

**Entwicklung neuartiger pharmakologischer
Wirkstoffe als Inhibitoren des HSF-1/HSP70-
Systems zur Behandlung des Multiplen Myeloms**

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

vorgelegt von
Andreas Walter Hartung
aus
Rannungen

Würzburg 2013



Eingereicht am: _____
bei der Fakultät für Chemie und Pharmazie.

Gutachter der schriftlichen Arbeit:

1. Gutachter: _____

2. Gutachter: _____

Prüfer des öffentlichen Promotionskolloquiums:

1. Prüfer: _____

2. Prüfer: _____

3. Prüfer: _____

Datum des öffentlichen Promotionskolloquiums: _____

Doktorurkunde ausgehändigt am: _____

MEINEN ELTERN

GERTRUD UND HELMUT HARTUNG

THE REAL VOYAGE OF DISCOVERY CONSISTS
NOT IN SEEKING NEW LANDSCAPES BUT IN HAVING NEW EYES.
(Marcel Proust)

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Oktober 2009 bis Januar 2013
unter der Anleitung von Frau Prof. Dr. Ulrike Holzgrabe
mit finanzieller Unterstützung der Klinischen Forschergruppe 216 (DFG)
am Institut für Pharmazie und Lebensmittel Chemie der Universität Würzburg angefertigt.

Teile der im Rahmen dieser Arbeit erzielten Ergebnisse waren bereits
Gegenstand einer Publikation^[82] sowie von Poster-Präsentationen und Vorträgen.

Danksagung

Bei allen Personen, die mich während der Erstellung dieser Arbeit in verschiedenster Form unterstützt haben, möchte ich mich recht herzlich bedanken:

Frau Prof. Dr. Ulrike Holzgrabe

danke ich herzlich für die Möglichkeit meine Dissertation im Rahmen eines interdisziplinären Forschungsprojekts anfertigen zu können, die gewährten wissenschaftlichen Freiräume sowie die ausgezeichnete Unterstützung bei dieser Arbeit. Ausdrücklich möchte ich mich auch für die freundliche Atmosphäre und die exzellenten Arbeitsbedingungen bedanken.

Daneben möchte ich mich bei meinen Kooperationspartnern und ihren Mitarbeitern für die angenehme Zusammenarbeit und das beeindruckende Engagement bedanken.

- Prof. Dr. Christoph Sotriffer vom Institut für Pharmazie und Lebensmittelchemie der Universität Würzburg sowie seinen Mitarbeitern Ulrich Peinz und David Zilian.
- Prof. Dr. Ralf Bargou und Dr. Manik Chatterjee der Medizinischen Klinik und Poliklinik II der Universität Würzburg und ihren Mitarbeiterinnen Elisabeth Müller und Heike Schraut.
- Prof. Dr. Dr. Lorenz Meinel vom Institut für Pharmazie und Lebensmittelchemie der Universität Würzburg sowie seinen Mitarbeitern Dr. Anastasios Sakalis und Nina Hecht.
- Dr. Andreas Beilhack von der Medizinischen Klinik und Poliklinik II der Universität Würzburg und seiner Mitarbeiterin Dr. Sabrina Kraus.
- Prof. Dr. Max Topp von der Medizinischen Klinik und Poliklinik II der Universität Würzburg und seinem Mitarbeiter Dr. Carsten Berges.

Prof. Dr. Dr. h. c. mult. Gerhard Bringmann vom Institut für Organische Chemie der Universität Würzburg möchte ich für die Bereitstellung der chiralen HPLC-Säulen danken. Mein Dank gilt auch dessen Mitarbeitern Dr. Thorsten Bruhn und Franziska Witterauf, die die Berechnung und die Messung der CD-Spektren durchgeführt haben.

Dr. Heike Bruhn vom Institut für Molekulare Infektionsbiologie der Universität Würzburg danke ich für Untersuchungen der Hämolyseaktivität und die Toxizitätsanalyse an Leber- und Nierenzellen.

Dr. Viktoria Gessner und Dr. Krzysztof Radacki (AG Braunschweig, Institut für Anorganische Chemie der Universität Würzburg) danke ich für die Durchführung der Röntgenstrukturanalysen.

Unseren Sekretärinnen Frau Möhler und Frau Ebner möchte ich recht herzlich für die Unterstützung bei der Abwicklung allerlei organisatorischer Angelegenheiten danken.

Für den regen fachlichen Austausch in synthetischen und analytischen Angelegenheiten möchte ich im Besonderen Georg Hiltensperger danken. Die vielen erholsamen Tage, die wir gemeinsam in den Allgäuer Alpen verbracht haben, haben jedes Mal neue Energie für den Laboralltag geliefert.

Dr. Jens Schmitz danke ich vor allem für seine Hilfe in Nomenklatur-Angelegenheiten.

Johannes Wiest gilt ein großes Dankeschön für die zahlreichen „Spezial“-NMR-Messungen außerhalb der Messautomatisation.

Dr. Alexander Hörst danke ich im Besonderen für die Bestimmung der Plasma-Proteinbindung.

Meinen Labor-Kolleginnen Dr. Jessica Klöckner, Dr. Eva Kugelmann und Regina Messerer möchte ich vor allem für die angenehme Arbeitsatmosphäre in unserem Labor danken. Ein Highlight waren die ernstesten aber auch amüsantesten Gespräche am Fenster, die ich mit dir Jessy geführt habe.

Ein großes Dankeschön geht auch an unsere Laborantin Lina Pogorelaia, deren Unterstützung im Laboralltag immer äußerst hilfreich war.

Meinen Wahlpflicht- und F-Praktikanten Alexander Grebner, Annette Raab, Florian Seufert, Steffen Heyer, Steffen Kalinna und Ukde Payze danke ich für ihr Interesse an meinem Forschungsprojekt und ihre hierzu geleisteten Beiträge.

Nicht zuletzt möchte ich mich auch bei meiner Freundin Céline bedanken, die mir sehr viel Verständnis entgegengebracht hat und mich in allen Lebenslagen ermutigt und unterstützt hat.

INHALTSVERZEICHNIS

ALLGEMEINER TEIL	1
1 Einleitung	1
1.1 Die Krebserkrankung „Multiples Myelom“	4
1.2 Das „Heat Shock“-System als innovatives Drug-Target.....	7
2 Zielsetzung.....	18
3 Ansätze zur Entwicklung von HSF-1-Inhibitoren.....	20
3.1 Synthese von Tetrahydroisochinolinonen via Ugi-Heck-Reaktion	21
3.2 Ergebnisse.....	30
3.3 Modifikationen der potentesten α -Acylaminocarboxamide	36
4 2,5-Diketopiperazine mit anti-proliferativer Aktivität	40
4.1 Synthese.....	41
4.2 Bioaktivitätsanalyse.....	45
5 Entwicklung neuartiger HSP70-Inhibitoren.....	49
5.1 Inhibitorentwicklung nach rationalem Wirkstoff-Design	49
5.2 Retrosynthetische Betrachtung des virtuellen Screening Hits.....	52
5.3 Aufbau einer Substanzbibliothek analoger Tetrahydroisochinolinone	53
5.3.1 Synthese verschiedener Arylaldimine	53
5.3.2 Synthese von Isochinolinon-Carbonsäuren	54
5.3.3 Synthese von Isochinolinon-Carboxamiden	57
5.4 „Hit to Lead“-Optimierung.....	61
5.4.1 Untersuchungen zur diastereospezifischen Aktivität.....	62
5.4.2 Optimierung der Substituenten in Position 2 und 3 des Isochinolin-Grundgerüsts...64	
5.4.3 Variationen des exozyklischen Amids.....	66
5.4.4 Falsifizierungsuntersuchungen zur adressierten Bindetasche	68
5.4.5 Analyse der enantiospezifischen Aktivität	69
5.4.6 Ermittlung des LogD und der PSA zur Einschätzung der Bioverfügbarkeit.....	75

5.4.7 Betrachtung von LE und LLE der aktiven Carboxamide	81
5.5 Detaillierte In-vitro-Bioaktivitäts- und Toxizitätsanalyse.....	84
5.6 Aktivitätsuntersuchung in einer In-vivo-Studie	88
5.6.1 Bestimmung physikochemischer Parameter ausgewählter Isochinolinon-Derivate..	88
5.6.2 Aktivitätsuntersuchung an MOPC-MM-Zellen und erweiterte Toxizitätsprüfung ...	99
5.6.3 Design und Ergebnisse der In-vivo-Studie	100
6 Zusammenfassung	105
7 Summary	110
EXPERIMENTELLER TEIL	115
8 Allgemeine Methoden.....	115
8.1 Verwendete Apparaturen und Messgeräte.....	115
8.2 Chromatographische Methoden.....	116
8.3 Chemikalien.....	118
9 Synthesen.....	120
9.1 Synthese der potenziellen HSF-1-Inhibitoren	120
9.1.1 Synthese von α -Acylaminocarboxamid-Derivaten.....	120
9.1.2 Synthese von Tetrahydroisochinolin-1-carboxamid-Derivaten.....	136
9.2 Synthese der 2,5-Diketopiperazin-Derivate	146
9.3 Synthese der HSP70-Inhibitoren	161
9.3.1 Synthese von Arylaldimin-Derivaten	161
9.3.2 Synthese von Tetrahydroisochinolin-4-carbonsäure-Derivaten	165
9.3.3 Synthese von Natrium Tetrahydroisochinolin-4-carboxylaten.....	174
9.3.4 Synthese von Tetrahydroisochinolin-4-carboxamid-Derivaten.....	178
10 Lipophiliebestimmung	197
11 Röntgenstrukturanalyse.....	200
LITERATUR UND ANMERKUNGEN.....	204

ALLGEMEINER TEIL

1 Einleitung

“America has long been the wealthiest nation in the world. Now it is time we became the healthiest nation in the world.”^[1]

(Richard Nixon)

Seit der U.S. amerikanische Präsident Richard Nixon im Jahr 1971 mit diesen Worten in seiner Rede zur Lage der Nation den „War on Cancer“ einleitete, wurde weltweit viel Arbeit und enorme finanzielle Mittel in die Krebsforschung investiert. Obwohl seither bedeutende Fortschritte auf diesem Gebiet verbucht werden konnten,^[2] zählen Krebserkrankungen auch heute noch zur zweithäufigsten Todesursache nach Erkrankungen des Herz-Kreislauf-Systems. Während die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister e.V. (GEKID) und des Zentrums für Krebsregisterdaten (ZfKD) des Robert-Koch-Instituts von einer jährlichen Neuerkrankungsrate von ca. 400.000 Menschen in Deutschland ausgehen,^[3, 4] beziffert die American Cancer Society die weltweite Prävalenz auf 12.7 Mio. Die Zahl der krebsbedingten Sterbefälle liegt bei 7.6 Mio., was einer täglichen Mortalitätsrate von knapp 21.000 Menschen entspricht.^[5]

Nach Meinung führender Wissenschaftler hat die Entwicklung von Krebsarzneistoffen heute die zweite goldene Ära erreicht, die bedingt durch hochspezifische Therapieansätze weitere deutliche Fortschritte für die Zukunft erwarten lässt. So ist der Nobelpreisträger Harold Varmus von der Geschwindigkeit beeindruckt, mit der neue Krebsgenotypen identifiziert werden, und davon überzeugt, dass in den nächsten Jahrzehnten zahlreiche Verbesserungen in der Krebsbehandlung zu erwarten sind (Abb. 1).^[6, 7]

“In oncology [...] we are identifying cancer genotypes at an impressive rate, and in some cases we are identifying new therapeutic opportunities and occasionally seizing them successfully as well. As a result, there is likely to be a lot of progress in treating cancer in the next couple of decades.”^[8]

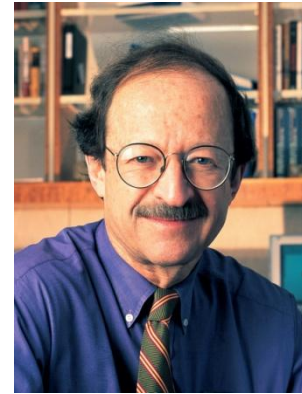


Abbildung 1: Harold Varmus^[9] erhielt für die „Entdeckung des zellulären Ursprungs retroviraler Krebsgene“ zusammen mit John Bishop im Jahr 1989 den Nobelpreis für Medizin und ist seit 2010 Direktor des National-Cancer-Institutes (NCI).

Als Beginn der ersten goldenen Ära der Entwicklung von Zytostatika wird die Beobachtung in den 1940ern betrachtet, dass das als Kampfstoff eingesetzte Senfgas zytotoxisch auf Lymphgewebe und Knochenmark wirkt.^[10] Es folgte die Entwicklung der DNA-Alkylierungsagenzien der N-Lost Substanzklasse (β -Chlorethylamine), die in einer ersten klinischen Studie therapeutische Aktivität bei non-Hodgkin-Lymphomen und Leukämie zeigte.^[11] Auf dieser Grundlage wurden in den folgenden Jahren zahlreiche zytotoxische Chemotherapeutika entwickelt, die noch heute Bestandteil von Antitumor-Therapien sind.^[7] Konzeptionell bauen sämtliche Zytostatika auf der Tatsache auf, dass Krebszellen eine deutlich größere Replikationsrate besitzen als gesunde Zellen und sich deren DNA damit häufiger teilen muss. Mit Methotrexat hatte man den ersten Wirkstoff entwickelt, mit dem das sehr aggressive Chorionkarzinom und, in Kombination mit Leucovorin, auch der bösartigen Knochentumor Osteosarkom heilbar wurde.^[10] Es folgte die Entwicklung von 5-Fluorurazil,^[12] das bei Kolorektal- und Mammakarzinomen eingesetzt wird, sowie die Zulassung von Cisplatin im Jahr 1978 und später dessen Analoga Carboplatin mit verbesserter Wirksamkeit und Toxizität.^[13, 14] Parallel dazu wurde auch die Verwendung von Naturstoffen in der Krebstherapie erforscht und dabei die zytotoxische Aktivität der Vinca-Alkaloide, Podophyllotoxine, Anthrachinon-Derivate, Camptothecine und Taxane entdeckt. Das aus der pazifischen Eibe *Taxus brevifolia* gewonnene Paclitaxel (Taxol) wurde 1987 zur Behandlung von Ovarialkarzinomen zugelassen.^[10] Da jedoch alle DNA zerstörenden oder die Zellteilung inhibierenden Substanzen auch gesunde Zellen beeinträchtigen, sind ungeachtet der Behandlungserfolge auch schwere Nebenwirkungen die Folge. Trotz intensiver Forschung konnte eine weitere Steigerung der Effektivität von Zytostatika nicht

erreicht werden, was sich auf die konzeptionell geringe therapeutische Breite zurückführen lässt.^[15]

Zur selben Zeit wurden auch die molekularen Ursachen von Krebserkrankungen intensiv erforscht. So wurde in den 60er und 70er Jahren des letzten Jahrhunderts Viren charakterisiert, die in Tieren Krebs verursachen, in den 70/80ern die ersten krebsauslösenden Onkogene und Tumorsuppressorgene identifiziert und in den Jahren um 1990 die Methodik aufgedeckt, wie Krebsgene die Signalwege in Zellen modifizieren und manipulieren.^[6] Während diese Erkenntnisse zu Beginn wenig Einfluss auf die Diagnostik und die Therapie von Krebserkrankungen hatte, hat sich die Situation in den letzten zehn Jahren deutlich geändert. Die für die Entstehung von Krebszellen zugrundeliegenden genetischen und biochemischen Mechanismen dienen heute als Grundlage für die Entwicklung von rationalen, Mechanismus-basierenden Wirkstoffen, die mit ihrer erhöhten Selektivität für maligne Zellen eine geringere Toxizität versprechen.^[16] Die Entwicklung von Wirkstoffen, die auf Basis molekularer onkologischer Erkenntnisse beruhen, wird heute als zweite goldene Ära bei der Erforschung von Krebsarzneistoffen bezeichnet.^[10]

Das wohl bekannteste Beispiel aus dieser Ära ist der Wirkstoff Imatinib (Gleevec). Bei nahezu allen Patienten mit chronischer myeloischer Leukämie (CML) im Anfangsstadium führt die Behandlung mit Imatinib zu einer vollständigen und nachhaltigen Remission und ist damit konventionellen Therapien deutlich überlegen.^[17] Das durch eine chromosomale Translokation aktivierte Onkoprotein BCR-ABL ist in der Pathogenese von CML von erheblicher Bedeutung. Der Wirkmechanismus von Imatinib beruht dabei auf der Unterbrechung dieses onkogenen Signalwegs durch die selektive Inhibition der BCR-ABL-Tyrosin-Kinase.

Unbestrittener Konsens besteht heute darüber, dass Krebs durch Mutationen und aberrante Expression von Genen ausgelöst wird.^[18] Hierzu zählt die Aktivierung der Onkogene selbst, die Deaktivierung von DNA-Reparaturgenen und Tumorsuppressorgenen sowie die Aktivierung von Genen, welche Proteine kodieren, die wie „Heat Shock“-Proteine (HSPs) onkogene Signalwege stützen. Die so stimulierten Signalwege führen zu den phänotypischen Krebsmerkmalen wie gesteigerter Proliferation, Apoptoseresistenz, Angiogenese und Metastasenbildung.^[7]

1.1 Die Krebserkrankung „Multiples Myelom“

Die neoplastische Erkrankung terminal differenzierter Plasmazellen (B-Zellen) wird als Multiples Myelom (MM) bezeichnet und zählt nach dem non-Hodgkin-Lymphom mit 10% zu den zweithäufigsten hämatologischen Krebserkrankungen und macht etwa 1% aller Krebsleiden aus.^[19, 20]

Gesunde Plasmazellen, die mit der Produktion von Antikörpern wesentlich für die humorale Immunantwort verantwortlich sind, entwickeln sich in einem mehrstufigen Differenzierungsprozess aus B-Zellen (Abb. 2). Das erste Stadium des Entwicklungsprozesses findet im Knochenmark statt. Aus einer hämatopoetischen Stammzelle entwickelt sich durch Umlagerung der Immunoglobulin-Ketten und Expressierung von Antigen-Rezeptoren an dessen Oberfläche eine sogenannte Naive B-Zelle. Zellen, bei denen dieser Prozess fehlgeschlagen ist, werden im Normalfall durch Apoptose ausgesiebt. Die naiven B-Zellen verlassen danach das Knochenmark und zirkulieren im Blutsystem bis sie aufgrund eines T-Zell-vermittelten Signal in Lymphgewebe migrieren. In Keimzentren findet dort unter aktivierter somatischer Hypermutation eine ausgeprägte Proliferation statt, um hochaffine Antikörper zu entwickeln. Unvorteilhafte Antikörpermutationen mit niedriger Affinität werden durch Apoptose der entsprechenden B-Zellen eliminiert. Durch eine abschließende Differenzierung gehen aus B-Zellen mit affinen Antigenen Gedächtniszellen oder Plasmazellen hervor, wobei letztere hauptsächlich im Knochenmark lokalisiert sind.^[21]

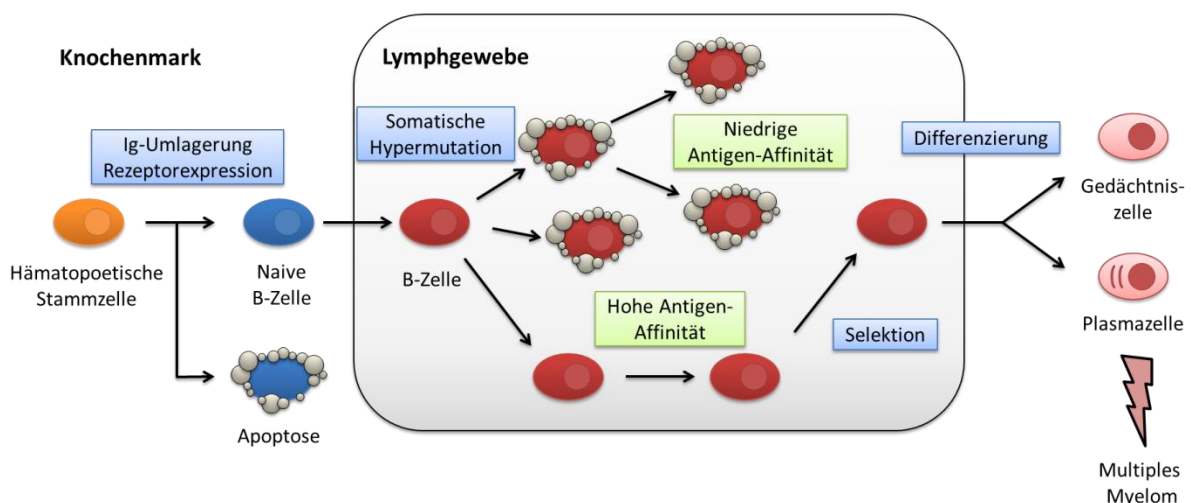


Abbildung 2: Die Entwicklung von Plasmazellen beginnt mit hämatopoetischen Stammzellen und verläuft über mehrere Differenzierungsschritte. Durch illegitimes Überleben maligner B-Zellen, werden entartete Plasmazellen gebildet, die das Multiple Myelom auslösen können. Abbildung erstellt in Anlehnung an Lit. [21].

Die mehrstufige Entwicklung des MM wird auf Fehlfunktionen während dieses Differenzierungsprozesses von B-Zellen zurückgeführt. Der Selektionsmechanismus, der die Produktion hochaffiner Antikörper gewährleisten soll, scheitert, sodass auch Plasmazellen gebildet werden, die funktionsuntüchtige Paraproteine produzieren. Zusätzliche onkogene Läsionen führen zunächst zur Krebsvorstufe „Monoklonale Gammopathie unklarer Signifikanz“ (MGUS) und später zur Ausbildung des symptomatischen MM.

Die klinischen Symptome des MM sind auf das krankhafte Wachstum der Plasmazellen im Knochenmark und die produzierten funktionsuntüchtigen Antikörper zurückzuführen. Häufig dringen die mutierten Plasmazellen in den umliegenden Knochen ein und es kommt durch dessen Auflösung zu Knochenschmerzen und Frakturen. Die von den Plasmazellen exzessiv produzierten monoklonalen Proteine (M-Proteine) führen zu Niereninsuffizienz und die verminderte Produktion normaler Antikörper bedingt eine Schwächung des Immunsystems. Es kommt daneben zu Schäden im blutbildenden System und zu den typischen Symptomen einer Anämie sowie zu Hyperkalzämie.^[22]

In den vergangenen Jahren konnten einige therapeutische Fortschritte bei der Behandlung des MM erzielt werden. Erste Behandlungserfolge wurden bereits Ende der 60er Jahre mit dem DNA-Alkylierungsagens Melphalan (**1**) verzeichnet (Abb. 3).^[23] Durch die Induktion der Verknüpfungsreaktionen von DNA-Strängen wird über die folgende Abspaltung von Basenpaaren und das Entstehen von Strangbrüchen die DNA-Replikation gestört. In Kombination mit Prednison konnte bei zuvor unbehandelten Patienten eine Ansprechrate von 40–50% und eine mittlere Überlebensdauer von 3 Jahren erreicht werden.^[24] Thalidomid (**2a**), das in den 50er Jahren gegen Morgenübelkeit und Schlafstörungen bei schwangeren Frauen auf den Markt kam und später wegen schweren teratogenen Nebenwirkungen zurückgezogen wurde, ist heute bei begleitenden Kontrazeptionsmaßnahmen zur Behandlung des MM zugelassen. Wie die weiterentwickelten Derivate Pomalidomid (**2b**) und Lenalidomid (**2c**) greifen die immunmodulierenden Wirkstoffe zur Bekämpfung der Myelomzellen in die Knochenmarksversorgung ein. Sie vermindern die Bindungsaffinität der Tumorzellen an die Stromazellen des Knochenmarks, lösen Caspase-8-vermittelte Apoptose in Myelomzellen aus und fungieren als Angiogenesehemmer. Während Lenalidomid (**2c**) eine höhere Wirksamkeit und ein besseres Nebenwirkungsprofil als Thalidomid (**2a**) besitzt, kommt Pomalidomid (**2b**) bei Resistenzen gegen Lenalidomid (**2c**) zum Einsatz.^[25]

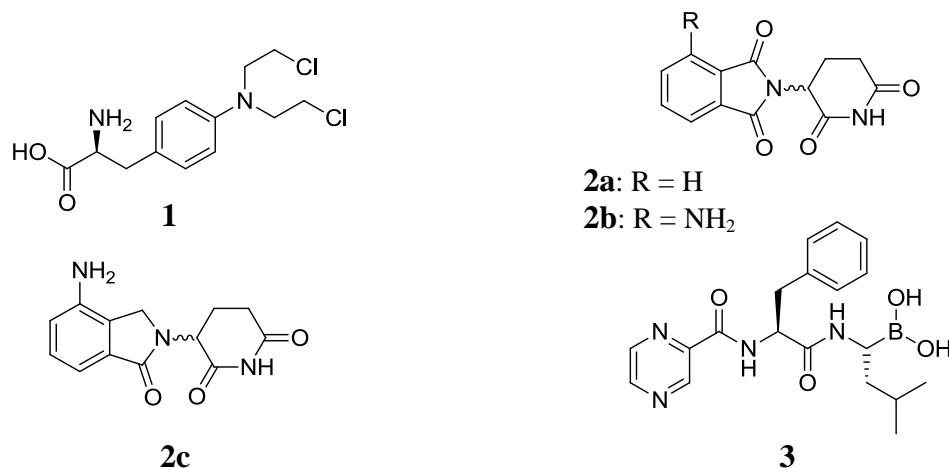


Abbildung 3: Die Strukturen der zur Behandlung des Multiplen Myeloms eingesetzten Wirkstoffe Melphalan (**1**), Thalidomid (**2a**), Pomalidomid (**2b**), Lenalidomid (**2c**) und Bortezomib (**3**).

Nachdem der Einfluss des Proteasoms auf den für Myelomzellen essenziellen NF κ B-Signalweg bekannt wurde, folgte die Entwicklung von Proteasominhibitoren. Bortezomib (**3**) wurde als erste Vertreter seiner Klasse im Jahr 2003 für die Behandlung von MM zugelassen.^[19, 26]

In der klinischen Therapie kommen heute vielfach Wirkstoffkombinationen zum Einsatz. Neben Bortezomib-Dexamethason, Lenalidomid-Dexamethason und Thalidomid-Dexamethason werden auch Kombinationen von drei Wirkstoffen wie Thalidomid-Bortezomib-Dexamethason oder Lenalidomid-Bortezomib-Dexamethason verwendet. Die Fortschritte durch die Verwendung von Bortezomib und die immunmodulierenden Wirkstoffe haben zu einem verbesserten Ansprechen der Therapie bei Erkrankten und zu einer verlängerten Überlebensdauer geführt. Sie liegt im Mittel heute bei etwa fünf Jahren.^[25]

Trotz der jüngsten Fortschritte bei der Behandlung des MM zeichnet sich der typische klinische Verlauf durch ein gutes initiales Ansprechen der Behandlung aus, dem jedoch bei nahezu allen Patienten ein Rezidiv und häufig eine Resistenzbildung gegenüber gegenwärtigen Therapien folgt. Zehn Jahre nach Diagnose sind lediglich noch 10% der Patienten am Leben.^[27] Subgruppen von Patienten sprechen darüber hinaus auf keine der bekannten Behandlungsmethoden an. Toxische Nebenwirkungen, wie beispielsweise periphere Neuropathie, begleiten die aktuellen Therapien.^[25]

Im Gegensatz zur beschriebenen Situation bei CML (siehe oben), zu dessen Behandlung die Inhibition eines einzigen Signalwegs ausreicht, handelt es sich bei MM um eine heterogene Erkrankung. Die Pathogenese kann auf die Aktivierung verschiedener maligner Signalwege

zurückgeführt werden. Hierzu zählen der PI3K/Akt-, JAK/Stat-, NFκB-, Wnt- und der Raf/MEK/MAPK-Signalweg. Sie steuern die Zell-Proliferation, das Überleben, die Migration sowie die Entwicklung von Wirkstoffresistenzen der Krebszellen.^[28] Für einen erfolgreichen Therapieansatz müssen daher mehrere Signalwege gleichzeitig inhibiert werden. Dieses Konzept, das auch als Multi-Target-Strategie bekannt ist, lässt sich entweder durch Kombination mehrerer spezifischer Wirkstoffe erreichen oder durch die Applikation eines Wirkstoffs, der an einer für die Aufrechterhaltung mehrere onkogener Signalwege kritischen Stelle ansetzt.^[29] Von derartiger zentraler Bedeutung für die Signalwege des MMs haben sich „Heat Shock“-Proteine (HSPs) erwiesen, die damit ein attraktives therapeutisches Target für die Entwicklung neuartiger Wirkstoffe darstellen.^[30, 31]

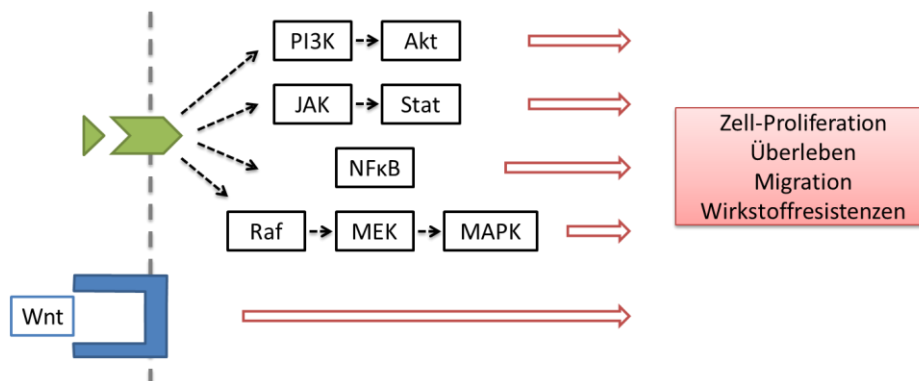


Abbildung 4: Bei MM handelt es sich um eine heterogene Erkrankung, die durch Entartung mehrerer Signalwege gekennzeichnet ist. Abbildung erstellt in Anlehnung an Lit. [28].

1.2 Das „Heat Shock“-System als innovatives Drug-Target

Als molekulare Chaperone nehmen HSPs bei der Proteinbiosynthese und der Rekonstruktion degenerierter Proteinen eine zentrale Rolle ein.^[32] Um ihre funktionale Aktivität zu erhalten, müssen die in den Ribosomen als lineare Peptidstränge synthetisierten Proteine eine wohldefinierte dreidimensionale Struktur einnehmen. Während dieses Prozesses verhindern HSPs Fehlfaltungen und Aggregationen, die bei einem zytosolischen Proteinlevel von 300–400 g/L unvermeidbar wären. Obwohl sich die exakte Funktionsweise der verschiedenen Chaperone voneinander unterscheidet, teilen alle das grundlegende Prinzip der Erkennung hydrophober Reste sowie freiliegender Regionen des Proteinbackbones und der Bereitstellung einer abgeschirmten Umgebung. Neu synthetisierte Peptidstränge, aber

auch Proteine, bei denen es zu einer zellulär stressbedingten Auflösung der Proteinstruktur gekommen ist, können hier ihre korrekte Faltung einnehmen.^[33]

Während HSPs unter normalen Bedingungen lediglich vorübergehend bei zellulärem Stress durch „Heat Shock“-Faktoren (HSF) induziert werden, liegen HSPs bei Krebszellen häufig konstitutiv überexprimiert vor.^[34] Dies konnte beispielsweise für HSP90 in MM-Zellen gezeigt werden.^[30] Als Ursache für diese Beobachtungen hat sich die Hypothese der Chaperon-Abhängigkeit von Krebszellen etabliert. Schlüsselemente in der Entwicklung der Tumore sind genetische Mutationen und eine erhöhte Proteinexpression. Sowohl der erhöhte Proteinlevel als auch die immanente Instabilität der mutierten Proteine führen zu einem erhöhten Bedarf an HSPs in Krebszellen.

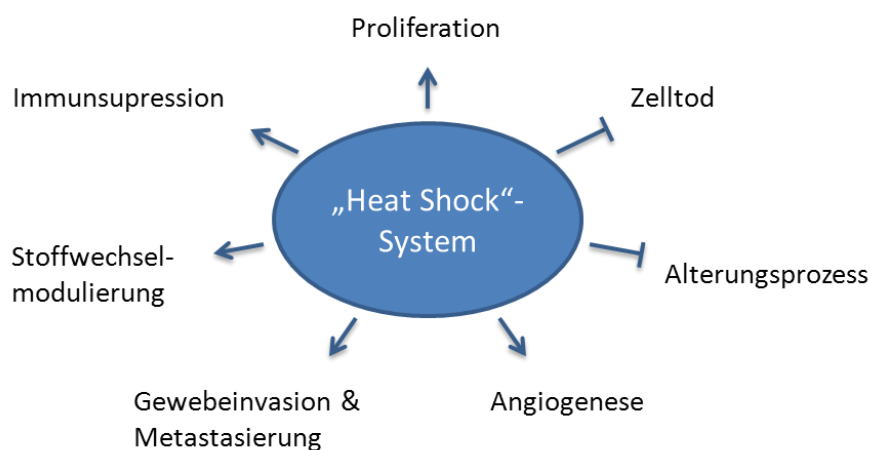


Abbildung 5: Das „Heat Shock“-System ist in zahlreichen Prozessen der Tumorgenese involviert. Abbildung erstellt in Anlehnung an Lit. [35].

Das „Heat Shock“-System ist darüber hinaus bei nahezu allen zentralen Prozessen involviert, die als Merkmale von Krebserkrankungen gelten. Hierzu zählen die Aufrechterhaltung der kontinuierlichen Proliferation, die Inhibition des programmierten Zelltods, die Verhinderung eines replikativ bedingten Alterungsprozesses, die Förderung der Angiogenese, die Gewebeinvasion und Metastasierung, die Modulierung des energetischen Stoffwechsels sowie die Immunsuppression (Abb. 5).^[35]

Als potenzielles Target zur Behandlung von Krebserkrankungen hatte sich daher zunächst das in diese Prozesse häufig involvierte HSP90 etabliert. Es folgte die Entwicklung verschiedener HSP90-Inhibitoren, wie beispielsweise die Geldanamycinderivate 17-AAG (**4a**) und 17-DMAG (**4b**) oder das Isoxazol NVP-AUY922 (**5**), die gleichzeitig multiple

onkogene Signalwege blockieren (Abb. 6).^[36, 37] Während sich Inhibitoren des HSP90 in präklinischen MM-Studien als erfolgreich herausstellten,^[30, 38-41] zeigten sie in der klinischen Therapie nur begrenzte Wirksamkeit.^[42] Vielmehr wurde beobachtet, dass eine Inhibition von HSP90 zu einer starken und schnellen HSF-1-vermittelten Hochregulation der HSP70-Expression führt. Die Hypothese, dass das hochregulierte HSP70 die Inhibition von HSP90 kompensiert und so zu einer Abschwächung der Antitumoraktivität führt, wurde experimentell bestätigt.^[43] So wiesen MM-Zellen, in denen entweder HSF-1 oder HSP70 genetisch deaktiviert wurde, eine erhöhte Sensitivität gegenüber HSP90-Inhibitoren auf.^[44, 45] Heute wird daher davon ausgegangen, dass eine duale Hemmung von HSP90 und des HSF-1/HSP70-Systems essenziell für eine wirksame Behandlung des Multiplen Myeloms ist.

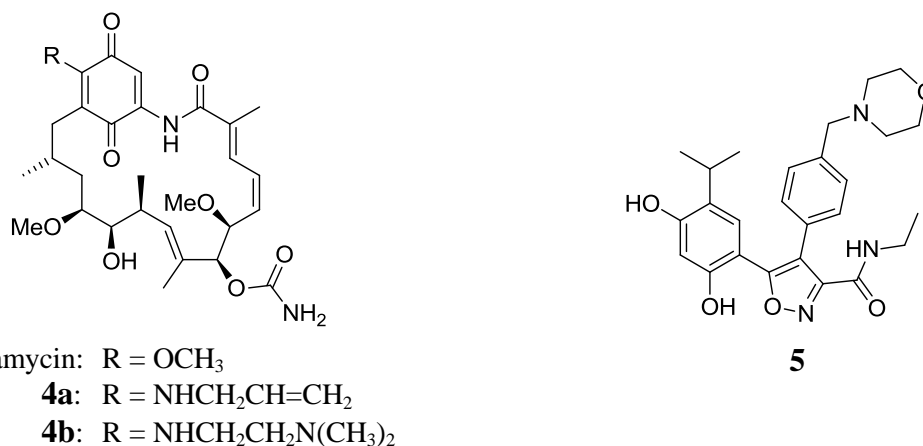


Abbildung 6: Die HSP90-Inhibitoren 17-AAG (**4a**), 17-DMAG (**4b**) und NVP-AUY922 (**5**) wurden in klinischen Studien als Wirkstoffe zur Behandlung von Krebserkrankungen untersucht.

