$ ), <b>H7:</b> 7.68 (1H, ddd, $J=9.3$ , $J_{\text{HF}}=8.0$ , $J=3.1$ ) <b>H-8:</b> 7.86 (1H, dd, $J=9.4$ , $J_{\text{HF}}=4.0$ ),	5.81 (2H, s)	7.21-7.38 (5H, m)	9.89 (1H, t, $J=5.6$ )	3.34-3.39 (4H, m)	1.31-1.46 (4H, m), 1.56-1.62 (2H, m), 1.68-1.75 (2H, m)	3.08 (6H, s)	3.00 (2H, t, $J=9.6$ ), 4.45 (2H, s), 4.31 (2H, t, $J=9.6$ ), 4.93 (2H, s)

**Tabelle 49:**  $^{13}\text{C}$ -NMR (DMSO- $d_6$ ,  $\delta$  [ppm]):

Verb	C-2	C-3	C <sub>Keton</sub> C <sub>Amid</sub>	C <sub>arom.</sub>	CH <sub>arom.</sub>	CH <sub>2</sub> benzyl	C <sub>qphenyl</sub>	CH <sub>phenyl</sub>	Alkyl	N <sup>+</sup> (CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	Iper
<b>32a-C6</b>	150.8	111.3	163.4, 174.5	C-4': 128.5 (d, $J_{\text{CF}}=7.2$ ) C-8: 151.5 (d, $J_{\text{CF}}=250.8$ ) C-8': 130.0	C-5: 122.4 (d, $J_{\text{CF}}=1.8$ ) C-6: 125.7 (d, $J_{\text{CF}}=8.3$ ) C-7: 120.2 (d, $J_{\text{CF}}=23.4$ )	59.7	136.9	125.6, 128.8, 38.2, 63.1	21.6, 25.3, 25.9, 28.9, 38.2, 63.1	49.7	32.1, 53.2, 57.1, 69.5, 76.1, 85.9, 166.6
<b>32e-C6</b>	149.2	111.7	163.5, 175.1	C-4': 126.2 C-7: 140.0 C-8': 126.8	C-5, C-6: 128.2 C-8: 120.4	55.5	135.6	126.4, 127.9, 128.9	21.8, 25.3, 25.9, 28.9, 38.1, 63.1	49.8	32.1, 53.2, 57.1, 69.5, 76.0, 85.9, 166.6
<b>32f-C6</b>	149.2	111.2	163.4, 174.2 (d, $J_{\text{CF}}=2.1$ )	C-4': 120.6, C-6: 154.3 (d, $J_{\text{CF}}=247.8$ ) C-7: 125.7 (d, $J_{\text{CF}}=20.1$ ) C-8': 136.2 (d, $J_{\text{CF}}=1.7$ )	C-5: 112.3 (d, $J_{\text{CF}}=21.6$ ) C-8: 120.6 (d, $J_{\text{CF}}=4.6$ )	55.8	135.4	126.5, 128.0, 128.9	21.6, 25.3, 25.9, 28.6, 38.2, 63.1	49.7	32.1, 53.3, 57.1, 69.5, 76.1, 85.9, 166.6
<b>32h-C6</b>	148.7	110.7	163.7, 174.7 (d, $J_{\text{CF}}=2.6$ )	C-4': 128.9, C-7: 159.1 (d, $J_{\text{CF}}=245.3$ ) C-8': 135.9	C-5: 110.4 (d, $J_{\text{CF}}=23.1$ ), C-8: 121.0 (d, $J_{\text{CF}}=8.3$ ), C-7: 121.4 (d, $J_{\text{CF}}=25.5$ )	56.0	135.6	126.4, 127.9, 128.9	21.6, 25.3, 25.9, 28.9, 38.1, 63.1	49.7	32.1, 53.2, 57.1, 69.5, 76.1, 85.9, 166.6

## 5.2.7 Synthese und Funktionalisierung des Fluoreszenzfarbstoffes Py-1

### 5.2.7.1 Synthese von 2,4,6-Trimethylpyrylium-tetrafluoroborat **33**

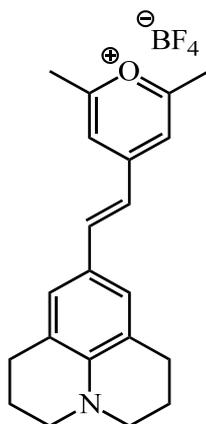
**33**

In Anlehnung an Balaban *et al.*<sup>157</sup> werden 5.93 g (80.0 mmol) abs. *tert*-Butanol in 100 ml Essigsäureanhydrid gelöst. Nun werden 7.02 g (80.0 mmol) HBF<sub>4</sub> zugetropft, dass die Temperatur des Reaktionsgemisches bei 100 °C liegt. Nach beendeter Zugabe wird 5 Stunden unter Rückfluss erhitzt, das Lösungsmittel auf etwa 25 ml im Vakuum entfernt und die Mischung mit 100 ml Et<sub>2</sub>O versetzt. Der entstehende Niederschlag wird abfiltriert und aus einem Ethanol-Methanol Gemisch im Verhältnis 1:1 mit 3 Tropfen HBF<sub>4</sub> umkristallisiert. Der weiße Feststoff wird über Phosphorpentoxid im Vakuum getrocknet.

Summenformel:	C <sub>8</sub> H <sub>11</sub> OBF <sub>4</sub>
Molekulargewicht:	209.9 g/mol
Schmelzpunkt:	223 °C (Zersetzung) [Lit.: 224-226 °C <sup>157</sup> ]
Ausbeute:	12.5 g (59.6 mmol, 74 %) [Lit.: 41-43% <sup>157</sup> ]
Aussehen:	weißer Feststoff

Die spektroskopischen Daten entsprechen den in der Literatur<sup>157</sup> mitgeteilten Daten.

5.2.7.2 Synthese von 2,6-Dimethyl-4-[(*E*)-2-(2,3,6,7-tetrahydro-1*H*,5*H*-pyrido[3,2,1-*ij*]-quinolin-9-yl)vinyl]pyrylium Tetrafluoroborate **34**

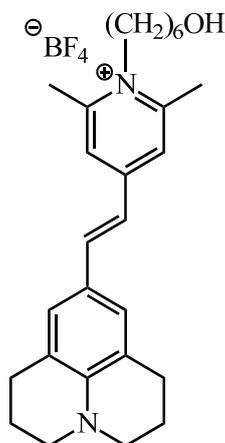


**34**

6.04 g (30.0 mmol) Julolidin-9-carbaldehyd, 6.93 g (33.0 mmol) 2,4,6-Trimethylpyrylium-tetrafluoroborat sowie ein Tropfen HBF<sub>4</sub> werden in 60 mL Acetonitril gelöst und die Mischung mikrowellenunterstützt auf 100 °C erhitzt (Aufheizrate 30 °C/min). Der Reaktionsverlauf wird mittels UV-Sensor kontrolliert. Nach Beenden der Reaktion wird auf RT abgekühlt, das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und das blaue Rohprodukt säulenchromatographisch gereinigt (Kieselgel, Chloroform/Methanol 25 : 1, dann 9 : 1, R<sub>f</sub> (Kieselgel, CHCl<sub>3</sub>/MeOH = 9 : 1) = 0.1).

Summenformel: C<sub>21</sub>H<sub>24</sub>NOBF<sub>4</sub>  
 Molekulargewicht: 393.2 g/mol  
 Schmelzpunkt: 213 °C [Lit.:205 °C<sup>158</sup>]  
 Ausbeute: 10.03 g (25.5 mmol, 85 %, Lit.: 65 %<sup>158</sup>)  
 Aussehen: blauer Feststoff

Die spektroskopischen Daten entsprechen den in der Literatur mitgeteilten Daten.<sup>158</sup>

5.2.7.1 Synthese von (*E*)-1-(6-Hydroxyhexyl)-2,6-dimethyl-4-[2-(2,3,6,7-tetrahydro-1*H*,5*H*-benzo[*ij*]quinolizidin-9-yl)ethenyl]pyridinium Tetrafluoroborate **35**

**35**

3.93 g (10.0 mmol) des blauen Farbstoffs **34** werden zusammen mit 1.17 g (10.0 mmol) 1-Amino-6-hexanol in 60 ml Acetonitril gelöst und mikrowellenunterstützt innerhalb von 3 min auf 100 °C erhitzt und die Temperatur anschließend konstant gehalten. Der Reaktionsverlauf wird mithilfe eines UV/Vis-Sensors verfolgt. Nach acht Minuten ist die Reaktion abgeschlossen, das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch gereinigt. (Kieselgel, CHCl<sub>3</sub> → CHCl<sub>3</sub>/MeOH 25:1, R<sub>f</sub> = 0.41).