Inhibition des HSF-1-Signalwegs: Als Haupttranskriptionsfaktor reguliert HSF-1 die Expression von „Heat Shock“-Proteinen in einem mehrstufigen Prozess (Abb. 7). Im stressfreien Grundzustand der Zelle liegt HSF-1 als inaktives Monomer in einem HSP-Komplex u.a. mit HSP70 vor. Besteht für die Stabilisierung und Faltung neu synthetisierter oder degenerierter Proteine ein erhöhter Bedarf an HSPs, wird HSF-1 aus diesem Komplex freigesetzt. Während so bereits die zuvor gebundenen HSPs für diese Aufgabe bereitstehen, wird über den sogenannten HSF-1-Signalweg die Expression weiterer HSPs induziert. Das durch Trimerisierung und Phosphorylierung aktivierte HSF-1 transloziert in den Zellkern, wo es an „Heat Shock“-Elemente (HSE) der Promotersequenz innerhalb der HSP-Gene bindet. Durch die Rekrutierung von Co-Regulatoren wie der RNA-Polymerase und des „positiven Transkription Elongationsfaktors b“ (p-TEFb) wird die Transkription der HSP-DNA in die

entsprechende RNA eingeleitet. Im darauf folgenden Translationsprozess werden schließlich die benötigten HSPs exprimiert und somit für die Stabilisierung von Klienten-Proteinen bereitgestellt.^[46, 47]

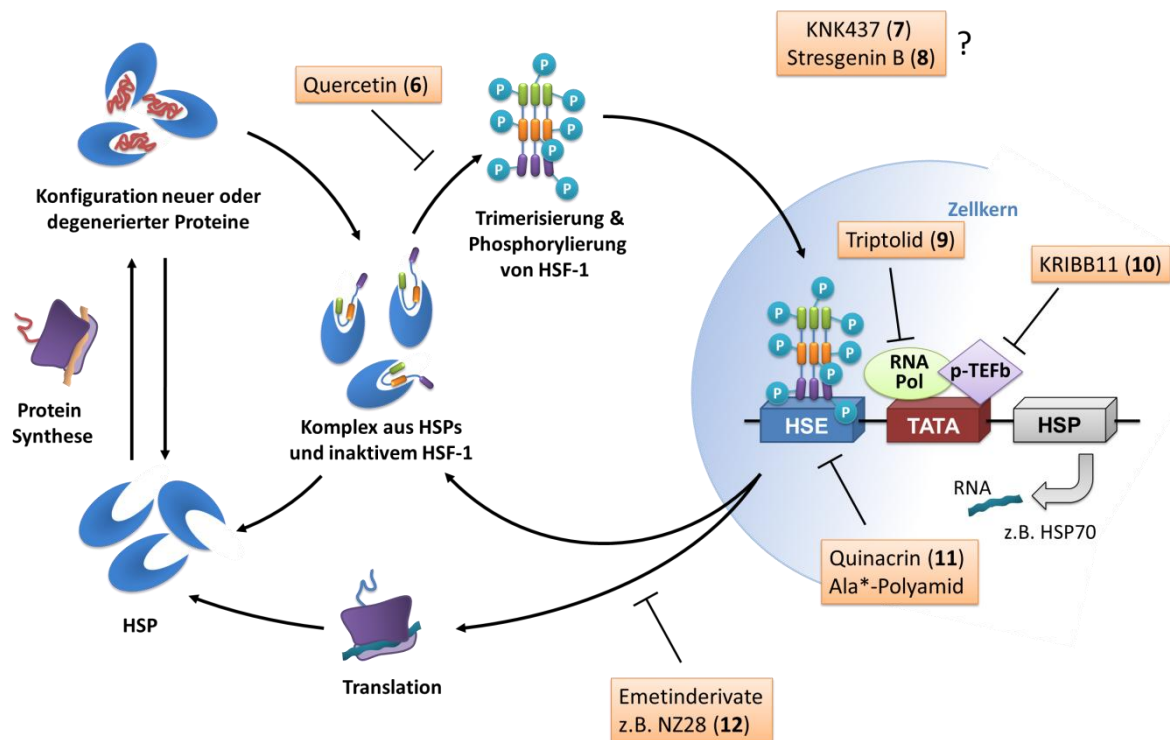


Abbildung 7: Schematische Darstellung der HSF-1 vermittelten HSP Expression und der Interaktionsstellen verschiedener Inhibitoren des HSF-1-Signalwegs. Abbildung erstellt in Anlehnung an Lit. [46] und Lit. [48].

Während bisher keine direkten Inhibitoren des HSF-1-Proteins bekannt sind, wurden in den vergangenen Jahren einige Verbindungen identifiziert, die an verschiedenen Stellen in den HSF-1-Signalweg eingreifen (Abb. 7, 8).^[46, 47] Das Flavonoid Quercetin (6) inhibiert *in vitro* zwar wirksam die Resonanz des „Heat Shock“-Systems, allerdings wird als Wirkort eine Proteinkinase vermutet, die für die initiale HSF-1-Aktivierung benötigt wird. Bei der benötigten Konzentration an Quercetin werden daneben eine Reihe weiterer Proteinkinasen inhibiert, was zu zahlreichen Nebenwirkungen führt und als Argument gegen eine spezifische Interaktion mit dem HSF-1-Signalweg angeführt wird.^[49] Eine Inhibition der HSP-Expression wurde auch für das Benzylidenlactam KNK437 (7) und Stresgenin B (8) beschrieben, wobei 7 allerdings eine sehr geringe Wirksamkeit besitzt und der molekulare Wirkmechanismus beider Verbindungen unbekannt ist. Triptolid (9) hingegen, das aus *Tripterygium wilfordii* isoliert wurde, wirkt bereits im niedrigen nanomolaren Bereich und gilt damit als potentester Inhibitor des HSF-1-Signalwegs. Als Mechanismus wurde die Inhibition des RNA-Polymerase-abhängigen Transkriptionsprozesses identifiziert.^[50, 51]

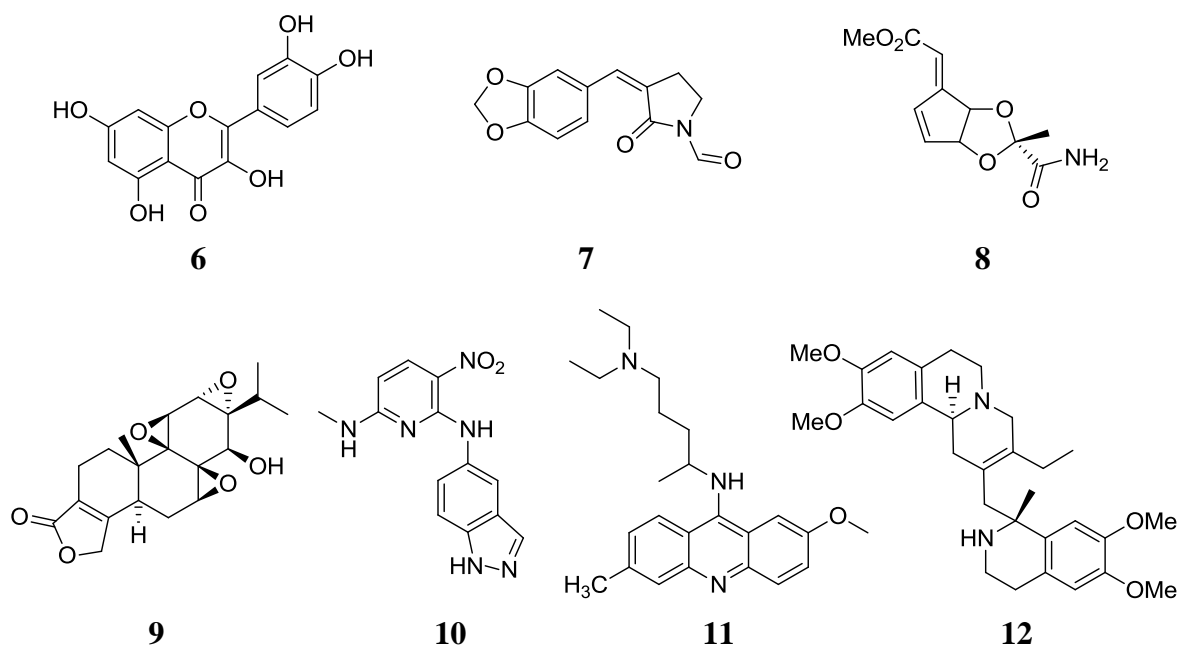


Abbildung 8: Die literaturbekannten Inhibitoren des HSF-1-Signalwegs: Quercetin (**6**), KNK437 (**7**), Stresgenin B (**8**), Triptolid (**9**), KRIBB11 (**10**), Quinacrin (**11**) und NZ28 (**12**).

Bei einem Datenbankscreening synthetischer Verbindungen wurde kürzlich das Indazolderivat KRIBB11 (**10**) als Inhibitor des HSF-1-Signalwegs gefunden. Als Mechanismus wurde das Eingreifen in die Anlagerung des Co-Regulators p-TEFb an die HSP70-Promoterregion identifiziert. Mit Konzentrationen im Bereich von 10–20 μM besitzt **10** jedoch eine relativ geringe Wirksamkeit.^[52] Auch für den Antimalaria-Wirkstoff Quinacrin (**11**) wurde die Inhibition der HSP70-Induktion berichtet. Im HSF-1-Signalweg wird eine Interaktion im Transkriptionsprozess postuliert, was sich mit den bekannten DNA-interkalierenden Eigenschaften von **11** aus dem Wirkmechanismus bei Malaria deckt.^[47] Mit dem Nebenwirkungspotential eines genotoxischen Wirkstoffes erscheint **11** damit jedoch als suboptimale Leitstruktur für die Entwicklungen spezifischer Inhibitoren.^[53]

Erst kürzlich wurde ein β -Alaninreiches Polyamid vorgestellt, das durch Blockierung von HSEs der HSP70-Promoterregion die Bindung von HSF-1 verhindert. Eine Inhibition der HSP70-Induktion konnte in Zellen jedoch nicht erreicht werden, was auf ein geringes Penetrationsvermögen des Peptids in die Zelle und/oder den Zellkern zurückgeführt wird.^[54] Aus einem weiteren Screening von 20.000 Verbindungen diversen Ursprungs ging das Emetinderivat NZ28 (**12**) als Inhibitor der HSP70-Induktion hervor. NZ28 zeigt bei niedriger mikromolarer Aktivität und geringer akuter Toxizität eine starke Sensitivierung von Myelomzellen gegen Proteasom- und HSP90-Inhibitoren. Durch Untersuchung des

Mechanismus konnte eine relativ spezifische Wirkung auf die Translation von HSP70 gezeigt werden. Eine unspezifische Inhibition des Translationsprozesses erscheint hingegen unwahrscheinlich, da die Induktion zweier unabhängiger Reporterproteine nicht inhibiert wurde. Das Emetinderivat **12** stellt damit eine vielversprechende Grundstruktur für weitere Entwicklungen von Inhibitoren des HSF-1-Signalwegs dar.^[49]

Inhibition von HSP70: Neben der Inhibition des HSF-1-Signalwegs eignet sich auch die direkte Inhibition von HSP70, um dessen induzierte Expression nach HSP90-Inhibition zu kompensieren.^[43, 45] Während zur Familie der humanen HSP70-Proteine acht Mitglieder zählen, die sich in ihrer exakten Peptidsequenz, ihrem Expressionslevel und ihrem zellulären Aufenthaltsort unterscheiden, stellen HSP72 und HSP73 die bedeutendsten zytosolischen Isoformen dar. Das induzierbare HSP72 liegt unter normalen Bedingungen nur in geringen Mengen vor, wird aber bei zellulärem Stress sehr stark exprimiert. Dahingegen ist HSP73, das auch als HSC70 bezeichnet wird, auch in tumorfreiem Gewebe konstitutiv exprimiert.^[55] Strukturell bestehen alle HSP70-Isoformen aus zwei Regionen mit unterschiedlicher Funktionalität. Während der ATP-Umsatz an der *N*-terminalen Nukleotidbindedomäne (NBD) stattfindet, läuft der Faltungsprozess von Klientenproteinen an der *C*-terminalen Substratbindedomäne (SBD) ab. NBD und SBD sind dabei über eine kurze Peptidsequenz verknüpft, die als Interdomän-Linker bezeichnet wird (Abb. 9). Die NBD lässt sich weiter in zwei Seitenflügel unterteilen, die eine Klemmen-ähnliche Struktur bilden. Durch Röntgenstrukturanalysen konnte die ATP-Bindestelle am Boden der gebildeten Spalte lokalisiert werden. Die SBD wird aus einer β -Faltblattstruktur gebildet, an der eine α -helikale Subdomäne befestigt ist und die ähnlich einem Deckel fungiert.^[55]

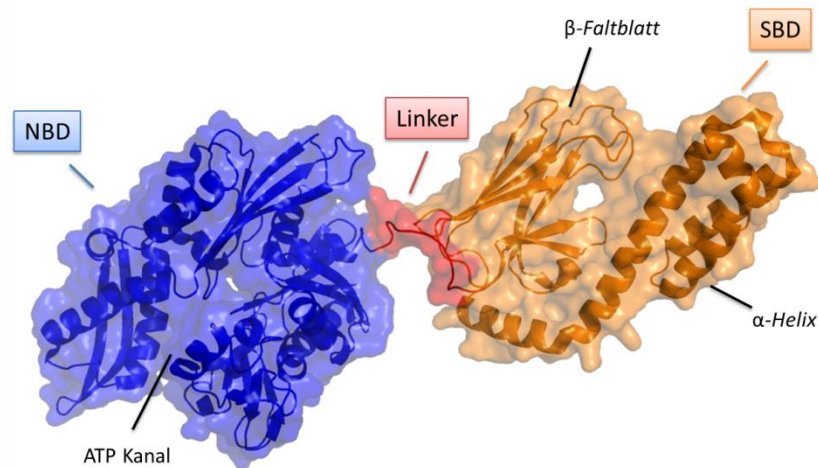


Abbildung 9: HSP70 besteht aus einer Nukleotidbindedomäne und einer Substratbindedomäne, die durch den sog. Interdomän-Linker verknüpft sind. Die Darstellung beruht auf der Kristallstruktur des HSP70-Analoga aus *E. coli* (pdb 2KHO).^[56]

Die zyklische Chaperonaktivität von HSP70 wird maßgeblich durch die Wechselwirkung von ATP und ADP mit der NBD bestimmt. Im ATP-gebundenen Zustand befindet sich der α -helikale Deckel der SBD in einem offenen Zustand, sodass der Austausch von Klientenproteinen möglich ist (Abb. 10, A). Mit der Hydrolyse von ATP zu ADP wird Energie für eine konformelle Änderung der SBD bereitgestellt, die zur Schließung des Deckels und damit zu einer erhöhten Bindungsaffinität des Substrats führt (Abb. 10, B). Nach dem Faltungsprozess muss für die Freisetzung des Substrats abschließend ADP eliminiert und ATP erneut gebunden werden (Abb. 10, C). Ursächlich für die konformellen Änderungen während des ATP-Umsatzes scheint eine allosterische Kommunikation zwischen NBD und SBD zu sein, in die der Interdomänlinker involviert ist.^[55, 57]

In den Chaperonzyklus integriert sind Wechselwirkungen von HSP70 mit verschiedenen Co-Chaperonen, die sich in drei Gruppen einteilen lassen. Durch Interaktionen mit der NBD von HSP70 beschleunigen HSP40-Proteine den ATP-Umsatz um nahezu eine Größenordnung, womit die ADP-Freisetzung zum geschwindigkeitsbestimmenden Schritt wird. Die Eliminierung von ADP wird durch NEFs (*engl.* nucleotid exchange factors) begünstigt, die ebenfalls an die NBD von HSP70 binden. Zusammen katalysieren HSP40 und NEFs so die ATPase-Aktivität von HSP70, die sich direkt auf die Substratbindung auswirkt. Die dritte Klasse, die TPR-Domänen Co-Chaperone (*engl.* tetratricopeptid repeat), bindet an die in der SBD von HSP70-enthaltene EEVD-Peptidsequenz. Durch die gleichzeitige Interaktion mit einem weiteren EEVD-Motiv, das sich auch in anderen HSPs befindet, wird die Anordnung

von Multi-Chaperonkomplexen initiiert und so der Substrataustausch z.B. zwischen HSP70 und HSP90 realisiert (Abb. 10).^[58, 59]

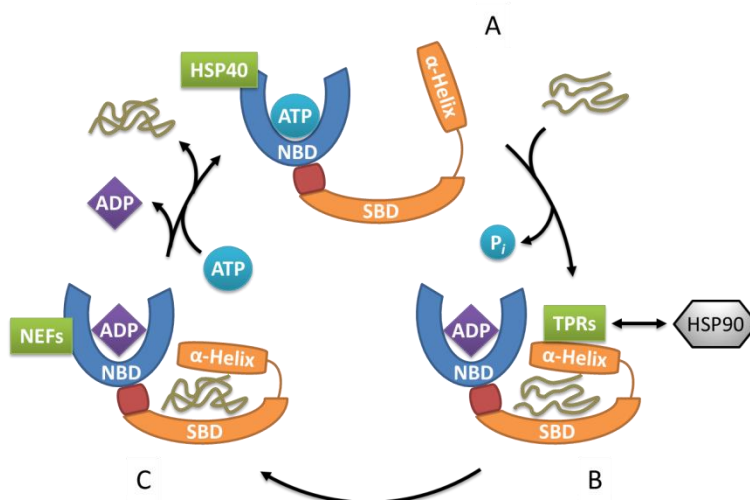


Abbildung 10: Schematische Darstellung des Chaperonzyklus von HSP70. Abbildung erstellt in Anlehnung an Lit. [55].

Die in den vergangenen Jahren identifizierten pharmakologischen Inhibitoren von HSP70 lassen sich nach der Protein-Domäne gruppieren, mit der sie interagieren (Abb. 11, 12). Bei der ersten Verbindung, für die eine Inhibition der ATPase-Aktivität von HSP70 berichtet wurde, handelt es sich um NSC 630668 (**13**), das aus einem Screening des National-Cancer-Instituts hervorging. Obwohl die exakte Bindestelle von **13** an HSP70 bis heute nicht bekannt ist, geht man davon aus, dass der Aktivität eine Interaktion mit der NBD-Region zu Grunde liegt.^[60] Die in Anlehnung an **13** untersuchten funktionalisierte Dihydropyrimidine zeigten eine divergente pharmakologische Wirkung auf die HSP70-Aktivität. Während MAL3-101 (**14**) eine HSP40-abhängige Inhibition der ATP-Hydrolyse zeigte und so die NBD als Bindestelle vermutet wird, verstärken strukturell sehr ähnliche Derivate den ATP-Umsatz. Die Analyse von etwa 30 analogen Substanzen, die mit 75–300 μM nur relativ schwach wirksam waren, konnte keine klaren Struktur-Wirkungsbeziehungen offenbaren.^[59] Die Bindestelle von Sulfoglykolipiden wie adaSGC (**15**) wurde mit Hilfe von Peptidmodifikationen an der NBD lokalisiert. Mit einem IC_{50} von 50 μM inhibiert **15** die ATPase-Aktivität von HSP70 in nichtkompetitiver Weise, wenngleich eine Spezifität für HSP70 nicht gezeigt wurde.^[59] Auch das Rhodacyaninderivat MKT-077 (**16**) bindet an der NBD von HSP70 und konnte *in vitro* die Proliferation von verschiedenen Krebszellen inhibieren. In klinischen Studien zeigte sich jedoch, dass eine therapeutische Dosis aufgrund der geringen Bioverfügbarkeit nicht erreicht werden konnte und Nieren-toxische Effekte auftraten.^[58, 59]

Für Apoptozol (**17**), das als potenteste Verbindung aus einem Screening von Imidazolderivaten hervorging, ist die Induktion von Apoptose in embryonalen Karzinomzellen berichtet. Als Grundlage dafür wird die mittels Oberflächenplasmonresonanzspektroskopie gezeigte Wechselwirkung mit humanem HSP72 und HSP73 vermutet.^[61] Die Ergebnisse einer molekularen Modelling-Untersuchung legen eine Interaktion mit der ATP-Bindestelle der NBD nahe.^[58] Aufgrund der sehr hohen Lipophilie ($\text{clogP} = 7.5$) und einem molekularen Gewicht von über 600 g/mol wird jedoch auch eine mögliche unspezifische Proteinwechselwirkung diskutiert.^[55]

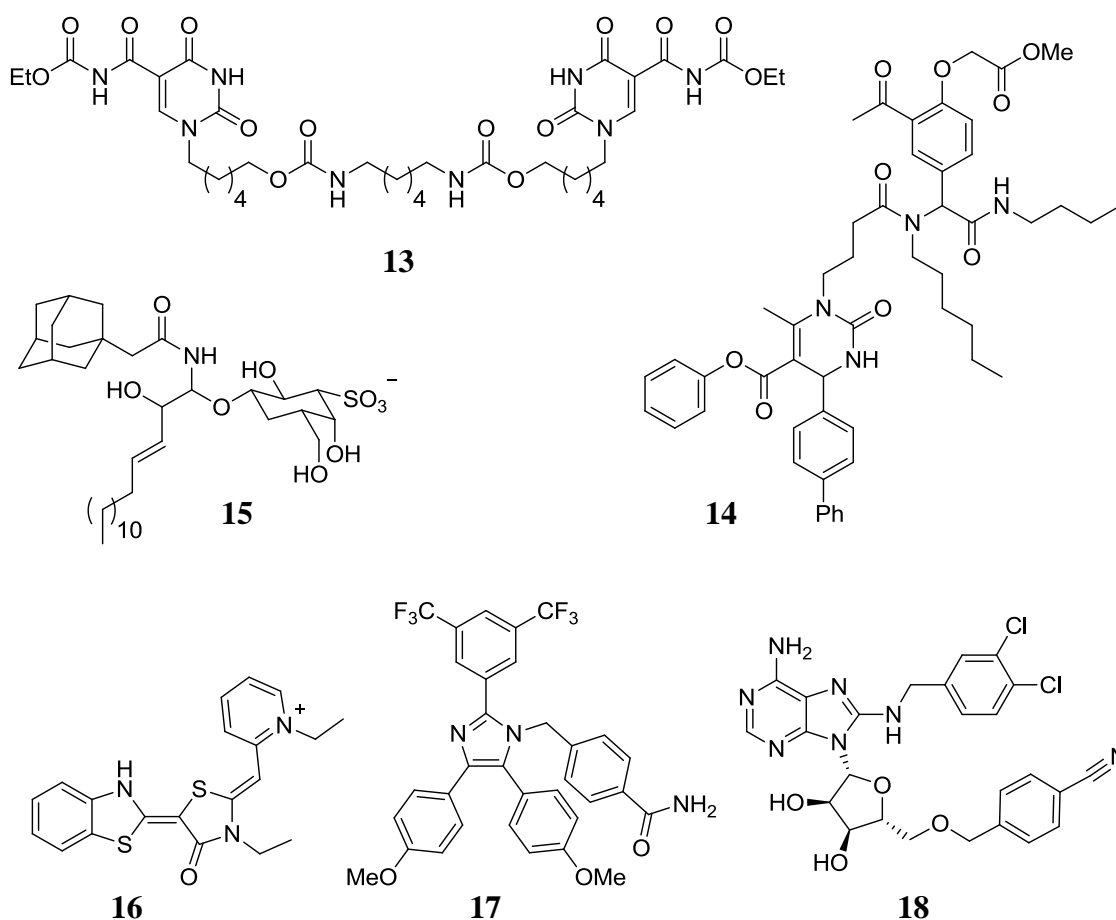
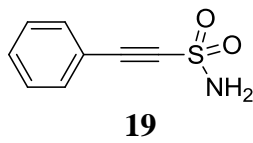


Abbildung 11: Die Inhibitoren NSC 630668 (**13**), MAL3-101 (**14**), adaSGC (**15**), MKT-077 (**16**), Apoptozol (**17**) und Ver-15508 (**18**) interagieren mit der NBD-Region von HSP70.

Die Inhibition der ATP-Bindestasche von HSP70 wurde auch mit Adenosinderivaten untersucht, die auf Grundlage von strukturbasiertem Design entwickelt wurden. Mit Ver-15508 (**18**) wurde dabei eine Verbindung gefunden, die sowohl den ATP-Umsatz als auch die Chaperonaktivität, die am Rückfältungsvermögen von degenerierter Luciferase

gemessen wurde, inhibiert.^[62] Bei *In-vivo*-Untersuchungen zeigte sich jedoch, dass **18** einem schnellen Metabolismus und Ausscheidungsprozess unterliegt, sodass pharmakologisch wirksame Konzentrationen nicht erreicht werden konnten.^[63] Grund dafür könnte die anomere Bindung zwischen Zucker- und Baseneinheit sein, die zu geringerer metabolischer Stabilität tendiert. Die vergleichbare Aktivität von **18** an anderen HSPs wie GRP78 offenbart zudem eine geringe Selektivität, die grundsätzlich zweifeln lässt, ob die sehr konservierte ATP-Tasche, die sich in einer Vielzahl unterschiedlicher Proteinen findet, für die Entwicklung von HSP70-Inhibitoren geeignet ist.^[55, 64]

Zu den Inhibitoren von HSP70, die mit der SBD-Region interagieren, zählt 2-PES (**19**). Der molekulare Wirkmechanismus beruht dabei auf der Störung der Interaktion von HSP70 mit seinen Co-Chaperonen. Allerdings sind für **19** auch eine Reihe weiterer biologischer Effekte, wie die Interaktion mit dem Tumorsuppressor-Protein p53 oder dem mitochondrialen Apoptose-Signalweg, beschrieben. Grund für diese Beobachtungen könnte die EWG-substituierte Dreifachbindung und die geringe Größe von **19** sein, womit die Interaktion als Michael-Akzeptor bei Reaktionen mit Thiolresten verschiedener Proteine denkbar ist.^[55] Daneben sind verschiedene Peptide beschrieben, die aufgrund ihrer Wechselwirkung mit der SBD-Region die HSP70-Aktivität inhibieren. So hemmt Pyrrhocoricin (**20**) den ATP-Umsatz, was auf eine Interaktion zurückgeführt, die den α -helikalen Deckel der SBD im geschlossenen Zustand hält und so die Substratfreisetzung blockiert.^[59] Basierend auf der Erkenntnis, dass zu den HSP70-Clients auch der Apoptose induzierende Faktor (AIF) zählt, wurde das Peptide ADD70 (**21**), das auf ausgewählten Abschnitten der Aminosäuresequenz von AIF beruht, als Inhibitor der Substratbindetasche entwickelt. Bei *In-vitro* und *In-vivo*-Untersuchungen konnte so eine Sensitivierung von Krebszellen gegenüber der Behandlung mit Cisplatin erreicht werden.^[65] Daneben lieferte ein Screening einer Peptidaptamer-Bibliothek die Sequenz aus acht Aminosäuren A8 (**22**), die an die SBD-Region von HSP70 bindet und dessen Chaperonaktivität inhibiert.^[58] Allerdings räumen die Autoren abschließend ein, dass derartige Peptide aufgrund ihrer geringen Größe und hohen Polarität wahrscheinlich nur eine geringe Bioverfügbarkeit besitzen, da sie dem Blutkreislauf durch renale Ausscheidung schnell entzogen werden dürften.^[66] Darüber hinaus unterliegen kurze lineare Aminosäuresequenzen häufig einem schnellen Abbau durch unspezifische Peptidasen, was deren Halbwertszeit unter physiologischen Bedingungen stark begrenzen dürfte.



Peptid	Aminosäuresequenz
20	VDKGSYLPRPTPPRPIYNRN
21	AIF-Sequenz gekürzt um Δ1-100, Δ367-466 und Δ567-609
22	SPWPRPTY

Abbildung 12: Die Inhibitoren 2-PES (**19**) sowie die Peptide Pyrrhocoricin (**20**), ADD70 (**21**) und Aptamer A8 (**22**) wechselwirken mit der SBD-Region von HSP70.

Obwohl durch die bisherigen Ansätze zur Entwicklung von Inhibitoren von HSF-1 und HSP70 zahlreiche neue Erkenntnisse bezüglich deren biomolekularer Eigenschaften gewonnen wurden, mangelt es jedoch weiterhin an klinisch relevanten Inhibitoren. Das enorme therapeutische Potenzial einer dualen Hemmung von HSP90 und des HSF-1/HSP70-Systems, das genetische Knockdown-Experimente bereits gezeigt haben, lässt weitere Forschungen auf diesem relativ jungen Gebiet äußerst lohnenswert erscheinen.^[55]

2 Zielsetzung

Das HSF-1/HSP70-System hat sich in den vergangenen Jahren zu einem vielversprechenden molekularen Zielsystem in der Krebsforschung entwickelt. So konnte dessen pathogene Rolle bei der Erkrankung am Multiplen Myelom gezeigt werden.^[67] In präklinischen und klinischen Studien zur Behandlung von MM mit HSP90-Inhibitoren zeigte sich zudem eine erhöhte HSF-1-vermittelte Expression von HSP70, was als Grund für die Abschwächung des Antitumoreffekts betrachtet wird.^[43, 68] In Einklang damit konnte kürzlich gezeigt werden, dass eine entsprechende genetische Deaktivierung (RNA-Silencing) von entweder HSF-1 oder HSP70 zu einer erhöhten Sensitivität von MM-Zellen gegenüber HSP90-Inhibitoren führt.^[45] Pharmakologische Inhibitoren des HSF-1-Signalwegs und von HSP70 werden daher als vielversprechende Therapeutika bei der Behandlung von MM betrachtet. Allerdings fehlen bis dato klinisch relevante Wirkstoffe, die den HSF-1-Signalweg oder HSP70 wirksam inhibieren können.

Unter den bekannten Inhibitoren des HSF-1-Signalwegs stellt das Emetinderivat NZ28 (**12**) die vielversprechendste Grundstruktur für weitere Entwicklungen dar (vgl. Kapitel 1.2). Strukturell setzt sich **12** aus einem trizyklischen Ringsystem mit einem daran geknüpften Tetrahydroisochinolinsubstituenten zusammen. Da formal auch der Trizyklus selbst ein Tetrahydroisochinolingerüst enthält, wurde in Vorarbeiten untersucht, in wieweit die Inhibition des HSF-1-Signalwegs auf dieses Strukturmotiv zurückzuführen ist.^[69] Dabei zeigte sich, dass die Isochinolin-Derivate **23a** und **23b**^[70] die HSF-1 vermittelte Expression von HSP70 bei einer Konzentration von 100 μM zu inhibieren vermochten. Um zu untersuchen, ob Tetrahydroisochinoline eine Leitstruktur für die Entwicklung von HSF-1-Inhibitoren darstellt und durch Variation des Substitutionsmusters eine Steigerung der HSF-1-Aktivität zu erzielen ist, sollten im Rahmen dieser Arbeit verschiedene phenylsubstituierte Tetrahydroisochinolin-Derivate mit Hilfe einer sequentiellen Ugi-Heck-Reaktion hergestellt werden.

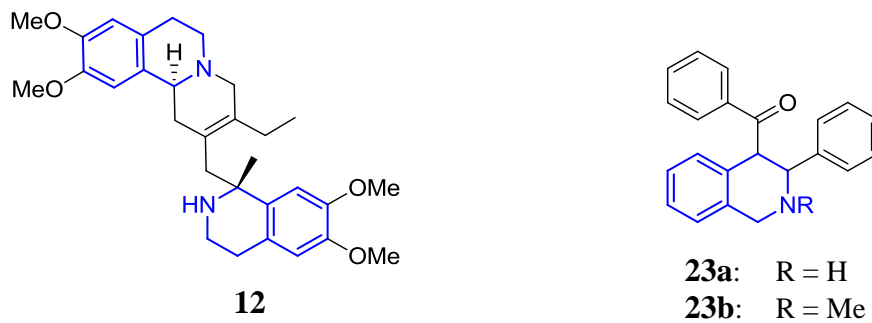


Abbildung 13: Wie das Emetinderivat NZ28 (**12**) vermögen auch die Tetrahydroisochinolin-Derivate **23a** und **23b** die HSF-1 vermittelte Expression von HSP70 zu inhibieren.

Daneben stand die Entwicklung von HSP70-Inhibitoren im Fokus dieser Arbeit. Ausgangspunkt dafür war das Ergebnis eines virtuellen Screenings, das in der kooperierenden Arbeitsgruppe Sottriffer durchgeführt wurde. Im Gegensatz zu den bisher bekannten HSP70-Inhibitoren, die entweder mit der SBD- oder NBD-Region interagieren, wurde dabei nach Wirkstoffmolekülen gesucht, die mit dem Interdomänen-Interface wechselwirken. Bei der aktivsten Verbindung dieses Screenings handelte es sich um das Tetrahydroisochinolinon-Derivat **24a**, das an MM-Zellen in mikromolarer Konzentration wirksam war (Abb. 14).

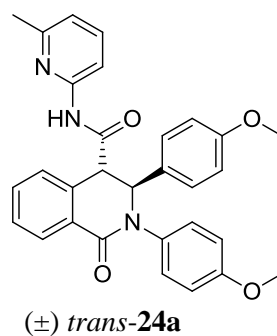


Abbildung 14: Strukturelle Modifikationen des virtuellen Screening-Hits sollten wesentliche Strukturelemente offenbaren und das Ableiten von Struktur-Wirkungsbeziehungen ermöglichen.

Daher sollte eine Syntheseroute zum virtuellen Screening-Hit etabliert werden, die sich gut für die Erstellung einer Bibliothek analoger Derivate eignet. Auf Basis systematischer Variationen sollten Struktur-Wirkungsbeziehungen abgeleitet werden und so die für die Bioaktivität wesentlichen Strukturelemente ermittelt werden.

3 Ansätze zur Entwicklung von HSF-1-Inhibitoren

Nachdem gezeigt werden konnte, dass hochreguliertes HSP70 maßgeblich in die Abschwächung des Anti-Tumoreffekts bei der Behandlung von MM mit HSP90-Inhibitoren involviert ist, wird eine duale Hemmung beider „Heat-Shock“-Proteine als vielversprechender Therapieansatz gehandelt.^[43] Aufgrund seiner Funktion als Transkriptionsfaktor für die HSP70-Expression wird in diesem Zusammenhang auch HSF-1 als potenzielles Ziel für eine pharmakologische Intervention betrachtet.^[44] Um zu untersuchen, in wieweit das in NZ28 (**12**) sowie in **23a** und **23b** enthaltene Tetrahydroisochinolin-Gerüst als Leitstruktur für neuartige Inhibitoren des HSF-1-Signalwegs dienen kann, sollte eine Serie unterschiedlich substituierter Tetrahydroisochinolin-Derivate hergestellt werden.

Neben der klassischen Pictet-Spengler-Reaktion,^[71] die in der Regel auf aktivierte Aromaten angewiesen ist und nur wenige Möglichkeiten für das Einfügen von Substituenten bietet, sind heute flexiblere Methoden für die Synthese von Tetrahydroisochinolinolen verfügbar. So lassen sich nach einer von Zhu *et al.* beschriebenen 3-Komponenten-Reaktion Tetrahydroisochinoline synthetisieren, die in Position 1 und 2 des Piperidinrings je nach verwendeten Edukten unterschiedlich substituiert sind (Abb. 15, Typ A).^[72] Eine ebenso flexible Methode stellt die zweistufige Ugi-Heck-Reaktion dar.^[73] Da die Produkte dieser Synthese darüber hinaus die Möglichkeit bieten, den Einfluss von drei unterschiedlichen Substituenten auf die Bioaktivität zu untersuchen, wurde diese Synthesemethode für die Herstellung einer ersten Serie von Tetrahydroisochinolinonen gewählt (Abb. 15, Typ B).

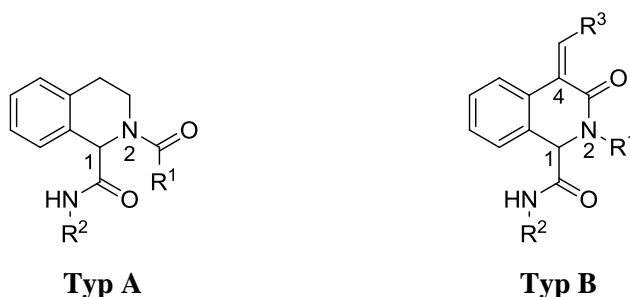
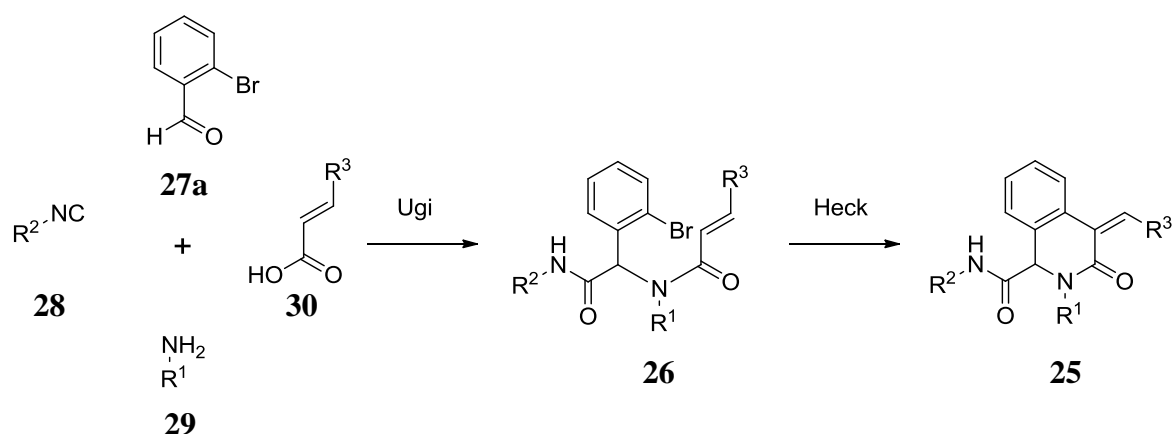


Abbildung 15: Während sich nach einer Methode von Zhu *et al.* Tetrahydroisochinoline herstellen lassen, die in Position 1 und 2 substituiert sind (Typ A), tragen die Produkte der Ugi-Heck-Reaktion in Position 4 des heterozyklischen Systems zusätzlich eine substituierte Doppelbindung (Typ B).

3.1 Synthese von Tetrahydroisochinolinonen via Ugi-Heck-Reaktion

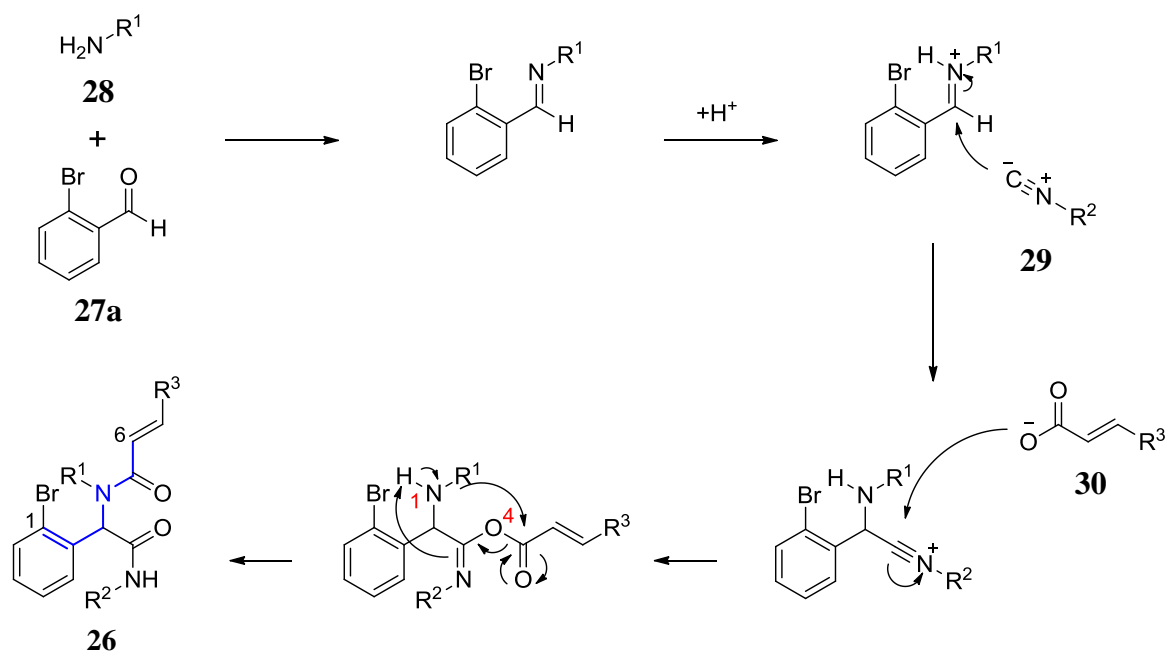
Substituierte Tetrahydroisochinolinon-Derivate (**25**) lassen sich *via* Heck-Reaktion aus α -Acylaminocarboxamiden (**26**) herstellen, wenn diese eine Arylhalogenid-Funktion und ein Olefinsystem tragen, die beide über eine zentrale Amid-Einheit verknüpft sind. Entsprechende Substrate lassen sich wiederum in nur einem Reaktionsschritt mit Hilfe der Ugi-Multikomponentenreaktion synthetisieren (Schema 1). Durch die Möglichkeit, die verwendeten Edukte hierbei flexibel zu variieren, stellt die Reaktion aus sequentieller Ugi- und Heck-Reaktion eine attraktive Methode für die Herstellung divers substituierter Tetrahydroisochinolinon-Derivate dar.



Schema 1: Die sequentielle Ugi-Heck-Reaktion bietet in nur zwei Reaktionsschritten Zugang zu hoch substituierten Tetrahydroisochinolinon-Derivaten.

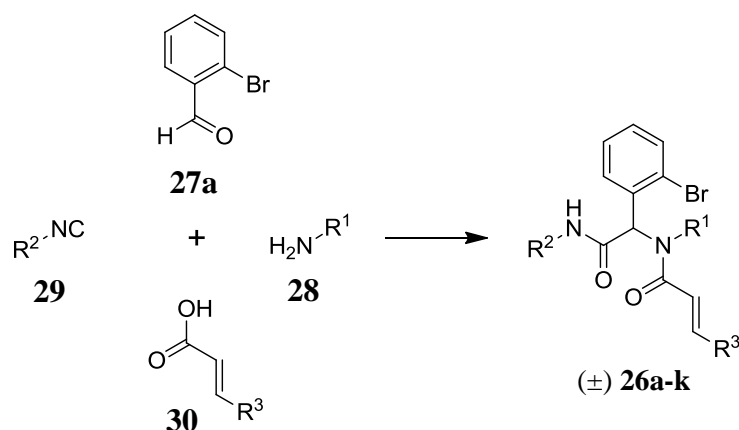
Im ersten Schritt werden nach einer von Ugi *et al.* zu Beginn der 1960er Jahre beschriebenen Reaktion 2-Brombenzaldehyd (**27a**) mit einem Amin (**28**), einem Isocyanid (**29**) und einer α,β -ungesättigten Carbonsäure (**30**) umgesetzt (Schema 2).^[74] Dabei reagiert zunächst die Aldehydverbindung mit dem Amin zum entsprechenden Imin. Das durch Protonierung durch die Carbonsäure entstehende Iminium-Ion wird anschließend nukleophil vom Isocyanid-Derivat angegriffen. Durch Addition des Carboxylats an das nun elektrophile Kohlenstoffatom des Isocyanids bildet sich ein Iminoacyl-Intermediat, das sich in einem irreversiblen Schritt zum α -Acylaminocarboxamid (**26**), dem Produkt der Ugi-Reaktion, umlagert. Wesentliches Element dieser Umlagerung ist der 1,4-(*O,N*)-Acyltransfer, der auch als Mumm-Umlagerung bekannt ist.^[75]

Die für die nachfolgende intramolekulare Heck-Reaktion essenzielle Arylhalogenid- und Olefinstruktur werden über die Aldehyd- und die Carbonsäure-Komponente in das α -Acylaminocarboxamid eingefügt und befinden sich im Ugi-Produkt in 1,6-Position zueinander. Das Stickstoffatom des Amin-Edukts liegt im Produkt in Benzylposition, sodass sich durch die im zweiten Schritt eingeleitete Ringschlussreaktion ein Isochinolin-Grundgerüst bildet (Schema 2).



Schema 2: Der Mechanismus der Ugi-Reaktion zeigt, wie die Umsetzung von Aldehyden (27), Aminen (28), Isocyaniden (29) und Carbonsäuren (30) zur Bildung von α -Acylaminocarboxamiden (26) führt.

Nach dieser Reaktion wurde eine Serie unterschiedlich substituierter α -Acylaminocarboxamide hergestellt (Tabelle 1). Die Synthese wurde bei Raumtemperatur in absolutem Methanol unter Argon-Atmosphäre durchgeführt und lieferte die Produkte **26a-k** in Ausbeuten von 37–81%.



#	R ¹	R ²	R ³	Produkt	[%]
1	Me (28a)	Bn (29a)	Ph (30a)	(±) 26a	77
2	<i>c</i> -Propyl (28b)	Bn (29a)	Ph (30a)	(±) 26b	57
3	Bn (28c)	Bn (29a)	Ph (30a)	(±) 26c	75
4	4-MeO-Bn (28d)	Bn (29a)	4-MeO-Ph (30b)	(±) 26d	60
5	<i>n</i> -Propyl (28e)	<i>c</i> -Hexyl (29b)	4-MeO-Ph (30b)	(±) 26e	72
6	Furan-2ylmethyl (28f)	<i>c</i> -Hexyl (29b)	Me (30c)	(±) 26f	81
7	3,4-(MeO) ₂ -Phenethyl (28g)	<i>n</i> -Pentyl (29c)	H (30d)	(±) 26g	69
8	2-Cl-Bn (28h)	<i>t</i> -Butyl (29d)	Me (30c)	(±) 26h	69
9	2-(2-Hydroxyethoxy)ethyl (28i)	<i>t</i> -Butyl (29d)	H (30d)	(±) 26i	41
10	Bn (28c)	2-Morpholinethyl (29e)	2,4-(Cl) ₂ -Ph (30e)	(±) 26j	37
11	<i>n</i> -Propyl (28e)	2-Morpholinethyl (29e)	Ph (30a)	(±) 26k	39

Tabelle 1: Die auf Basis der Ugi-Reaktion hergestellten α -Acylaminocarboxamide **26a-k**.

Die Konstitution des α -Acylaminocarboxamid-Gerüsts, die während der Multikomponentenreaktion aus der beschriebenen Abfolge mehrerer einzelner Reaktionsschritte entsteht, konnte anhand der Kristallstruktur des Ugi-Produkts **26h** nochmals belegt werden (Abb. 16).

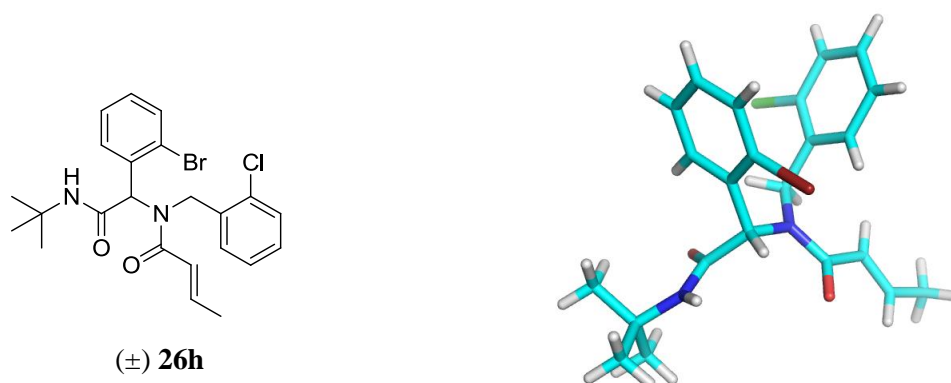
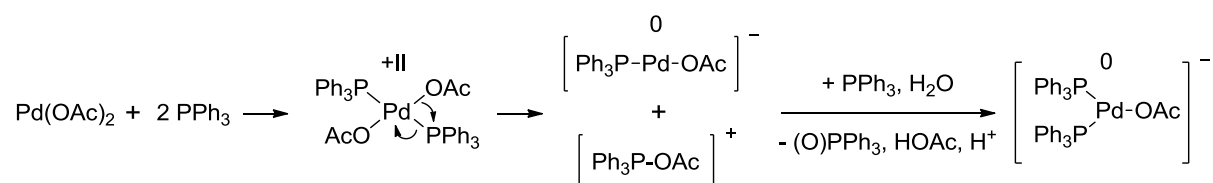


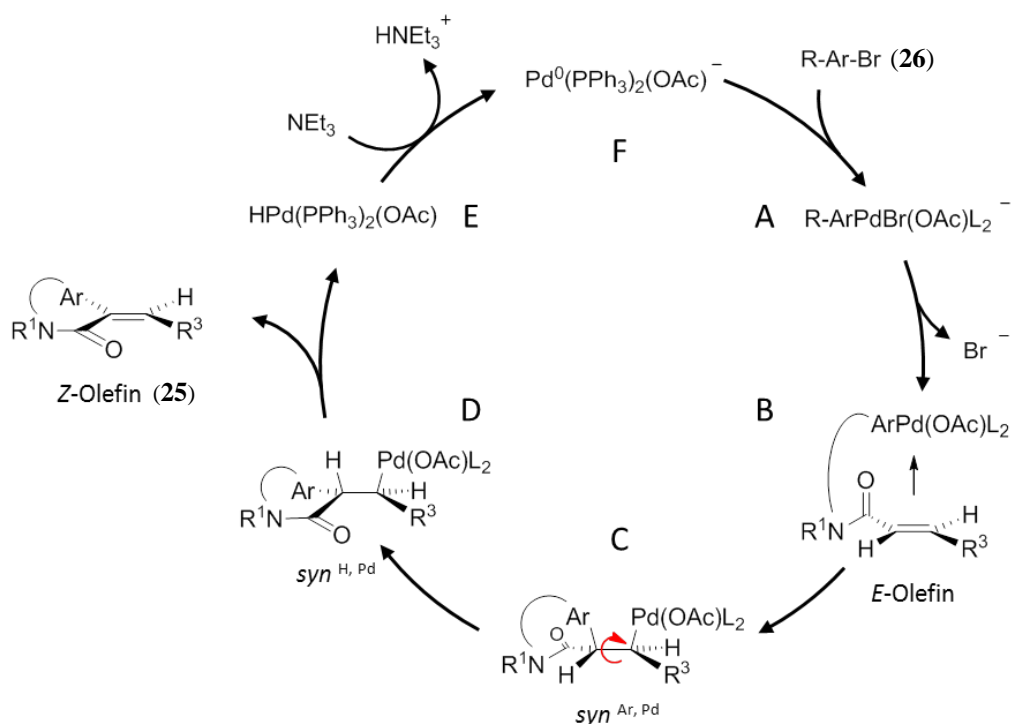
Abbildung 16: Die Strukturformel und Röntgenkristallstruktur^[76] von Verbindung **26h**.

Im zweiten Reaktionsschritt wird die intramolekulare Knüpfung der C-C-Bindung mit Hilfe der Heck-Reaktion durchgeführt. Die Palladium-katalysierte Kreuzkupplung verläuft dabei über einen mehrstufigen Reaktionsmechanismus, der mit der *In-situ*-Generierung der Pd(0)-Spezies beginnt. Unter den bekannten mono- und bidentaten Phosphin-Liganden kommt dabei häufig Triphenylphosphin zum Einsatz. Die aktive Katalysatorspezies $\text{Pd}^0(\text{PPh}_3)_2(\text{OAc})^-$ wird aus $\text{Pd}(\text{OAc})_2$ und PPh_3 gebildet (Schema 3).^[77]



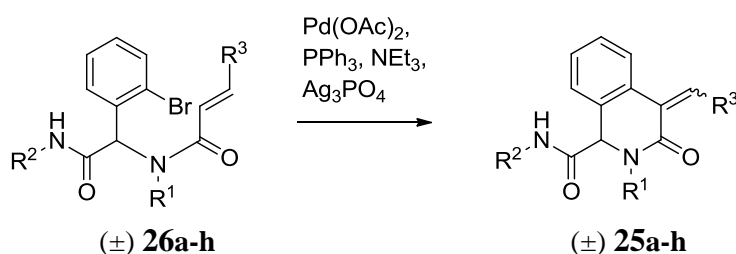
Schema 3: Generierung der aktiven Pd⁰-Spezies aus Pd(OAc)₂ und PPh₃.

Der Katalysezyklus beginnt mit der oxidativen Addition der Arylbromidfunktion der Ugi-Derivate (**26**) an die aktive Palladium-Spezies (Schema 4, A). Unter Abspaltung des Bromid-Ions entsteht ein neutraler σ -Arylpalladium-(II)-Komplex (B), der die intramolekulare Olefineinheit in Form eines π -Komplexes vorkoordiniert. In der darauffolgenden syn-Addition an die Doppelbindung wird diese in die Aryl-Palladium-Bindung inseriert und es entsteht ein σ -Alkylpalladium-Intermediat (C). Nach der Ausbildung der C-C-Bindung findet eine interne Rotation um die ursprüngliche Doppelbindung statt, sodass der β -Wasserstoff in syn-Orientierung zum Palladiumkomplex steht (D). Dies ist notwendig, da die β -Hydrideliminierung, die hier zur Freisetzung des *Z*-konfigurierten Alken-Produkts führt, ausschließlich aus der syn-Position abläuft (E). Unter Einwirkung einer Base kommt es im letzten Schritt zur reduktiven Eliminierung, was den Hydrido-Palladiumkomplex in die aktive Katalysatorspezies zurückführt (F).^[78]



Schema 4: Der Katalysezyklus der Heck-Kupplung am Beispiel einer intramolekularen Reaktion der Ugi-Produkte (**26**).

Die zuvor in der Ugi-Reaktion hergestellten α -Acylaminocarboxamide **26a-h** wurden nach dieser intramolekularen Heck-Reaktion zu den entsprechenden ringgeschlossenen Tetrahydroisochinolinon-Derivaten **25a-h** umgesetzt (Tabelle 2). Da die Verwendung von Silber-I-Additiven ein gängiges Verfahren zur Steigerung der Katalyserate darstellt,^[79] wurde neben den Reagenzien, die essenziell für den Katalyse-Zyklus sind, zusätzlich Ag_3PO_4 zugesetzt. Auf diese Weise wird das während der Umsetzung freiwerdende Bromid als Silbersalz abgefangen und das Reaktionsgleichgewicht auf die Produktseite verschoben.



#	Edukt	R ¹	R ²	R ³	Produkt	Konfig.	[%]
1	(±) 26a	Me	Bn	Ph	(±) 25a	Z ^a	50
2	(±) 26b	<i>c</i> -Propyl	Bn	Ph	(±) 25b	Z ^a	57
3	(±) 26c	Bn	Bn	Ph	(±) 25c	Z ^a	77

#	Edukt	R ¹	R ²	R ³	Produkt	Konfig.	[%]
4	(±) 26d	4-MeO-Bn	Bn	4-MeO-Ph	(±) 25d	Z ^a	88
5	(±) 26e	<i>n</i> -Propyl	<i>c</i> -Hexyl	4-MeO-Ph	(±) 25e	<i>E</i> + Z ^b	64 ^c
6	(±) 26f	Furan-2ylmethyl	<i>c</i> -Hexyl	Me	(±) 25f	Z ^a	19
7	(±) 26g	3,4-(MeO) ₂ -Phenethyl	<i>n</i> -Pentyl	H	(±) 25g	-	10
8	(±) 26h	2-Cl-Bn	<i>t</i> -Butyl	Me	(±) 25h	<i>E</i> + Z ^b	37 ^c

Tabelle 2: Mit Hilfe der Heck-Reaktion wurden die α -Acylaminocarboxamide (**26**) in die entsprechenden Tetrahydroisochinolinon-Derivate (**25**) überführt. ^a Es konnte nur das *Z*-konfigurierte Produkt isoliert werden; ^b Verhältnis der isolierten Isomere: *E*-/*Z*-**25e** 1:5, *E*-/*Z*-**25h** 1:1 ^c Angegeben ist die Gesamtausbeute der rein isolierten *E*- und *Z*-Diastereomeren.

Während die Zyklisierung der Ugi-Produkte in den meisten Fällen ausschließlich das durch die syn- β -H-Eliminierung bedingte *Z*-Isomer lieferte, wurde für Verbindung **25e** und **25h** zusätzlich das entsprechende *E*-Isomer isoliert. Dies konnte mit Hilfe der NMR-Technik der dipolar Kopplung vermittelten Proton-Proton-Korrelation, auch bekannt als Nuklear-Overhauser-Effekt (NOE), belegt werden. Während *Z*-konfigurierte Isomere einen Overhauser-Effekt zwischen dem olefinischen Proton und dem Proton an C-5 des Isochinolin-Gerüsts zeigen (Abb. 17 und 18, Korrelation I), fehlt diese Korrelation bei den entsprechenden *E*-Isomeren. Stattdessen lässt sich bei *E*-konfigurierten Olefinen eine Korrelation zwischen dem Proton an C-5 des Isochinolins und den Methylprotonen (Abb. 17 und 19, Korrelation II) bzw. den *ortho*-Phenylprotonen (Abb. 17 und 20, Korrelation III) des Olefin-Substituenten beobachten.

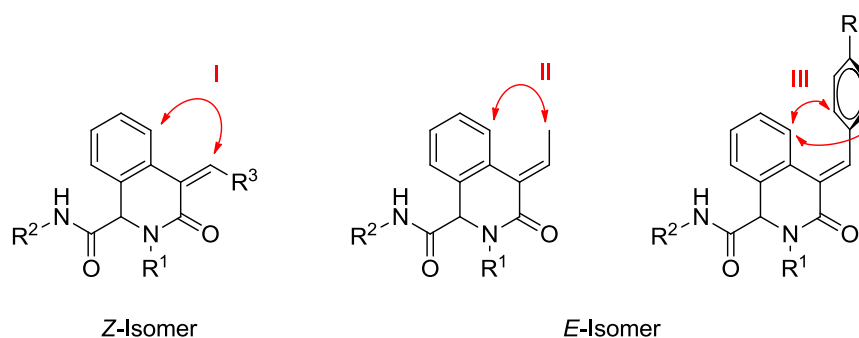


Abbildung 17: Mit Hilfe der NOESY-Korrelation lässt sich die Konfiguration der Doppelbindung ermitteln. I: *Z*-Isomer; II, III: *E*-Isomer.

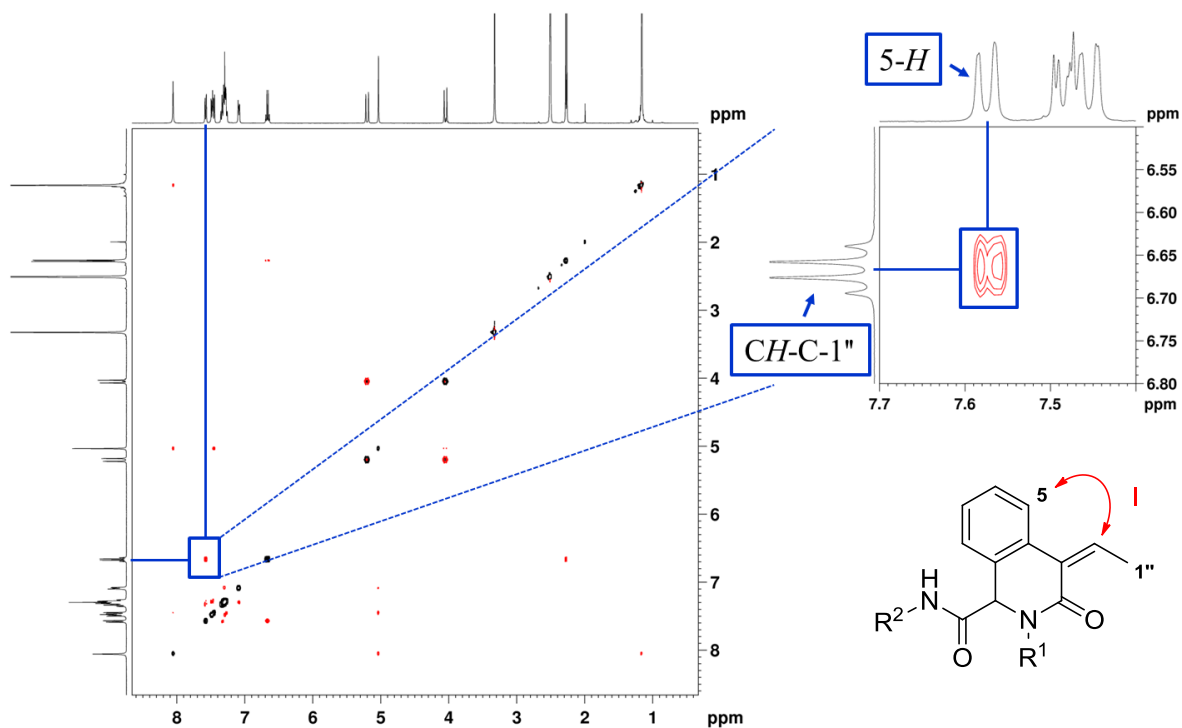


Abbildung 18: Das NOESY-Spektrum von Verbindung **Z-25h** zeigt die Korrelation zwischen dem olefinischen Proton (**CH-C-1''**) und dem aromatischen Proton **5-H** des Isochinolin-Gerüsts.

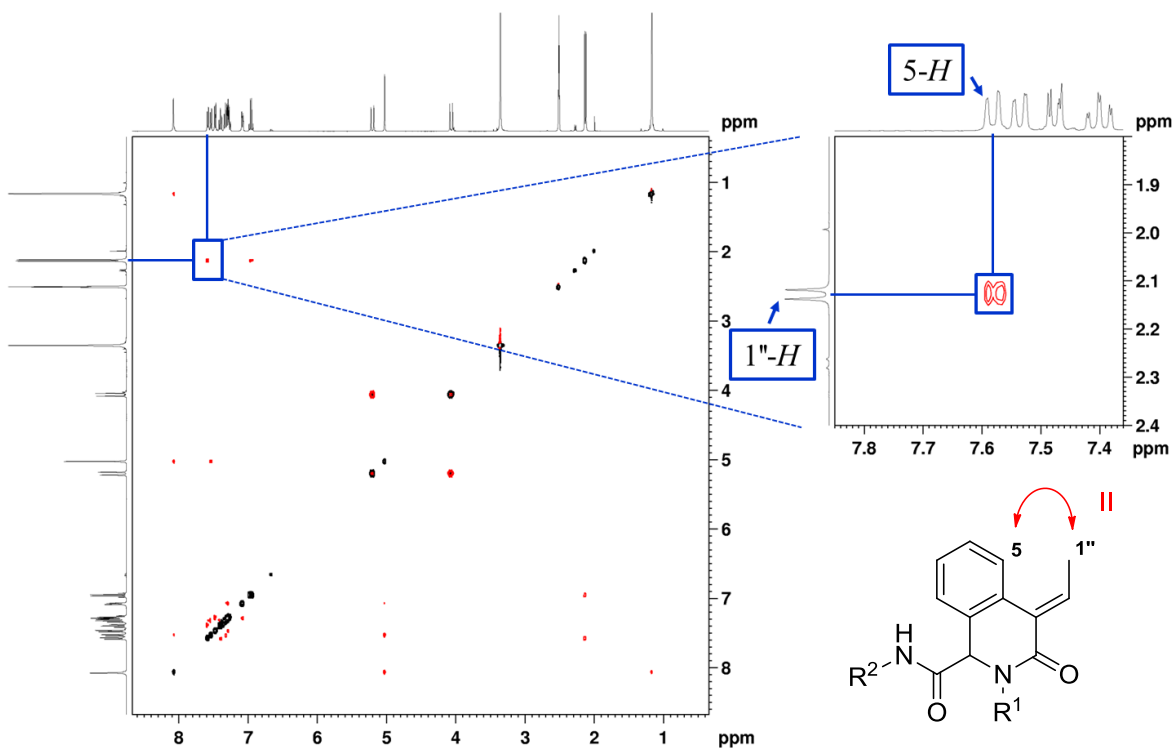


Abbildung 19: Das NOESY-Spektrum von Verbindung **E-25h** zeigt die Korrelation zwischen den Methylprotonen (**1''-H**) und dem aromatischen Proton **5-H** des Isochinolin-Gerüsts.

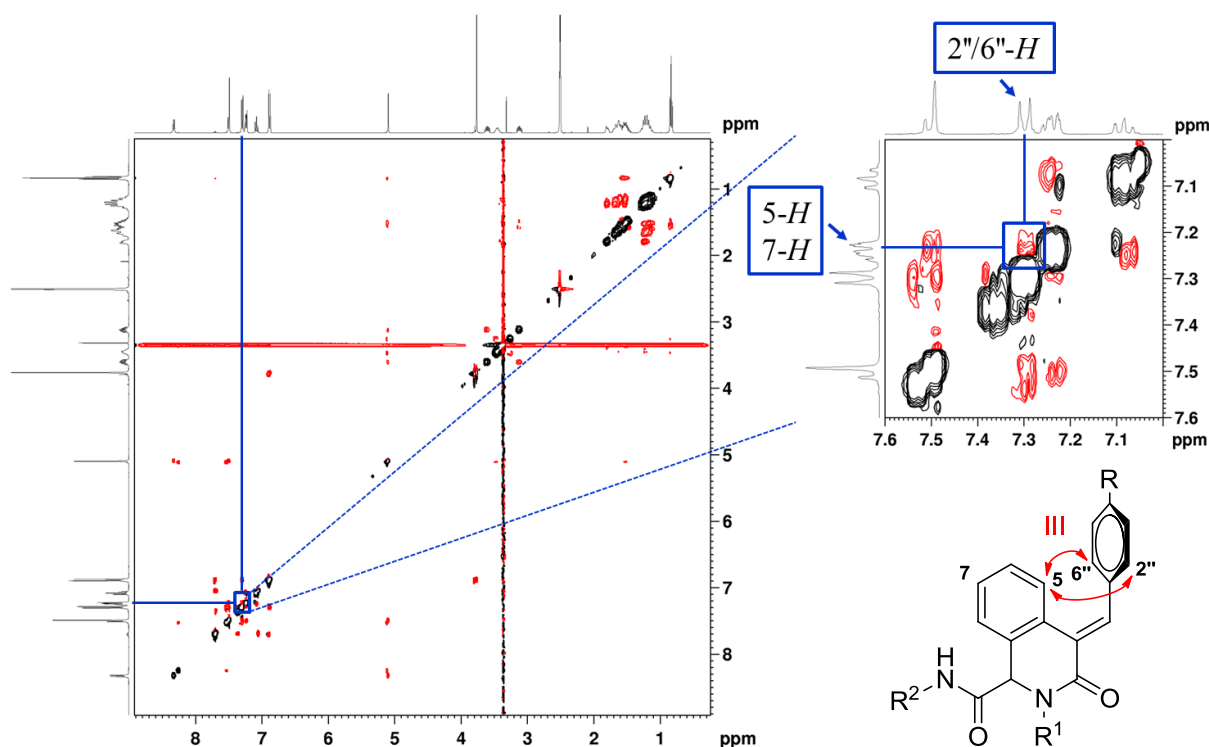


Abbildung 20: Das NOESY-Spektrum von Verbindung *E-25e* zeigt eine Korrelation zwischen den *ortho*-Phenylprotonen (2''/6''-H) und dem ^1H -Signal, das die beiden Proton 5-H und 7-H des Isochinolin-Gerüsts liefern.

Anhand der Kristallstruktur von *Z-25e* lässt sich sowohl die erfolgreiche Knüpfung der neuen C-C-Bindung sowie die *Z*-konfigurierte Doppelbindung erkennen (Abb. 21).

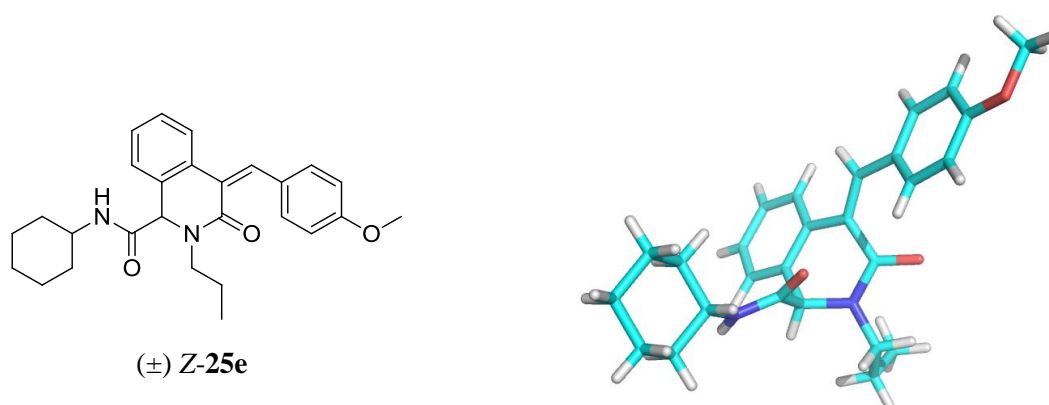
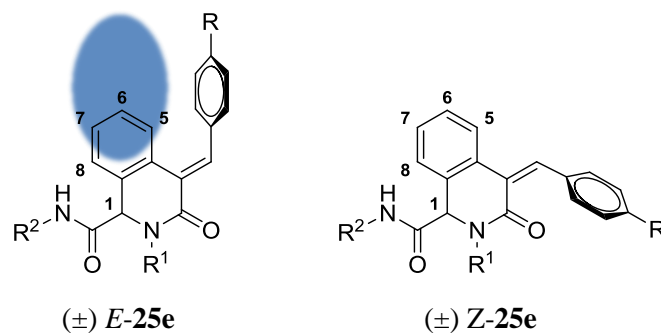


Abbildung 21: Die Strukturformel und Röntgenkristallstruktur^[76] von Verbindung *Z-25e*.

Einen weiteren Beleg für die Konfiguration der exozyklischen Doppelbindung lässt sich bei Derivaten mit aromatischen Olefin-Substituenten finden. So kommt es in Folge des Ringstromeffekts bei *E*-Olefinen zu einer Verschiebung der ^1H -NMR-Signale der Isochinolin-Protonen an C-5, -6 und -7. Der von Aromaten ausgehende diamagnetische

Ringstrom schwächt das effektive Magnetfeld, das ober- und unterhalb sowie im Inneren des Rings besteht ab, sodass es in diesen Regionen zu einer verstärkten Abschirmung von Protonen kommt. In Folge dessen kommt es bei *E*-konfigurierten Produkten zu einer Hochfeldverschiebung dieser Protonen, was sich in kleineren ppm-Werten widerspiegelt.^[80]



Proton	$\delta_{E\text{-Konfig}}$ [ppm]	$\delta_{Z\text{-Konfig}}$ [ppm]	$\Delta\delta_{Z-E}$ [ppm]
H-1	5.09	5.11	0.02
H-5	7.23	7.68	0.45
H-6	7.08	7.36	0.28
H-7	7.23	7.30	0.07
H-8	7.50	7.53	0.03

Tabelle 3: Die Verschiebung der Protonen des Tetrahydroisochinolinon-Gerüsts der *E*- und *Z*-konfigurierten **25e**-Diastereomeren.

Dieser Effekt lässt sich an Verbindung **25e** betrachten, die sowohl in *E*- und *Z*-Konfiguration isoliert wurde (Tabelle 3). Während die Isochinolin-Protonen an C-1 und C-8 keine wesentliche Verschiebungsdifferenz zeigen, erscheinen die Protonen an C-5, -6 und -7 bei *E*-**25e** bei niedrigeren ppm-Werten als bei *Z*-**25e**. Die abnehmende Ausprägung kann dabei auf die Entfernung zum aromatischen Olefin-Substituenten zurückgeführt werden. Verbindungen **25a-d**, die ebenfalls einen aromatischen Substituenten an der Doppelbindung des Tetrahydroisochinolin-Gerüsts tragen, zeigen dagegen die für *Z*-Olefinerivate typische Verschiebung.

Da aus dem Katalysezyklus der Heck-Reaktion bei Verwendung von *E*-konfigurierten α,β -ungesättigten Carbonsäuren ausschließlich *Z*-konfigurierte Tetrahydroisochinolinon-Produkte freigesetzt werden können, wird davon ausgegangen, dass im Fall von **25e** und **25h** eine nachträgliche Isomerisierung stattgefunden hat. Der reversible Prozess der β -Hydrideliminierung macht eine Rückaddition des Hydrido-Palladiumkomplexes an die zuvor

generierte Doppelbindung möglich. In Abhängigkeit der Regiochemie dieses Additionsvorgangs kann nach erneuter β -Hydrideliminierung das ursprüngliche *Z*-Olefin oder das diastereomere *E*-Olefin gebildet werden (Abb. 22).^[79]

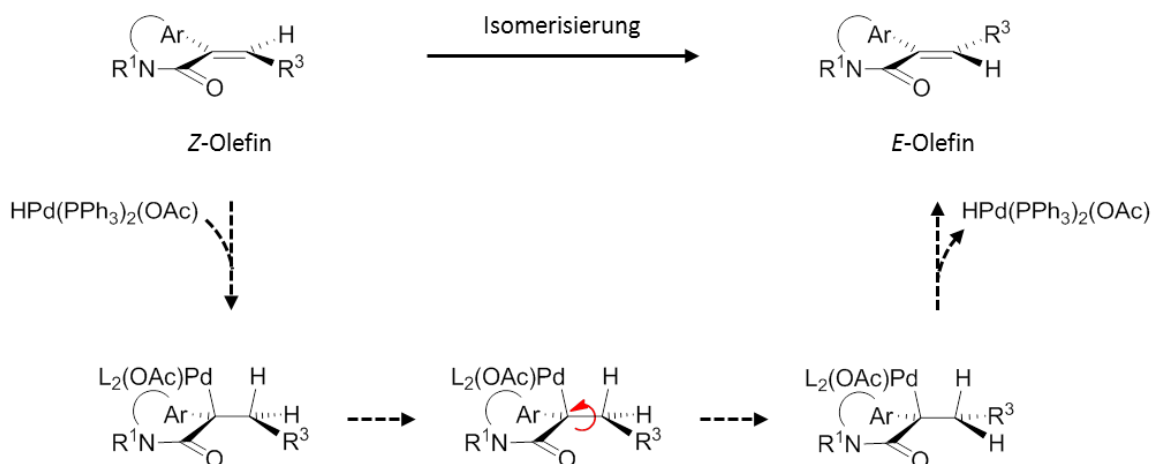


Abbildung 22: Die Isomerisierung des initial gebildeten *Z*-Olefins wird durch die Rückaddition des Hydrido-Palladiumkomplexes an die Doppelbindung in umgekehrter Orientierung und erneute β -Hydrideliminierung ermöglicht.

Eine schlüssige Erklärung, weshalb diese Isomerisierung allerdings ausschließlich bei den Tetrahydroisochinolinon-Derivaten **25e** und **25h** beobachtet wurde, konnte indes nicht gefunden werden. So weicht weder das Verhältnis der eingesetzten Edukte und Reagenzien noch die Reaktionstemperatur und -dauer von den übrigen Synthesen ab. Auch sterische Aspekte können nicht zur Argumentation herangezogen werden, da bei anderen Heck-Kupplungen mit den gleichen Olefin-Substituenten lediglich das *E*-konfigurierte Produkt isoliert werden konnte. Aufgrund der sich abzeichnenden negativen Bioaktivitätsergebnissen wurden keine weiteren Untersuchungen durchgeführt.

3.2 Ergebnisse

Die Tetrahydroisochinolinon-Derivate **25a-h** wurden in der Arbeitsgruppe Chatterjee (H. Schraud) auf ihr Inhibitionsvermögen des HSF-1-Signalwegs untersucht. Dazu wurde die Erkenntnis genutzt, dass die Behandlung von MM-Zellen mit HSP90-Inhibitoren zu einer HSF-1-vermittelten Hochregulation der HSP72-Expression führt (vgl. Kapitel 1.2).^[44, 81]

MM-Zellen wurden daher zunächst mit den potenziellen Inhibitoren **25a-h** inkubiert und danach mit dem HSP90-Inhibitor NVP-AUY922 (**5**) behandelt. Durch die anschließende Messung des HSP72-Levels *via* Westernblot-Analyse wurde das Inhibitionsvermögen der getesteten Substanzen ermittelt. Ein Inhibitor, der regulatorisch in den HSF-1-Signalweg eingreift, sollte hierbei einen reduzierten Proteinlevel an HSP72 zeigen. Zur Interpretation der ermittelten Proteinbanden wurden eine Positiv- sowie eine Negativ-Kontrolle durchgeführt. Dabei dienten MM-Zellen, die weder mit potenziellen Inhibitoren des HSF-1-Signalwegs noch mit einem HSP90-Inhibitor behandelt wurden, als Positiv-Kontrolle. Sie zeigen den HSP72-Proteinlevel im Grundzustand. Als Negativ-Kontrolle dienten MM-Zellen, die ausschließlich mit dem HSP90-Inhibitor NVP-AUY922 (**5**) behandelt wurden und damit eine erhöhte Expression von HSP72 aufweisen. Um eine spezifische Inhibition des HSF-1-Signalwegs von unspezifisch zytotoxischen Effekten zu unterscheiden, wurde zusätzlich der Level des Strukturproteins α -Tubulin beobachtet. Eine gleichzeitige Reduktion von HSP72 und α -Tubulin würde eine zytotoxische Wirkung der getesteten Verbindungen nahelegen.