Summenformel:	C <sub>27</sub> H <sub>37</sub> BF <sub>4</sub> N <sub>2</sub> O
Molekulargewicht:	492.4 g/mol
Schmelzpunkt:	147 °C
Ausbeute:	4.05 g (mmol, 82 %)
Aussehen:	tiefroter Feststoff

**IR** [cm<sup>-1</sup>]: 1056, 3547, 1356, 1407, 1517, 1557, 2858, 2937

**<sup>1</sup>H-NMR** (CD<sub>3</sub>CN, δ [ppm], *J* [Hz]): 1.41–1.52 (7 H, m, *H*-3', *H*-4', *H*-5', OH), 1.72–1.79 (2H, m, *H*-2'), 1.92 (4H, t, *J*=6.0, *H*-2'', *H*-6''), 2.68 (6 H, s, 2x CH<sub>3</sub>), 2.72 (4 H, t, *J*=6.0, *H*-1'', *H*-7''), 3.52 (2 H, q, *J*=5.0, *H*-6'), 4.21 (2 H, t, *J*=8.5, *H*-1'), 6.77 (1 H, d, *J*=16.0, *H*-2'), 7.09 (2 H, s, *H*-8'', *H*-10''), 7.53 (2 H, s, *H*-3, *H*-5), 7.54 (1H, d, *J*=6.0, *H*-1')

**<sup>13</sup>C-NMR** (CD<sub>3</sub>CN, δ [ppm]): 21.3 (2x CH<sub>3</sub>), 22.2 (*C*-2'', *C*-6''), 26.0 (*C*-3'), 27.1 (*C*-4'), 28.1 (*C*-1'', *C*-7''), 29.3 (*C*-2'), 33.3 (*C*-5'), 50.6 (*C*-3'', *C*-5''), 62.4 (*C*-6'), 116.1 (*C*-2''), 122.3 (*C*-7a'', *C*-10a''), 122.6 (*C*-9''), 128.8 (*C*-8'', *C*-10''), 143.3 (*C*-1'), 146.6 (*C*-10b''), 14.4 (*C*-2, *C*-6).

## 6 Literaturverzeichnis

1. Mutschler, E.; Geisslinger, G.; Kroemer, H. K.; Ruth, P.; Schäfer-Korting, M., *Mutschler Arzneimittelwirkungen Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie*. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH: Stuttgart, **2012**.
2. Lagerstrom, M. C.; Schioth, H. B., Structural diversity of G protein-coupled receptors and significance for drug discovery. *Nat. Rev. Drug. Discov.* **2008**, 7 (4), 339-357.
3. Mohr, K.; Schmitz, J.; Schrage, R.; Tränkle, C.; Holzgrabe, U., Molekulare Allianz – von orthosterischen und allosterischen Liganden zu dualsterischen/bitopischen Agonisten G-Proteingekoppelter Rezeptoren. *Angew. Chem.* **2013**, 125 (2), 530-538.
4. Bridges, T. M.; Lindsley, C. W., G-Protein-Coupled Receptors: From Classical Modes of Modulation to Allosteric Mechanisms. *ACS Chem. Biol.* **2008**, 3 (9), 530-541.
5. Fredriksson, R.; Lagerström, M. C.; Lundin, L.-G.; Schiöth, H. B., The G-Protein-Coupled Receptors in the Human Genome Form Five Main Families. Phylogenetic Analysis, Paralogon Groups, and Fingerprints. *Mol. Pharmacol.* **2003**, 63 (6), 1256-1272.
6. Wess, J., Molecular basis of muscarinic receptor function. *Trends Pharmacol. Sci.* **1993**, 14 (8), 308-313.
7. Ji, T. H.; Grossmann, M.; Ji, I., G Protein-coupled Receptors: I. DIVERSITY OF RECEPTOR-LIGAND INTERACTIONS. *J. Bio. Chem.* **1998**, 273 (28), 17299-17302.
8. Rosenbaum, D. M.; Rasmussen, S. G. F.; Kobilka, B. K., The structure and function of G-protein-coupled receptors. *Nature* **2009**, 459 (7245), 356-363.
9. Limbird, L. E., *Cell Surface Receptors: A Short Course on Theory and Methods*. Springer: **2004**; Vol. 3rd edition.
10. Milligan, G.; Kostenis, E., Heterotrimeric G-proteins: a short history. *Br. J. Pharmacol.* **2006**, 147 (S1), S46-S55.
11. Rajagopal, S.; Rajagopal, K.; Lefkowitz, R. J., Teaching old receptors new tricks: biasing seven-transmembrane receptors. *Nat. Rev. Drug. Discov.* **2010**, 9 (5), 373-386.
12. Schertler, G. F.; Villa, C.; Henderson, R., Projection structure of rhodopsin. *Nature* **1993**, 362 (6422), 770-772.

13. Congreve, M.; Langmead, C. J.; Mason, J. S.; Marshall, F. H., Progress in Structure Based Drug Design for G Protein-Coupled Receptors. *J. Med. Chem.* **2011**, *54* (13), 4283-4311.
14. Bikker, J. A.; Trumpp-Kallmeyer, S.; Humblet, C., G-Protein coupled receptors: models, mutagenesis, and drug design. *J. Med. Chem.* **1998**, *41* (16), 2911-27.
15. Haga, K.; Kruse, A. C.; Asada, H.; Yurugi-Kobayashi, T.; Shiroishi, M.; Zhang, C.; Weis, W. I.; Okada, T.; Kobilka, B. K.; Haga, T.; Kobayashi, T., Structure of the human M2 muscarinic acetylcholine receptor bound to an antagonist. *Nature* **2012**, *482* (7386), 547-551.
16. Kruse, A. C.; Hu, J.; Pan, A. C.; Arlow, D. H.; Rosenbaum, D. M.; Rosemond, E.; Green, H. F.; Liu, T.; Chae, P. S.; Dror, R. O.; Shaw, D. E.; Weis, W. I.; Wess, J.; Kobilka, B. K., Structure and dynamics of the M3 muscarinic acetylcholine receptor. *Nature* **2012**, *482* (7386), 552-556.
17. Wu, H.; Wacker, D.; Mileni, M.; Katritch, V.; Han, G. W.; Vardy, E.; Liu, W.; Thompson, A. A.; Huang, X.-P.; Carroll, F. I.; Mascarella, S. W.; Westkaemper, R. B.; Mosier, P. D.; Roth, B. L.; Cherezov, V.; Stevens, R. C., Structure of the human  $[\kappa]$ -opioid receptor in complex with JD1c. *Nature* **2012**, *485* (7398), 327-332.
18. Manglik, A.; Kruse, A. C.; Kobilka, T. S.; Thian, F. S.; Mathiesen, J. M.; Sunahara, R. K.; Pardo, L.; Weis, W. I.; Kobilka, B. K.; Granier, S., Crystal structure of the  $[\mu]$ -opioid receptor bound to a morphinan antagonist. *Nature* **2012**, *485* (7398), 321-326.
19. Eglen, R. M., Muscarinic receptor subtypes in neuronal and non-neuronal cholinergic function. *Auton. Autacoid. Pharmacol.* **2006**, *26* (3), 219-233.
20. Bonner, T. I., The molecular basis of muscarinic receptor diversity. *Trends Neurosci.* **1989**, *12* (4), 148-151.
21. Wess, J., Molecular biology of muscarinic acetylcholine receptors. *Crit. Rev. Neurobiol.* **1996**, *10* (1), 69-99.
22. Caulfield, M. P.; Birdsall, N. J. M., International Union of Pharmacology. XVII. Classification of Muscarinic Acetylcholine Receptors. *Pharmacol. Rev.* **1998**, *50* (2), 279-290.
23. Volpicelli, L. A.; Levey, A. I., Muscarinic acetylcholine receptor subtypes in cerebral cortex and hippocampus. *Prog. Brain Res.* **2004**, *145*, 59-66.
24. Abrams, P.; Andersson, K.-E.; Buccafusco, J. J.; Chapple, C.; de Groat, W. C.; Fryer, A. D.; Kay, G.; Laties, A.; Nathanson, N. M.; Pasricha, P. J.; Wein, A. J., Muscarinic receptors: their distribution and function in body systems, and the implications for treating overactive bladder. *Br. J. Pharmacol.* **2006**, *148* (5), 565-578.