Bei der Aktivitätsuntersuchung zeigte sich jedoch, dass bei einer Konzentration von 50 μ M keines der synthetisierten Tetrahydroisochinolinon-Derivate **Z-25a-h** die HSF-1-vermittelte HSP72-Expression zu inhibieren vermochte (Abb. 23). Unabhängig von den verschiedenen Substituenten an R^1 , R^2 und R^3 der Tetrahydroisochinolinone (Tabelle 2) führte die Behandlung von MM-Zellen mit AUY (**5**) zu einer unverminderten Hochregulation der HSP72-Expression.

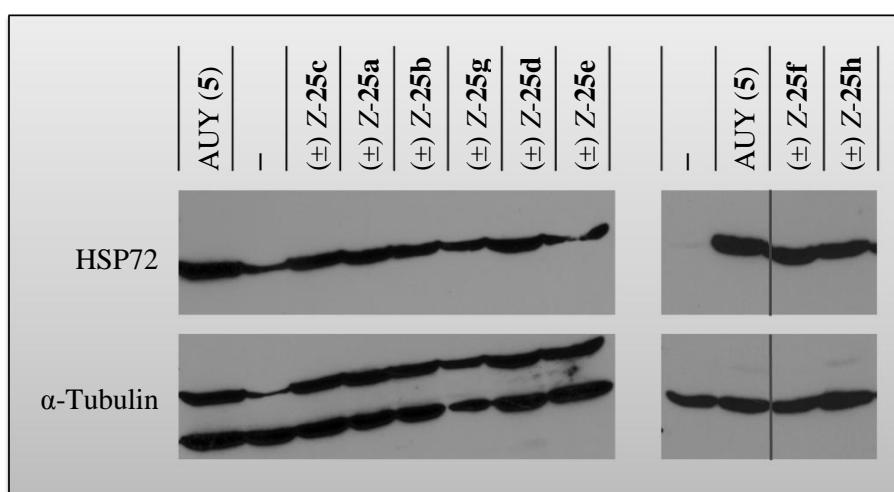


Abbildung 23: Westernblot-Analyse der HSF-1 vermittelten HSP70-Expression nach Behandlung mit den Tetrahydroisochinolinon-Derivaten **Z-25a-h** bei einer Konzentration von 50 μ M.

Die ausgebliebene Inhibition der HSP72-Expression ist darüber hinaus unabhängig vom eingesetzten Isomer, wie der Vergleich der HSP72-Proteinlevel nach Behandlung mit **Z-25e** und **E-25e**, sowie mit **Z-25h** und **E-25h** zeigt (Abb. 24). Auch die *E*-Isomere konnten bei einer Konzentration von 50 μM die Hochregulation von HSP72 nicht inhibieren.

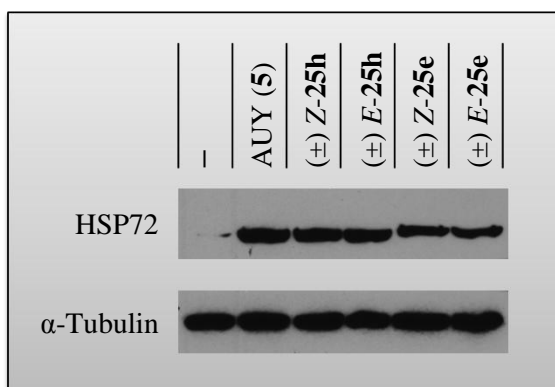


Abbildung 24: Die Westernblot-Analyse der HSF-1-vermittelten HSP70-Expression nach Behandlung mit den *E*- und *Z*-Isomeren der Verbindungen **25e** und **25h** bei einer Konzentration von 50 μM .

Da unter diesen ersten, *via* Ugi-Heck-Reaktion erhaltenen, Tetrahydroisochinolinon-Derivaten keine Verbindung gefunden werden konnte, die eine Inhibition des HSF-1-Signalwegs zeigte, wurde auf die Synthese weiterer analoger Derivate verzichtet.

Um hingegen zu untersuchen, ob die ausgebliebene Aktivität auf das spezifische Substitutionsmuster der Heck-Produkte (**25**) zurückzuführen ist, wurden einige der als HSP70-Inhibitoren entwickelten Verbindungen (vgl. Kapitel 5.3.2 und 5.3.3) im beschriebenen HSF-1-Assay untersucht. Bei diesen Molekülen handelt es sich ebenfalls um Tetrahydroisochinolinon-Derivate, die sich allerdings im Substitutionsmuster des gesättigten Ringsystems deutlich von den Heck-Produkten (**25**) unterscheiden (Abb. 25). So befindet sich beispielsweise die amidische Carbonylfunktion bei den HSP70-Inhibitoren (**24**) in Position 1, während der entsprechende Carbonyl-Sauerstoff der Heck-Produkte (**25**) in Position 3 an das Tetrahydroisochinolin-Gerüst gebunden ist. Daneben unterscheiden sich auch die Positionen der variablen Substituenten R^1 – R^3 .

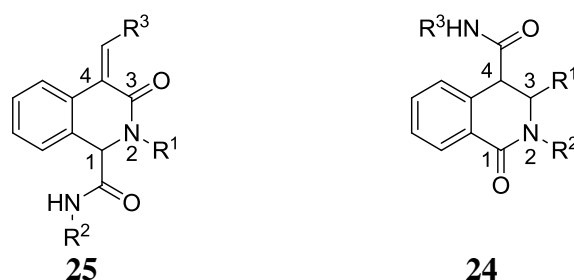
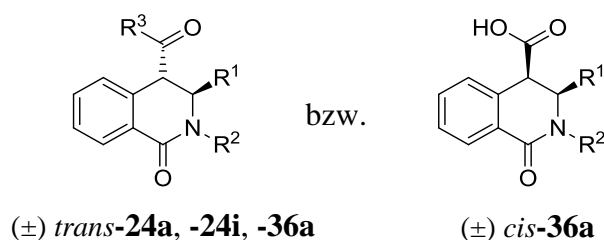


Abbildung 25: Gegenüberstellung des Substitutionsmusters der Tetrahydroisochinolinone **24** und **25**.

Um den Einfluss des alternativen Substitutionsmuster zu prüfen, wurden vier entsprechende Verbindungen auf ihre Fähigkeit untersucht, den HSF-1-Signalweg zu inhibieren. Hierzu wurden exemplarisch die Tetrahydroisochinolinon-4-carboxamide *trans*-**24a** und *trans*-**24i** (vgl. 5.3.3) sowie die analogen Tetrahydroisochinolinon-4-carbonsäuren *cis*-**36a** und *trans*-**36a** (vgl. 5.3.2) ausgewählt (Tabelle 4).



#	Verbindung	R ¹	R ²	R ³
1	(±) <i>trans</i> - 24a			
2	(±) <i>trans</i> - 24i			
3	(±) <i>cis</i> - 36a			-
4	(±) <i>trans</i> - 36a			OH

Tabelle 4: Die als HSP70-Inhibitoren entwickelten Tetrahydroisochinolinon-Derivate, die auf ihre Fähigkeit untersucht wurden, den HSF-1-Signalweg zu inhibieren.

Nach Behandlung der MM-Zellen mit Substanzkonzentrationen von 50 µM zeigte die Westernblot-Analyse jedoch auch für diese Verbindungen keine signifikant reduzierte HSP72-Expression (Abb. 26).

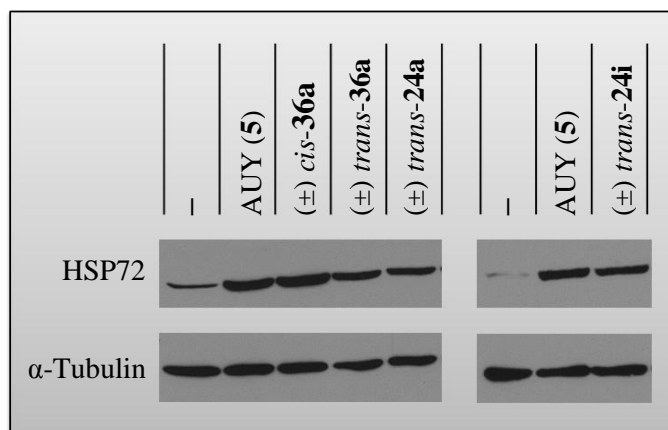


Abbildung 26: Westernblot-Analyse der HSP72-Expression nach Behandlung von MM-Zellen mit den Tetrahydroisochinolin-Derivaten *trans*-24a, -24i sowie *cis*- und *trans*-36a.

Zusammengefasst legen die Bioaktivitätsergebnisse der getesteten Verbindungen **24a**, **24i**, **25a-h** sowie *cis*- und *trans*-**36a** nahe, dass das in NZ28 (**12**) enthaltene Tetrahydroisochinolin-Gerüst möglicherweise keine Leitstruktur für Inhibitoren des HSF-1-Signalwegs darstellt. Der strukturelle Unterschied zwischen den synthetisierten Derivaten und dem Tetrahydroisochinolin-System in NZ28 (**12**) könnte eine Ursache für die Inaktivität der untersuchten Verbindungen darstellen.

Überraschenderweise konnte dagegen für einige der als Zwischenprodukte synthetisierten α -Acylaminocarboxamide **26a-k** eine verminderte HSP72-Expression nach Inhibition von HSP90 beobachtet werden. Während die Westernblot-Analyse der meisten Verbindungen wie für **26c** keinen inhibitorischen Effekt auf die Hochregulation des HSP72-Levels zeigte, konnte nach Behandlung mit **26a**, **26e** und **26h** (25 μ M) eine reduzierte Expression von HSP72 beobachtet werden (Abb. 27). Nach entsprechender Behandlung der Myelom-Zellen mit **26b** und **26j** konnte die HSF-1-vermittelte Hochregulation der HSP72-Expression sogar gänzlich unterbunden werden. Wie die unverminderten Proteinbanden des Strukturproteins α -Tubulin zeigen, ist die Viabilität der Myelom-Zellen zum Zeitpunkt der verminderten HSP72-Expression nicht beeinträchtigt. Eine unspezifisch zelltoxische Wirkung kann als Grund für den reduzierten HSP72-Level somit ausgeschlossen werden.

Eine entsprechende Aktivitätsuntersuchung mit Hilfe eines ELISA-Assays machte darüber hinaus eine quantitative Auswertung der qualitativen Westernblot-Ergebnisse möglich. Hierbei lässt sich die Menge an HSP72 ermitteln, die sich nach Behandlung mit einem HSP90-Inhibitor im Lysat der MM-Zellen befindet. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen der Westernblot-Analyse zeigte das α -Acylaminocarboxamid **26c** keine

wesentliche Inhibition der HSF-1-vermittelten HSP72-Expression gegenüber der Negativ-Kontrolle (Abb. 27). Die Behandlung mit den Derivaten **26a**, **26e** und **26h** vermochte dagegen die Protein-Expression etwa zu halbieren. Den stärksten Inhibitionseffekt zeigten – wie bereits im Westernblot – Verbindung **26b** und **26j**. Hier lag die Menge an exprimiertem HSP72 in der Größenordnung der unbehandelten Positiv-Kontrolle, was auf eine vollständige Inhibition der HSF-1-vermittelten HSP72-Expression hindeutet.

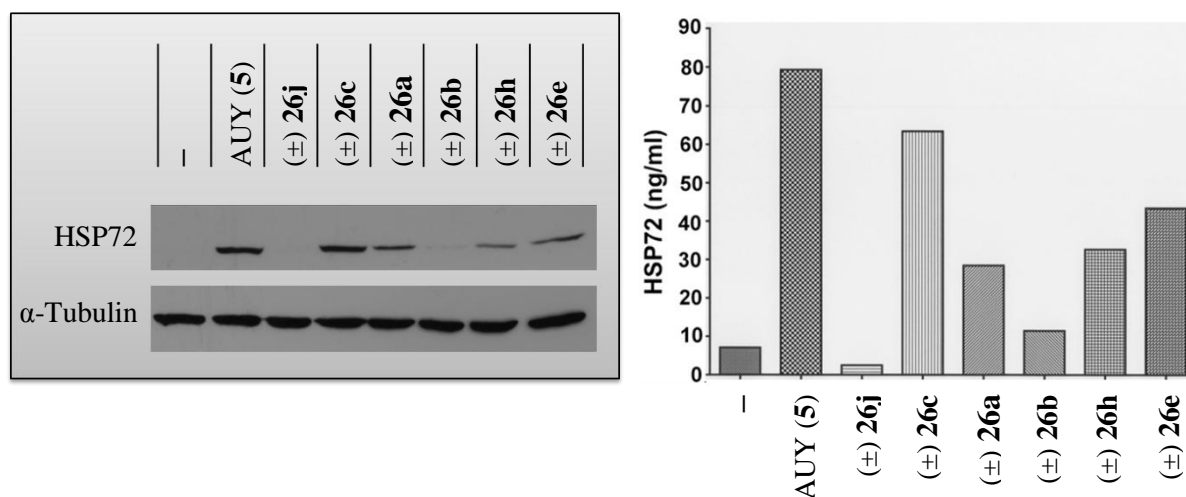
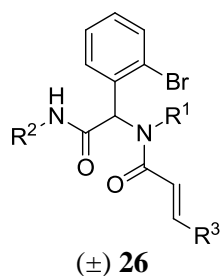


Abbildung 27: Unter den α -Acylaminocarboxamiden **26a-k**, die auf eine Inhibition des HSF-1-Signalwegs untersucht wurden, vermochten einige Verbindungen die HSP72-Expression zu verhindern. (links: Westernblot-Analyse, rechts: ELISA-Assay)

Vergleicht man die Strukturelemente der aktiven α -Acylaminocarboxamide **26a**, **26b**, **26e**, **26h** und **26j**, lassen sich jedoch keine klaren Struktur-Wirkungsbeziehungen gewinnen (Tabelle 5). Dies wird deutlich, wenn man beispielsweise die Substituenten R^1 und R^2 der beiden aktivsten Derivate **26b** und **26j** vergleicht. Während **26b** an R^1 einen aliphatischen *c*-Propyl-Rest trägt, befindet sich bei **26j** an gleicher Stelle eine aromatische Benzyleinheit. Auch die Substituenten an R^2 unterscheiden sich in beiden Molekülen. Verbindung **26b** trägt an dieser Stelle einen Benzylrest, wohingegen **26j** mit einem Morpholinoethylrest substituiert ist.

Die Aktivitätsdaten erlauben daneben auch keine strukturelle Abgrenzung der aktiven von den inaktiven Derivate. So unterscheidet sich die hochaktive Verbindung **26b** nur durch eine *c*-Propyleinheit an R^1 von der nahezu inaktiven Verbindung **26c**, die hier einen Benzylsubstituenten trägt. Die geringe Aktivität von **26c** kann allerdings nicht ausschließlich auf die Benzyleinheit an R^1 zurückgeführt werden, da das aktivste Derivat **26j** an R^1 ebenfalls einen Benzylrest trägt (Tabelle 5).



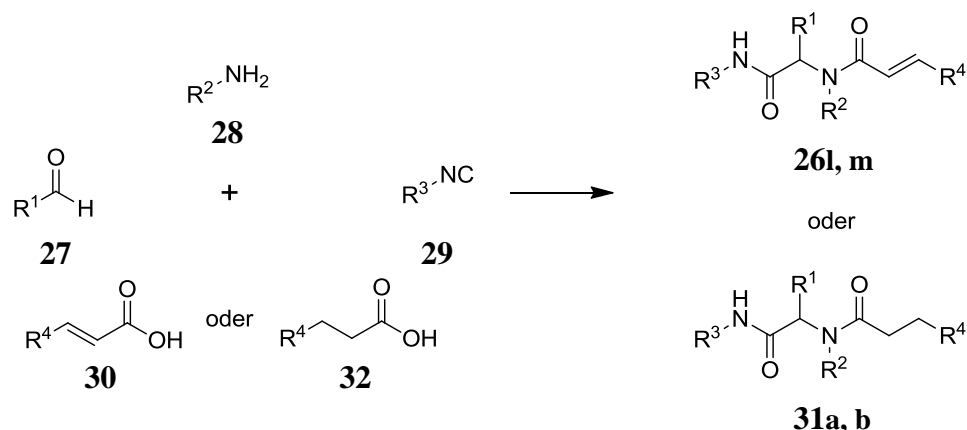
#	Verbindung	R ¹	R ²	R ³
1	(±) 26a	Me	Bn	Ph
2	(±) 26b	<i>c</i> -Propyl	Bn	Ph
3	(±) 26c	Bn	Bn	Ph
4	(±) 26e	<i>n</i> -Propyl	<i>c</i> -Hexyl	4-MeO-Ph
5	(±) 26h	2-Cl-Bn	<i>t</i> -Butyl	Me
6	(±) 26j	Bn	2-Morpholinethyl	2,4-(Cl) ₂ -Ph

Tabelle 5: Die α -Acylaminocarboxamid-Derivate **26a**, **b**, **e**, **h** und **j** inhibieren die HSF-1-vermittelte HSP72-Expression nach Inhibition von HSP90. Verbindung **26c** zeigt dagegen keine inhibitorische Aktivität.

3.3 Modifikationen der potentesten α -Acylaminocarboxamide

Um den Einfluss der Grundstruktur der bisherigen α -Acylaminocarboxamide auf die beobachtete Aktivität zu untersuchen, wurden weitere Strukturvariationen durchgeführt. Als Ausgangsmoleküle hierfür wurden die bis dato aktivsten Verbindungen **26b** und **26j** gewählt. Der Austausch von 2-Brombenzaldehyd (**27a**) durch Benzaldehyd (**27b**) lieferte bei ansonsten unveränderten Edukten die Derivate **26m** und **26l** (Tabelle 6). Sie erlauben den Einfluss des Bromsubstituenten auf die Bioaktivität zu untersuchen, der ursprünglich für die anschließend vorgesehene Heck-Zyklisierung ins Molekül eingebracht wurde.

Die Olefineinheit, die ebenfalls für die Zyklisierung in die α -Acylaminocarboxamide eingeführt wurde, bildet mit der Carbonylamidfunktion ein Michael-System. Um zu untersuchen, ob der Aktivität der Verbindungen **26b** und **26j** eine kovalente Bindung zugrunde liegt, die aus einer nukleophilen Addition an das Michael-System hervorgehen kann, wurden deren gesättigte Analoga (**31a** und **31b**) hergestellt. Dazu wurde in der Ugi-Reaktion die α,β -ungesättigten Zimtsäurederivate durch die entsprechenden α,β -gesättigten Carbonsäuren (**32a** und **32b**) ersetzt (Tabelle 6).



#	R ¹	R ²	R ³	R ⁴	Produkt	[%]
1	Ph (27b)	<i>c</i> -Propyl (28b)	Bn (29a)	Ph (30a)	(±) 26l	73
2	Ph (27b)	Bn (28c)	2-Morpholinethyl (29e)	2,4-(Cl) ₂ -Ph (30e)	(±) 26m	53
4	2-Br-Ph (27a)	<i>c</i> -Propyl (28b)	Bn (29a)	Ph (32a)	(±) 31a	60
3	2-Br-Ph (27a)	Bn (28c)	2-Morpholinethyl (29e)	2,4-(Cl) ₂ -Ph (32b)	(±) 31b	37

Tabelle 6: Die in Anlehnung an die potentesten α -Acylaminocarboxamide **26b** und **26j** synthetisierten Derivate **26l** und **26m** sowie **31a** und **31b**.

Das Vermögen die HSF-1-vermittelte HSP72-Expression zu inhibieren, wurde wie zuvor durch eine Analyse *via* Westernblot und den entsprechenden ELISA-Assay ermittelt (Abb. 28). Dabei zeigte sich, dass nach Behandlung mit den Verbindungen **26l**, **31a** und **31b** die Expression von HSP72 wirksam inhibiert werden konnte. Dagegen zeigte die Behandlung von MM-Zellen mit dem Derivat **26m** nahezu keine Auswirkung auf den Level an exprimiertem HSP72.

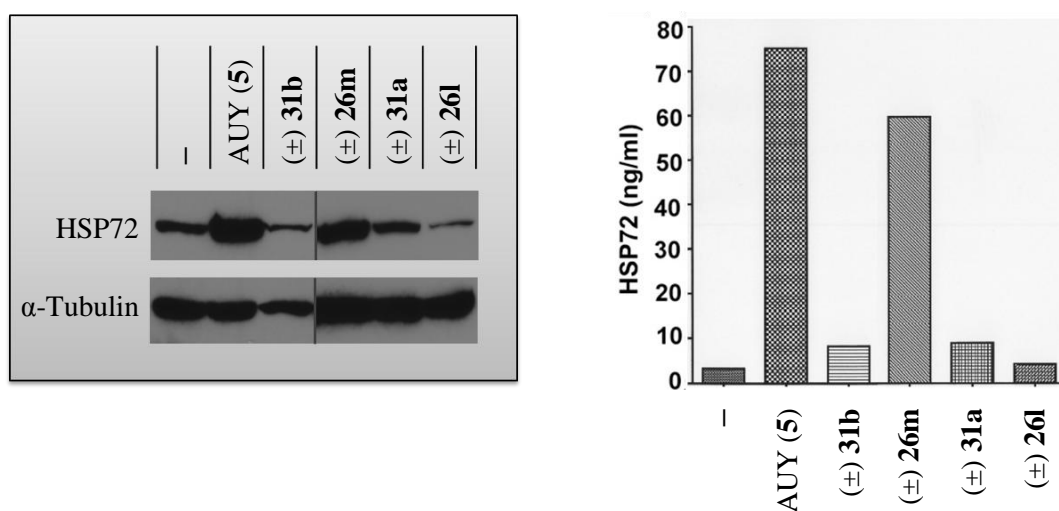


Abbildung 28: Bestimmung des Levels an HSP72 nach Behandlung mit **26l**, **26m**, **31a** und **31b** sowie anschließender Inhibition von HSP90 (links: Westernblot-Analyse, rechts: ELISA-Assay).

Während der Austausch des Bromrestes in **26j** durch Wasserstoff zum Verlust der Bioaktivität des Derivats **26m** führt, wird die entsprechende Substitution in Verbindung **26b** toleriert, wie die Aktivität von **26l** zeigt. Eine eindeutige Korrelation zwischen der Präsenz des Bromsubstituenten und der Fähigkeit die HSP72-Expression zu inhibieren, lässt sich somit nicht herstellen.

Der Einfluss des Michael-Systems auf die Bioaktivität zeigt hingegen ein konsistentes Bild. Wie die verminderte Expression von HSP72 nach Behandlung mit **31a** und **31b** zeigt, ist deren Aktivität nicht an das Michael-System der analogen Derivate **26b** und **26j** gekoppelt. Eine kovalente Bindung an das Michael-System als zugrundeliegendes Wirkprinzip der α -Acylaminocarboxamide erscheint damit unwahrscheinlich.

Gesamtübersicht aller α -Acylaminocarboxamide und deren Inhibitionseigenschaften der HSF-1-vermittelten HSP72-Expression (Tabelle 7).

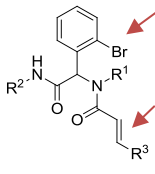
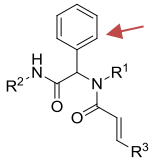
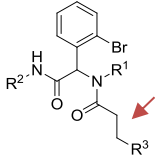
Struktur	#	Verbindung	R ¹	R ²	R ³	Inhibition der HSP72-Expression
	1	(±) 26a	Me	Bn	Ph	+
	2	(±) 26b	<i>c</i> -Propyl	Bn	Ph	+
	3	(±) 26c	Bn	Bn	Ph	-
	4	(±) 26d	4-MeO-Bn	Bn	4-MeO-Ph	-
	5	(±) 26e	<i>n</i> -Propyl	<i>c</i> -Hexyl	4-MeO-Ph	+
	6	(±) 26f	Furan-2ylmethyl	<i>c</i> -Hexyl	Me	-
	7	(±) 26g	3,4-(MeO) ₂ -Phenethyl	<i>n</i> -Pentyl	H	-
	8	(±) 26h	2-Cl-Bn	<i>t</i> -Butyl	Me	+
	9	(±) 26i	2-(2-Hydroxyethoxy)ethyl	<i>t</i> -Butyl	H	-
	10	(±) 26j	Bn	2-Morpholinethyl	2,4-(Cl) ₂ -Ph	+
	11	(±) 26k	<i>n</i> -Propyl	2-Morpholinethyl	Ph	-
	12	(±) 26l	<i>c</i> -Propyl	Bn	Ph	+
	13	(±) 26m	Bn	2-Morpholinethyl	2,4-(Cl) ₂ -Ph	-
	14	(±) 31a	<i>c</i> -Propyl	Bn	Ph	+
	15	(±) 31b	Bn	2-Morpholinethyl	2,4-(Cl) ₂ -Ph	+

Tabelle 7: Gesamtübersicht über die Aktivität der α -Acylaminocarboxamide **26a-m** sowie **31a** und **31b**.

4 2,5-Diketopiperazine mit anti-proliferativer Aktivität*

Im Rahmen der strukturellen Variation der in der Ugi-Reaktion eingesetzten Edukte, wurde als Carbonsäurederivat auch Benzoylacrylsäure eingesetzt. Dabei wurde beobachtet, dass die Verwendung von β -Acyl-substituierten Acrylsäurederivaten in der Ugi-4-Komponenten-Reaktion auch ohne die Verwendung von Mikrowellenstrahlung zur Bildung von 2,5-Diketopiperazinderivaten (2,5-DKP) führt.^[82] Damit wurde in nur einem Reaktionsschritt der Zugang zu einer Substanzklasse erhalten, die pharmakologisch interessant ist.^[83-85] So ist beispielsweise der aus *Aspergillus ochraceus* isolierte Naturstoff Avrainamid (**33**) gegen multiresistente Bakterien wie *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes* und *Enterococcus faecalis* aktiv.^[86] Auch aus der pharmazeutischen Entwicklung von Wirkstoffen sind 2,5-DKPs bekannt. So wurde der Wirkstoff Aplavivoc (**34**) als CCR5-Antagonist zur HIV-Behandlung bis in die Klinische Phase III entwickelt (Abb. 29).^[87]

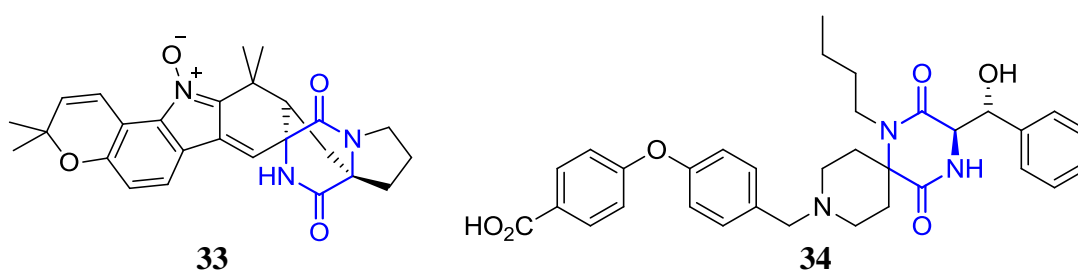


Abbildung 29: 2,5-Diketopiperazine finden sich sowohl in bioaktiven Naturstoffen wie Avrainamid (**33**) als auch pharmakologischen Wirkstoffen wie Aplavivoc (**34**).

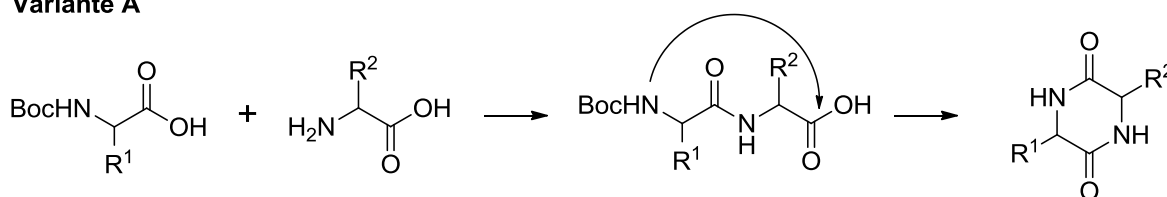
Neben dem Screening auf HSF-1-Inhibition wurde in der Arbeitsgruppe Topp (C. Berges), die Inhibition der Proliferation von aktivierten T-Zellen durch 2,5-DKPs untersucht. Dabei wurde beobachtet, dass die durch die modifizierte Ugi-Reaktion synthetisierten 2,5-DKPs eine spezifische antiproliferative Wirkung aufweisen und somit als potenzielle Wirkstoffkandidaten für die Behandlung von unbeabsichtigten T-Zell-vermittelten Autoimmunantworten von großem Interesse sind. Auf Basis dieser Multikomponentenreaktion wurde deshalb eine kleine Substanzbibliothek aufgebaut um Struktur-Wirkungsbeziehungen für diese anti-proliferativen Wirkstoffe abzuleiten und sehr gut wirksame Derivate aufzufinden.

* Dieses Kapitel wurde bereits publiziert; siehe Lit. [82].

4.1 Synthese

Die Synthese von hoch substituierten 2,5-DKPs erfolgt gewöhnlich in zwei Reaktionsschritten, die zunächst mit einer klassischen Dipeptidsynthese (Schema 5, Variante A)^[88, 89] oder der Synthese eines Dipeptids *via* Ugi-Reaktion (Schema 5, Variante B)^[83, 90] beginnt, und der sich in beiden Fällen eine Entschützung sowie eine zyklisierende Amidierung anschließt.

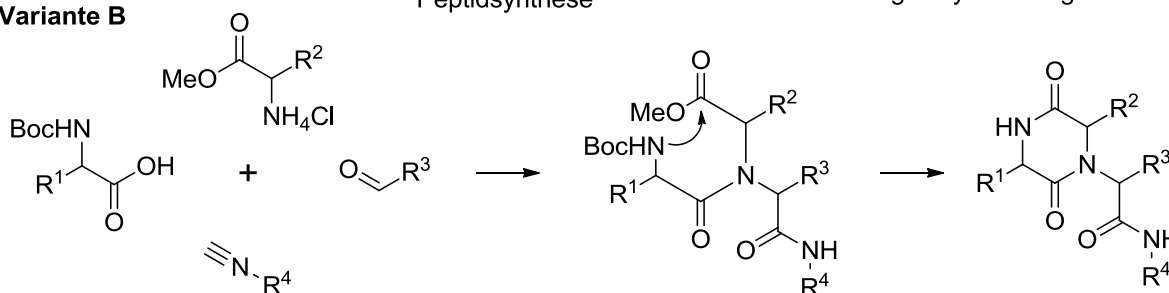
Variante A



1. Schritt:
Peptidsynthese

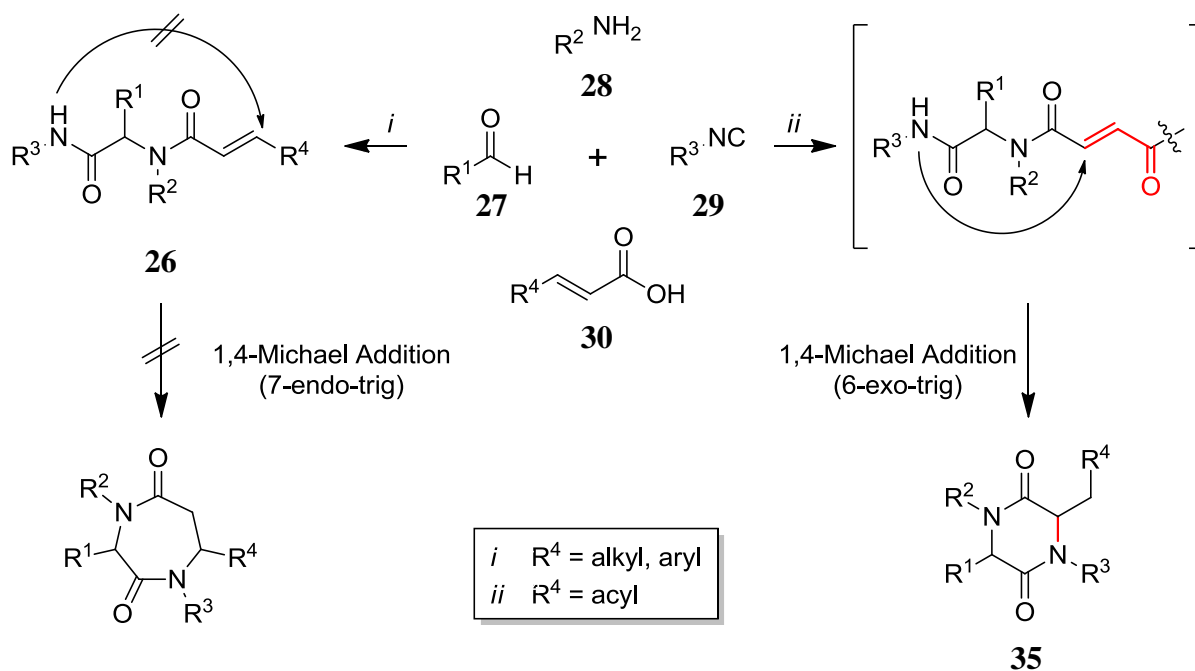
2. Schritt:
Entschützung & Zyklisierung

Variante B



Schema 5: Die beiden klassischen Syntheserouten zu substituierten 2,5-Diketopiperazinen verlaufen mehrstufig über die Ausbildung zweier Peptidbindungen.

Während die Umsetzung von Aldehyden mit Aminen, Isocyaniden und α,β -ungesättigten Carbonsäuren in der Ugi-Reaktion normal zu α -Acylaminocarboxamiden (**26**) führt (Schema 6), lässt sich die bekannte Multikomponentenreaktion durch Variation der Säurekomponente so modifizieren, dass 2,5-DKPs bereits nach einstufiger Synthese entstehen. Durch die Verwendung von β -Acyl-substituierten Acrylsäurederivaten enthält das gebildete „Ugi-Produkt“ ein Michael-System, das in einer intramolekularen aza-1,4-Michael-Addition, klassifiziert als 6-exo-trig, zum zyklischen Diketopiperazin (**35**) reagiert. Dahingegen reagieren Ugi-Produkte, die auf Basis von α,β -ungesättigten Carbonsäuren synthetisiert wurden und ebenfalls ein Michael-System enthalten, nicht in der analogen 7-endo-trig Reaktion zum 7-gliedrigen Bislactam (Schema 6). Für die Ringschlussreaktion ist also das doppelte Michael-System der Butendion-Einheit essenziell, das über jedes beliebige β -Acyl-substituierte Acrylsäurederivat eingefügt werden kann.



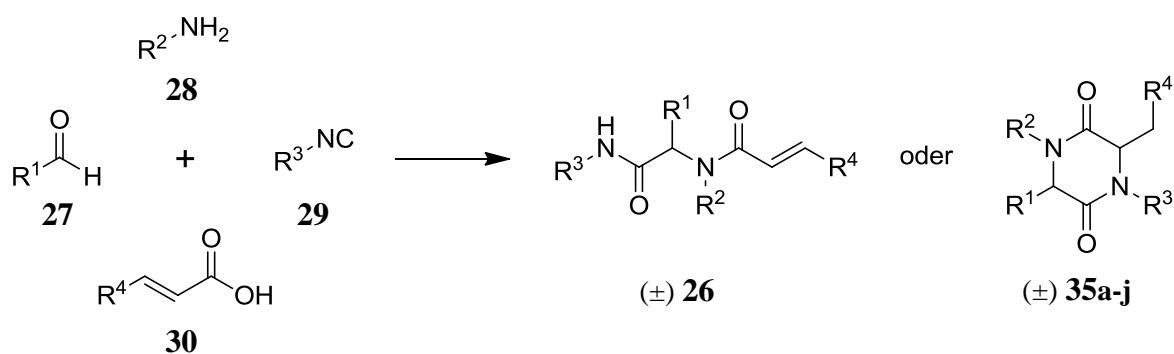
Schema 6: Die Ugi-4-Komponenten Reaktion mit α,β -ungesättigten Carbonsäuren (Typ *i*) liefert α -Acylaminocarboxamide, die trotz enthaltenem Michael-System keine 7-endo-trig Ringschlussreaktion zum 7-gliedrigen Lactam vollziehen. Wird die Ugi-Reaktion dagegen mit β -Acyl substituierten Acrylsäurederivaten durchgeführt (Typ *ii*), reagiert das Ugi-Produkt in einer 6-exo-trig Michael-Addition weiter zum entsprechenden 2,5-DKP. Modifiziert nach Lit. [82].

Die einstufige Ugi/Aza-Reaktion zu 2,5-DKPs kann sowohl mit Aldehyden^[91] als auch mit Ketonen^[92] durchgeführt werden, wobei bisher beschrieben wurde, dass die Bestrahlung mit Mikrowellen für den finalen Ringschluss zwingend erforderlich ist. Die Umsetzung war darüber hinaus ausschließlich für Alkyl- und Benzylisocyanide genutzt worden, die beide für gute Ausbeuten in Ugi-Reaktionen bekannt sind.

Die zur Analyse der anti-proliferativen Eigenschaften von Diketopiperazinen synthetisierten Derivate wurden hingegen auf Basis des hydrophilen *p*-Toluolsulfonylmethylisocyanid (TosMIC) hergestellt. Zwar ist bekannt, dass TosMIC in Ugi-Reaktionen eine geringe Reaktivität besitzt^[93, 94] und die Umsetzung zu 2,5-DKPs damit deutlich anspruchsvoller ist, doch bringt dessen Verwendung auch einige Vorzüge mit sich. Zum einen sind stark lipophile Verbindungen für unspezifische Wechselwirkungen und damit ungewollte Nebeneffekte bekannt.^[95] Zum anderen müssen die zu testenden Substanzen für Bioaktivitätsanalysen ein Mindestmaß an Wasserlöslichkeit besitzen. Mit seiner polaren und weithin inerten Sulfon-Gruppe ist TosMIC ideal als Synthesebaustein geeignet, um die Polarität und Wasserlöslichkeit in Diketopiperazinen zu erhöhen.

Um den Einfluss der β -Acylgruppe in Acrylsäuren auf den Reaktionsverlauf bei der Umsetzung mit Aldehyden, Aminen und Isocyaniden aufzuklären, wurde 2-Brombenzaldehyd (**27a**) mit 3-(Aminomethyl)pyridin (**28j**), TosMIc (**29f**) und Zimtsäure (**30a**) zur Reaktion gebracht. Wie erwartet, wurde dabei das azyklische Produkt der Ugi-Reaktion **26n** isoliert. Das Ersetzen von Zimtsäure durch die sich lediglich um einen Carbonylfunktion unterscheidende Benzoylacrylsäure (**30f**) lieferte hingegen das zyklische 2,5-DKP-Derivat **35a** (Schema 6).

Es wurde eine kleine Serie verschiedener Derivate von Verbindung **35a** hergestellt (Tabelle 8). Zu bemerken ist, dass alle Reaktionen zwischen Raumtemperatur und 75 °C in Methanol ohne die Verwendung von Mikrowellenstrahlung durchgeführt wurden. Vielmehr konnte keine der ausgeführten Synthesen von der Durchführung in Wasser oder der Umsetzung unter Mikrowelleneinfluss profitieren, die für die Synthese von 2,5-DKPs auf Basis von Fumarsäure beschrieben waren.^[91] Die bei der Synthese der Diketopiperazine erzielten moderaten Ausbeuten werden auf die erläuterte geringe Reaktivität von TosMIc zurückgeführt, stehen jedoch in Einklang mit verwandten Multikomponentenreaktionen, die mit TosMIc durchgeführt wurden.^[96]



#	R ¹	R ²	R ³	R ⁴	Produkt	<i>cis:trans</i>	[%]
1	2-Br-Ph (27a)	Pyridin-3ylmethyl (28j)	Tosylmethyl (29f)	Ph (30a)	(±) 26n	-	17
2	2-Br-Ph (27a)	Pyridin-3ylmethyl (28j)	Tosylmethyl (29f)	Benzoyl (30f)	(±) 35a	1.6:1	35 ^b
3	Ph (27b)	Pyridin-3ylmethyl (28j)	Tosylmethyl (29f)	Benzoyl (30f)	(±) 35b	<i>trans</i> ^a	45
4	2-Cl-Ph (27c)	Pyridin-3ylmethyl (28j)	Tosylmethyl (29f)	Benzoyl (30f)	(±) 35c	2.2:1	35 ^b
5	2-I-Ph (27d)	Pyridin-3ylmethyl (28j)	Tosylmethyl (29f)	Benzoyl (30f)	(±) 35d	1:1	43 ^b

#	R ¹	R ²	R ³	R ⁴	Produkt	<i>cis:trans</i>	[%]
6	4-F-Ph (27e)	Pyridin-3ylmethyl (28j)	Tosylmethyl (29f)	Benzoyl (30f)	(±) 35e	<i>trans</i> ^a	42
7	Ph (27b)	Bn (28c)	Tosylmethyl (29f)	Benzoyl (30f)	(±) 35f	<i>trans</i> ^a	55
8	Ph (27b)	Phenethyl (28k)	Tosylmethyl (29f)	Benzoyl (30f)	(±) 35g	<i>trans</i> ^a	12
9	Ph (27b)	4-MeO-Bn (28l)	Tosylmethyl (29f)	Benzoyl (30f)	(±) 35h	<i>trans</i> ^a	39
10	Ph (27b)	Pyridin-3ylmethyl (28j)	Tosylmethyl (29f)	4-Cl-Benzoyl (30g)	(±) 35i	<i>trans</i> ^a	37
11	Ph (27b)	Pyridin-3ylmethyl (28j)	Tosylmethyl (29f)	4-MeO-Benzoyl (30h)	(±) 35j	<i>trans</i> ^a	36

Tabelle 8: Das azyklische Ugi Produkt **26n** und die synthetisierten 2,5-Diketopiperazine **35a-j**. ^a Das *trans*-Produkt präzipitierte aus der Reaktionslösung; ^b Angegeben ist die Ausbeute der rein isolierten Diastereomerenmischungen. Modifiziert nach Lit. [82].

Die Stereochemie der synthetisierten 2,5-DKPs wurde in Bezug auf die Konfiguration der Substituenten an C-3 und C-6 untersucht (Abb. 30). Sind beide Substituenten *trans*-ständig orientiert, lässt sich eine NOESY-Korrelation zwischen dem Proton an C-3 und den an C-6 gebundenen Metylenprotonen (Abb. 30, Korrelation I) und/oder dem Proton an C-6 und den *ortho*-Protonen des Phenylsubstituenten an C-3 (Abb. 30, Korrelation II) beobachten. Sind die Substituenten dagegen *cis*-konfiguriert, lässt sich eine NOESY-Korrelation zwischen dem Proton an C-6 und den *ortho*-Protonen des Phenylsubstituenten an C-3 beobachten (Abb. 30, Korrelation III).^[97]

Die Kristallstruktur von **35b** (Abb. 30) bestätigt sowohl die mittels NMR-Spektroskopie ermittelte 2,5-DKP-Konstitution als auch die relative Konfiguration der Stereozentren. Die Substituenten an C-3 und C-6 des nahezu flachen DKP-Rings sind wie erwartet *trans*-konfiguriert.

Während die Mehrzahl der synthetisierten 2,5-DKPs aus der Reaktionslösung ausfielen, mussten die Verbindungen **35a**, **35c** und **35d** mittels Säulenchromatographie isoliert werden. In den Fällen, in denen die Produkte ausgefallen sind, wurden interessanter Weise stets nur die *trans*-Diastereomere isoliert. Die Analyse von zwei repräsentativen Reaktionslösungen (**35b** und **35j**) zeigte kein *cis*-Produkt. Bei der Synthese zu Verbindung **35a**, **35c** und **35d** wurden Diastereomerenmischungen mit *cis:trans*-Verhältnissen von 1:1 bis 1:2 (ermittelt *via* Integration der ¹H-NMR Signale der Protonen an C-3) erhalten. Durch eine zweite säulen-

chromatographische Trennung an Flash-Kieselgel konnten die Diastereomere voneinander getrennt werden.

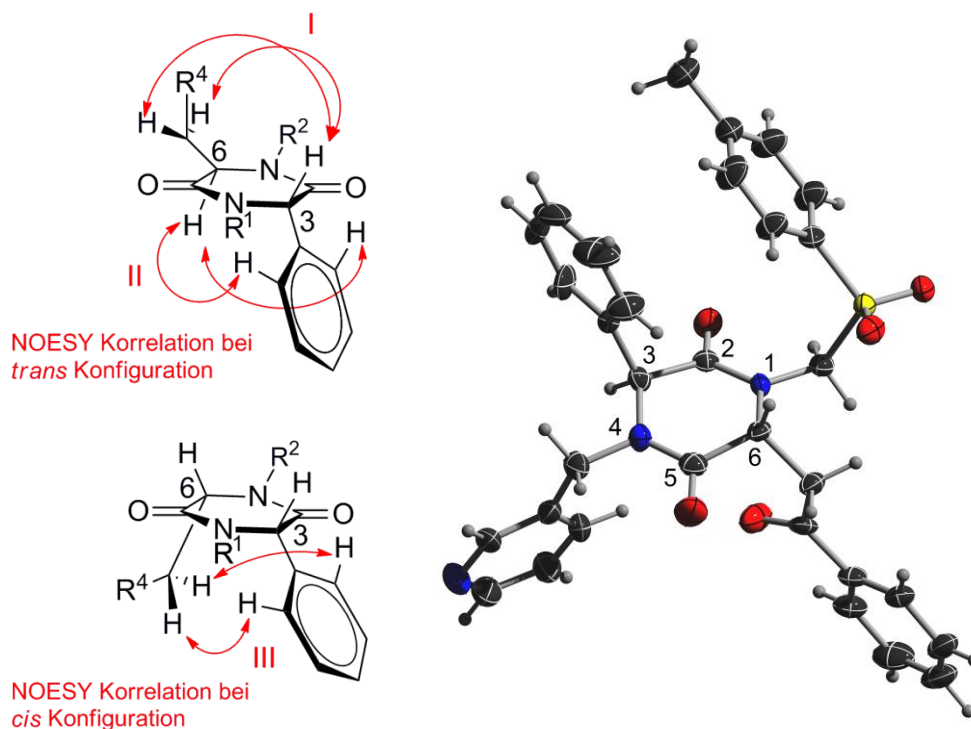


Abbildung 30: Durch die NOESY Korrelationssignale lässt sich die Konfiguration des DKP-Gerüsts mittels NMR-Spektroskopie bestimmen. I, II: *trans*; III: *cis* (links).^[97] Die Röntgenkristallstruktur^[98] von Verbindung **35b** zeigt die *trans*-Konfiguration der Substituenten an C-3 und C-6 (links). Modifiziert nach Lit. [82].

4.2 Bioaktivitätsanalyse

Um die anti-proliferative Aktivität weiter zu untersuchen, die für 2,5-DKPs bereits an Krebszelllinien beobachtet werden konnte,^[99, 100] wurden aktivierte T-Zellen verwendet. Diese nehmen zum einen eine zentrale Rolle bei der adaptiven Immunantwort ein, die unter anderem die körpereigene Abwehr gegen krankhaft veränderte Zellen auslösen kann, sind aber auch bei der Aktivierung von dysregulierten Immunantworten wie Entzündungsreaktionen, Autoimmunerkrankungen oder Abstoßungsreaktionen von Transplantaten beteiligt.^[101, 102] Als Positiv-Kontrolle wurde für die Aktivitätsanalyse der HSP90-Inhibitor 17-Dimethylaminoethylamino-17-demethoxygeldanamycin (17-DMAG, **4b**) verwendet, der selektiv die Proliferation von aktivierten T-Zellen inhibiert.^[103]

Gereinigte humane T-Zellen wurden zunächst durch Co-Kultivierung mit allogenen dendritische Zellen unter physiologischen Bedingungen aktiviert und anschließend für 24 h mit unterschiedlichen Konzentrationen der synthetisierten 2,5-DKPs, 17-DMAG und einer DMSO-Kontrolle inkubiert. Die Proliferation der aktivierten humanen T-Zellen wurde über die Aufnahme von [³H]-Thymidin gemessen (Tabelle 9). Zur Bestimmung der Zytotoxizität wurden ruhende T-Zellen für 24 h mit den entsprechenden Konzentrationen der 2,5-DKP-Derivate, 17-DMAG und der DMSO-Kontrolle inkubiert und die Apoptoserate anschließend *via* Annexin V+/7-AAD+-Anfärbung ermittelt (Tabelle 9).

Verbindung	Konz [μM]	Effekt auf die Proliferation ^{a,b}	Zytotox. ^{c,d}	Verbindung	Konz [μM]	Effekt auf die Proliferation ^{a,b}	Zytotox. ^{c,d}
DMAG	0.5	54.3 (3.0)	-	<i>cis</i> -35d	1	101.6 (12.1)	-
	2	41.6 (2.6)	-		5	80.8 (3.3)	-
	5	43.9 (1.7)	2.9 (1.8)		10	75.1 (9.1)	-
	10	37.0 (2.2)	9.9 (3.1)		20	58.8 (7.6)	-
<i>cis</i> -35a	1	92.9 (2.5)	-	50	48.5 (7.4)	1.7 (1.1)	
	5	100.2 (15.3)	-	<i>trans</i> -35d	1	87.8 (18.0)	-
	10	86.2 (14.2)	-		5	60.7 (15.3)	-
	20	67.8 (8.3)	0.4 (0.9)		10	44.3 (17.4)	-
50	44.8 (6.1)	11.7 (6.4)	20		34.1 (14.8)	-	
<i>trans</i> -35a	1	86.4 (16.0)	-	50	25.6 (11.3)	-	
	5	59.5 (8.3)	-	<i>trans</i> -35e	10	68.1 (6.4)	-
	10	43.3 (4.3)	-		20	79.1 (6.3)	-
	20	24.0 (2.3)	-		50	63.7 (8.0)	-
50	11.0 (1.3)	2.4 (1.2)	<i>trans</i> -35f		10	92.1 (8.5)	-
10	64.2 (6.7)	-		20	93.4 (9.7)	-	
20	54.8 (3.2)	-		50	68.6 (3.5)	-	
50	30.0 (2.7)	1.7 (0.3)		<i>trans</i> -35g	10	66.4 (2.5)	7.0 (1.3)
<i>cis</i> -35c	1	94.9 (11.3)	-		20	71.4 (4.4)	12.5 (2.3)
	5	86.2 (9.8)	-		50	74.2 (9.5)	14.0 (4.2)
	10	68.6 (11.5)	-		<i>trans</i> -35h	10	58.7 (5.0)
	20	62.0 (5.1)	-	20		49.7 (4.2)	-
50	35.6 (4.8)	4.8 (1.2)	50	47.5 (2.9)		-	
<i>trans</i> -35c	1	80.4 (11.9)	-	<i>trans</i> -35i		10	29.9 (1.6)
	5	61.7 (8.5)	-		20	19.3 (2.6)	46.0 (2.2)
	10	41.5 (5.8)	-		50	12.5 (7.4)	30.4 (7.2)
	20	28.2 (4.8)	0.2 (0.2)		<i>trans</i> -35j	10	98.1 (9.2)
50	14.8 (3.2)	3.9 (1.7)	20	89.1 (8.0)		-	
			50	77.4 (6.5)		0.2 (1.0)	

Tabelle 9: ^a Prozentuale [³H]-Thymidin-Aufnahme rel. zur DMSO Kontrolle; ^b Mittelwerte von mindestens 4 unabhängigen Dreifach-Messungen; ^c Spezifische Apoptose von ruhenden T-Zellen in %; ^d Mittelwerte von mindestens 4 unabhängigen Zweifach-Messungen. Modifiziert nach Lit. [82].

Während die 2,5-*trans*-DKPs **35f**, **35g** und **35j** auch bei Konzentrationen von 50 μM nur einen schwachen Effekt ($\geq 75\%$) auf die Proliferation von aktivierten T-Zellen zeigen, inhibieren die Verbindungen *cis*-**35a**, *trans*-**35b**, *cis*-**35c**, *cis*-**35d** und *trans*-**35h** die Proliferation bei 20 μM bereits bis zur Hälfte (49–68 %) bezogen auf die DMSO-Kontrolle (Tabelle 9). Die *trans*-konfigurierten Diketopiperazine **35a**, **35c**, **35d** und **35i** unterdrücken die Proliferation von aktivierten T-Zellen bei Wirkstoffkonzentrationen von 20 μM bereits stärker als die höchste getestete 17-DMAG Konzentrationen (10 μM) und liegen bei äquivalenten Konzentrationen in der Größenordnung der Positiv-Kontrolle (Abb. 31). Vergleicht man die Diastereomerenpaare von **35a**, **35c** und **35d**, die sich lediglich durch die unterschiedliche Stellung der Substituenten unterscheiden, so zeigt sich, dass die *trans*-konfigurierten DKPs stets deutlich aktiver sind als ihre entsprechenden *cis*-Analoge. Die aktivste Verbindung der synthetisierten Serie an 2,5-DKP-Derivaten ist *trans*-**35i**.

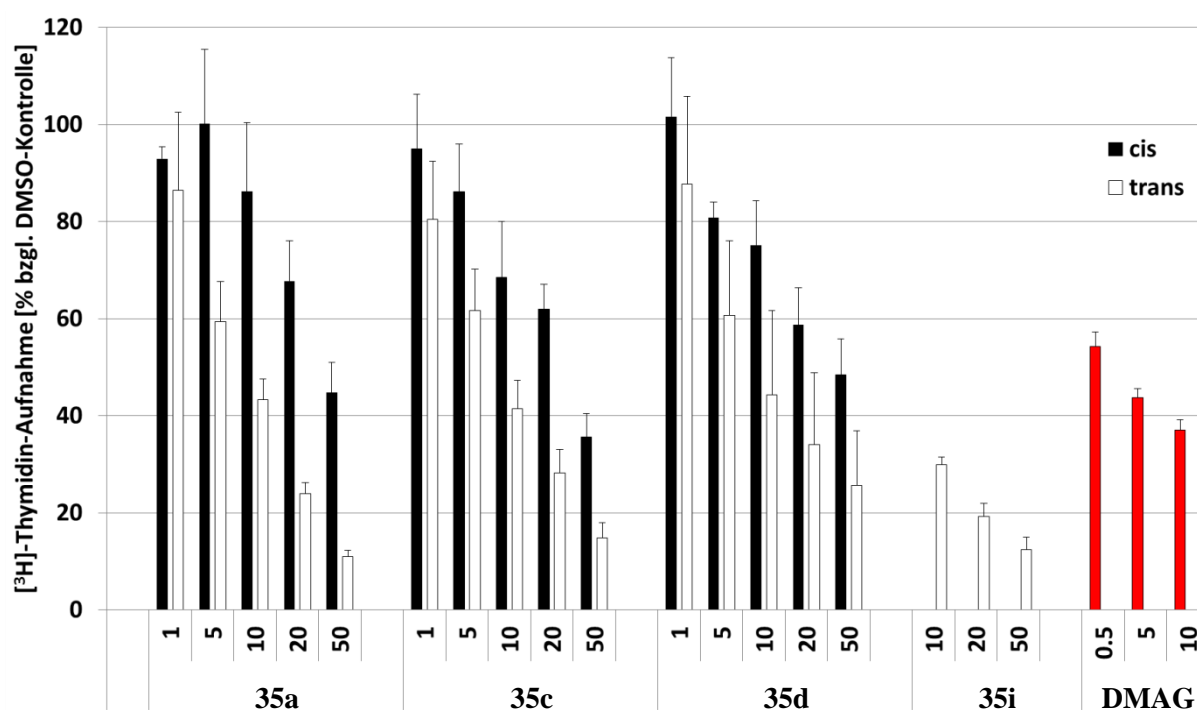


Abbildung 31: Aktivierte humane T-Zellen wurden für 24 h mit den angegebenen Konzentrationen der synthetisierten *cis*- (schwarze Balken), *trans*-2,5-DKPs (weisse Balken) oder 17-DMAG (rote Balken) inkubiert und anschließend die Proliferation mittels [^3H]-Thymidin-Aufnahme gemessen. Modifiziert nach Lit. [82].

Die Analyse der Struktur-Wirkungsbeziehung zeigt darüber hinaus, dass Brom- und Chlorsubstituenten in Position 2 (R^1) zu Diketopiperazinen mit stärkerem anti-proliferativen Effekt führen ($\text{Br} \approx \text{Cl} > \text{I} > \text{H} > \text{F}$). Im Hinblick auf den Einfluss von R^2 zeigt sich, dass die polaren Pyridinylmethyl- und Methoxybenzyl-Substituenten vorteilhafter sind als die lipophile

Benzyl- und Phenethylgruppe. Der Vergleich der unterschiedlichen Substituenten ergibt für R⁴ eine klare Präferenz für den Chlorbenzoylrest (Cl-Benzoyl > Benzoyl > MeO-Benzoyl).

Um die spezifische Aktivität an aktivierten T-Zellen von unspezifisch toxischen Effekten abzugrenzen, wurde die Wirkung der synthetisierten 2,5-DKPs auf ruhende T-Zellen untersucht (Tabelle 9). Dabei zeigte sich, dass die Verbindungen *trans*-**35d**, *trans*-**35e** und *trans*-**35f** bei keiner der getesteten Konzentrationen Apoptose der ruhenden T-Zellen auslöst. Die nur bei hohen Konzentrationen von *cis*- und *trans*-**35a**, *cis*- und *trans*-**35c** sowie von *cis*-**35d** induzierte Apoptose ist vernachlässigbar gering und fällt in allen Fällen niedriger aus als die der DMAG-Referenz. Demgegenüber zeigten alle verwendeten Konzentrationen von *trans*-**35g** und **35i** eine moderate bzw. erhöhte Apoptoseinduktion der ruhenden T-Zellen. Der anti-proliferative Effekt auf aktivierte T-Zellen ist zwar sowohl für Verbindungen **35g** als auch **35i** deutlich ausgeprägter als die induzierte Apoptose, dennoch muss davon ausgegangen werden, dass ein Teil der gemessenen Aktivität auf zytotoxische Effekte zurückzuführen ist.

Abschließend lässt sich zusammenfassen, dass die *trans*-2,5-DKPs **35a**, **35c** und **35d** die Proliferation von aktivierten T-Zellen dosisabhängig, spezifisch und signifikant reduzieren (Abb. 31) und damit vorausgegangene Untersuchungen bestätigen, die ebenfalls zeigten, dass 2,5-DKPs die Proliferation verschiedener stark proliferierender Zellen zu unterdrücken vermögen.^[99, 100]

5 Entwicklung neuartiger HSP70-Inhibitoren

Im Gegensatz zu den bisherigen HSP70-Inhibitoren, die entweder mit der NBD- oder der SBD-Region von HSP70 interagieren (Abb. 9, 11 und 12), sollte im Kontext dieser Arbeit für das Design neuartiger Inhibitoren erstmals der Interdomän-Linker adressiert werden. Verglichen mit einer Hemmung von HSP70 durch Interaktion mit der NBD oder SBD lässt dieser Ansatz spezifischer wirksame Inhibitoren erwarten. Grund für diese Annahme ist die Tatsache, dass ATP-Bindestellen in einer Vielzahl von Proteinen vorhanden sind und daher eine selektive Inhibition von HSP70 durch Blockade der NBD nur schwer zu erzielen ist. Dies gilt in gleicher Weise für eine spezifische Interaktion von Inhibitoren mit der SBD-Region, da zu den HSP70-Clients zahlreiche unterschiedliche Proteine zählen. Die Erkenntnisse aus der Entwicklung von Ver-15508 (**18**) unterstützt diese Auffassung. Die Autoren schlussfolgerten ebenfalls, dass sich die Entwicklung potenter, selektiver und *in vitro* aktiver Inhibitoren sowohl an der NBD als auch an der hochgradig polaren SBD äußerst anspruchsvoll darstellt.^[64] Demgegenüber stellt die Interdomänen-Region, die auf essenzielle Weise in die allosterische Kommunikation zwischen NBD und SBD involviert ist,^[57] ein attraktiveres Ziel für eine pharmakologische Intervention dar.

5.1 Inhibitorentwicklung nach rationalem Wirkstoff-Design

Ausgangspunkt für die Entwicklung neuartiger HSP70-Inhibitoren waren detaillierte Untersuchungen der Proteinstruktur, die mittels computergestützter Methoden in der Arbeitsgruppe Sotriffer (U. Peinz, D. Zilian) durchgeführt wurden. An der Kristallstruktur des bovinen HSC70, das mit der humanen Isoform eine hohe Sequenzhomologie aufweist, wurde zunächst das Interdomänen-Interface auf seine Eignung als Bindestelle analysiert. Auf Basis einer geometrischen Analyse wurde dazu die Topologie der Proteinoberfläche untersucht und die Zahl potenzieller Kontaktstellen für eine Ligand-Interaktion ermittelt (Abb. 32A). Nachdem dabei reproduzierbar die Interface-Region als potenziell geeignete Bindestelle aufgefunden wurde, wurde eine Untersuchung der physikochemischen Wechselwirkungsmöglichkeiten innerhalb der Bindetasche und die Generierung eines Pharmakophormodells angeschlossen. Auf Basis der berechneten Hotspots für Akzeptor- und Donor-Gruppen von Wasserstoffbrückenbindungen sowie für aromatische Systeme wurde ein Pharmakophormodell entwickelt, das aus neun Pseudozentren für verschiedene Wechselwirkungstypen besteht (Abb. 32B).

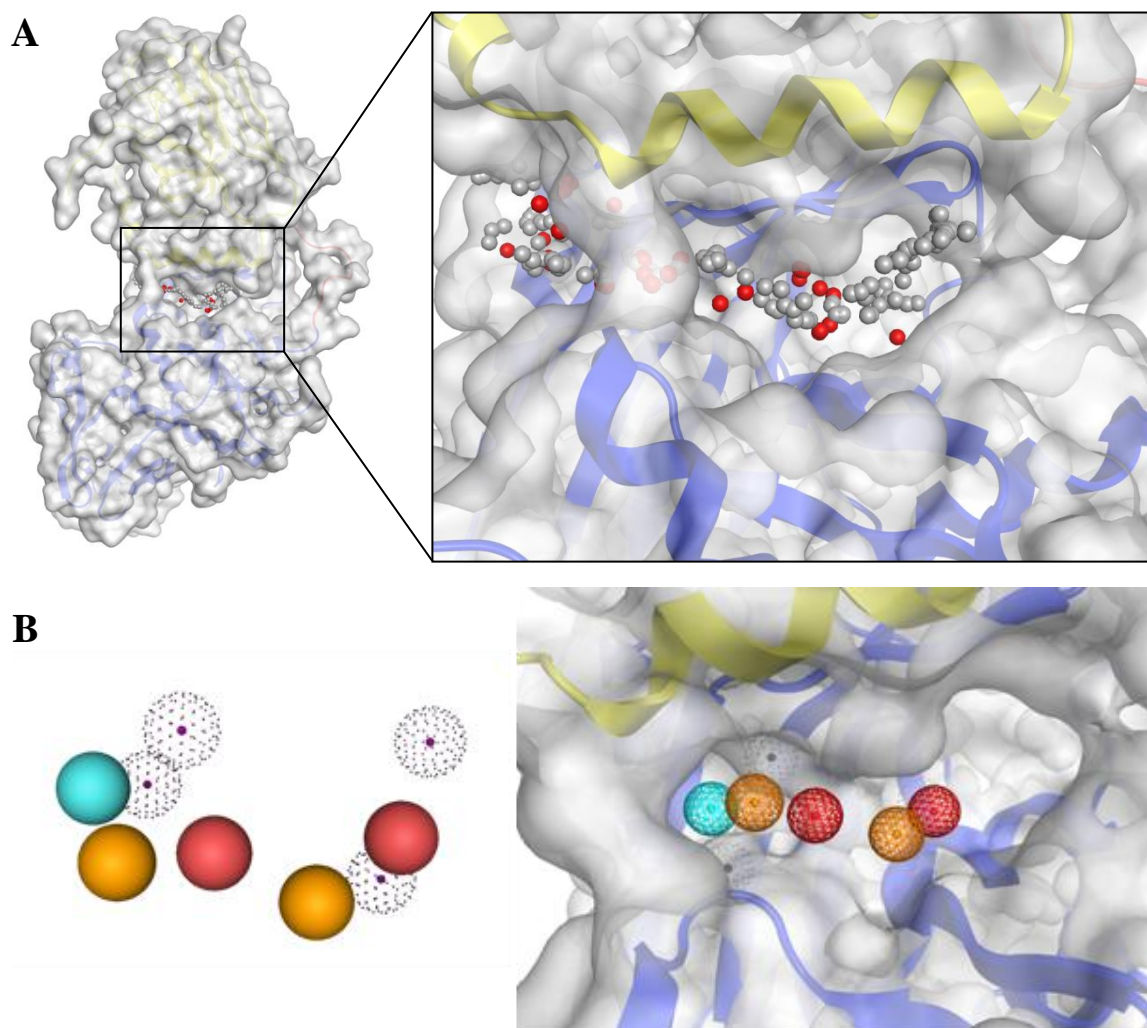


Abbildung 32: **A:** Das HSP70-Interdomänen-Interface bietet zahlreiche potenzielle Interaktionsstellen, die wenig exponiert im abgeschirmten Proteininneren liegen (graue Orbitale: hydrophobe Wechselwirkungspositionen; rote Orbitale: Positionen hydrophiler Wechselwirkungen). **B:** Die Bestandteile des Pharmakophormodells und deren Positionierung im Interdomänen-Interface (orange Orbitale: aromatische Eigenschaft; rote Orbitale: Donor-/Akzeptor-Funktion für H-Brücke; cyanes Orbital: Donor-Funktion für H-Brücke; gepunktete Orbitale: projizierte Donor-/Akzeptor-Funktion auf der Proteinoberfläche). Den Abbildungen liegt die Kristallstruktur des bovinen HSC70 zu Grunde (pdb 1YUW).^[57]

Den Kern des Pharmakophormodells stellen zwei aromatische Regionen dar, die gemäß der Hotspot-Analyse im Zentrum des Interdomänen-Interface liegen. Daneben sind zwei Regionen enthalten, die sowohl Donor- als auch Akzeptorfunktionen für Wasserstoffbrückenbindungen repräsentieren und die Ausbildung hydrophiler Wechselwirkungen zwischen Pharmakophor und Proteinstruktur erlauben. Zusätzlich liegt im linken Bereich des Interdomänen-Interface (betrachtet aus der in Abb. 32, B dargestellten Perspektive) eine Region, die von einer Wasserstoffbrücken-Donorfunktion besetzt sein soll. Neben diesen fünf regulären Regionen enthält das Pharmakophormodell vier weitere „projizierte Features“, die

auf der Proteinoberfläche liegen. Sie stellen unter anderem die korrekte Orientierung von funktionellen Gruppen eines Liganden sicher, die für gerichtete Wechselwirkungen mit der Proteinoberfläche notwendig ist.

Zusätzlich zu diesem strukturbasierten Pharmakophormodell wurde durch den Kooperationspartner ein zweiter ligandbasierter Ansatz gewählt. Grundlage dafür waren neue Erkenntnisse über die mögliche Bindestelle von Apoptozol (**17**) an HSP70. Während **17** sowohl erfolgreich an die NBD-, die SBD- und die Interdomänen-Region gedockt werden kann, erscheint das Interdomänen-Interface nach Sottriffer *et al.* allerdings als plausibelste Bindestelle. Um eine Suche nach ähnlichen Liganden durchzuführen, wurde von Apoptozol (**17**) ein nicht-linearer Diskriptor (Feature Tree) generiert, der die enthaltenen funktionellen Gruppen sowie deren relative Anordnung repräsentiert und sich daher für einen zeiteffizienten Datenbankabgleich eignet.

Aufbauend auf dem strukturbasierten und dem ligandbasierten Ansatz wurde ein Screening nach potenziellen HSP70-Inhibitoren durchgeführt. Dabei kam eine modifizierte Version der ZINC-Datenbanken^[104] mit $2.9 \cdot 10^6$ Verbindungen sowie eine zweite Datenbank mit potenziellen Leitstrukturen mit $6.5 \cdot 10^5$ Verbindungen zum Einsatz. Die daraus resultierten 454 virtuellen „Hits“ wurden einem ausführlicheren Docking unterzogen und die erhaltenen Posen mit einem Scoring-Algorithmus bewertet. Nach visueller Prüfung von 55 ausgewählten Verbindungen wurden die neun vielversprechendsten für eine *In-vitro*-Testung ausgewählt und käuflich erworben.

Dazu wurde in der Arbeitsgruppe Chatterjee (E. Müller) das Vermögen dieser kommerziellen Substanzen geprüft, Apoptose in MM-Zellen auszulösen, was auch nach HSP70-Knockout beobachtet werden konnte.^[45] Während vier Verbindungen eine Wirksamkeit im zweistellig mikromolaren Bereich aufwiesen ($EC_{50} = 17\text{--}90 \mu\text{M}$), zeigte Verbindung **24a** mit Abstand die höchste Antitumor-Aktivität ($EC_{50} = 0.7 \mu\text{M}$) (Abb. 33). Das Tetrahydroisoquinolinon-Derivat **24a** bildete daher die Grundlage für die im Rahmen dieser Arbeit entwickelte Substanzbibliothek, mit Hilfe derer Struktur-Wirkungsbeziehungen abgeleitet werden sollten.

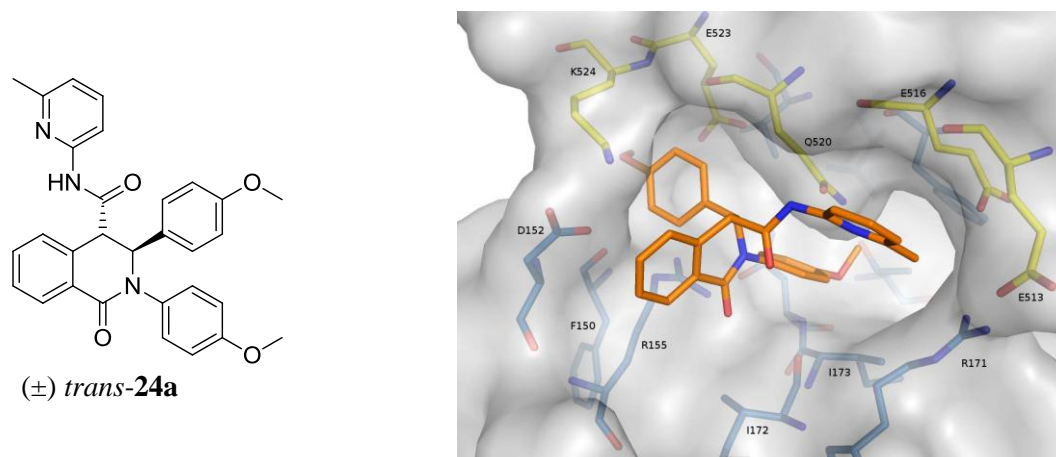


Abbildung 33: Das Tetrahydroisoquinolinon-Derivat **24a** zeigte die höchste Antitumor-Aktivität bei der Behandlung von MM-Zellen und passt im berechneten Bindemodus sehr gut in das Interdomänen-Interface von HSP70.

5.2 Retrosynthetische Betrachtung des virtuellen Screening Hits

Bei der Wahl einer geeigneten Syntheseroute zu einem Wirkstoffmolekül sind in der medizinischen Chemie verschiedene Aspekte zu beachten. So spielt die Flexibilität und die Anzahl der Syntheseschritte eine entscheidende Rolle für die Generierung einer Bibliothek verwandter Substanzen. Eine unter diesen Gesichtspunkten durchgeführte retrosynthetische Betrachtung von **24a** legt die initiale Spaltung des exozyklischen Amids nahe. Die resultierende Isochinolinon-Carbonsäure **36a** kann aus Homophthalsäureanhydrid (**37**) und dem entsprechenden Imin **38a** hergestellt werden. Durch die Spaltung des Imins in Aldehyd und Amin lässt sich die retrosynthetische Zerlegung des Screening-Hits in gängige Synthesebausteine vollenden (Abb. 34). Die Synthese der Zielverbindung kann so in nur drei Stufen realisiert werden und bietet darüber hinaus die Möglichkeit das Produkt durch Variation der Edukte einfach und flexibel zu modifizieren.

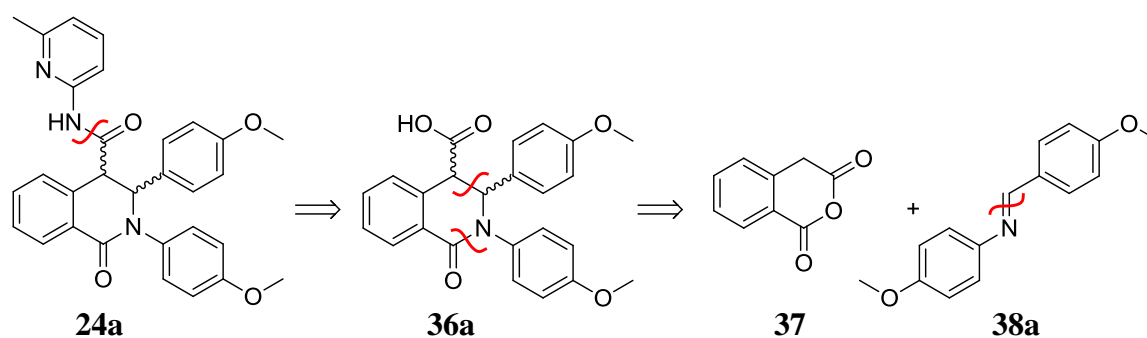
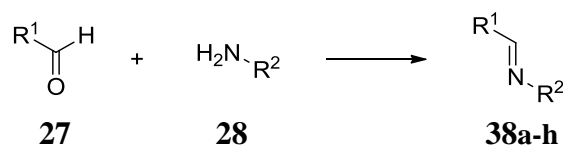


Abbildung 34: Die Retrosynthese von **24a** zeigt, wie das Zielmolekül in nur drei Schritten aus Homophthalsäureanhydrid, einem Aldehyd und zwei unterschiedlichen Aminen aufgebaut werden kann.

5.3 Aufbau einer Substanzbibliothek analoger Tetrahydroisochinolinone

5.3.1 Synthese verschiedener Arylaldimine

Die Synthese des Screening-Hits **24a** und analoger Derivate beginnt im ersten Schritt stets mit der Kondensationsreaktion von Aldehyden (**27**) und Aminen (**28**) zu den entsprechenden Iminen (**38**) (Tabelle 10). Während dabei klassischer Weise Lösungsmittel wie Dichlormethan^[105] oder Ethanol^[106] zum Einsatz kommen, wurde kürzlich eine neue Methode beschrieben, bei der Ethyllactat als Lösungsmittelbestandteil verwendet wird.^[107] Durch die Zugabe von Wasser zu Ethyllactat lässt sich die Polarität des Lösungsmittelgemisches perfekt für die Synthese einer Reihe von Arylaldiminen einstellen. Diese kristallisieren dann in sehr guten Ausbeuten und in hoher Reinheit direkt aus dem Lösungsmittel aus. Die obligatorische Aufreinigung durch Umkristallisation bei Verwendung konventioneller Lösungsmittel entfällt damit. Entsprechend dieser Methode wurden die Imine **38a** und **38e-h** hergestellt. Da bei der Synthese von **38b-d** auch nach Variation der Lösungsmittelverhältnisse keine Kristallisation der Produkte erreicht werden konnte, wurden diese klassisch in Ethanol hergestellt.