25. Wess, J.; Eglén, R. M.; Gautam, D., Muscarinic acetylcholine receptors: mutant mice provide new insights for drug development. *Nat. Rev. Drug. Discov.* **2007**, *6* (9), 721-733.
26. Felder, C. C.; Bymaster, F. P.; Ward, J.; Delapp, N., Therapeutic opportunities for muscarinic receptors in the central nervous system. *J. Med. Chem.* **2000**, *43* (23).
27. Eglén, R. M.; Choppin, A.; Watson, N., Therapeutic opportunities from muscarinic receptor research. *Trends Pharmacol. Sci.* **2001**, *22* (8), 409-414.
28. Wess, J., Muscarinic acetylcholine receptor knockout mice: Novel Phenotypes and Clinical Implications. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **2004**, *44*, 423-450.
29. Eglén, R. M., Muscarinic Receptor Subtype Pharmacology and Physiology. *Prog. Med. Chem.* **2005**, *43*, 105-136.
30. Caulfield, M. P., Muscarinic Receptors—Characterization, coupling and function. *Pharmacol. Ther.* **1993**, *58* (3), 319-379.
31. Kow, R. L.; Nathanson, N. M., Structural biology: Muscarinic receptors become crystal clear. *Nature* **2012**, *482* (7386), 480-481.
32. Decker, M.; Holzgrabe, U., M1 muscarinic acetylcholine receptor allosteric modulators as potential therapeutic opportunities for treating Alzheimer's disease. *MedChemComm.* **2012**, *3* (7), 752-762.
33. Hulme, E. C.; Lu, Z. L.; Bee, M. S., Scanning mutagenesis studies of the M1 muscarinic acetylcholine receptor. *Receptors Channels* **2003**, *9* (4), 215-228.
34. Birdsall, N. J. M.; Lazareno, S., Allosterism at Muscarinic Receptors: Ligands and Mechanisms. *Mini Rev. Med. Chem.* **2005**, *5* (6), 523-543.
35. May, L. T.; Leach, K.; Sexton, P. M.; Christopoulos, A., Allosteric modulation of G protein-coupled receptors. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **2007**, *47*, 1-51.
36. Gregory, K. J.; Sexton, P. M.; Christopoulos, A., Allosteric modulation of muscarinic acetylcholine receptors. *Curr. Neuropharmacol.* **2007**, *5* (3), 157-167.
37. Jeffrey Conn, P.; Christopoulos, A.; Lindsley, C. W., Allosteric modulators of GPCRs: a novel approach for the treatment of CNS disorders. *Nat. Rev. Drug. Discov.* **2009**, *8* (1), 41-54.
38. Burford, N. T.; Watson, J.; Bertekap, R.; Alt, A., Strategies for the identification of allosteric modulators of G-protein-coupled receptors. *Biochem. Pharmacol.* **2011**, *81* (6), 691-702.

39. Keov, P. S., P. M.; Christopoulos, A., Allosteric modulation of G protein-coupled receptors: A pharmacological perspective. *Neuropharmacology* **2011**, *60*, 24-35.
40. Monod, J.; Wyman, J.; Changeux, J. P., On the nature of allosteric transition. *J. Mol. Biol.* **1965**, *12*, 88-118.
41. Kords, H.; Lüllmann, H.; Ohnesorge, F. K.; Wassermann, O., Action of atropine and some hexane-1.6-bis-ammonium derivatives upon the toxicity of DFP in mice. *Eur. J. Pharmacol.* **1968**, *3* (4), 341-346.
42. Lüllmann, H.; Ohnesorge, F. K.; Schauwecker, G. C.; Wassermann, O., Inhibition of the actions of carbachol and DFP on guinea pig isolated atria by alkane-bis-ammonium compounds. *Eur. J. Pharmacol.* **1969**, *6* (3), 241-247.
43. Jepsen, K.; Lüllmann, H.; Mohr, K.; Pfeffer, J., Allosteric Stabilization of 3H-N-Methylscopolamine Binding in Guinea-Pig Myocardium by an Antidote against Organophosphate Intoxication. *Pharmacol. Toxicol.* **1988**, *63* (3), 163-168.
44. Ehlert, F. J., Estimation of the affinities of allosteric ligands using radioligand binding and pharmacological null methods. *Mol. Pharmacol.* **1988**, *33* (2), 187-194.
45. Christopoulos, A.; Kenakin, T., G Protein-Coupled Receptor Allosterism and Complexing. *Pharmacol. Rev.* **2002**, *54* (2), 323-374.
46. Mohr, K.; Tränkle, C.; Kostenis, E.; Barocelli, E.; De Amici, M.; Holzgrabe, U., Rational design of dualsteric GPCR ligands: quests and promise. *Br. J. Pharmacol.* **2010**, *159* (5), 997-1008.
47. Mohr, K.; Tränkle, C.; Holzgrabe, U., Structure/activity relationships of M2 muscarinic allosteric modulators. *Receptors Channels* **2003**, *9*, 229-240.
48. Schwartz, T. W.; Holst, B., Ago-Allosteric Modulation and Other Types of Allosterism in Dimeric 7TM Receptors. *J. Recept. Signal. Transduct. Res.* **2006**, *26* (1-2), 107-128.
49. Schwartz, T. W.; Holst, B., Allosteric enhancers, allosteric agonists and ago-allosteric modulators: where do they bind and how do they act? *Trends Pharmacol. Sci.* **2007**, *28* (8), 366-373.
50. Clark, A. L.; Mitchelson, F., The inhibitory effect of gallamine on muscarinic receptors. *Br. J. Pharmacol.* **1976**, *58* (3), 323-331.
51. Matsui, M.; Motomura, D.; Fujikawa, T., Mice lacking M2 and M3 muscarinic acetylcholine receptors are devoid of cholinergic smooth muscle contractions but still viable. *J. Neurosci.* **2002**, *22*, 10627-10632.

52. Gautam, D.; Han, S.-J.; Hamdan, F. F.; Jeon, J.; Li, B.; Li, J. H.; Cui, Y.; Mears, D.; Lu, H.; Deng, C.; Heard, T.; Wess, J., A critical role for  $\beta$  cell M3 muscarinic acetylcholine receptors in regulating insulin release and blood glucose homeostasis in vivo. *Cell. Metab.* **2006**, *3* (6), 449-461.
53. Jakubík, J.; El-Fakahany, E. E., Allosteric Modulation of Muscarinic Acetylcholine Receptors. *Pharmaceuticals* **2010**, *3* (9), 2838-2860.
54. Lazareno, S.; Doležal, V.; Popham, A.; Birdsall, N. J. M., Thiochrome Enhances Acetylcholine Affinity at Muscarinic M4 Receptors: Receptor Subtype Selectivity via Cooperativity Rather than Affinity. *Mol. Pharmacol.* **2004**, *65* (1), 257-266.
55. Potter, L. T., Snake toxins that bind specifically to individual subtypes of muscarinic receptors. *Life Sci.* **2001**, *68* (22-23), 2541-2547.
56. Spalding, T. A.; Trotter, C.; Skjærbæk, N.; Messier, T. L.; Currier, E. A.; Burstein, E. S.; Li, D.; Hacksell, U.; Brann, M. R., Discovery of an Ectopic Activation Site on the M1 Muscarinic Receptor. *Mol. Pharmacol.* **2002**, *61* (6), 1297-1302.
57. Langmead, C. J.; Fry, V. A. H.; Forbes, I. T.; Branch, C. L.; Christopoulos, A.; Wood, M. D.; Herdon, H. J., Probing the Molecular Mechanism of Interaction between 4-n-Butyl-1-[4-(2-methylphenyl)-4-oxo-1-butyl]-piperidine (AC-42) and the Muscarinic M1 Receptor: Direct Pharmacological Evidence that AC-42 Is an Allosteric Agonist. *Mol. Pharmacol.* **2006**, *69* (1), 236-246.
58. Sur, C.; Mallorga, P. J.; Wittmann, M.; Jacobson, M. A.; Pascarella, D.; Williams, J. B.; Brandish, P. E.; Pettibone, D. J.; Scolnick, E. M.; Conn, P. J., N-desmethylozapine, an allosteric agonist at muscarinic 1 receptor, potentiates N-methyl-d-aspartate receptor activity. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2003**, *100* (23), 13674-13679.
59. Holzgrabe, U.; Hopfinger, A. J., Conformational Analysis, Molecular Shape Comparison, and Pharmacophore Identification of Different Allosteric Modulators of Muscarinic Receptors. *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* **1996**, *36* (5), 1018-1024.
60. Hasselmo, M. E., The role of acetylcholine in learning and memory. *Curr. Opin. Neurobiol.* **2006**, *16* (6), 710-715.
61. Lleó, A.; Greenberg, S. M.; Growdon, J. H., Current pharmacotherapy for Alzheimer's disease. *Annu. Rev. Med.* **2006**, *57*, 513-533.
62. Fisher, A.; Pittel, Z.; Haring, R.; Bar-Ner, N.; Kliger-Spatz, M.; Natan, N.; Egozi, I.; Sonogo, H.; Marcovitch, I.; Brandeis, R., M<sub>1</sub> muscarinic agonists can modulate some of the hallmarks in Alzheimer's disease. *J. Mol. Neurosci.* **2003**, *20* (3), 349-356.