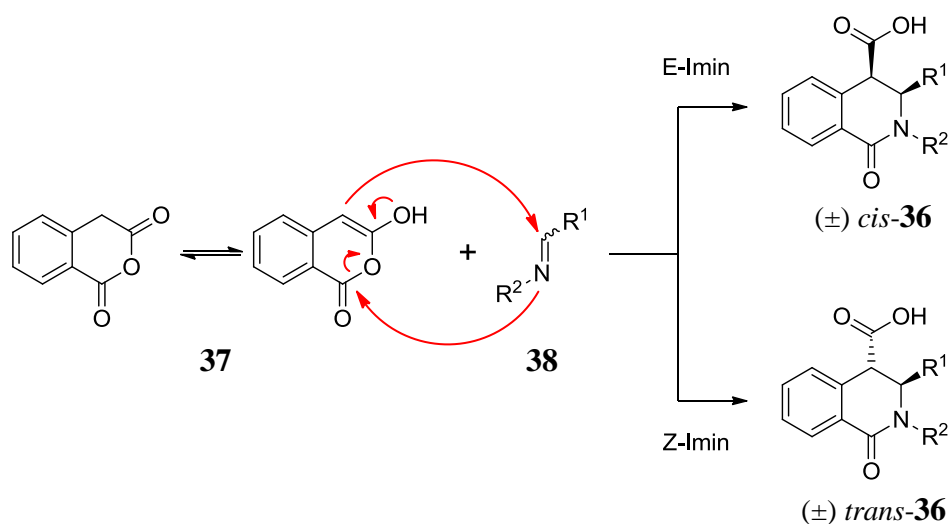
#	R ¹	R ²	Lösungsmittel	Produkt	[%]
1	4-MeO-Ph (27f)	4-MeO-Ph (28m)	Ethyllactat / H ₂ O (9 : 1)	38a	99
2	Ph (27b)	4-MeO-Ph (28m)	EtOH	38b	92
3	4-MeO-Ph (27f)	Ph (28n)	EtOH	38c	97
4	Ph (27b)	Ph (28n)	EtOH	38d	83
5	4-F-Ph (27g)	4-F-Ph (28o)	Ethyllactat / H ₂ O (8 : 2)	38e	94
6	4-Cl-Ph (27h)	4-Cl-Ph (28p)	Ethyllactat / H ₂ O (8 : 2)	38f	85
7	3,5-(Me) ₂ -Ph (27i)	3,5-(Me) ₂ -Ph (28q)	Ethyllactat / H ₂ O (8 : 2)	38g	97
8	4-MeO-Ph (27f)	4-PhO-Ph (28r)	Ethyllactat / H ₂ O (8 : 2)	38h	98

Tabelle 10: Synthese der unterschiedlich substituierten Imine **38a-h**.

5.3.2 Synthese von Isochinolinon-Carbonsäuren

Im zweiten Reaktionsschritt werden die Isochinolinon-Carbonsäuren (**36**) nach einer ursprünglich von Cushman *et al.* beschriebenen Reaktion durch Umsetzung von Homophthalsäureanhydrid (**37**) mit verschiedenen Imin-Derivaten (**38**) hergestellt.^[108, 109] Darauf aufbauend wurden in den vergangenen Jahren verschiedene Methoden beschrieben, die zu einer Steigerung der Stereoselektivität und der Ausbeute führen. Hierfür kommen beispielsweise Lewissäuren, protische Säuren, Basen, ionische Flüssigkeiten und heterogene Katalysatoren zum Einsatz.^[110-113] Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei dieser Methoden für die Herstellung der Isochinolinon-Carbonsäuren (**36**) verwendet.

Die direkte Umsetzung von **37** mit sterisch anspruchsvollen Iminen führt bereits ohne Auxiliare selektiv zur Bildung der *cis*-konfigurierten Carbonsäuren. Als Grund dafür wird vermutet, dass Imine, die aufgrund ihrer voluminösen Substituenten als *E*-Imine vorliegen, mit Homophthalsäureanhydrid zu *cis*-Carbonsäuren reagieren. Dagegen sollen *Z*-Imine bei direkter Umsetzung zu *trans*-substituierte Produkten führen (Schema 7). Eine schlüssige mechanistische Erklärung für diesen experimentell zu beobachtenden Reaktionsverlauf konnte bisher jedoch nicht erbracht werden.^[109]



Schema 7: Während die direkte Umsetzung von **37** mit *E*-Iminen generell zu *cis*-konfigurierten Isochinolinon-Produkten führt, liefern *Z*-Imine die entsprechenden *trans*-Produkte.

Bei der zweiten Methode handelt es sich um die bis dato einzige Methode, mit der eine selektive Synthese der entsprechenden *trans*-Produkte aus Arylaldiminen gelingt. Sie wurde von Vara *et al.* beschrieben und basiert auf der Verwendung von Diisopropylethylamin (DIPEA) und $TiCl_4$.^[111]

Der Mechanismus dieser Umsetzung wurde mit Hilfe von DFT-Berechnungen untersucht. Durch die nicht nukleophile Base DIPEA wird das Anhydrid zunächst zum entsprechenden Enolat deprotoniert, an das anschließend TiCl_4 bindet (Abb. 35, A). Bei der folgenden Anlagerung des Imins kann sich entweder ein halbsesselartiger (Abb. 35, B) oder ein bootförmiger Übergangszustand (ÜZ) (Abb. 35, C) ausbilden. Während der halbsesselartige ÜZ nach DFT-Berechnungen energetisch günstiger ist und zum *trans*-Produkt führt, würde der energiereichere bootförmige ÜZ das *cis*-Produkt liefern.^[111]

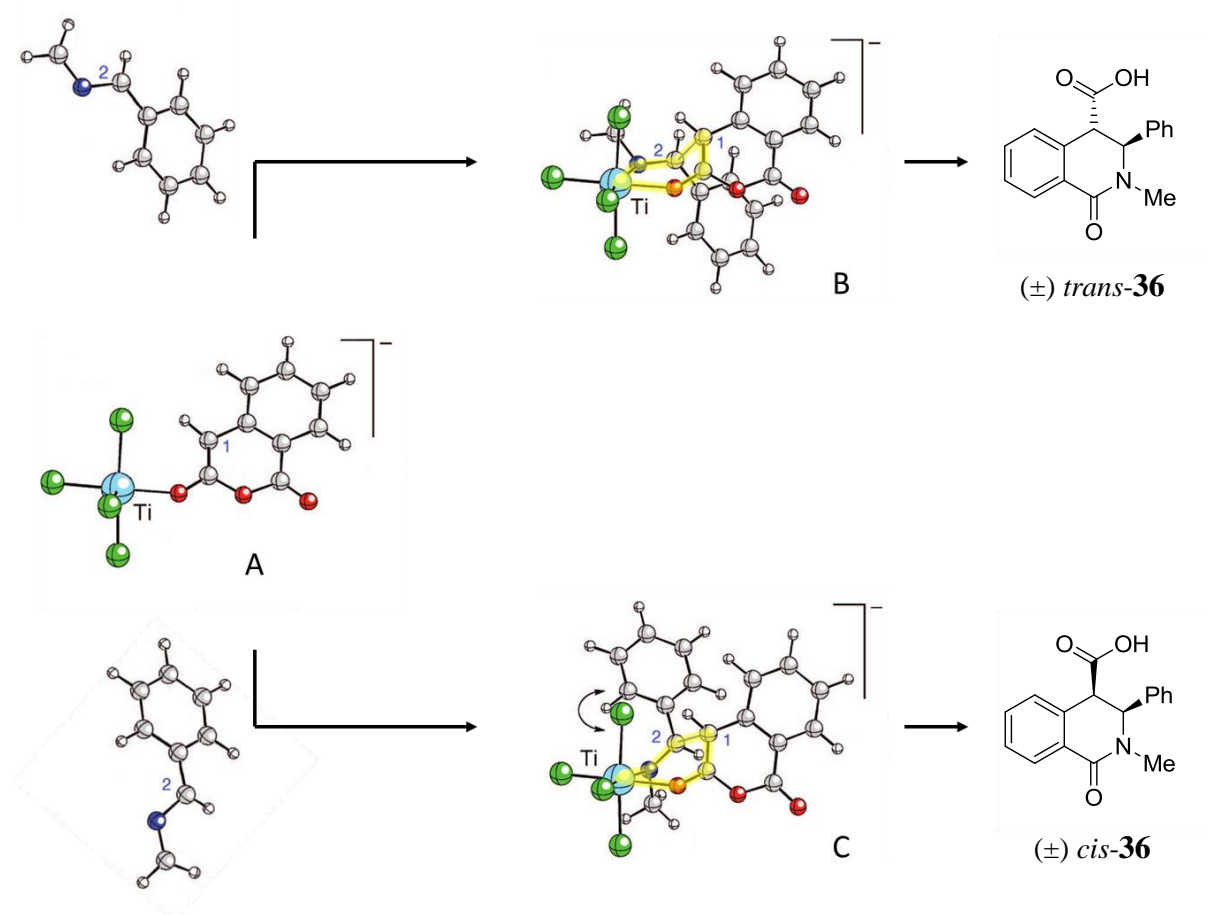
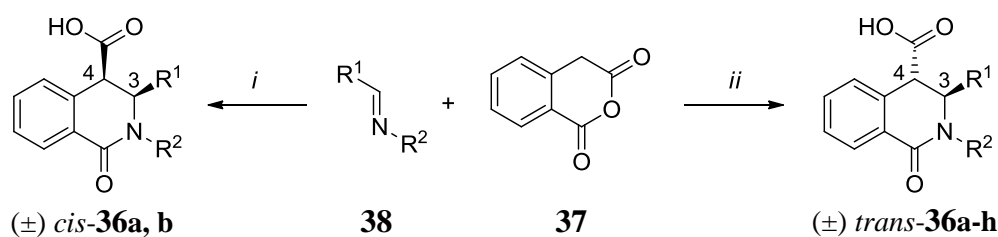


Abbildung 35: Mechanistische Studien mit Hilfe von DFT-Berechnungen. Wird die Umsetzung von Homophthalsäureanhydrid mit Iminen in Anwesenheit von TiCl_4 durchgeführt, kann sich ein halbsesselartiger ÜZ (B) oder ein bootförmiger ÜZ (C) ausbilden. Der energetisch günstigere Zustand B führt dabei zu *trans*-Produkten. Adaptiert mit Genehmigung von Lit. [111]. Copyright 2008 American Chemical Society.

Die Konfiguration des erhaltenen Produkts lässt sich NMR-spektroskopisch ermitteln. Grundlage dafür ist der durch die Karplus-Kurve wiedergegebene Zusammenhang zwischen dem Diederwinkel vicinaler Protonen und der $^3J(\text{H,H})$ -Kopplungskonstante.^[80] Sind die Substituenten an C-3 und C-4 des Isochinolinogerüsts *cis*-konfiguriert, beträgt der Dieder-

winkel zwischen den daran gebundenen Protonen etwa 0° , was zu einer Kopplungskonstante von 5–6 Hz führt. Befinden sich die Substituenten dagegen in *trans*-Stellung, beträgt der Torsionswinkel etwa 90° womit die Kopplungskonstante zwischen 0–2 Hz liegt.^[109]

Unter Verwendung der beiden vorgestellten Synthesemethoden wurden unterschiedlich substituierte Isochinolinon-Carbonsäurederivat in *cis*- und *trans*-Konfiguration hergestellt (Tabelle 11). Der Grad der Diastereoselektivität wurde im Rohprodukt mittels NMR-Spektroskopie ermittelt. Mit 55–85% lag der Diastereomerenüberschuss (*engl.* diastereomeric excess; d.e.), der durch Integration der Signale von H-3 und H-4 des *cis*- und *trans*-Produkts ermittelt wurde (vgl. Experimenteller Teil S. 165), durchwegs im zufriedenstellenden Bereich. Die moderaten Ausbeuten von 39–58%, sind in guter Übereinstimmung mit den Literaturergebnissen für diese Reaktion.^[111, 114]

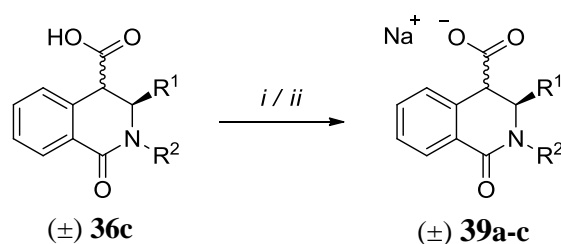


#	Imin	R ¹	R ²	Methode	Produkt	d.e. [%]	[%]
1	38a	4-MeO-Ph	4-MeO-Ph	<i>i</i>	(±) <i>cis</i> - 36a	87	44
2	38a	4-MeO-Ph	4-MeO-Ph	<i>ii</i>	(±) <i>trans</i> - 36a	87	47
3	38b	Ph	4-MeO-Ph	<i>i</i>	(±) <i>cis</i> - 36b	85	48
4	38b	Ph	4-MeO-Ph	<i>ii</i>	(±) <i>trans</i> - 36b	71	44
5	38c	4-MeO-Ph	Ph	<i>ii</i>	(±) <i>trans</i> - 36c	75	44
6	38d	Ph	Ph	<i>ii</i>	(±) <i>trans</i> - 36d	- ^a	41
7	38e	4-F-Ph	4-F-Ph	<i>ii</i>	(±) <i>trans</i> - 36e	85	49
8	38f	4-Cl-Ph	4-Cl-Ph	<i>ii</i>	(±) <i>trans</i> - 36f	74	39
9	38g	3,5-(Me) ₂ -Ph	3,5-(Me) ₂ -Ph	<i>ii</i>	(±) <i>trans</i> - 36g	60	58
10	38h	4-MeO-Ph	4-PhO-Ph	<i>ii</i>	(±) <i>trans</i> - 36h	55	46

Tabelle 11: Synthese der unterschiedlich substituierten Isochinolinon-Carbonsäurederivat **36a-h**. *i*: CHCl₃, RT; *ii*: TiCl₄, DIPEA, CH₂Cl₂, 0°C/RT. ^a *cis*-Produkt nicht identifizierbar.

Eine Auswahl der hergestellten Isochinolinon-Carbonsäuren wurde in die entsprechenden Natriumcarboxylate (**39**) überführt. Im Fall von *cis*-**39a**, *cis*-**39b** und *trans*-**39c** wurde dies

durch Umsetzung der entsprechenden Carbonsäurederivate mit 1 M NaHCO₃-Lsg. erreicht. Für die Herstellung von *trans*-**39a** und *trans*-**39b** wurde die in der Literatur beschriebene *cis* → *trans*-Epimerisierung nach Behandlung mit NaOH herangezogen (Tabelle 12).^[109] Grund dafür war, dass die Aufreinigung der *trans*-konfigurierten Carbonsäuren deutlich aufwendiger ist als die Reinigung der *cis*-Produkte. Während sich die *cis*-Derivate durch Umkristallisation von Verunreinigung befreien ließen, waren für die entsprechenden *trans*-Verbindungen mehrere säulenchromatographische Trennungen nötig.

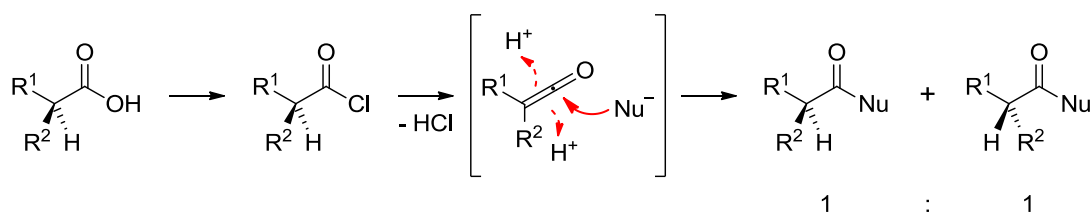


#	Carbonsäure	R ¹	R ²	Methode	Produkt	[%]
1	(±) <i>cis</i> - 36a	4-MeO-Ph	4-MeO-Ph	<i>i</i>	(±) <i>cis</i> - 39a	98
2	(±) <i>cis</i> - 36a	4-MeO-Ph	4-MeO-Ph	<i>ii</i>	(±) <i>trans</i> - 39a	89
3	(±) <i>cis</i> - 36b	Ph	4-MeO-Ph	<i>i</i>	(±) <i>cis</i> - 39b	98
4	(±) <i>cis</i> - 36b	Ph	4-MeO-Ph	<i>ii</i>	(±) <i>trans</i> - 39b	97
5	(±) <i>trans</i> - 36c	4-MeO-Ph	Ph	<i>i</i>	(±) <i>trans</i> - 39c	96

Tabelle 12: Die Umsetzung der Carbonsäuren **36a-c** zu den Natriumcarboxylaten **39a-c**. *i*: NaHCO₃ (1M), EtOH, RT, 30 min; *ii*: NaOH (8M), EtOH, RT, 30 min.

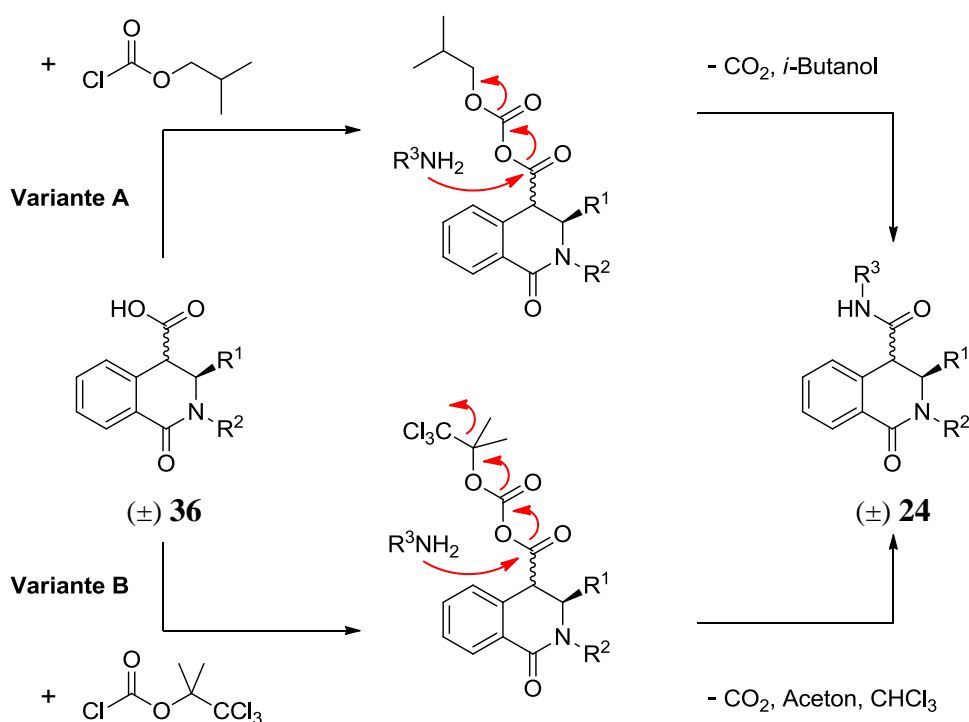
5.3.3 Synthese von Isochinolinon-Carboxamiden

Im dritten Reaktionsschritt wird die Synthese des Hit-Moleküls **24a** und analoger Verbindungen durch eine Amidierung abgeschlossen. Für die Aktivierung der Carbonsäure-Edukte sind dabei verschiedene Methoden denkbar.^[115] Die weitverbreitete Aktivierung zu Carbonsäurechloriden verbietet sich in diesem Fall allerdings aufgrund des α -chiralen Protons der Carbonsäuren **36**. Säurechloride mit α -ständigen Protonen sind in der Lage unter formaler Abspaltung eines HCl-Moleküls intermediär Ketene zu bilden. Diese reagieren mit Nucleophilen zwar ebenfalls zum gewünschten Produkt, allerdings kommt es dabei zum Verlust der Chiralitätsinformation in α -Position zur Carbonylfunktion (Schema 8).



Schema 8: Die Carbonsäureaktivierung *via* Säurechloride führt bei α -chiralen-Carbonylen zum Verlust der Stereoinformation.

Besser geeignet ist in diesem Fall die Überführung der Carbonsäure in ein gemischtes Anhydrid, das durch den nukleophilen Angriff eines Amins zum entsprechenden Amid reagiert. Die Umsetzung mit *i*-Butylchlorformiat wird hierfür sehr oft verwendet. Das intermediär gebildete Anhydrid setzt bei der Bildung jeweils ein Äquivalent CO₂ und *i*-Butanol frei (Schema 9, Variante A).



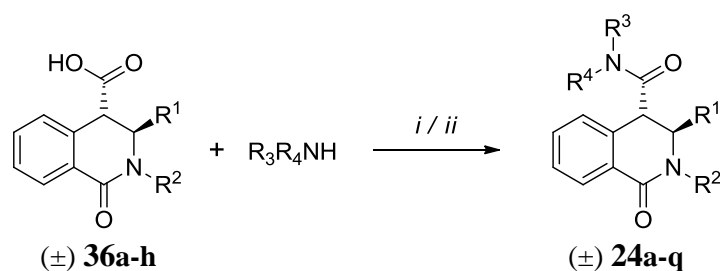
Schema 9: Die Umsetzung von Carbonsäuren zu Amidien mittels Aktivierung als gemischte Anhydride. Während die Reaktion mit *i*-Butylchlorformiat zur Freisetzung von CO₂ und *i*-Butanol führt (Variante A), setzen die auf TCBOC-Chlorid basierenden Anhydride kein Nucleophil frei (Variante B).

Da bei der Umsetzung zu verschiedenen Amidien allerdings auch der entsprechende *i*-Butanolester als Nebenprodukt auftrat, wurde nach einem Anhydrid-Reagenz gesucht, das bei der Reaktion mit Aminen keine Alkohole oder andere Nucleophile freisetzt. 2,2,2-Trichlor-

1,1-dimethylethylchloroformiat (TCBoc-Chlorid) erfüllt diese Bedingung. Der nukleophile Angriff auf das Carbonsäureanhydrid-Intermediat führt lediglich zur Freisetzung von jeweils einem Äquivalent CO_2 , Aceton und Chloroform (Schema 9, Variante B).

Entsprechend dieser beider Methoden wurden verschiedene Tetrahydroisoquinolinon-Derivate (**24**) synthetisiert (Tabelle 13). Während die *trans*-Säuren wie erwartet zu den entsprechenden *trans*-Amiden umgesetzt werden konnte, bereitete die Herstellung der *cis*-Carboxamide Probleme. So lieferte die Umsetzung von *cis*-**36a** mit 2-Amino-6-picolin das *trans*-Amid **24a** als Hauptprodukt, wohingegen das erwartete *cis*-Produkt nur in Spuren vorlag. Als mitverantwortlich für die nahezu quantitative Epimerisierung hat sich die in der Reaktion eingesetzte Base *N*-Methylmorpholin herausgestellt. Ein Experiment, bei dem *cis*-**36a** ausschließlich mit *N*-Methylmorpholin bei Raumtemperatur gerührt wurden, zeigte, dass bereits nach 1 h mehr als die Hälfte des Edukts epimerisiert war (*cis/trans*-**36a** 1:2). Bei der Wiederholung der Synthese wurde deshalb *N*-Methylmorpholin durch NaHCO_3 ersetzt. Zwar konnte *cis*-**24a** hierbei in geringen Mengen isoliert werden, doch zeigte sich auch hier, dass auch das *cis*-Produkt innerhalb einer Woche zum *trans*-Produkt epimerisiert (*cis/trans*-**24a** 1:1). Da offensichtlich bereits die Basenstärke des im Produkt enthaltenen Pyridin-substituenten ausreicht, um die Epimerisierung des Carboxamid-Produkts einzuleiten, muss geschlussfolgert werden, dass das *cis*-Analoge des virtuellen Screening-Hits **24a** nicht stabil ist.

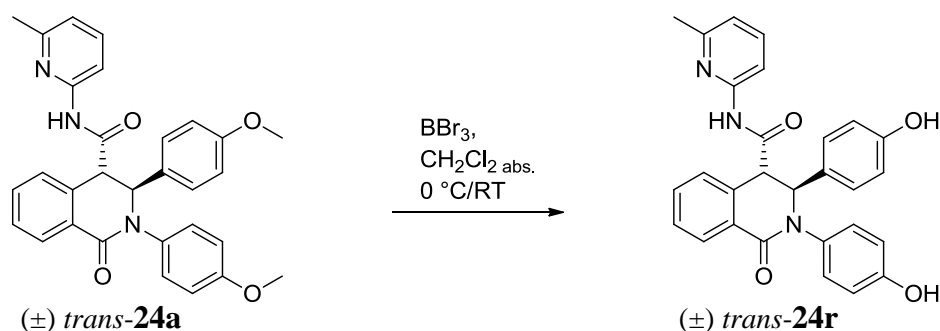
Mit dieser Erkenntnis wurde anschließend der Versuch unternommen, unter Verwendung von NaHCO_3 das *cis*-Carboxamid **24b** herzustellen, welches keine basischen Molekülbestandteile besitzt. Allerdings konnte dabei auch nach drei Tagen keine Umsetzung zum Produkt beobachtet werden. Als Grund dafür werden starke repulsive Wechselwirkungen zwischen der Arylamidgruppe und dem phenylsubstituierten Isochinolinongerüst vermutet, die bei den entsprechenden *trans*-Produkten nicht bestehen. Da sich zudem aus Struktur-Wirkungsbeziehungen der Carbonsäuren (**36**) die *cis*-Konfiguration als unvorteilhaft herausgestellt hatte (vgl. Kapitel 5.4.1), wurde auf weitere Syntheserversuche von *cis*-Carboxamiden verzichtet.



#	Carbonsäure	R ¹	R ²	R ³	R ⁴	Produkt	[%]
1	(±) <i>trans</i> - 36a	4-MeO-Ph	4-MeO-Ph	6-Me-Pyridin-2yl	H	(±) <i>trans</i> - 24a	71 ⁱⁱ
2	(±) <i>trans</i> - 36a	4-MeO-Ph	4-MeO-Ph	m-Tolyl	H	(±) <i>trans</i> - 24b	64 ⁱ
3	(±) <i>trans</i> - 36a	4-MeO-Ph	4-MeO-Ph	Pyridin-2yl	H	(±) <i>trans</i> - 24c	62 ⁱ
4	(±) <i>trans</i> - 36a	4-MeO-Ph	4-MeO-Ph	3,5-(Me) ₂ -Ph	H	(±) <i>trans</i> - 24d	91 ⁱⁱ
5	(±) <i>trans</i> - 36a	4-MeO-Ph	4-MeO-Ph	Me	H	(±) <i>trans</i> - 24e	74 ⁱⁱ
6	(±) <i>trans</i> - 36a	4-MeO-Ph	4-MeO-Ph	Me	Me	(±) <i>trans</i> - 24f	63 ⁱⁱ
7	(±) <i>trans</i> - 36a	4-MeO-Ph	4-MeO-Ph	Tetrahydro-Naph-1yl	H	(±) <i>trans</i> - 24g	90 ⁱⁱ
8	(±) <i>trans</i> - 36b	Ph	4-MeO-Ph	6-Me-Pyridin-2yl	H	(±) <i>trans</i> - 24h	54 ⁱ
9	(±) <i>trans</i> - 36c	4-MeO-Ph	Ph	6-Me-Pyridin-2yl	H	(±) <i>trans</i> - 24i	87 ⁱⁱ
10	(±) <i>trans</i> - 36c	4-MeO-Ph	Ph	Pyrimidin-2yl	H	(±) <i>trans</i> - 24j	48 ⁱⁱ
11	(±) <i>trans</i> - 36c	4-MeO-Ph	Ph	Pyridin-3yl	H	(±) <i>trans</i> - 24k	86 ⁱⁱ
12	(±) <i>trans</i> - 36c	4-MeO-Ph	Ph	4,6-(Me) ₂ -Pyridin-2yl	H	(±) <i>trans</i> - 24l	45 ⁱⁱ
13	(±) <i>trans</i> - 36d	Ph	Ph	6-Me-Pyridin-2yl	H	(±) <i>trans</i> - 24m	82 ⁱ
14	(±) <i>trans</i> - 36e	4-F-Ph	4-F-Ph	6-Me-Pyridin-2yl	H	(±) <i>trans</i> - 24n	90 ⁱⁱ
15	(±) <i>trans</i> - 36f	4-Cl-Ph	4-Cl-Ph	6-Me-Pyridin-2yl	H	(±) <i>trans</i> - 24o	77 ⁱⁱ
16	(±) <i>trans</i> - 36g	3,5-(Me) ₂ -Ph	3,5-(Me) ₂ -Ph	6-Me-Pyridin-2yl	H	(±) <i>trans</i> - 24p	94 ⁱⁱ
17	(±) <i>trans</i> - 36h	4-MeO-Ph	4-PhO-Ph	6-Me-Pyridin-2yl	H	(±) <i>trans</i> - 24q	83 ⁱⁱ

Tabelle 13: Die aus den Carbonsäurederivaten **36a-h** synthetisierten Amide **24a-q**. *i*: *i*-Butylchlorformiat, NaHCO₃, CH₃CN_{abs}, 0 °C/RT; *ii*: TCBOC-Chlorid, NaHCO₃ oder NEt₃, CH₃CN_{abs}, 0 °C/RT.

Neben den in Tabelle 13 gelisteten Carboxamiden wurde ein weiteres Isochinolinonderivat hergestellt, das mit zwei Phenolgruppen substituiert ist. Durch Spaltung der Methoxygruppen mittels Bortribromid wurde *trans*-**24r** aus *trans*-**24a** mit einer Ausbeute von 61% erhalten (Schema 10).



Schema 10: Das Carboxamid *trans*-**24r** wurde aus *trans*-**24a** hergestellt.

Anhand der repräsentativen Kristallstruktur von *trans*-**24n** konnte sowohl die Konstitution als auch die relative *trans*-Konfiguration des Carboxamides bestätigt werden (Abb. 36). Der gemessene Diederwinkel zwischen H-3 und H-4 von 78.7° ist zudem in guter Übereinstimmung mit der $^3J(\text{H,H})$ -Kopplungskonstante von 0–2 Hz, die wie zuvor beschrieben, für die *trans*-Isomere im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum beobachtet wurde.

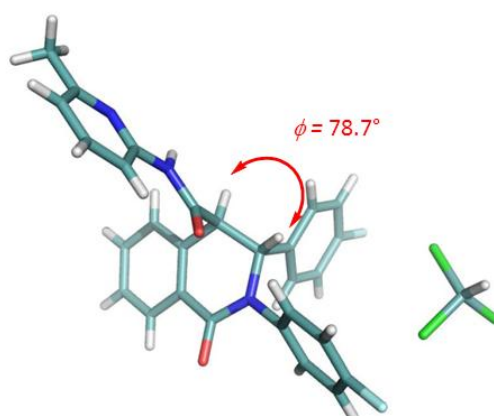


Abbildung 36: Die Kristallstruktur^[76] des Carboxamids *trans*-**24n** zeigt die *trans*-Konfiguration der Substituenten an C-3 und C-4. Die Elementarzelle enthält auch ein Molekül CHCl_3 .

5.4 „Hit to Lead“-Optimierung

Ausgehend vom Screening-Hit **24a** wurde eine Substanzbibliothek strukturell verwandter Isochinolinon-Verbindungen aufgebaut. Die in diesem Prozess synthetisierten Derivate wurden dabei nach verschiedenen Gesichtspunkten gewählt. Neben der Verifikation verschiedener Strukturmerkmale und der Optimierung der Substituenten des Isochinolinon-Gerüsts bestimmten auch Überlegungen zur Falsifizierung der adressierten Bindetasche das Design der Derivate.

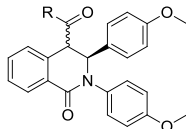
Die pharmakologische Wirksamkeit der verschiedenen Derivate wurde in einem Zellviabilitäts-Assay in der Arbeitsgruppe Chatterjee (E. Müller) bestimmt. Dazu wurden MM-Zellen (INA-6) mit der zu testenden Substanz für 72 h inkubiert und der Anteil lebender und apoptotischer Zellen anschließend *via* Annexin V-FITC/PI-Anfärbung detektiert. Durch Verwendung verschiedener Konzentrationen der getesteten Verbindungen wurden so Viabilitätskurven erstellt und die mittleren effektiven Konzentrationen (EC₅₀-Werte) ermittelt.

Um eine tumorspezifische Wirksamkeit von unspezifisch toxischen Effekten zu unterscheiden, wurden daneben mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (*engl.* peripheral blood mononuclear cells; PMBCs) mit den zu testenden Verbindungen inkubiert und die Apoptoserate auf analoge Weise ermittelt.

Auf Basis der erhaltenen EC₅₀-Werte an INA-6-Zellen und PBMCs wurden Struktur-Wirkungsbeziehungen abgeleitet, die zur Identifikation wichtiger Strukturelementen herangezogen wurden.

5.4.1 Untersuchungen zur diastereospezifischen Aktivität

Wie NMR-Untersuchungen zeigten, handelte es sich bei dem kommerziell erworbenen Screening-Hit **24a** um das *trans*-konfigurierte Carboxamid. Um zu prüfen, ob die beobachtete Antitumorwirkung diastereospezifischer Natur ist, wurde zunächst versucht die entsprechende *cis*-konfigurierte Verbindung (*cis*-**24a**) herzustellen. Wie in Kapitel 5.3.3 ausgeführt, ist *cis*-**24a** jedoch aufgrund einer Epimerisierungsreaktion nicht stabil, sodass ein Aktivitätsvergleich an diesem Diastereomerenpaar nicht möglich war. Der Einfluss der Konfiguration auf die Wirksamkeit wurde stattdessen an verschiedenen Isochinolinon-Carbonsäurderivaten (**36**) analysiert (Tabelle 14).

Struktur	#	Verbindung	Konfig.	R	INA-6 EC ₅₀ (±sdv) [μM] ^a	PBMC EC ₅₀ [μM]
	1	(±) 36a	<i>trans</i>	HO-	10.1 (±0.1)	> 100
	2	(±) 36a	<i>cis</i>	HO-	> 100	-
	3	(±) 39a	<i>trans</i>	Na ⁺ O-	7.9 (±0.8)	> 100
	4	(±) 39a	<i>cis</i>	Na ⁺ O-	> 100	-

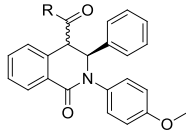
Struktur	#	Verbindung	Konfig.	R	INA-6 EC ₅₀ (±sdv) [μM] ^a	PBMC EC ₅₀ [μM]
	5	(±) 36b	<i>trans</i>	HO-	57 (±15)	> 100
	6	(±) 36b	<i>cis</i>	HO-	> 100	-
	7	(±) 39b	<i>trans</i>	Na ⁺ O-	64 (±19)	> 100
	8	(±) 39b	<i>cis</i>	Na ⁺ O-	> 100	-

Tabelle 14: Bioaktivitätsergebnisse der Diastereomerenpaare der Carbonsäure **36a** und **36b** sowie der entsprechenden Carboxylate **39a** und **39b**.^a Die angegebenen EC₅₀-Werte sind Mittelwerte von mindestens drei unabhängigen Bestimmungen.

Während Verbindung *trans*-**36a** bei einer Konzentration von 10 μM bei 50% der MM-Zellen Apoptose auslöst, konnte für *cis*-**36a** bis 100 μM keine Aktivität festgestellt werden. Das gleiche Bild zeigt sich bei einem Aktivitätsvergleich der Carbonsäuren *trans*-**36b** und *cis*-**36b**. Obwohl während des Viabilitäts-Assays keine Präzipitation beobachtet werden konnte, sollte ausgeschlossen werden, dass die Inaktivität der *cis*-Derivate von deren schlechteren initialen Löslichkeit herrührt. Eine verbesserte Löslichkeit lässt sich bei Salzen beobachten, da diese in Lösung leicht dissoziieren und Gitterkräfte im Kristall reduziert sind.^[116] Die getesteten Carbonsäuren wurden daher in die entsprechenden Natriumcarboxylate überführt und deren Bioaktivität erneut bestimmt. Vergleicht man die Aktivitäten der *trans*-Carbonsäuren mit den *trans*-Carboxylaten, zeigt sich, dass diese wie erwartet in derselben Größenordnung liegen. Trotz der verbesserten Löslichkeit der *cis*-Verbindungen konnte auch für die Natriumcarboxylate *cis*-**39a** und *cis*-**39b** keine Aktivität bis 100 μM beobachtet werden.

Die Ergebnisse zeigen, dass die *trans*-Konfiguration der Isochinolinonsubstituenten maßgeblich für die Bioaktivität verantwortlich ist. Diese Beobachtung steht darüber hinaus in Einklang mit den Vorhersagen des molekularen Modellings, das eine Präferenz für die Interaktion von *trans*-Verbindungen mit dem Interdomänen-Interface prognostiziert.

Wie die Viabilitätsdaten an PBMCs zeigen (EC₅₀ > 100 μM), induzieren die Verbindungen nur in MM-Zellen Apoptose und zeigen somit eine tumorspezifische Wirksamkeit. Für eine zusammenfassende Diskussion der Toxizität der synthetisierten HSP70-Inhibitoren siehe Kapitel 5.5.

5.4.2 Optimierung der Substituenten in Position 2 und 3 des Isochinolin-Grundgerüsts

Der virtuelle Screening-Hit *trans*-**24a** trägt in Position 2 und 3 des Isochinolin-Grundgerüsts zwei *p*-Methoxyphenyl-Reste. Um den Einfluss dieser beider Substituenten auf die Aktivität zu untersuchen, wurden verschiedene analoge Derivate synthetisiert (Tabelle 15).

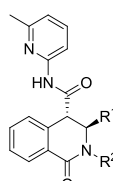
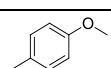
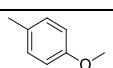
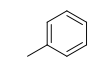
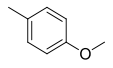
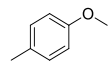
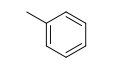
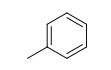
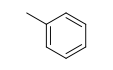
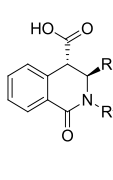
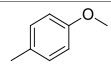
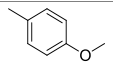
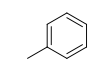
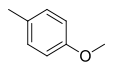
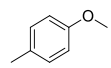
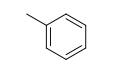
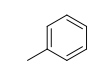
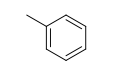
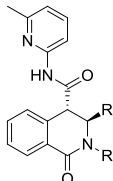
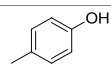
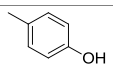
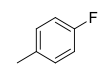
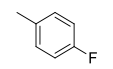
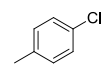
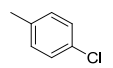
Struktur	#	Verbindung	R ¹	R ²	INA-6 EC ₅₀ (±sdv) [μM] ^a	PBMC EC ₅₀ [μM]
	1	(±) <i>trans</i> - 24a			0.68 (±0.04)	> 100
	2	(±) <i>trans</i> - 24h			> 50 ^b	-
	3	(±) <i>trans</i> - 24i			0.41 (±0.03)	> 100
	4	(±) <i>trans</i> - 24m			2.3 (±0.6)	> 100
	5	(±) <i>trans</i> - 36a			10.1 (±0.1)	> 100
	6	(±) <i>trans</i> - 36b			57 (±15)	> 100
	7	(±) <i>trans</i> - 36c			1.3 (±0.2)	> 100
	8	(±) <i>trans</i> - 36d			6.9 (±0.3)	> 100
	9	(±) <i>trans</i> - 24r			30 (±2)	80
	11	(±) <i>trans</i> - 24n			6.4 (±0.7)	> 100
	12	(±) <i>trans</i> - 24o			2.9 (±0.3)	> 100

Tabelle 15: Der Einfluss der Substituenten R¹ und R² auf die Apoptoseinduktion an INA-6-Zellen und PBMCs. ^a Die angegebenen EC₅₀-Werte sind Mittelwerte von mindestens drei unabhängigen Bestimmungen; ^b Die Verbindung präzipitierte unter Assay-Bedingungen.

Dabei wurden aufgrund der bereits passablen Aktivität (EC₅₀ = 0.7 μM) bewusst nur geringfügige Veränderungen vorgenommen. So wurden die Methoxy-Substituenten alternierend (*trans*-**24h**, -**24i**) und parallel (*trans*-**24m**) durch Wasserstoff ersetzt. Während der Verlust der Methoxyfunktion am Phenylsubstituenten R¹ (*trans*-**24h**) zu einer massiven Verringerung der Aktivität gegenüber *trans*-**24a** führt, die aufgrund der im Assay beobachteten Präzipitate jedoch mit Vorsicht zu interpretieren ist, konnte durch Elimination der Methoxyfunktion am Phenylsubstituenten R² (*trans*-**24i**) die Aktivität gesteigert werden. Ist das Molekül mit zwei Phenylgruppen substituiert (*trans*-**24m**), verringert sich die Aktivität gegenüber dem zwei *p*-Methoxyphenyl-Reste tragenden *trans*-**24a**.

Vergleicht man die Carboxamide (*trans*-**24a**, **-24h**, **-24i**, **-24m**) mit den korrespondierenden Carbonsäuren (*trans*-**36a**, **-36b**, **-36c**, **-36d**) fallen zwei Punkte auf. Zum einen besitzen die Carbonsäurederivate eine geringere Aktivität als die Amidverbindungen, zum anderen bestätigt sich die Tendenz, den die Methoxygruppen auf die Aktivität haben. Auch bei *trans*-**36b** zeigt sich der negative Effekt des Substitutionsmuster, welches bereits bei Verbindung *trans*-**24h** einen Aktivitätseinbruch vermuten ließ. Dagegen zeigt Verbindung *trans*-**36c**, die an R¹ den *p*-Methoxyphenyl-Reste und an R² den Phenylsubstituenten trägt, auch die höchste Aktivität unter den Carbonsäuren.

Neben dem Einfluss der Methoxygruppen wurde die Auswirkung weiterer Substituenten auf die Aktivität geprüft. Dabei zeigte sich, dass deren Austausch durch Hydroxylgruppen (*trans*-**24r**), die unter physiologischen Bedingungen nahezu vollständig protoniert vorliegen dürften (> 99:1), zu einer knapp fünfzigfachen Verringerung der Bioaktivität führt. Eine Steigerung der Polarität durch den Einbau von Hydroxylsubstituenten wird an dieser Stelle des Moleküls folglich nicht toleriert. Die Derivate, die anstelle der Methoxygruppen zwei Fluor- (*trans*-**24n**) bzw. zwei Chloratome (*trans*-**24o**) tragen, zeigen ebenfalls eine reduzierte Aktivität im Vergleich zu *trans*-**24a**. Während die Wirksamkeit des chloresubstituierten Derivats *trans*-**24o** um das Fünffache geringer ausfällt, unterscheidet sich die Aktivität des fluorsubstituierten *trans*-**24n** bereits um eine Größenordnung von der des ursprünglichen Screening-Hits. Vor dem Hintergrund, dass sowohl -OMe, -F, und -Cl denselben elektronischen Einfluss auf den aromatischen Phenylring besitzen (+M-, -I-Effekt), scheint die Bioaktivität maßgeblich durch andere Einflussfaktoren bestimmt zu werden. Dies wird auch bei Vergleich des unsubstituierten-Derivats *trans*-**24m** mit dem chloresubstituierten-Derivat *trans*-**24o** deutlich, deren Aktivität nahezu gleich ist. Die positive Auswirkung auf die Induktion von Apoptose in MM-Zellen, die der *p*-Methoxyphenylsubstituent in R¹ (*trans*-**24a**, **-24i**) zeigte, könnte vielmehr auf seine Fähigkeit zurückzuführen sein Wasserstoffbrückenbindungen auszubilden. Der Aktivitätsvergleich mit *trans*-**24r** legt nahe, dass der Ligand dabei als Wasserstoffbrückenakzeptor und nicht als Donor agiert.

Mit Ausnahme von *trans*-**24r** zeigt keines der Derivate unspezifisch toxische Effekte an PBMCs (EC₅₀ > 100 µM).

5.4.3 Variationen des exozyklischen Amids

Der Einfluss, den der Substituent des exozyklischen Amids auf die Aktivität der Isochinolinone nimmt, wurde am Grundgerüst der beiden aktivsten Carboxamide *trans*-**24a** und *trans*-**24i** untersucht (Tabelle 16).

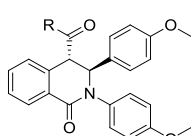





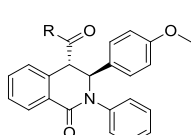




Struktur	#	Verbindung	R	INA-6 EC ₅₀ (±sdv) [μM] ^a	PBMC EC ₅₀ [μM]
	1	(±) <i>trans</i> - 24a		0.68 (±0.04)	> 100
	2	(±) <i>trans</i> - 24b		0.88 (±0.10)	> 100
	3	(±) <i>trans</i> - 24c		0.53 (±0.03)	> 100
	4	(±) <i>trans</i> - 24e		7.1 (±0.3)	> 100
	5	(±) <i>trans</i> - 24f		> 100	-
	6	(±) <i>trans</i> - 24i		0.41 (±0.03)	> 100
	7	(±) <i>trans</i> - 24j		0.20 (±0.01)	> 50 ^b
	8	(±) <i>trans</i> - 24k		0.57 (±0.02)	> 50 ^b
	9	(±) <i>trans</i> - 24l ^c		0.34 (±0.04)	> 50 ^b

Tabelle 16: Derivate von *trans*-**24a** und *trans*-**24i** mit unterschiedlichen Amidsubstituenten. ^a Die angegebenen EC₅₀-Werte sind Mittelwerte von mindestens drei unabhängigen Bestimmungen; ^b Wegen der submikromolaren Aktivität an MM-Zellen wurde hier eine Konzentration von 50 μM als Grenze für eine unspezifische Toxizität festgelegt; ^c Verbindung **24l** wurde in Kenntnis der Aktivität von **24d** (vgl. Kapitel 5.4.4) synthetisiert.

So wurde ausgehend von *trans*-**24a** durch Substitution der =N-Einheit mit der isoelektronischen CH-Gruppe der Einfluss des Pyridinrings auf die Aktivität untersucht. Variationen nach diesem Azalogie-Prinzip können die Eigenschaften von Wirkstoffen maßgeblich beeinflussen.^[117] Ein Vergleich der Wirksamkeit von *trans*-**24a** und dessen Carba-Analogon *trans*-**24b** zeigt hier jedoch keinen wesentlichen Aktivitätsunterschied. Auch der Einfluss der Methylgruppe am Pyridinring ist gering, wie Verbindung *trans*-**24c** zeigt. Demgegenüber trägt die Arylamidgruppe offensichtlich entscheidend zur Aktivität bei.

Das Ersetzen durch eine aliphatische MeHN-Einheit (*trans*-**24e**) führt zu einer Reduktion der Wirksamkeit um eine Größenordnung. Als noch entscheidender stellt sich die sekundäre Amidstruktur heraus. Wie am Beispiel des tertiären Amidderivats *trans*-**24f** zu sehen, führt das Fehlen der NH-Gruppe zu einem kompletten Verlust der Aktivität. Die Aktivitätsergebnisse legen daher eine essenzielle Wasserstoffbrückenbindung zu HSP70 nahe, bei dem das Isochinolinon als Donor fungiert.

Aufbauend auf der Überlegung, die Löslichkeit der Carboxamide durch die Modifikation der Basenstärke des Amidsubstituenten zu beeinflussen, wurden die Derivate *trans*-**24j**, **-24k** und **-24l** synthetisiert. Aufgrund des CH-aciden Protons in Position 4 des Isochinolingerüsts und der basischen Pyridylgruppe handelt es sich bei den Carboxamiden wie *trans*-**24i** um Ampholyte. Da Säure- und Basenstärke den pH-Bereich bestimmen, in dem Ampholyte geladen vorliegen und damit eine höhere Polarität besitzen, sollten sich die pK_a-Eigenschaften eines Moleküls direkt auf dessen Löslichkeit auswirken. Während das Pyrimidin-Derivat *trans*-**24j** eine geringere Basenstärke als das Pyridin-Derivat *trans*-**24i** besitzt, ist die Stärke der Stickstoffbase in *trans*-**24k** und *trans*-**24l** größer als in *trans*-**24i**. Leider korrelieren die abgeschätzten Basenstärken jedoch nicht mit den visuell ermittelten Löslichkeiten. Während sich *trans*-**24j** und *trans*-**24k** besser lösen als *trans*-**24i**, besitzt *trans*-**24l** eine schlechtere Löslichkeit (Tabelle 17).

#	Verbindung	max. Konz. ohne Präzipitate	Konz. Präzipitation beobachtet
1	(±) <i>trans</i> - 24i	0.5 µM	2 µM
2	(±) <i>trans</i> - 24j	2 µM	5 µM
3	(±) <i>trans</i> - 24k	5 µM	20 µM
4	(±) <i>trans</i> - 24l	- ^a	0.5 µM

Tabelle 17: Die Wasserlöslichkeit der Carboxamide *trans*-**24i–24l** wurde unter Verwendung eines Lichtmikroskops mit Hilfe einer Verdünnungsreihe (100, 20, 5, 2 sowie 0.5 µM) abgeschätzt. Verwendete Stammlösung: 10 mM in DMSO. ^a Löslichkeit < 0.5 µM.

Der Vergleich von *trans*-**24i** und *trans*-**24c** zeigt, dass die zusätzliche Methylgruppe die Wirksamkeit nicht beeinflusst. Dahingegen zeigt das Derivat *trans*-**24k**, dass eine Verknüpfung des Pyridylrestes in *ortho*-Position zu einer besseren Aktivität führt, als eine Verknüpfung in *meta*-Position. Durch die Verwendung eines Pyrimidinsubstituenten (*trans*-**24j**) konnte die Aktivität gegenüber dem bis dato aktivsten Carboxamid *trans*-**24i** nochmals verdoppelt werden.

5.4.4 Falsifizierungsuntersuchungen zur adressierten Bindetasche

Neben der Synthese von Isochinolinon-Derivaten, die zur Identifikation wichtiger Strukturelemente und zur Optimierung der Bioaktivität dienten, wurden auch gezielt Derivate hergestellt, die nicht in der Lagen sein sollten, im postulierten Bindemodus an das Interdomänen-Interface binden zu können. Dazu wurden sowohl am exozyklischen Amid als auch an R¹ und R² sterisch anspruchsvollere Substituenten eingefügt, deren Platzbedarf zu einem Affinitäts- und Aktivitätsverlust führen sollte (Abb. 37).

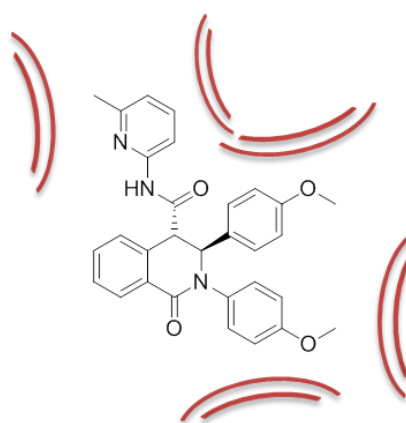


Abbildung 37: Nach einer berechneten Docking-Pose sollten voluminöse Substituenten zu einem Affinitäts- und Aktivitätsverlust führen.

Da die Analyse einer berechneten Docking-Pose nahelegte, dass für Substituenten am exozyklischen Amid nur ein begrenztes Volumen zu Verfügung steht, wurden an dieser Stelle sterisch anspruchsvollere Substituenten eingebaut. So wurde der Arylsubstituent zum einen um eine weitere Methylgruppe in *meta*-Position (*trans*-**24d**) ergänzt und zum anderen durch einen Tetrahydronaphthylrest (*trans*-**24g**) ersetzt (Tabelle 18). Während die zweite Methylgruppe von *trans*-**24d** das vorhandene Platzangebot nicht überschreitet und eine Aktivität im einstelligen mikromolaren Bereich zeigt, wird das Tetrahydronaphthyl-Grundgerüst offensichtlich nicht mehr toleriert. Verbindung *trans*-**24g** zeigte keine Aktivität.

Struktur	#	Verbindung	R	INA-6 EC ₅₀ (±sdv) [μM] ^a	PBMC EC ₅₀ [μM]
	1	(±) <i>trans</i> - 24a		0.68 (±0.04)	> 100
	2	(±) <i>trans</i> - 24d		0.95 (±0.09)	> 100

Struktur	#	Verbindung	R	INA-6 EC ₅₀ (±sdv) [μM] ^a	PBMC EC ₅₀ [μM]
s.o.	3	(±) <i>trans</i> - 24g		> 100	-

Tabelle 18: Der Einfluss sterisch Anspruchsvoller Substituenten am exozyklischen Amid. ^a Die angegebenen EC₅₀-Werte sind Mittelwerte von mindestens drei unabhängigen Bestimmungen.

Auch die Größe der Protein-Subtaschen, die von den beiden Substituenten R¹ und R² belegt werden, lässt vermuten, dass die Verwendung sterisch anspruchsvoller Gruppen mit einem Aktivitätsverlust einhergeht. Wie erwartet führte sowohl der Einbau zweier *meta*-Xylolreste (*trans*-**24p**) als auch das Ersetzen der *p*-Methoxyphenyleinheit durch eine *p*-Phenoxyphenylgruppe (*trans*-**24q**) zu einer Reduktion der Aktivität (Tabelle 19). Der exakte numerische EC₅₀-Wert muss allerdings aufgrund der während des Assays aufgetretenen Präzipitate mit Vorsicht interpretiert werden.

Struktur	#	Verbindung	R ¹	R ²	INA-6 EC ₅₀ (±sdv) [μM] ^a	PBMC EC ₅₀ [μM]
	1	(±) <i>trans</i> - 24a			0.68 (±0.04)	> 100
	2	(±) <i>trans</i> - 24p			43 (±12) ^b	-
	3	(±) <i>trans</i> - 24q			> 100 ^b	-

Tabelle 19: Die Auswirkungen sterisch anspruchsvoller Substituenten auf die Bioaktivität. ^a Die angegebenen EC₅₀-Werte sind Mittelwerte von mindestens drei unabhängigen Bestimmungen; ^b Die Verbindung präzipitierte unter Assay-Bedingungen.

5.4.5 Analyse der enantiospezifischen Aktivität

Durch die beiden Chiralitätszentren in Position 3 und 4 des Isochinolinon-Gerüsts können die Carbonsäure-Derivate **36** und die entsprechenden Carboxamide **24** in Form vier verschiedener Stereoisomere vorliegen. Durch die Aktivitätsdifferenzierung zwischen dem *cis*- und *trans*-Diastereomerenpaar konnte die Wirksamkeit bereits auf die beiden *trans*-Enantiomere eingeschränkt werden (vgl. Kapitel 5.4.1). Um weiter aufzuklären, ob die Aktivität auf nur eines der beiden Enantiomere zurückzuführen ist, oder ob beide Enantiomeren gleichermaßen zur Wirksamkeit beitragen, sollten beide getrennt voneinander getestet werden.

Zu diesem Zweck wurde eine chirale HPLC-Trennung von *R,R*- und *S,S*-**24a** durchgeführt. Im ersten Schritt wurde dazu eine Trennmethode im analytischen Maßstab entwickelt. Unter Verwendung einer chiralen Säule (Lux Cellulose-1) konnte eine Basislinien-Trennung beider Verbindungen bereits bei einem isokratischen Eluentengemisch aus Wasser (A) und Acetonitril (B) (A/B 2:8) innerhalb einer Trennzeit von sechs Minuten erreicht werden (Tabelle 20, Abb. 38). Durch sukzessives Erhöhen des Wasseranteils verlängerte sich zwar die Retentionszeit beider Enantiomere, dafür vergrößerte sich die Retentionsdifferenz beider Signale von 0.5 min auf 5.8 min (A/B 1:1).

Zu den drei wichtigen Beurteilungsparametern einer chromatographische Trennung zählen die Reinheit der Fraktionen, die Ausbeute sowie die Effizienz der Trennmethode. Da sich diese Parameter gegenseitig beeinflussen, lässt sich eine Trennung nicht gleichzeitig auf alle drei Größen optimieren.^[118] Während eine Trennung beider Enantiomere innerhalb von sechs Minuten zwar effizient ist, ist die zu erwartende Reinheit beider Fraktionen jedoch gering. Da vor dem Hintergrund der Aktivitätsuntersuchung die Reinheit beider Enantiomere von höchster Bedeutung ist, wurde bei der Wahl der Trennmethode der Schwerpunkt auf eine ausreichende Separierung beider Signale gelegt. Für die präparative Trennung sollte daher als Elutionsmittel Wasser/Acetonitril im Verhältnis 1:1 zum Einsatz kommen.

#	A/B	t_R (Signal A)	t_R (Signal B)	Δt_R	R_S
1	2:8	4.6 min	5.0 min	0.4 min	1.8
2	3:7	6.4 min	7.4 min	1.0 min	2.8
3	4:6	10.3 min	12.5 min	2.2 min	3.3
4	1:1	22.5 min	28.3 min	5.8 min	3.8

Tabelle 20: Enantiomerentrennung von *trans*-**24a** bei verschiedenen Zusammensetzungen des Elutionsmittels: Wasser (A), Acetonitril (B). Die chromatographische Auflösung R_S wurde wie folgt ermittelt: $R_S = 1.18 \cdot \frac{t_R(B) - t_R(A)}{w_{0.5(A)} + w_{0.5(B)}}$, mit $w_{0.5}$ als Halbwertsbreite.^[119]

Analytische HPLC-Säulen mit einem Innendurchmesser (iD) von 4.6 mm haben typischer Weise eine Kapazität von 2–3 mg Substanz, wobei das Injektionsvolumen zwischen 10–50 μ L liegen sollte. Da sowohl eine Substanz- als auch Volumenüberladung zu einer Signalverbreiterung und damit zu einer verschlechterten Trennung führen, limitieren beide Faktoren die pro Trennung applizierbare Substanzmenge.^[118] Hinzu kommt, dass die stationäre Phase der verwendete Lux-Säule aus Polysaccharid beschichtetem Kieselgel

besteht, womit sich die Verwendung von Lösungsmitteln wie DMSO auch bei der Proben-
vorbereitung verbietet. Auch die Löslichkeit der zu trennenden Substanz im Elutionsmittel
beschränkt damit die Trennkapazität. Im Fall von *trans-24a* lag die maximale Löslichkeit im
Elutionsmittel bei 1 mg/mL womit sich die mit einer analytischen Säule trennbare
Substanzmenge auf 0.05 mg beschränkt.

Die Trennung der für die Bioaktivitätsanalyse benötigten Substanzmenge musste daher an
einer Säule mit größerem Innendurchmesser erfolgen. Präparative HPLC-Säulen mit einem
Innendurchmesser von 21.2 mm besitzen eine Substanzkapazität von 50–200 mg und zeigen
auch bei Injektionsvolumina von 1 mL keine Überladungseffekte. Für das Scale-Up einer
Trennung von einer analytischen auf eine präparative Säule, muss die Flussrate (\dot{V}) angepasst
werden. Sie lässt sich nach folgender Formel umrechnen:

$$\frac{\dot{V}_1}{\dot{V}_2} = \frac{r_1^2}{r_2^2}$$

Damit wird aus einer Flussrate von 1 mL/min bei einer analytischen Säule (iD 4.6 mm) eine
Flussrate von 21 mL/min bei einer präparativen Säule (iD 21.2 mm).^[118]

Nach der so modifizierten Methode wurde die racemische Verbindung *trans-24a* unter
Verwendung einer präparativen HPLC-Säule getrennt und die isolierten Enantiomere
anschließend auf ihre Reinheit überprüft. Dabei zeigte sich, dass beide Enantiomere
quantitativ voneinander separiert werden konnten (Abb. 38).

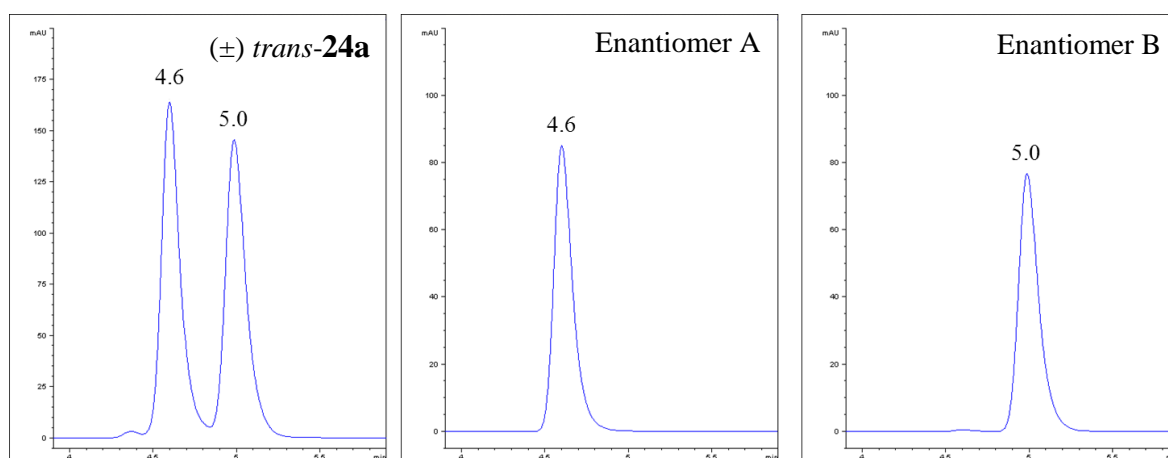


Abbildung 38: HPLC-Chromatogramme des getrennten *trans-24a*-Racemats und der separierten Enantiomere.

Die Bestimmung der Absolutkonfiguration der getrennten Enantiomere wurde in der Arbeitsgruppe Bringmann (F. Witterauf, T. Bruhn) durchgeführt. Dazu wurden Circular dichroismus-Spektren (CD) aufgenommen und die Konfiguration der Stereozentren durch Vergleich mit quantenchemisch berechneten Spektren der Enantiomere bestimmt. Das Messprinzip der CD-Spektroskopie beruht auf dem unterschiedlichen Absorptionsverhalten von rechts-circular (A^r) und links-circular polarisiertem Licht (A^l) durch chirale Verbindungen. Die Differenz der Absorption ist als CD definiert und wird als Elliptizität θ in der Einheit mdeg angegeben.^[120]

$$CD(\lambda) = A^l - A^r \quad \theta(\lambda) = 3300 \cdot CD$$

Bei nicht-chiralen Verbindungen und Racematen unterscheidet sich das Absorptionsverhalten A^r und A^l nicht, sodass die Elliptizität in diesen Fällen null beträgt. Dagegen verhält sich die Absorptionsdifferenz bei Enantiomeren genau umgekehrt zueinander, womit die Kurvenverläufe Spiegelbilder voneinander darstellen.

Die gemessenen und berechneten CD-Kurvenverläufe von Enantiomer A und B sowie von *R,R*- und *S,S*-**24a** sind in Abb. 39 dargestellt. Deren Vergleich zeigt, dass es sich bei Enantiomer A um *R,R*-**24a** handelt, während Enantiomer B dem *S,S*-konfigurierten **24a**-Isomer entspricht.

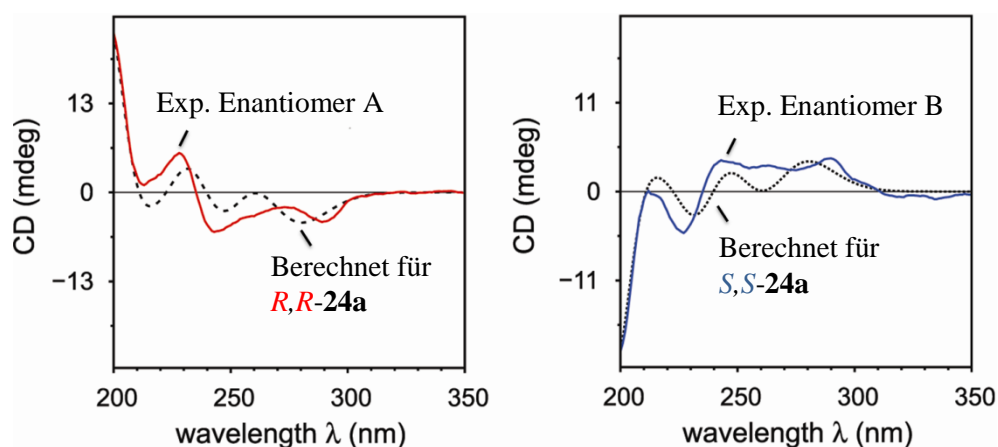


Abbildung 39: Experimentelle und berechnete CD-Spektren von Enantiomer A und *R,R*-**24a** sowie von Enantiomer B und *S,S*-**24a**.

Im Viabilitäts-Assay zeigte sich, dass die Enantiomeren unterschiedlich wirksam sind. Während *S,S*-**24a** keine Aktivität an MM-Zellen zeigte, wurde für *R,R*-**24a** ein EC_{50} -Wert von $0.40 \mu\text{M}$ ermittelt (Tabelle 21). Dies entspricht etwa der Hälfte des EC_{50} -wertes des

trans-**24a**-Racemats und bestätigt damit die Beobachtung, dass die für das Racemat gemessene Aktivität nur durch ein Enantiomer ausgelöst wird. An PBMCs zeigte *R,R*-**24a** bis 50 μM keine Toxizität.

#	Verbindung	INA-6 EC ₅₀ (\pm sdv) [μM]	PBMC EC ₅₀ [μM]
1	(\pm) <i>trans</i> - 24a	0.68 (\pm 0.04)	> 100
1	<i>R,R</i> - 24a	0.40 (\pm 0.03)	> 50
2	<i>S,S</i> - 24a	> 100	-

Tabelle 21: Bioaktivitätsergebnisse des *trans*-**24a**-Racemats sowie der Enantiomeren *R,R*-**24a** und *S,S*-**24a**.

Um die Beobachtung der enantiospezifischen Aktivität auf ein breiteres Fundament zu stellen, wurde das zunächst aktivste Carboxamid-Racemat *trans*-**24i** ebenfalls einer Enantiomerentrennung unterzogen. Analog zum Vorgehen bei *trans*-**24a** wurde zunächst eine HPLC-Trennmethode im analytischen Maßstab entwickelt. Dabei stellte sich heraus, dass eine vollständige Basislinien-Trennung erst bei einem Lösungsmittelgemisch mit schwächerer Elutionskraft (A/B 4:6 statt 2:8) erreichen werden konnte, womit sich die Trenndauer folglich erhöht. Eine vergleichbare Retentionsdifferenz beider Signale konnte bei einem Laufmittelverhältnis von 5.6:4.4 erreicht werden. Bedingt durch die längere Retentionszeit, die für eine adäquate Trennung notwendig war, kommt es zu einer Verbreiterung der Signale. Um eine hohe Reinheit der Enantiomere sicherzustellen, wurde für die präparative Trennung deshalb eine Methode mit isokratisches Acetonitril/Wasser-Verhältnis von 5.8:4.2 gewählt, bei der die Retentionsdifferenz der Signale 7.4 Minuten beträgt (Tabelle 22).

#	A/B	t _R (Signal A)	t _R (Signal B)	Δt_R	R _S
1	2:8	4.5	4.7	0.2 ^a	1.1
2	3:7	5.8	6.2	0.4 ^a	1.4
3	4:6	9.3	10.1	0.8	1.9
4	1:1	20.1	22.7	2.6	2.4
5	5.2:4.8	24.5	27.6	3.1	2.4
6	5.4:4.6	30.4	34.4	4.0	2.5
7	5.6:4.4	38.3	43.5	5.2	2.7
8	5.8:4.2	50.8	58.2	7.4	3.3

#	A/B	t_R (Signal A)	t_R (Signal B)	Δt_R	R_S
9	6:4	67.1	77.3	10.2	3.9

Tabelle 22: Enantiomertrennung von *trans*-**24i** bei verschiedenen Zusammensetzungen des Elutionsmittels: Wasser (A), Acetonitril (B). Die chromatographische Auflösung R_S wurde wie oben berechnet (siehe S. 70). ^a Signale nicht basisliniengetrent.

Die Reinheitsanalyse der isolierten Enantiomere zeigte, dass Enantiomer A ohne Verunreinigung durch das zweite Enantiomer isoliert werden konnte. Auch Enantiomer B konnte in zufriedenstellender Reinheit erhalten werden und enthielt nur Spuren (< 2%) von Enantiomer A (Abb. 40).

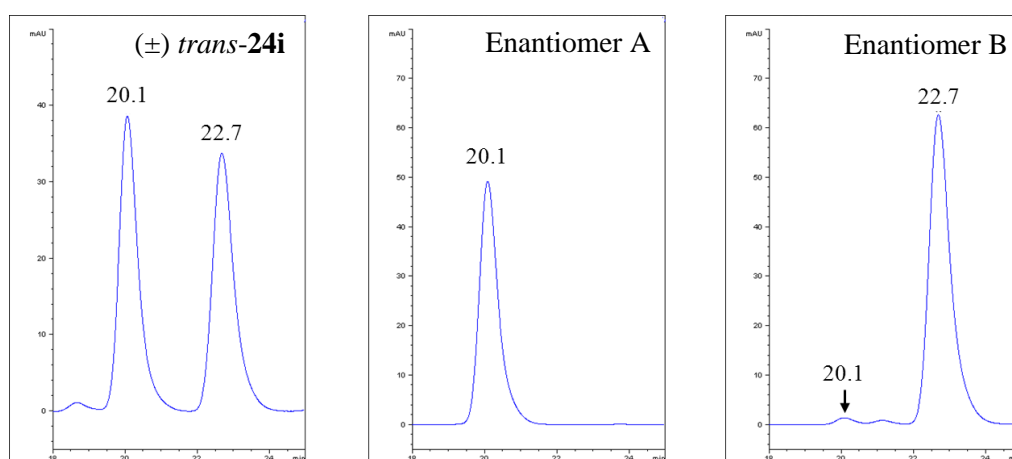


Abbildung 40: HPLC-Chromatogramme des getrennten *trans*-**24i**-Racemats und der separierten Enantiomere.

Die für beide Enantiomere aufgenommenen CD-Spektren zeigten den gleichen Kurvenverlauf wie bereits die Enantiomer A und B von *trans*-**24a** (Abb. 41). Da sich *trans*-**24a** und *trans*-**24i** lediglich um eine Methoxy-Gruppe unterscheiden, ist eine Zuordnung der absoluten Konfiguration durch Vergleich der experimentellen CD-Spektren von **24i** mit den berechneten CD-Spektren von **24a** legitim. Demzufolge handelt es sich bei Enantiomer A um *R,R*-**24i** und bei Enantiomer B um *S,S*-**24i**.

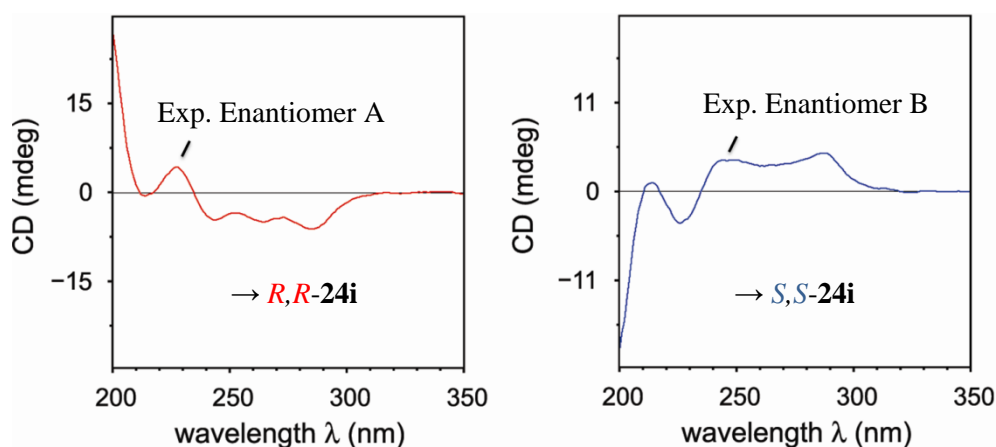


Abbildung 41: Experimentelle CD-Spektren von Enantiomer A und B der Verbindung *trans*-**24i**.

Eine Aktivitätsanalyse zeigte, dass auch in diesem Fall nur das *R,R*-konfigurierte Enantiomer eine Wirkung gegen MM-Zellen hat, während *S,S*-**24i** inaktiv ist (Tabelle 23). Dies wird durch den EC_{50} -Wert von *R,R*-**24i** unterstrichen, der etwa der Hälfte des Racemats entspricht. Wie zu erwarten, zeigte *R,R*-**24i** keine toxischen Effekte an PBMCs.

#	Verbindung	INA-6 EC_{50} (\pm sdv) [μ M]	PBMC EC_{50} [μ M]
1	(\pm) <i>trans</i> - 24i	0.41 (\pm 0.03)	> 100
1	<i>R,R</i> - 24i	0.16 (\pm 0.02)	> 50
2	<i>S,S</i> - 24i	> 25	-

Tabelle 23: Bioaktivitätsergebnisse des *trans*-**24i**-Racemats und der Enantiomere *R,R*-**24i** und *S,S*-**24i**.

5.4.6 Ermittlung des LogD und der PSA zur Einschätzung der Bioverfügbarkeit

Die pharmakokinetischen Eigenschaften eines Wirkstoffs werden maßgeblich durch dessen Lipophilie beeinflusst. So wirkt sich die Polarität eines Moleküls auf jeden der Prozesse aus, die unter der Bezeichnung ADMET (*engl.* A = absorption, D = distribution, M = metabolism, E = excretion, T = toxicity) zusammengefasst werden. Während für eine ausreichende Löslichkeit in physiologischen Medien ein Mindestmaß an Polarität notwendig ist, setzt die Zellpermeabilität gleichzeitig einen lipophilen Charakter des Wirkstoffs voraus. Die Lipophilie wirkt sich daneben auch direkt auf den Metabolismus und die Ausscheidung einer Verbindung aus und bestimmt damit die Bioverfügbarkeit eines Wirkstoffs. Auch die Verteilung zwischen den Kompartimenten und die Toxizität eines Moleküls hängen

unmittelbar von dessen Polarität ab. So nimmt beispielsweise die Fähigkeit, unspezifisch mit verschiedensten Zielstrukturen zu interagieren, mit der Lipophilie eines Wirkstoffs zu. Neben den pharmakokinetischen Parametern werden auch die pharmakodynamischen Eigenschaften, wie z.B. die Interaktion eines Wirkstoffs mit Zielproteinen und damit die Wirksamkeit, durch die Polarität einer Verbindung beeinflusst.^[121]

Eine in der medizinischen Chemie weit verbreitete Methode um ein Wirkstoffmolekül physikochemisch zu charakterisieren und dessen Lipophilie zu quantifizieren, stellt die Ermittlung des Verteilungskoeffizienten zwischen Octanol und Wasser dar. Während dieser für neutrale Moleküle als logP-Wert angegeben wird, verwendet man für ionisierbare Verbindungen den pH-abhängigen logD-Wert.

$$\log P = \frac{[\text{Verbindung}_{\text{Octanol}}]}{[\text{Verbindung}_{\text{Wasser}}^{\text{neutral}}]} \quad \log D_{pH} = \frac{[\text{Verbindung}_{\text{Octanol}}]}{[\text{Verbindung}_{\text{Wasser}}^{\text{neutral}}] + [\text{Verbindung}_{\text{Wasser}}^{\text{ionisiert}}]}$$

Für lipophile Moleküle, die zu einem größeren Anteil in der Octanol-Phase vorliegen, resultieren positive logP/D-Werte, dagegen ergeben sich für polare Verbindungen negative Werte. Ein logP/D-Wert von null stellt eine äquimolare Verteilung einer Verbindung in beiden Phasen dar.

LogD-Werte tragen dem Umstand Rechnung, dass saure und basische Verbindungen je nach pH-Wert zu unterschiedlichen Anteilen neutral oder ionisiert vorliegen, was sich direkt auf deren Polarität auswirkt. Wie an obigen Formeln zu erkennen, entspricht im Fall von nicht-ionisierbaren Verbindungen der logD-Wert dem logP-Wert, da hier die Konzentration an ionischer Spezies null beträgt. Bei ionisierbaren Verbindungen hingegen hängen die Verteilungskoeffizienten logP und logD über folgende Beziehungen miteinander zusammen.

$$\log D_{pH} = \log P - \log (1 + 10^{pH-pK_a}) \quad \text{für Säuren}$$

$$\log D_{pH} = \log P - \log (1 + 10^{pK_a-pH}) \quad \text{für Basen}$$

$$\log D_{pH} = \log P - c_D$$

Dabei entspricht der $\log P$ der Lipophilie der neutralen Verbindung und der $\log D$ der Lipophilie bei einem bestimmten pH-Wert. Da der pK_a -abhängige Korrekturfaktor c_D sowohl für Säuren als auch Basen stets größer-gleich null ist, ist der $\log D$ -Wert immer kleiner-gleich dem $\log P$ -Wert. Dies ist plausibel, da ionisierte Verbindungen aufgrund ihrer Polarität eine höhere Wasserlöslichkeit besitzen.^[122-124]

Die klassische Methode zur Bestimmung der Verteilungskoeffizienten beruht auf einem mehrstündigen Schüttelprozess, bei dem sich die zu untersuchende Substanz in dem 2-Phasensystem aus Octanol und Wasser verteilt. Die anschließende Bestimmung der Konzentration im jeweiligen Lösungsmittel erfolgt gewöhnlich UV/Vis-spektroskopisch. Während dieses Verfahren sehr zeitintensiv ist, wurden Methoden wie die Bestimmung *via* HPLC entwickelt, mit der sich im Hochdurchsatz sehr zuverlässige Daten ermitteln lassen. Grundlage für die chromatographische Bestimmung der Verteilungskoeffizienten ist die sehr gute Korrelation zwischen der Retentionszeit einer Substanz an einer stationären Phase mit RP-18-Säulenmaterial und dessen Verteilungskoeffizienten $\log P$ bzw. $\log D$. Zwischen dem logarithmierten Kapazitätsfaktor k' und dem $\log P/D$ -Wert besteht der folgende lineare Zusammenhang.^[125-127]

$$\log P/D = a \cdot \log k' + b$$

$$\text{wobei } k' = \frac{t_R - t_0}{t_0}$$

t_R = Retentionszeit der Substanz

t_0 = Totzeit (= Retentionszeit der mobilen Phase)

Durch die Ermittlung der Retentionszeiten von Referenzsubstanzen mit bekannten $\log P/D$ -Werten werden im ersten Schritt durch lineare Regression die Parameter a und b der Geradengleichung bestimmt. Die Verteilungskoeffizienten der Testsubstanzen lassen sich im zweiten Schritt anhand der Retentionszeiten ermitteln.