63. Caccamo, A.; Oddo, S.; Billings, L. M.; Green, K. N.; Martinez-Coria, H.; Fisher, A.; LaFerla, F. M., M1 Receptors Play a Central Role in Modulating AD-like Pathology in Transgenic Mice. *Neuron* **2006**, *49* (5), 671-682.
64. Hamilton, S. E.; Nathanson, N. M., The M1 Receptor Is Required for Muscarinic Activation of Mitogen-activated Protein (MAP) Kinase in Murine Cerebral Cortical Neurons. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276* (19), 15850-15853.
65. Berkeley, J. L.; Gomeza, J.; Wess, J.; Hamilton, S. E.; Nathanson, N. M.; Levey, A. I., M1 Muscarinic Acetylcholine Receptors Activate Extracellular Signal-Regulated Kinase in CA1 Pyramidal Neurons in Mouse Hippocampal Slices. *Mol. Cell. Neurosci.* **2001**, *18* (5), 512-524.
66. Buller, S.; Zlotos, D. P.; Mohr, K.; Ellis, J., Allosteric Site on Muscarinic Acetylcholine Receptors: A Single Amino Acid in Transmembrane Region 7 Is Critical to the Subtype Selectivities of Caracurine V Derivatives and Alkane-Bisammonium Ligands. *Mol. Pharmacol.* **2002**, *61* (1), 160-168.
67. Gnagey, A. L.; Seidenberg, M.; Ellis, J., Site-Directed Mutagenesis Reveals Two Epitopes Involved in the Subtype Selectivity of the Allosteric Interactions of Gallamine at Muscarinic Acetylcholine Receptors. *Mol. Pharmacol.* **1999**, *56* (6), 1245-1253.
68. Krejčí, A.; Tuček, S., Changes of Cooperativity between N-Methylscopolamine and Allosteric Modulators Alcuronium and Gallamine Induced by Mutations of External Loops of Muscarinic M3 Receptors. *Mol. Pharmacol.* **2001**, *60* (4), 761-767.
69. Jakubík, J.; Krejčí, A.; Doležal, V., Asparagine, Valine, and Threonine in the Third Extracellular Loop of Muscarinic Receptor Have Essential Roles in the Positive Cooperativity of Strychnine-Like Allosteric Modulators. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2005**, *313* (2), 688-696.
70. Prilla, S.; Schrobang, J.; Ellis, J.; Höltje, H.-D.; Mohr, K., Allosteric Interactions with Muscarinic Acetylcholine Receptors: Complex Role of the Conserved Tryptophan M242Trp in a Critical Cluster of Amino Acids for Baseline Affinity, Subtype Selectivity, and Cooperativity. *Mol. Pharmacol.* **2006**, *70* (1), 181-193.
71. Disingrini, T.; Muth, M.; Dallanoce, C.; Barocelli, E.; Bertoni, S.; Kellershohn, K.; Mohr, K.; De Amici, M.; Holzgrave, U., Design, Synthesis, and Action of Oxotremorine-Related Hybrid-Type Allosteric Modulators of Muscarinic Acetylcholine Receptors. *J. Med. Chem.* **2005**, *49* (1), 366-372.
72. Steinfeld, T.; Mammen, M.; Smith, J. A. M.; Wilson, R. D.; Jasper, J. R., A Novel Multivalent Ligand That Bridges the Allosteric and Orthosteric Binding Sites of the M2 Muscarinic Receptor. *Mol. Pharmacol.* **2007**, *72* (2), 291-302.

73. Antony, J.; Kellershohn, K.; Mohr-Andrä, M.; Kebig, A.; Prilla, S.; Muth, M.; Heller, E.; Disingrini, T.; Dallanoce, C.; Bertoni, S.; Schrobang, J.; Tränkle, C.; Kostenis, E.; Christopoulos, A.; Höltje, H.-D.; Barocelli, E.; De Amici, M.; Holzgrave, U.; Mohr, K., Dualsteric GPCR targeting: a novel route to binding and signaling pathway selectivity. *FASEB J.* **2009**, *23* (2), 442-450.
74. Schwyzer, R., ACTH: A short introductory review. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **1977**, *297* (1), 3-26.
75. Matsui, H.; Lazareno, S.; Birdsall, N. J., Probing of the location of the allosteric site on m1 muscarinic receptors by site-directed mutagenesis. *Mol. Pharmacol.* **1995**, *47* (1), 88-98.
76. Ellis, J.; Seidenberg, M., Interactions of Alcuronium, TMB-8, and Other Allosteric Ligands with Muscarinic Acetylcholine Receptors: Studies with Chimeric Receptors. *Mol. Pharmacol.* **2000**, *58* (6), 1451-1460.
77. Eberlein, W. G.; Engel, W.; Mihm, G.; Rudolf, K.; Wetzel, B.; Entzeroth, M.; Mayer, N.; Doods, H. N., Structure-activity relationships and pharmacological profile of selective tricyclic antimuscarinics. *Trends Pharmacol. Sci.* **1989**, *Suppl*, 50-4.
78. Engel, W. W.; Eberlein, W. G.; Mihm, G.; Hammer, R.; Trummlitz, G., Tricyclic compounds as selective muscarinic receptor antagonists. 3. Structure-selectivity relationships in a series of cardioselective (M2) antimuscarinics. *J. Med. Chem.* **1989**, *32* (8), 1718-1724.
79. Lanzafame, A.; Christopoulos, A.; Mitchelson, F., The allosteric interaction of otenzepad (AF-DX 116) at muscarinic M2 receptors in guinea pig atria. *Eur. J. Pharmacol.* **2001**, *416* (3), 235-244.
80. Valant, C.; Gregory, K. J.; Hall, N. E.; Scammells, P. J.; Lew, M. J.; Sexton, P. M.; Christopoulos, A., A Novel Mechanism of G Protein-coupled Receptor Functional Selectivity. *J. Biol. Chem.* **2008**, *283* (43), 29312-29321.
81. Tahtaoui, C.; Parrot, I.; Klotz, P.; Guillier, F.; Galzi, J.-L.; Hibert, M.; Ilien, B., Fluorescent Pirenzepine Derivatives as Potential Bitopic Ligands of the Human M1 Muscarinic Receptor. *J. Med. Chem.* **2004**, *47* (17), 4300-4315.
82. Voigtländer, U.; Jöhren, K.; Mohr, M.; Raasch, A.; Tränkle, C.; Buller, S.; Ellis, J.; Höltje, H.-D.; Mohr, K., Allosteric Site on Muscarinic Acetylcholine Receptors: Identification of Two Amino Acids in the Muscarinic M2 Receptor That Account Entirely for the M2/M5 Subtype Selectivities of Some Structurally Diverse Allosteric Ligands in N-Methylscopolamine-Occupied Receptors. *Mol. Pharmacol.* **2003**, *64* (1), 21-31.
83. Lu, Z.-L.; Saldanha, J. W.; Hulme, E. C., Seven-transmembrane receptors: crystals clarify. *Trends Pharmacol. Sci.* **2002**, *23* (3), 140-146.

84. Kholodenko, B. N., Cell-signalling dynamics in time and space. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **2006**, *7* (3), 165-176.
85. Mistry, R.; Dowling, M. R.; Challiss, R. A. J., An investigation of whether agonist-selective receptor conformations occur with respect to M2 and M4 muscarinic acetylcholine receptor signalling via Gi/o and Gs proteins. *Br. J. Pharmacol.* **2005**, *144* (4), 566-575.
86. Fang, Y.; Li, G.; Ferrie, A. M., Non-invasive optical biosensor for assaying endogenous G protein-coupled receptors in adherent cells. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods* **2007**, *55* (3), 314-322.
87. Großmüller, M.; Antony, J.; Tränkle, C.; Holzgrabe, U.; Mohr, K., Allosteric site in M2 acetylcholine receptors: evidence for a major conformational change upon binding of an orthosteric agonist instead of an antagonist. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* **2006**, *372* (4), 267-276.
88. Muth, M.; Bender, W.; Scharfenstein, O.; Holzgrabe, U.; Balatkova, E.; Tränkle, C.; Mohr, K., Systematic Development of High Affinity Bis(ammonio)alkane-type Allosteric Enhancers of Muscarinic Ligand Binding. *J. Med. Chem.* **2003**, *46* (6), 1031-1040.
89. Schmitz, J.; Heller, E.; Holzgrabe, U., A Fast and Efficient Track to Allosteric Modulators of Muscarinic Receptors: Microwave-Assisted Syntheses. *Monatsh. Chem.* **2007**, *138* (2), 171-174.
90. Mohr, M.; Heller, E.; Ataie, A.; Mohr, K.; Holzgrabe, U., Development of a New Type of Allosteric Modulator of Muscarinic Receptors: Hybrids of the Antagonist AF-DX 384 and the Hexamethonio Derivative W84. *J. Med. Chem.* **2004**, *47* (12), 3324-3327.
91. Jäger, D.; Schmalenbach, C.; Prilla, S.; Schrobang, J.; Kebig, A.; Sennwitz, M.; Heller, E.; Tränkle, C.; Holzgrabe, U.; Höltje, H.-D.; Mohr, K., Allosteric Small Molecules Unveil a Role of an Extracellular E2/Transmembrane Helix 7 Junction for G Protein-coupled Receptor Activation. *J. Biol. Chem.* **2007**, *282* (48), 34968-34976.
92. Muth, M. Synthese und Charakterisierung allosterer Modulatoren muscarinischer M2-Rezeptoren – Strukturvariationen der Bis(ammonium)alkan-Verbindung W84. Dissertation, Universität Würzburg, **2004**.
93. Raasch, A.; Scharfenstein, O.; Tränkle, C.; Holzgrabe, U.; Mohr, K., Elevation of Ligand Binding to Muscarinic M2 Acetylcholine Receptors by Bis(ammonio)alkane-Type Allosteric Modulators. *J. Med. Chem.* **2002**, *45* (17), 3809-3812.
94. Staudt, M.; Tränkle, C.; Mohr, K.; Holzgrabe, U., Contribution of Lateral Substituents in Symmetrical and Non-symmetrical Heptane-bisammonio Compounds to the Allosteric Stabilization of N-methylscopolamine Binding to Muscarinic M2 Receptors. *Arch. Pharm.* **2003**, *336* (8), 385-389.

95. Bender, W.; Staudt, M.; Tränkle, C.; Mohr, K.; Holzgrabe, U., Probing the size of a hydrophobic binding pocket within the allosteric site of muscarinic acetylcholine M2-receptors. *Life Sci.* **2000**, *66* (18), 1675-1682.
96. Schmitz, J. Synthese von Liganden muscarinergere Rezeptoren - Allosterische Modulatoren, bivalente Agonisten und Antagonisten. Dissertation, Universität Würzburg, **2008**.
97. Mary, A.; Renko, D. Z.; Guillou, C.; Thal, C., Potent acetylcholinesterase inhibitors: design, synthesis, and structure-Activity relationships of bis-interacting ligands in the galanthamine series. *Bioorg. Med. Chem.* **1998**, *6* (10), 1835-1850.
98. Estevam, I. H. S.; da Silva, M. F.; Bieber, L. W., Aminomethylation of organic halides promoted by zinc in protic medium. *Tetrahedron Lett.* **2005**, *46* (44), 7601-7604.
99. Laue, T.; Plagens, A., *Namen- und Schlagwort-Reaktionen der organischen Chemie*. Teubner: Stuttgart, **1998**; Vol. 3.
100. Becker, H. G. O.; Berger, W.; Domschke, G.; Fanghaenel, E.; Faust, J.; Fischer, M.; Gentz, F.; Gewalt, K.; Gluch, R.; Mayer, R.; Mueller, K.; Pavel, D.; Schmidt, H.; Schollberg, K.; Schwetlick, K.; Seiler, E.; Zeppenfeld, G., *Organikum - Organisch-Chemisches Praktikum*. WILEY-VCH Verlag: **1993**; Vol. 24.
101. da Silva, R. A.; Estevam, I. H. S.; Bieber, L. W., Reductive methylation of primary and secondary amines and amino acids by aqueous formaldehyde and zinc. *Tetrahedron Lett.* **2007**, *48* (43), 7680-7682.
102. Yasuda, R., Imaging spatiotemporal dynamics of neuronal signaling using fluorescence resonance energy transfer and fluorescence lifetime imaging microscopy. *Curr. Opin. Neurobiol.* **2006**, *16* (5), 551-561.
103. Chang, C.-W.; Wu, M.; Merajver, S. D.; Mycek, M.-A., Physiological fluorescence lifetime imaging microscopy improves Förster resonance energy transfer detection in living cells. *J. Biomed. Opt.* **2009**, *14* (6), 060502.
104. Chan, F. T. S.; Kaminski, C. F.; Kaminski Schierle, G. S., HomoFRET Fluorescence Anisotropy Imaging as a Tool to Study Molecular Self-Assembly in Live Cells. *ChemPhysChem.* **2011**, *12* (3), 500-509.
105. Wallrabe, H.; Periasamy, A., Imaging protein molecules using FRET and FLIM microscopy. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2005**, *16* (1), 19-27.

106. van Munster, E. B.; Gadella, T. W. J., Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy (FLIM) Microscopy Techniques. Springer Berlin / Heidelberg: **2005**; Vol. 95, pp 1301-1303.
107. Chen, Y.; Mills, J. D.; Periasamy, A., Protein localization in living cells and tissues using FRET and FLIM. *Differentiation* **2003**, *71* (9-10), 528-541.
108. Wade, P. A., Synthesis of 3-substituted 2-isoxazolines and 5,6-dihydro-4H-1,2-oxazines. *J. Org. Chem.* **1978**, *43* (10), 2020-2023.
109. Dallanoce, C.; Conti, P.; De Amici, M.; De Micheli, C.; Barocelli, E.; Chiavarini, M.; Ballabeni, V.; Bertoni, S.; Impicciatore, M., Synthesis and functional characterization of novel derivatives related to oxotremorine and oxotremorine-M. *Bioorg. Med. Chem.* **1999**, *7* (8), 1539-1547.
110. Calogeropoulou, T.; Angelou, P.; Detsi, A.; Fragiadaki, I.; Scoulica, E., Design and Synthesis of Potent Antileishmanial Cycloalkylidene-Substituted Ether Phospholipid Derivatives. *J. Med. Chem.* **2008**, *51* (4), 897-908.
111. Baeckström, P.; Stridh, K.; Li, L.; Norin, T., Claisen Rearrangements with Mesityl Oxide Dimethyl Ketal. Synthesis of Ipsdienone, E- and Z-Ocimenone, 2,6-Dimethyl-2,7-octadien-4-one and 2,6-Dimethyl-2,7-octadien-4-ol. *Acta Chem. Scand.* **1987**, *B 41*, 442-447.
112. Fang, Y.; Ferrie, A. M.; Fontaine, N. H.; Mauro, J.; Balakrishnan, J., Resonant Waveguide Grating Biosensor for Living Cell Sensing. *Biophys. J.* **2006**, *91* (5), 1925-1940.
113. Fang, Y., Non-invasive Optical Biosensor for Probing Cell Signaling. *Sensors* **2007**, *7* (10), 2316-2329.
114. Kebig, A. E. Signalwegsaktivierung an muskarinischen M2-Rezeptoren: Einfluss der allosterischen Bindungsstelle. Dissertation, Universität Bonn, **2012**.
115. Schroder, R.; Schmidt, J.; Blattermann, S.; Peters, L.; Janssen, N.; Grundmann, M.; Seemann, W.; Kaufel, D.; Merten, N.; Drewke, C.; Gomeza, J.; Milligan, G.; Mohr, K.; Kostenis, E., Applying label-free dynamic mass redistribution technology to frame signaling of G protein-coupled receptors noninvasively in living cells. *Nat. Protocols* **2011**, *6* (11), 1748-1760.
116. Schroder, R.; Janssen, N.; Schmidt, J.; Kebig, A.; Merten, N.; Hennen, S.; Muller, A.; Blattermann, S.; Mohr-Andra, M.; Zahn, S.; Wenzel, J.; Smith, N. J.; Gomeza, J.; Drewke, C.; Milligan, G.; Mohr, K.; Kostenis, E., Deconvolution of complex G protein-coupled receptor signaling in live cells using dynamic mass redistribution measurements. *Nat. Biotech.* **2010**, *28* (9), 943-949.
117. Harrison, C.; Traynor, J. R., The [35S]GTP $\gamma$ S binding assay: approaches and applications in pharmacology. *Life Sci.* **2003**, *74* (4), 489-508.

118. Kaufel, D. Interaktion orthosterisch/allosterischer Antagonist-Hybride mit muskarinischen M2-Acetylcholinrezeptoren. Dissertation, Universität Bonn, **2010**.
119. Ballesteros, J. A.; Weinstein, H., [19] Integrated methods for the construction of three-dimensional models and computational probing of structure-function relations in G protein-coupled receptors. *Methods Neurosci.* **1995**, Volume 25, 366-428.
120. Schrage, R.; Seemann, W. K.; Klöckner, J.; Dallanoce, C.; Racké, K.; Kostenis, E.; De Amici, M.; Holzgrabe, U.; Mohr, K., Agonists with supraphysiological efficacy at the muscarinic M2 acetylcholine receptor. *Br. J. Pharmacol.* **2012**, DOI: 10.1111/bph.12003.
121. Banholzer, R. Process for preparing pure enantiomers of tropic acid esters. PCT/EP96/01779, **1999**.
122. Ramer, S. E.; Moore, R. N.; Vederas, J. C., Mechanism of formation of serine  $\beta$ -lactones by Mitsunobu cyclization: synthesis and use of L-serine stereospecifically labelled with deuterium at C-3. *Can. J. Chem.* **1986**, 64 (4), 706-713.
123. Dimitrov, V. S.; Spassov, S. L.; Radeva, T. Z.; Ladd, J. A., Nuclear magnetic resonance spectra of tropic acid and some derivatives. *J. Mol. Struct.* **1975**, 27 (1), 167-176.
124. Zeile, K.; Schulz, W.; Banholzer, R.; Wick, H. N-Substituted noratropinium salts. ZA 6707766 19680522, **1968**.
125. Zeile, K.; Adickes, F.; Wick, H. Quaternary Tropeine Compounds and a Process of making same. US 2824106 19580218, **1958**.
126. Gmelin, E., dl-Norscopolamin. *Arch. Pharm. Ber. dt. pharm. Ges.* **1941**, 279, 112-115.
127. Scheuing, G.; Krauss, W. Quaternary scopolamine salts. DE 698274 19401003, **1940**.
128. Closs, G. L., The Configurational Equilibrium of the N-Methyl Group in Some Tropane Deuteriohalides. *J. Am. Chem. Soc.* **1959**, 81 (20), 5456-5461.
129. Fodor, G.; Chastain, R. V.; Frehel, D.; Copper, M. J.; Mandava, N.; Gooden, E. L., Stereochemistry of tropane quaternization. *J. Am. Chem. Soc.* **1971**, 93 (2), 403-413.
130. Chazin, W. J.; Colebrook, L. D., Use of proton spin-lattice relaxation and nuclear Overhauser effect data in structure analysis of alkaloids. *J. Org. Chem.* **1986**, 51 (8), 1243-1253.
131. Hesse, M.; Meier, H.; Zeeh, B., *Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie*. Georg Thieme verlag: Stuttgart, **2005**; Vol. 7. Auflage.

132. Rubio Esteban, A.; Hilliard, D. W., Thienpüridines as allosteric potentiators of the M4 muscarinic receptor. US Patent App. 20,090/105,244: **2005**.
133. Lounasmaa, M.; Johansson, C. J., Synthetic studies in the alkaloid field—IV: The sodium dithionite reduction of 1-[2-(3-indolyl)-ethyl]-3-methoxycarbonyl pyridinium bromides. *Tetrahedron* **1977**, *33* (1), 113-117.
134. Sato, M.; Kanuma, N.; Kato, T., Synthesis of N-Acylacetoacetamide using 2, 2, 6-Trimethyl-1, 3-dioxin-4-one. *Chem. Pharm. Bull.* **1982**, *30* (4), 1315-1321.
135. Katritzky, A. R.; Rachwal, S.; Smith, T. P.; Steel, P. J., Synthesis and reactivity of 2,6-diamino-4-methyl-3-pyridinecarbonitrile. *J. Heterocycl. Chem.* **1995**, *32* (3), 979-984.
136. Kanno, K.; Quin, G.-w.; Nakanishi, K.; Murata, M.; Naya, Y., Synthesis of Amphikuemin and Analogs: A Synomone That Mediates Partner-Recognition between Anemonefish and Sea Anemone. *Heterocycles* **1990**, *30* (1), 247-251.
137. Palmer, A. M., Neuroprotective therapeutics for Alzheimer's disease: progress and prospects. *Trends Pharmacol. Sci.* **2011**, *32* (3), 141-147.
138. Langmead, C. J.; Watson, J.; Reavill, C., Muscarinic acetylcholine receptors as CNS drug targets. *Pharmacol. Ther.* **2008**, *117* (2), 232-243.
139. Takeda, A.; Loveman, E.; Clegg, A.; Kirby, J.; Picot, J.; Payne, E.; Green, C., A systematic review of the clinical effectiveness of donepezil, rivastigmine and galantamine on cognition, quality of life and adverse events in Alzheimer's disease. *Int. J. Geriatr. Psychiatry.* **2006**, *21* (1), 17-28.
140. Giacobini, E., Cholinergic function and Alzheimer's disease. *Int. J. Geriatr. Psychiatry.* **2003**, *18* (S1), S1-S5.
141. Sellin, A. K.; Shad, M.; Tamminga, C., Muscarinic Agonists for the Treatment of Cognition in Schizophrenia. *CNS Spectr.* **2008**, *13* (11), 985-996.
142. Heinrich, J. N.; Butera, J. A.; Carrick, T.; Kramer, A.; Kowal, D.; Lock, T.; Marquis, K. L.; Pausch, M. H.; Popiolek, M.; Sun, S.-C.; Tseng, E.; Uveges, A. J.; Mayer, S. C., Pharmacological comparison of muscarinic ligands: Historical versus more recent muscarinic M1-preferring receptor agonists. *Eur. J. Pharmacol.* **2009**, *605* (1-3), 53-56.
143. Ma, L.; Seager, M. A.; Wittmann, M.; Jacobson, M.; Bickel, D.; Burno, M.; Jones, K.; Graufelds, V. K.; Xu, G.; Pearson, M.; McCampbell, A.; Gaspar, R.; Shughrue, P.; Danziger, A.; Regan, C.; Flick, R.; Pascarella, D.; Garson, S.; Doran, S.; Kretsoulas, C.; Veng, L.; Lindsley, C. W.; Shipe, W.; Kuduk, S.; Sur, C.; Kinney, G.; Seabrook, G. R.; Ray, W. J., Selective activation of the M1

muscarinic acetylcholine receptor achieved by allosteric potentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2009**, *106* (37), 15950-15955.

144. Kuduk, S.; Chang, R. Quinolizidinone M1 receptor positive allosteric modulators. WO 2009051715, **2009**.

145. Kuduk, S. D.; Di Marco, C. N.; Cofre, V.; Pitts, D. R.; Ray, W. J.; Ma, L.; Wittmann, M.; Seager, M.; Koeplinger, K.; Thompson, C. D.; Hartman, G. D.; Bilodeau, M. T., Pyridine containing M1 positive allosteric modulators with reduced plasma protein binding. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2010**, *20* (2), 657-661.

146. Leyva, E.; Monreal, E.; Hernández, A., Synthesis of fluoro-4-hydroxyquinoline-3-carboxylic acids by the Gould–Jacobs reaction. *J. Fluor. Chem.* **1999**, *94* (1), 7-10.

147. Baker, B. R.; Bramhall, R. R., Irreversible Enzyme Inhibitors. 189. Inhibition of Some Dehydrogenases by Derivatives of 4-Hydroxyquinoline-2- and -3-carboxylic Acids. *J. Med. Chem.* **1972**, *15* (3), 230-233.

148. Conroy, A. E.; Mosher, H. S.; Withmore, F., C., Heterocyclic Basic Compounds. XII. 7-Bromo-and 7-Iodo-quinolines. *J. Am. Chem. Soc.* **1949**, *71* (9), 3236-3237.

149. de la Cruz, A.; Elguero, J.; Goya, P.; Martínez, A.; Pfeleiderer, W., Tautomerism and acidity in 4-quinolone-3-carboxylic acid derivatives. *Tetrahedron* **1992**, *48* (29), 6135-6150.

150. Niedermeier, S. 4-Chinolone als Ausgangspunkt für antiparasitäre und antivirale Wirkstoffe. Dissertation, Universität Würzburg, **2010**.

151. Chua, K. B.; Goh, K. J.; Wong, K. T.; Kamarulzaman, A.; Tan, P. S. K.; Ksiazek, T. G.; Zaki, S. R.; Paul, G.; Lam, S. K.; Tan, C. T., Fatal encephalitis due to Nipah virus among pig-farmers in Malaysia. *Lancet* **1999**, *354* (9186), 1257-1259.

152. Dixit, S. K.; Mishra, N.; Sharma, M.; Singh, S.; Agarwal, A.; Awasthi, S. K.; Bhasin, V. K., Synthesis and in vitro antiplasmodial activities of fluoroquinolone analogs. *Eur. J. Med. Chem.* **2012**, *51* (0), 52-59.

153. Kuduk, S. D.; Di Marco, C. N.; Chang, R. K.; Ray, W. J.; Ma, L.; Wittmann, M.; Seager, M. A.; Koeplinger, K. A.; Thompson, C. D.; Hartman, G. D.; Bilodeau, M. T., Heterocyclic fused pyridone carboxylic acid M1 positive allosteric modulators. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2010**, *20* (8), 2533-2537.

154. Barros, M. T.; Phillips, A. M. F., Synthesis of New Chiral Amines with a Cyclic 1, 2-Diacetal Skeleton Derived from (2R, 3R)-(+)-Tartaric Acid. *Molecules* **2006**, *11* (2), 177-196.

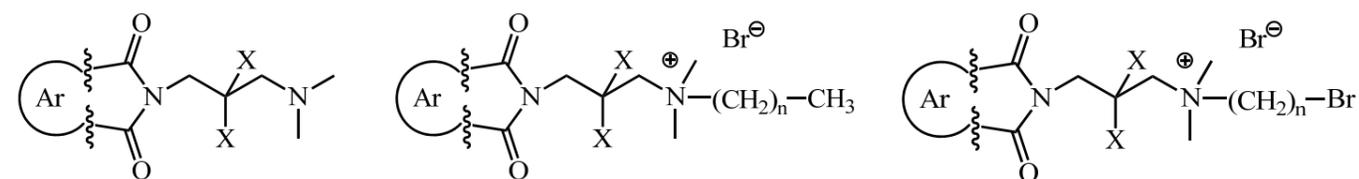
155. Schneider, E.; Keller, M.; Brennauer, A.; Hoefelschweiger, B. K.; Gross, D.; Wolfbeis, O. S.; Bernhardt, G.; Buschauer, A., Synthesis and Characterization of the First Fluorescent Nonpeptide NPY Y1 Receptor Antagonist. *ChemBioChem*. **2007**, *8* (16), 1981-1988.
156. Wetzl, B. K.; Yarmoluk, S. M.; Craig, D. B.; Wolfbeis, O. S., Ein Chamäleon-Marker zur Anfärbung und quantitativen Bestimmung von Proteinen. *Angew. Chem*. **2004**, *116* (40), 5515-5517.
157. Balaban, A. T.; Boulton, A. J., 2,4,6-Trimethylpyrylium Tetrafluoroborate. *Org. Synth. Coll. Vol*. **1973**, *5*, 1112-1115.
158. Höfelschweiger, B. K. The Pyrylium Dyes: A New Class of Biolabels. Synthesis, Spectroscopy, and Application as Labels and in General Protein Assay. Dissertation, Universität Regensburg, **2005**.
159. Caro, B.; Le Guen-Robin, F.; Salmain, M.; Jaouen, G., 4-Benchrotrenyl Pyrylium Salts as Protein Organometallic Labelling Reagents. *Tetrahedron* **2000**, *56*, 257-263.
160. Bejeuhr, A.; Holzgrabe, U.; Mohr, K.; Sürig, U.; v Petersenn, A., *Pharm. Pharmacol. Lett*. **1992**, *2*, 100.
161. Kostenis, E.; Holzgrabe, U.; Mohr, K., Allosteric effect on muscarinic M2-receptors of derivatives of the alkane-bis-ammonium compound W84. Comparison with bispyridinium-type allosteric modulators. *Eur. J. Med.Chem*. **1994**, *29* (12), 947-953.
162. Shaibakova, M.; Titova, I.; Ibragimov, A.; Dzhemilev, U., Aminomethylation of acetylene alcohols and their esters with *gem*-diamines catalyzed by complexes of *d*-transition and rare-earth metals. *Russ. J. Org. Chem*. **2011**, *47* (2), 161-167.
163. Bock, A.; Merten, N.; Schrage, R.; Dallanocce, C.; Bätz, J.; Klöckner, J.; Schmitz, J.; Matera, C.; Simon, K.; Kebig, A.; Peters, L.; Müller, A.; Schrobang-Ley, J.; Tränkle, C.; Hoffmann, C.; De Amici, M.; Holzgrabe, U.; Kostenis, E.; Mohr, K., The allosteric vestibule of a seven transmembrane helical receptor controls G-protein coupling. *Nat. Commun*. **2012**, *3*, 1044.
164. Makarevich, I.; Gubin, Y., Quaternary salts of alkaloids. *Chem. Nat. Comp*. **2006**, *42* (4), 473-476.
165. Engelhardt, A.; Wick, H., Relations between constitution and pharmacological activity in tropeines and their quaternary derivatives, especially N-octylatropinium bromide. *Arzneimittelforschung* **1957**, *7*, 217-222.
166. Soyka, L.; Gyermek, L., Cholinergic Blockade as Related to Chain Length of Monoquaternary Derivatives of Atropine and Benzoyl-tropine. *J. Med. Pharm. Chem*. **1960**, *2* (4), 361-373.

167. Skoko, Z. e.; Zamir, S.; Naumov, P. e.; Bernstein, J., The Thermosolient Phenomenon. "Jumping Crystals" and Crystal Chemistry of the Anticholinergic Agent Oxitropium Bromide. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132* (40), 14191-14202.
168. Banholzer, R.; Pook, K. H., Synthesis of anticholinergically active N-alkylnorscopolamines and their quaternary salts with particular consideration of the bronchospasmolytic compound (-)-N-ethylnorscopolamine methobromide (Ba 253 BR). *Arzneimittelforschung* **1985**, *35* (1A), 217-218.
169. Boehringer, C. H. N-Alkylscopolammonium salts. FR 1503294 19671124, **1967**.
170. Musso, D. L.; Cochran, F. R.; Kelley, J. L.; McLean, E. W.; Selph, J. L.; Rigdon, G. C.; Orr, G. F.; Davis, R. G.; Cooper, B. R.; Styles, V. L.; Thompson, J. B.; Hall, W. R., Indanylidenes. 1. Design and Synthesis of (E)-2-(4,6-Difluoro-1-indanylidene)acetamide, a Potent, Centrally Acting Muscle Relaxant with Antiinflammatory and Analgesic Activity. *J. Med. Chem.* **2002**, *46* (3), 399-408.
171. Bobbitt, J. M.; Scola, D. A., Synthesis of Isoquinoline Alkaloids. II. The Synthesis and Reactions of 4-Methyl-3-pyridinecarboxaldehyde and Other 4-Methyl-3-substituted Pyridines 1,2. *J. Org. Chem.* **1960**, *25*, 560-564.
172. Di Rienzo, B.; Mellini, P.; Tortorella, S.; De Vita, D.; Scipione, L., Facile and efficient synthesis of 4-alkyl derivatives of 3-carbamoyl- and 3,5-dicarbamoylpyridines as nicotinamide mimetics. *Synthesis* **2010**, *22*, 3835-3838.
173. Erickson, E. H.; Hainline, C. F.; Lenon, L. S.; Matson, C. J.; Rice, T. K.; Swingle, K. F.; Van Winkle, M., Inhibition of rat passive cutaneous anaphylaxis by 3-(tetrazol-5-yl)quinolines. *J. Med. Chem.* **1979**, *22* (7), 816-823.
174. Lutz, R. E.; Ohnmacht, C. J.; Davis, F., Antimalarials. 5. .alpha.-Dibutylaminomethyl- and .alpha.-(2-piperidyl)-3-quinolinemethanols. *Journal of Medicinal Chemistry* **1971**, *14* (1), 17-24.
175. Watanuki, S.; Koga, Y.; Moritomo, H.; Tsukamoto, I.; Kaga, D.; Okuda, T.; Hirayama, F.; Moritani, Y.; Takasaki, J. Preparation of quinolone derivatives as platelet aggregation inhibitors. WO 2005009971 A1 20050203, **2005**.
176. Lucero, B. d. A.; Gomes, C. R. B.; Frugulhetti, I. C. d. P. P.; Faro, L. V.; Alvarenga, L.; de Souza, M. C. B. V.; de Souza, T. M. L.; Ferreira, V. F., Synthesis and anti-HSV-1 activity of quinolonic acyclovir analogues. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, *16* (4), 1010-1013.
177. Koga, H.; Itoh, A.; Murayama, S.; Suzue, S.; Irikura, T., Structure-activity relationships of antibacterial 6,7- and 7,8-disubstituted 1-alkyl-1,4-dihydro-4-oxoquinoline-3-carboxylic acids. *J. Med. Chem.* **1980**, *23* (12), 1358-1363.

178. Yang, F. V.; Shipe, W. D.; Bunda, J. L.; Nolt, M. B.; Wisnoski, D. D.; Zhao, Z.; Barrow, J. C.; Ray, W. J.; Ma, L.; Wittmann, M.; Seager, M. A.; Koeplinger, K. A.; Hartman, G. D.; Lindsley, C. W., Parallel synthesis of N-biaryl quinolone carboxylic acids as selective M1 positive allosteric modulators. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2010**, *20* (2), 531-536.
179. van Es, T.; Staskun, B., 1-Alkyl-1,4-dihydro-4-iminoquinoline-3-carboxylic acids: Synthesis, Structure and Properties. *S. Afr. J. Chem.* **2002**, *55*, 13-33.
180. Guerry, P.; Jolidon, S.; Masciadri, R.; Stalder, H.; Then, R. Novel benzyl pyrimidines with antibacterial activity. WO 9616046 A2 19960530, **1996**.

## Übersicht über die synthetisierten Verbindungen

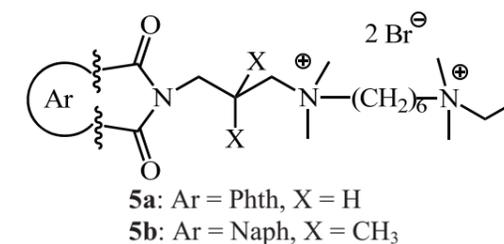
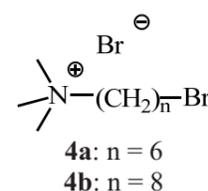
### Allostere Modulatoren



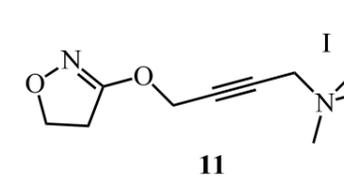
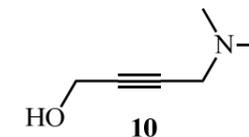
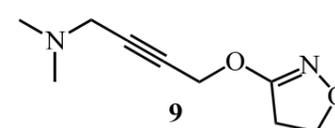
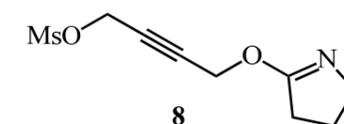
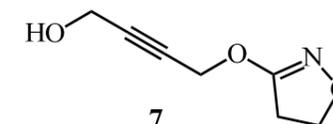
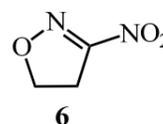
**1a:** Ar = Phth, X = H  
**1b:** Ar = Naph, X = H  
**1c:** Ar = Naph, X = CH<sub>3</sub>

**2a:** Ar = Phth, X = H, n = 2  
**2b:** Ar = Phth, X = H, n = 5  
**2c:** Ar = Naph, X = H, n = 2  
**2d:** Ar = Naph, X = H, n = 6  
**2e:** Ar = Naph, X = CH<sub>3</sub>, n = 2

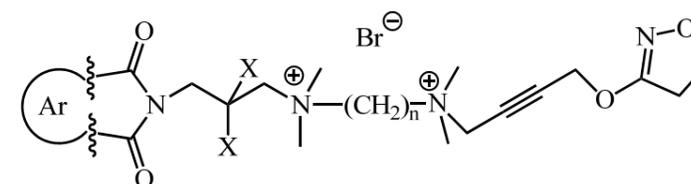
Ar = Phth:      Ar = Naph:  
**3a:** n = 4      **3e:** n = 6, X = H  
**3b:** n = 6      **3f:** n = 4, X = CH<sub>3</sub>  
**3c:** n = 7      **3g:** n = 6, X = CH<sub>3</sub>  
**3d:** n = 8      **3h:** n = 8, X = CH<sub>3</sub>



### Iperoxo



### Agonistische Hybride

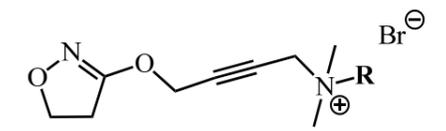
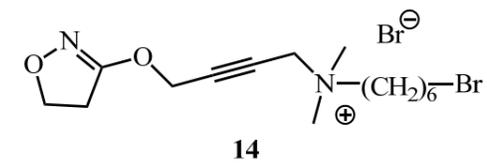


**12a:** Ar = Phth, X = H, n = 4  
**12b:** Ar = Phth, X = H, n = 6  
**12c:** Ar = Naph, X = CH<sub>3</sub>, n = 6



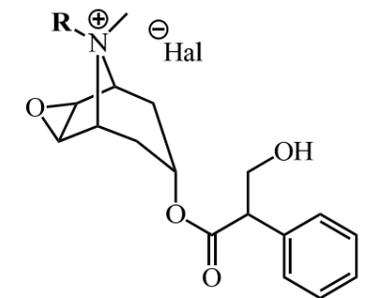
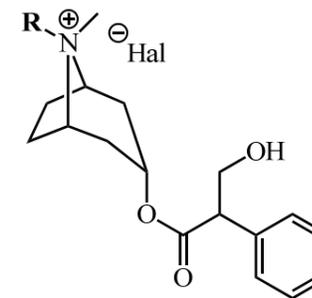
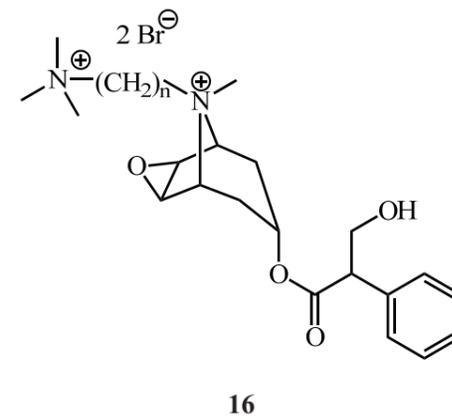
**13**

**Verkürzte Iperoxo-Derivate**



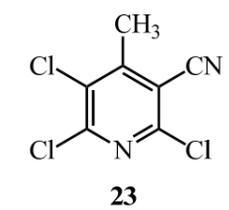
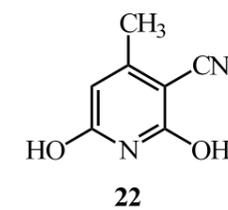
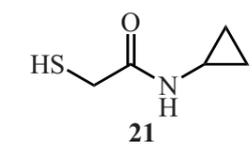
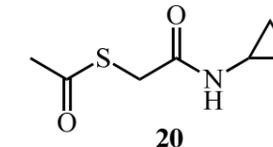
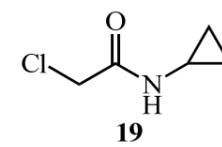
R = **15a:** Ethyl    **15f:** Heptyl  
**15b:** Propyl    **15g:** Octyl  
**15c:** Butyl    **15h:** Nonyl  
**15d:** Pentyl    **15i:** Decyl  
**15e:** Hexyl

**Verkürzte antagonistische Derivate**

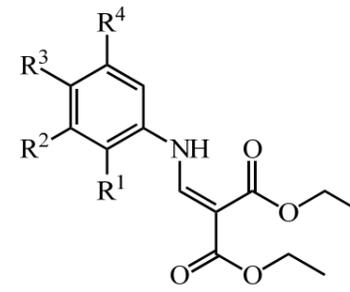


R = **17a:** Methyl    **17f:** Hexyl  
**17b:** Ethyl    **17g:** Heptyl  
**17c:** Propyl    **17h:** Octyl  
**17d:** Butyl    **17e:** Pentyl  
**17f:** Hexyl    **18b:** Ethyl    **18f:** Hexyl  
**17g:** Heptyl    **18c:** Propyl    **18g:** Heptyl  
**17h:** Octyl    **18d:** Pentyl    **18h:** Octyl

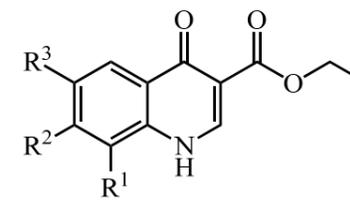
**Thienopyridin-Vorstufen**



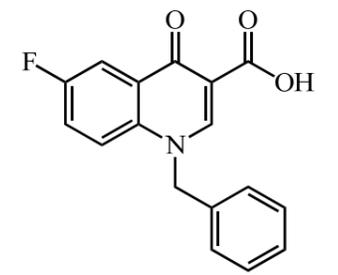
### Chinolon-Iperoxo-Hybride und Vorstufen



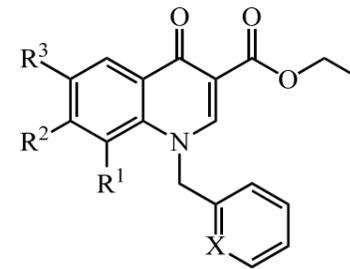
24a-h



25a,b,d-h

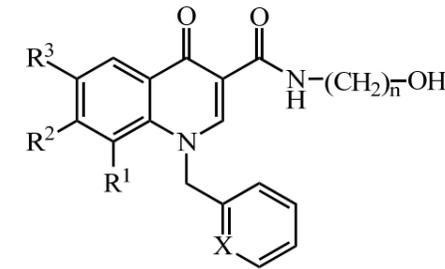


26



$X = C$ : 27a,b,d,e,f,h

$X = N$ : 28h



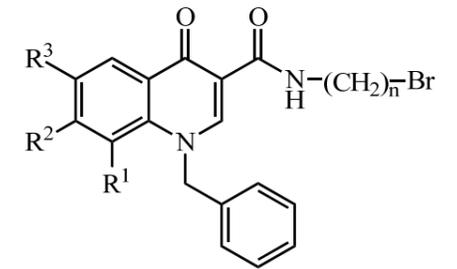
$X = C$ :

$n = 2$ : 29-C2 (e,h)

$n = 3$ : 29-C3

$n = 4$ : 29-C4 (a,e,f,h)

$n = 6$ : 29-C6 (a,e,f,h)



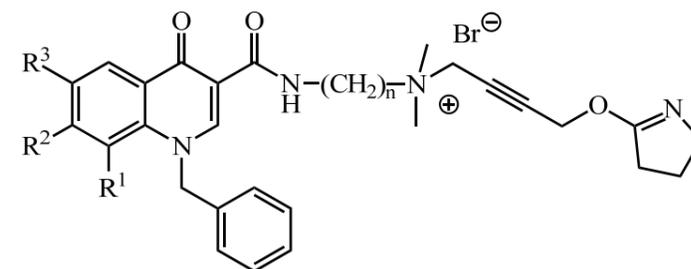
$X = N$ :

$n = 4$ : 30h-C4

$n = 6$ : 30h-C6

$n = 4$ : 31-C4 (a,e,f,h)

$n = 6$ : 31-C6 (a,e,f,h)

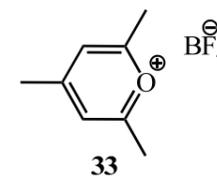


$n = 4$ : 32-C4 (a,e,f,h)

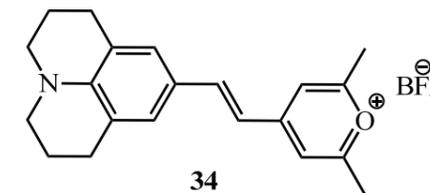
$n = 6$ : 32-C6 (a,e,f,h)

	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	R <sup>3</sup>	(R <sup>4</sup> )
<b>a</b>	F	H	H	H
<b>b</b>	Cl	H	Cl	H
<b>c</b>	Cl	H	H	Cl
<b>d</b>	H	F	H	H
<b>e</b>	H	Br	H	H
<b>f</b>	H	Cl	F	H
<b>g</b>	H	NO <sub>2</sub>	Cl	H
<b>h</b>	H	H	F	H

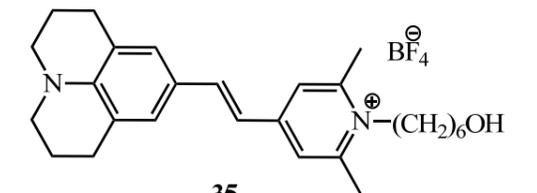
### Floureszenzfarbstoff



33



34



35