Bei der Wahl der Referenzsubstanzen wurde darauf geachtet, dass diese den relevanten Lipophiliebereich von $\log P = 1.36$ – 4.45 abdecken. Als mobile Phase wurde eine Mischung aus Methanol/Phosphatpuffer (pH 7.4, Verhältnis 7:3) verwendet. Die experimentell bestimmten Retentionszeiten, die $\log k'$ -Werte sowie die Geradengleichungen, die für die

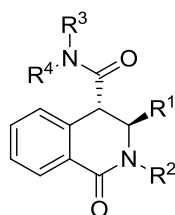
Bestimmung der Verteilungskoeffizienten verwendet wurden, sind im Experimentellen Teil angegeben (S. 197).

Die ermittelten logD-Werte der Isochinolinoncarboxamide **24** liegen unter physiologischen Bedingungen zwischen 0.9 und 4.2 und spiegeln den Einfluss der verschiedenen Substituenten auf die Lipophilie der jeweiligen Derivate wider (Tabelle 24). Die zu beobachtenden Tendenzen decken sich zudem mit den berechneten clogP-Werten der neutralen Verbindungen. Betrachtet man die Carboxamide, die sich in den Resten R¹ und R² unterscheiden, so zeigt sich bei Vergleich der Derivate **24a**, **24h**, **24i** und **24m**, dass die Methoxysubstituenten nahezu keinen Einfluss auf die Lipophilie haben. Während im Vergleich zu **24a** die Polarität durch Hydroxylsubstituenten steigt (**24r**), nimmt der lipophile Charakter der Derivate mit Fluor- (**24n**), Chlor- (**24o**), Methyl- (**24p**) und Phenoxysubstituenten (**24q**) erwartungsgemäß zu. Dies gilt ebenso für die am exozyklischen Amid variierten Verbindungen. Die Verwendung von Toly- (**24b**), Dimethylphenyl- (**24d**), Tetrahydronaphthalinyl- (**24g**) und Dimethylpyridinyl-Resten (**24l**) führt zu größeren logP- und logD-Werten. Derivate, die am exozyklischen Amid Pyridinyl- (**24c** und **24k**) oder Pyrimidinylsubstituenten (**24j**) sowie eine (**24e**) oder zwei Methylgruppen (**24f**) tragen, besitzen kleinere Verteilungskoeffizienten als der ursprüngliche Screening-Hit **24a**.

Zur Beurteilung der Lipophilie werden in der Literatur häufig berechnete logP-Werte herangezogen. So beinhalten die viel zitierten „Lipinski’s Rule of Five“, mit derer sich die Wahrscheinlichkeit einer guten Löslichkeit und Permeabilität/Resorption einschätzen lässt, einen logP-Grenzwert von < 5 .^[128] Der Grund, weshalb anstelle der pK_a-abhängigen logD-Werte häufig logP-Werte Verwendung finden, ist deren einfachere theoretische Berechnung. Die Löslichkeit einer ionisierbaren Verbindung vergrößert sich mit der Differenz zwischen pH und pK_a. Der Einbau von ionisierbaren funktionellen Gruppen hat sich als Strategie zur Verbesserung der Löslichkeit etabliert. Bei ionisierbaren Verbindungen geben LogD-Werte die effektive Lipophilie unter physiologischen Bedingungen somit adäquater wider.^[121, 129] Als Bereich, in dem Wirkstoffe eine ausgeglichene Lipophilie besitzen, wird ein logD von 1–3 angenommen.^[121, 130]

Unter den synthetisierten Carboxamiden liegt neben den Derivaten, die gezielt zur Falsifikation der postulierten HSP70-Bindetasche hergestellt wurden (**24g**, **24l**, **24p** und **24q**), nur die chloresubstituierte Verbindung **24o** deutlich außerhalb des vorgeschlagenen logD-

Bereichs von 1–3. Alle anderen Derivate besitzen unter physiologischen Bedingungen logD-Werte von 0.9–2.9 und zeigen damit einen ausgewogenen lipophilen Charakter.



#	Verbindung	R ¹	R ²	R ³	R ⁴	clogP	logD _{7.4}	PSA [Å ²]
1	(±) <i>trans</i> - 24a	4-MeO-Ph	4-MeO-Ph	6-Me-Pyridin-2yl	H	5.6	2.8	84.4
2	(±) <i>trans</i> - 24b	4-MeO-Ph	4-MeO-Ph	m-Tolyl	H	6.2	2.9	72.1
3	(±) <i>trans</i> - 24c	4-MeO-Ph	4-MeO-Ph	Pyridin-2yl	H	5.3	2.4	85.1
4	(±) <i>trans</i> - 24d	4-MeO-Ph	4-MeO-Ph	3,5-(Me) ₂ -Ph	H	6.1	3.4	70.6
5	(±) <i>trans</i> - 24e	4-MeO-Ph	4-MeO-Ph	Me	H	3.9	1.6	76.3
6	(±) <i>trans</i> - 24f	4-MeO-Ph	4-MeO-Ph	Me	Me	3.6	1.6	76.3
7	(±) <i>trans</i> - 24g	4-MeO-Ph	4-MeO-Ph	Tetrahydro-Naph-1yl	H	6.7	3.4	71.7
8	(±) <i>trans</i> - 24h	Ph	4-MeO-Ph	6-Me-Pyridin-2yl	H	5.6	2.8	76.1
9	(±) <i>trans</i> - 24i	4-MeO-Ph	Ph	6-Me-Pyridin-2yl	H	5.6	2.8	76.1
10	(±) <i>trans</i> - 24j	4-MeO-Ph	Ph	Pyrimidin-2yl	H	3.8	1.8	87.6
11	(±) <i>trans</i> - 24k	4-MeO-Ph	Ph	Pyridin-3yl	H	3.9	2.0	76.7
12	(±) <i>trans</i> - 24l	4-MeO-Ph	Ph	4,6-(Me) ₂ -Pyridin-2yl	H	5.8	3.1	74.7
13	(±) <i>trans</i> - 24m	Ph	Ph	6-Me-Pyridin-2yl	H	5.4	2.8	66.4
14	(±) <i>trans</i> - 24n	4-F-Ph	4-F-Ph	6-Me-Pyridin-2yl	H	5.7	2.9	68.4
15	(±) <i>trans</i> - 24o	4-Cl-Ph	4-Cl-Ph	6-Me-Pyridin-2yl	H	6.5	3.9	66.5
16	(±) <i>trans</i> - 24p	3,5-(Me) ₂ -Ph	3,5-(Me) ₂ -Ph	6-Me-Pyridin-2yl	H	7.4	4.2	65.2
17	(±) <i>trans</i> - 24q	4-MeO-Ph	4-PhO-Ph	6-Me-Pyridin-2yl	H	6.8	4.0	78.0
18	(±) <i>trans</i> - 24r	HO-Ph	HO-Ph	6-Me-Pyridin-2yl	H	4.0	0.9	112.9

Tabelle 24: Übersicht über berechnete clogP- und PSA-Werte sowie die experimentell ermittelten logD-Werte aller synthetisierten Isochinolinon-Carboxamide.

Neben der Verwendung der Verteilungskoeffizienten zur Einschätzung der pharmakokinetischen Eigenschaften eines Wirkstoffs hat sich auch die polare Moleküloberfläche (*engl.* polar molecular surface; PSA) als sehr nützlicher Parameter herausgestellt. Die PSA ist dabei als zugängliche Oberfläche aller Sauerstoff- und Stickstoffatome sowie der daran gebundenen Wasserstoffe in einem Molekül definiert. Mit dessen Hilfe lassen sich vor allem die

Permeabilitätseigenschaften eines Wirkstoffs d.h. dessen Resorptionsvermögen gut abschätzen. Dies lässt sich physikalisch auf den Einfluss polarer Gruppen im Desolvationsprozess erklären, der während der Migration von einer polaren extrazellulären Umgebung in lipophile Membranen abläuft.^[129, 131]

Grundsätzlich unterscheidet man drei verschiedene Berechnungsmethoden der PSA. Während die statische PSA auf der geometrieoptimierten 3D-Struktur eines einzigen Konformers basiert (Abb. 42), errechnet sich die dynamische PSA_d aus dem Mittelwert der PSA verschiedener energieminimierter Konformere, die nach ihrer Wahrscheinlichkeit gewichtet werden.^[132] Um den rechnerischen Aufwand vor allem in Hinblick auf Hochdurchsatz-Screeningverfahren zu minimieren, wurde ein dritte Variante entwickelt, die als topologische polare Moleküloberfläche (TPSA) bezeichnet wird. Dabei handelt es sich um einen Fragment-basierten Ansatz, bei dem sich die ermittelte PSA additiv aus Beiträgen einzelner polarer Wirkstofffragmente zusammensetzt.^[133]

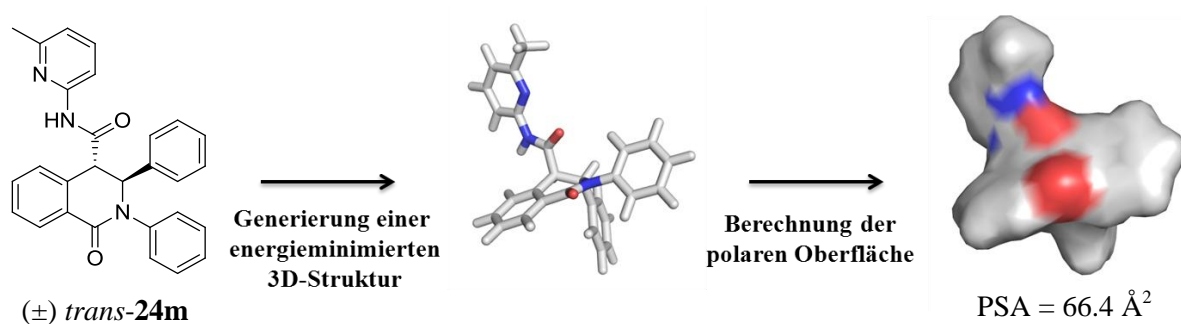


Abbildung 42: Die Berechnung der polaren Moleküloberfläche (PSA) auf Basis einer energieminimierten Konformation am Beispiel des Carboxamids *trans*-24m.

Während die TPSA-Methode die Abhängigkeit der tatsächlichen polaren Oberfläche von der Konformation des Wirkstoffs vernachlässigt, kommt der daraus resultierende rechnerische Zeitgewinn erst bei großen Moleküldatenbanken zum Tragen. Daneben konnte auch gezeigt werden, dass die statische polare Moleküloberfläche, die im Gegensatz zur PSA_d nur auf Basis einer energieminimierten Konformation beruht, in den meisten Fällen für eine sehr gute Korrelation mit dem Absorptionsverhalten eines Wirkstoffs ausreicht.^[134]

Der Zusammenhang von PSA und dem Anteil der Resorption oral verabreichter Wirkstoffe wird durch eine sigmoidale Kurve beschrieben (Abb. 43). Für bekannte Wirkstoffe, die eine nahezu vollständige Resorption von > 90% zeigen, liegt die berechnete PSA in der Regel

unter 63 \AA^2 . Beträgt die polare Moleküloberfläche hingegen Werte größer als 139 \AA^2 , wird ein Resorptionsanteil von $< 10\%$ beobachtet.^[132]

Um das Resorptionsverhalten der synthetisierten Carboxamide **24** abschätzen zu können, wurde deren polare Moleküloberfläche mit Hilfe der statischen PSA-Methode berechnet (Tabelle 24). Wie sich beim Vergleich der Ergebnisse zeigt, liegen mit Ausnahme des hydroxylsubstituierten Derivats **24r** (PSA = 113 \AA^2) die Werte aller Verbindungen (**24a-q**) in einem Bereich von $65\text{--}88 \text{ \AA}^2$. Basierend auf der Korrelation von PSA und dem Resorptionsanteil eines Wirkstoffs lässt sich so eine durchaus passable Permeabilität und die Aufnahme der synthetisierten Carboxamid **24a-q** in einer Größenordnung von $55\text{--}90\%$ erwarten (Abb. 43).

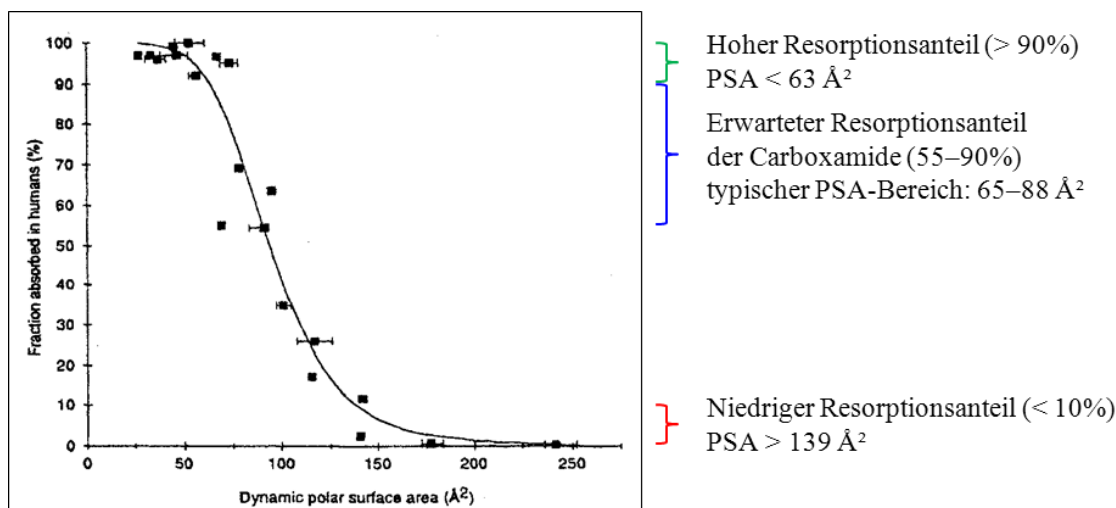


Abbildung 43: Die Korrelation der PSA mit dem Anteil an resorbiertem Wirkstoff nach oraler Gabe bei Menschen zeigt einen sigmoidalen Zusammenhang.^[132, Fig. 1] © 1997 Plenum Publishing Corporation. Abbildung mit freundlicher Genehmigung der Springer Science and Business Media.

5.4.7 Betrachtung von LE und LLE der aktiven Carboxamide

Um die Effizienz von Wirkstoffen zu beurteilen, hat sich in der medizinische Chemie die Berechnung der Ligandeneffizienz (*engl.* ligand efficiency; LE) und der lipophilen Ligandeneffizienz (*engl.* ligand lipophilic efficiency; LLE) etabliert.^[135] Das Konzept der LE-Berechnung basiert dabei auf der Beobachtung, dass die Wirksamkeit in einer Serie von verwandten Derivaten stark mit deren molekularem Gewicht korreliert.^[136] Während der Optimierung einer Wirkstoffstruktur nimmt das molekulare Gewicht typischer Weise zu.^[95] Bei der Auswahl eines Derivates, das als Ausgangspunkt für weitere Optimierungen dienen soll, ist daher die Wirksamkeit als alleiniges Kriterium ungeeignet. Vielmehr empfiehlt es

sich, die biologische Aktivität um physikalische Einflussfaktoren zu korrigieren und dieses Ergebnis weiteren Entscheidungen zugrunde zu legen. Als häufig verwendeter Bezugspunkt zur Berechnung von LE-Werten hat sich die Anzahl an Schweratomen (*engl.* heavy atom count; HA) eines Wirkstoffmoleküls etabliert, mit der die Anzahl aller nicht-Wasserstoffatomen gemeint ist.

$$LE = [pIC_{50} \text{ (oder } pK_i) \div HA] \cdot 1.37$$

Je größer die Effizienz des Liganden, desto stärker tragen die physikochemischen Eigenschaften des Moleküls zur Wirksamkeit bei. Für Wirkstoffkandidaten wird ein Richtwert von > 0.3 empfohlen.^[95]

Neben der Anzahl an nicht-Wasserstoffatomen hat sich die Lipophilie einer Verbindung als zweiter wichtiger Einflussfaktor für das Verhalten eines Wirkstoffs herausgestellt. Wie bereits erwähnt nimmt die Wahrscheinlichkeit für toxische Nebenwirkungen mit der Lipophilie eines Wirkstoffs zu. Um diesen Aspekt bei der Wahl potenzieller Wirkstoffmoleküle zu berücksichtigen, hat sich die Ermittlung von LLE-Werten bewährt.

$$LLE = pIC_{50} \text{ (oder } pK_i) - cLogP \text{ (oder } LogD)$$

Dieser Kennwert bringt damit das Bestreben zum Ausdruck, Wirkstoffe mit maximaler Aktivität und gleichzeitig minimaler Lipophilie zu entwickeln. Eben dieses Ziel wird auch bei der Entwicklung aktueller Wirkstoff-Kandidaten verfolgt, wie der Vergleich der Lipophilie-Werte von Ausgangsmolekülen und optimierten Wirkstoffen zeigt.^[95] Heute geht man davon aus, dass Wirkstoff-Kandidaten einen LLE-Wert von > 5 besitzen sollten.

Um einen relativen Vergleich unter den aktiven Isochinolin-Carboxamiden **24** anzustellen, wurden entsprechende LE- und LLE-Werte auf Basis der ermittelten effektiven Wirkstoffkonzentrationen (EC_{50}) und der LogD-Werte berechnet (Tabelle 25).

#	Verbindung	EC ₅₀ [μM]	LE	LLE	#	Verbindung	EC ₅₀ [μM]	LE	LLE
1	(±) <i>trans</i> - 24a	0.68	0.23	3.4	9	(±) <i>trans</i> - 24j	0.20	0.27	4.9
2	<i>R,R</i> - 24a	0.40	0.24	3.6	10	(±) <i>trans</i> - 24k	0.57	0.25	4.2
3	(±) <i>trans</i> - 24b	0.88	0.22	3.2	11	(±) <i>trans</i> - 24l	0.34	0.25	3.4
4	(±) <i>trans</i> - 24c	0.53	0.24	3.9	12	(±) <i>trans</i> - 24m	2.3	0.23	2.8
5	(±) <i>trans</i> - 24d	0.95	0.22	2.6	13	(±) <i>trans</i> - 24n	6.4	0.20	2.3
6	(±) <i>trans</i> - 24e	7.1	0.23	3.5	14	(±) <i>trans</i> - 24o	2.9	0.22	1.6
7	(±) <i>trans</i> - 24i	0.41	0.25	3.6	15	(±) <i>trans</i> - 24p	43	0.16	0.2
8	<i>R,R</i> - 24i	0.16	0.27	4.0	16	(±) <i>trans</i> - 24r	30	0.18	3.6

Tabelle 25: Die ermittelten EC₅₀-Werte an INA-6-MM-Zellen sowie die berechneten LE- und LLE-Werte der aktiven Isochinolin-Carboxamide.

Da inhibitorische Konzentrationen (IC₅₀) in der Regel deutlich geringer ausfallen als effektive Konzentrationen (EC₅₀), können zwar die Richtwerte für LE und LLE nicht direkt zur Bewertung der ermittelten Werte herangezogen werden, deren Vergleich untereinander liefert jedoch ebenfalls wertvolle Informationen. Zur Bewertung der Qualität einzelner Verbindungen bietet sich eine graphische Darstellung von LE und LLE an (Abb. 44).

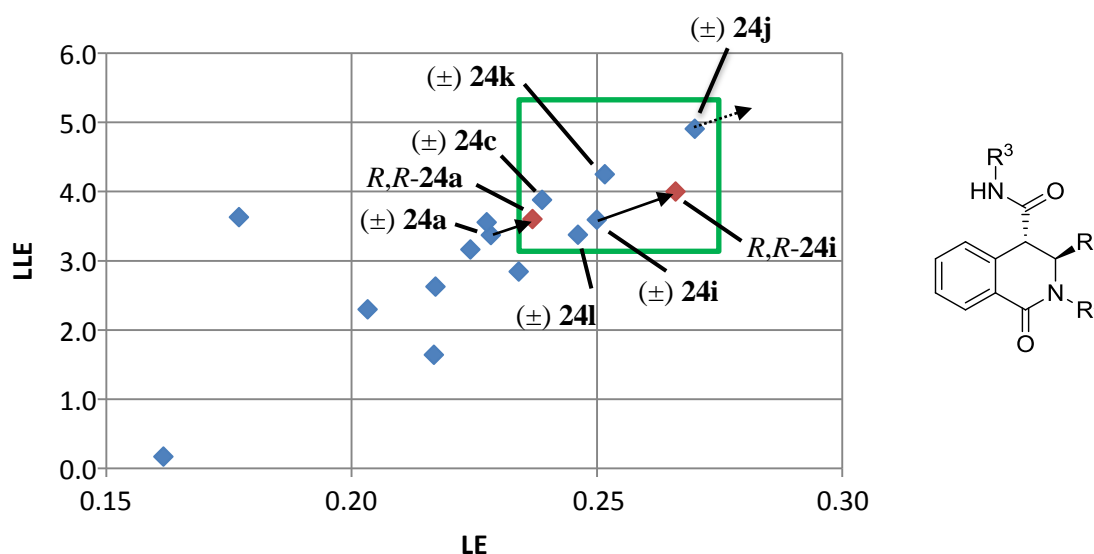


Abbildung 44: LE und LLE der aktiven Isochinolin-Carboxamide. Racemische Derivate sind in Blau dargestellt, isolierte Enantiomere in Rot.

Betrachtet man die racemischen *trans*-Carboxamide, zeigen die Verbindungen **24c**, **24i**, **24j**, **24k** und **24l** die größten LE- und LLE-Werte. Während darunter nur **24c** an R¹ und R² mit

zwei Methoxyphenylresten substituiert ist, handelt es sich bei **24i**, **24j**, **24k** und **24l** um Derivate, die alle an R¹ den Methoxyphenylsubstituenten und R² einen Phenylrest tragen. Bei dem so substituierten Isochinolin-Gerüst lässt sich die größte Ligandeneffizienz aller Carboxamide beobachten. Vergleicht man diese vier Verbindungen, die sich nur durch den Substituenten am exozyklischen Amid (=R³) unterscheiden, zeigt sich der Einfluss der Lipophilie auf die LLE. Die Lipophilie sinkt vom Dimethylpyridinyl- (**24l**) über den Methylpyridinyl- (**24i**) und Pyridinyl- (**24k**) bis zum Pyrimidinyl-Substituenten (**24j**) kontinuierlich ab, wodurch die LLE zunimmt. Verbindung **24j** zeigt die günstigste Kombination aus LE und LLE aller racemischen Carboxamide.

Wie in Kapitel 5.4.5 ausgeführt, zeigen nur die *R,R*-Enantiomere der Carboxamide eine therapeutische Wirkung auf MM-Zellen. Im Vergleich zu den racemischen Verbindungen resultiert damit eine Halbierung der effektiven Konzentration. Da sich die Anzahl an nicht-Wasserstoffatomen sowie die Lipophilie für die reinen Enantiomere nicht von denen der entsprechenden Racemate unterscheidet, resultieren für die reinen Enantiomere günstigere LE- und LLE-Werte. Dies wird bei Vergleich der Koordinaten von (\pm) *trans*-**24a** mit *R,R*-**24a** sowie von (\pm) *trans*-**24i** mit *R,R*-**24i** deutlich (Abb. 44). Analog dazu lässt eine Enantiomeren-trennung von (\pm) *trans*-**24j** eine weitere Steigerung der LE und LLE erwarten.

5.5 Detaillierte *In-vitro*-Bioaktivitäts- und Toxizitätsanalyse

Da MM-Zellen nach genetischem Knockdown von HSP70 den apoptotischen Zelltod einleiten,^[45] wurde während der Entwicklung pharmakologischer HSP70-Inhibitoren in einem *In-vitro*-Assay zunächst das Vermögen der synthetisierten Verbindungen untersucht, ebenfalls Apoptose bei MM-Zellen auszulösen. Dabei zeigten die aktivsten Isochinolin-Carboxamide **24** effektive Konzentrationen im submikromolaren Bereich.

Um eine tumorspezifische Aktivität an MM-Zellen von unspezifisch toxischen Effekten zu unterscheiden, wurde der Einfluss der Isochinoline auf die Viabilität von mononukleären Zellen des peripheren Blutes untersucht. Während für Toxizitäts-Assays häufig genetisch veränderte oder transformierte Zelllinien verwendet werden, die sich vom physiologischen Zustand entsprechender Zellen teils deutlich unterscheiden, bietet ein Assay-System mit frisch isolierte Blutzellen ein Testmodell, das sehr nahe an *In-vivo*-Bedingungen heranreicht.^[137] Mit Ausnahme des phenolsubstituierten Isochinolin-Derivats *trans*-**24r**

($EC_{50} = 80 \mu\text{M}$) zeigte keine der getesteten Verbindungen toxische Effekte an PBMCs ($EC_{50} > 100 \mu\text{M}$), was einen spezifischen Wirkmechanismus nahelegt.

Um den zellulären Wirkmechanismus der synthetisierten Isochinolin-Derivate zu untersuchen, wurde in der Arbeitsgruppe Chatterjee (E. Müller) der Expressionslevel verschiedener Proteine in MM-Zellen nach Behandlung mit dem Carboxamid *trans*-**24i** analysiert. Dabei konnte eine Reduktion der Proteinlevel von HSP72 und HSP73, nicht aber von HSP90, beobachtet werden (Abb. 45A). Dies legt nahe, dass *trans*-**24i** spezifisch an die HSP70-Isoformen bindet und es in Folge dessen zu einer Defunktionalisierung der Proteine und einer darauf folgenden Degenerierung kommt. Der unveränderte Proteinlevel des Strukturproteins α -Tubulin signalisiert, dass die Integrität der Zelle zu diesem Zeitpunkt noch nicht beeinflusst ist, die Zellen also viabel sind. Die Behandlung von MM-Zellen mit *trans*-**24i** beeinflusst wie erwartet auch den Expressionslevel der Klientenproteine des HSP70/90-Chaperon-Komplexes (Abb. 45B). So ist beispielsweise das Niveau der Proteine C-Raf, IKK α und MEK im Vergleich zur Kontrolle stark reduziert. Dagegen bleibt das Protein ERK, das kein Klient des HSP70/90-Komplexes ist, unbeeinflusst. Beide Befunde sprechen für eine spezifische und wirksame Inhibition von HSP70.

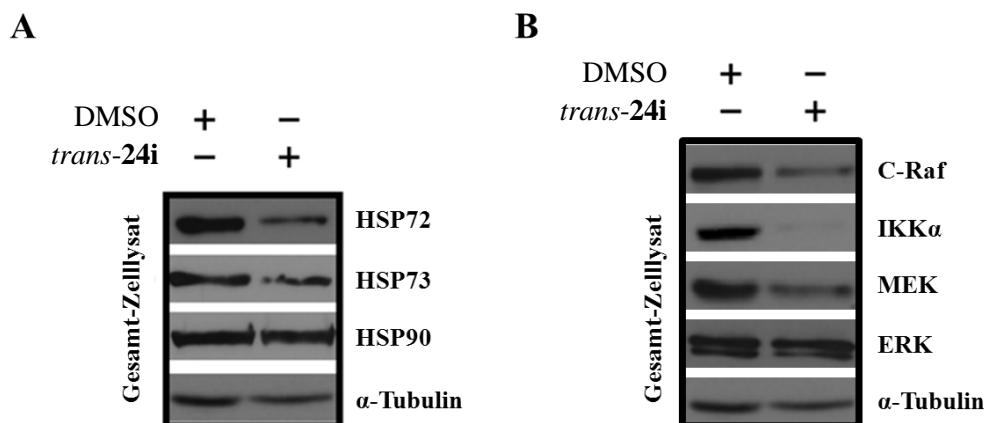


Abbildung 45: Nach Behandlung von MM-Zellen mit *trans*-**24i** zeigen Westernblot-Analysen eine Reduktion des HSP72- und HSP73-Proteinlevels (**A**) sowie eine Reduktion der Proteinklienten des HSP70/90-Chaperon-Komplexes (**B**).

Daneben konnte gezeigt werden, dass der nach Behandlung mit *trans*-**24i** beobachteten Apoptose von MM-Zellen ein Caspase-abhängiger Mechanismus zugrunde liegt (Abb. 46). Während der Anteil viabler MM-Zellen durch *trans*-**24i** im Vergleich zu einer Negativ-

Kontrolle wirksam reduziert wird, verhindert die gleichzeitige Verwendung des Caspase-Inhibitors Z-VAD-FMK den durch *trans-24i* induzierten Zelltod.

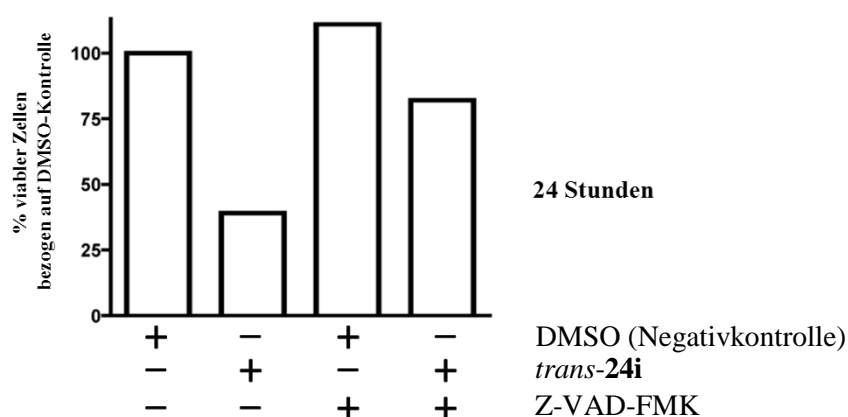


Abbildung 46: Viabilitätsanalyse von MM-Zellen nach Behandlung von *trans-24i* in Anwesenheit oder Abwesenheit des Caspase-Inhibitors Z-VAD-FMK.

Bei der intrinsischen Initiation der Apoptose spielen der Apoptose-induzierte Faktor (AIF) und die sogenannte Caspase-Kaskade eine wichtige Rolle. Eine Variante der Apoptose-initiation basiert auf der Translokation von AIF in den Zellkern, wo AIF die Degradation der DNA und damit den Zelltod auslöst. Unabhängig davon kann eine Aktivierung der Caspase-Kaskade zur Auslösung von Apoptose führen. Dabei wird zunächst inaktive Caspase-9 durch Spaltung aktiviert. Die so aktivierte Caspase-9 überführt anschließend inaktive Caspase-3 in ihre aktivierte Form, welche den proteolytischen Abbau des DNA-Reparaturenzyms PARP einleitet und so zu Apoptose führt.

Da sowohl AIF als auch Caspase-9 und -3 durch HSP70 in der jeweils inaktiven Form stabilisiert werden,^[138-141] wurde deren Aktivierungsstatus nach Behandlung untersucht. Dabei zeigte eine Analyse der Protein-Expression im Zellkern nach einer Inkubation mit *trans-24i* eine deutliche Translokation von AIF (Abb. 47A). Die Integrität des Zellkerns wird durch die unverminderte Präsenz des nukleären Strukturproteins Lamin-A signalisiert. Die gleichzeitige Inkubation mit Z-VAD-FMK hat keinen Einfluss und verdeutlicht, dass es sich bei der Translokation von AIF um einen Caspase-unabhängigen Prozess handelt. Nach Behandlung von MM-Zellen mit *trans-24i* zeigt die Analyse des gesamten Zelllysats, dass sowohl Caspase-9 und -3 aktiviert wurden als auch der Abbau von PARP eingeleitet wurde (Abb. 47B). Wie erwartet unterbleibt die Aktivierung der Caspase-Kaskade bei zeitgleicher Behandlung mit dem Caspase-Inhibitor Z-VAD-FMK. Diese Beobachtungen stützen damit

ebenfalls die Hypothese, dass die induzierte Apoptose auf die Interaktion von *trans-24i* mit HSP70 zurückzuführen ist.

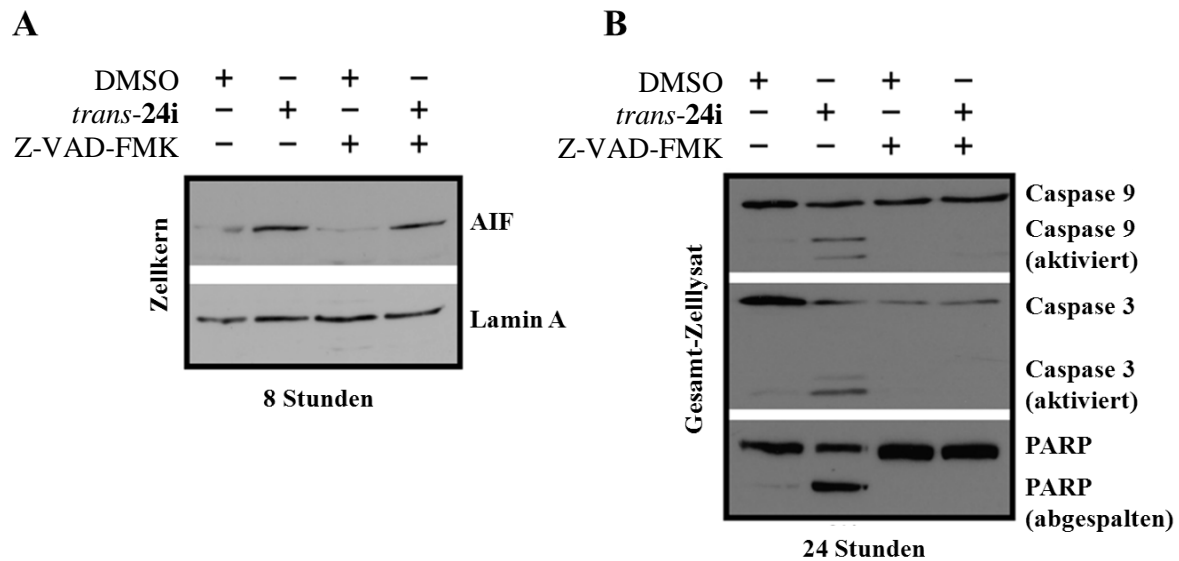


Abbildung 47: Nach Inkubation von MM-Zellen mit *trans-24i* lässt sich sowohl eine deutliche Translokation von AIF in den Zellkern (**A**) als auch die Aktivierung der Caspase-Kaskade (**B**) beobachten.

Wie eingangs erwähnt (Kapitel 1.2) geht man heute davon aus, dass für eine wirksame Behandlung des Multiplen Myeloms eine duale Hemmung von HSP70 und HSP90 notwendig ist. Um zu untersuchen, ob sich die als HSP70-Inhibitoren entwickelten Isochinolinon-Derivate für eine duale Therapie mit einem HSP90-Inhibitor eignen, wurden in einem ersten Versuch persistente MM-Zelllinien (AMO, JN3 und MMS) mit *trans-24i* und NVP-AUY922 (**5**) behandelt (Abb. 48). Während der Anteil viable Zellen nach Inkubation mit **5** (5 bzw. 15 nM) auf 85–90% zurück ging, führte die Einzelbehandlung mit *trans-24i* (30 µM) zu einer Reduktion der Zellviabilität auf 50–65%. Bei zeitgleicher Inkubation der MM-Zelllinien mit beiden Wirkstoffen, zeigte sich ein klarer additiver Effekt. Unter Verwendung der gleichen Konzentrationen wie bei der Behandlung mit nur einem Wirkstoff ging der Anteil viable Zellen auf 25–35% zurück.

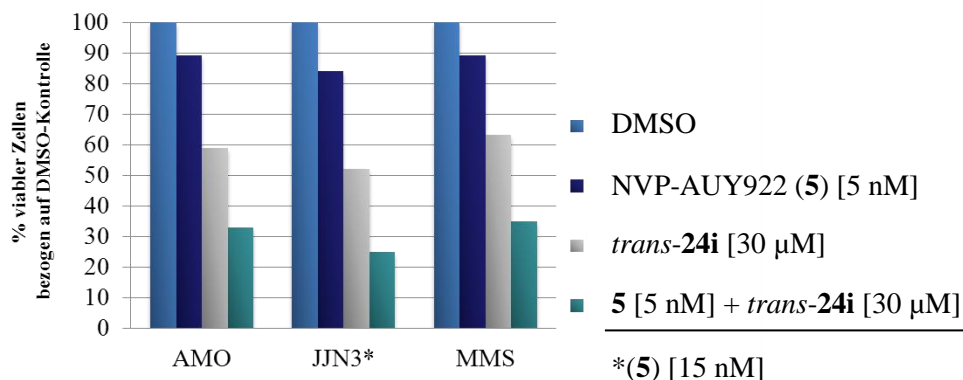


Abbildung 48: Eine duale Hemmung von HSP70 und HSP90 durch gleichzeitige Inkubation mit *trans*-24i und NVP-AUY922 (5) führt in verschiedenen MM-Zelllinien zu einem additiven pro-apoptotischen Effekt.

5.6 Aktivitätsuntersuchung in einer *In-vivo*-Studie

Aufgrund der vielversprechenden Bioaktivitäts- und Toxizitätsergebnisse, die die synthetisierten Isochinolin-Carbonsäurederivate (**36** und **39**) und -Carboxamidderivate (**24**) *in vitro* gezeigt hatten, sollte eine repräsentative Verbindung in einer *In-vivo*-Studie untersucht werden. Zu diesem Zweck stand im Rahmen der Klinischen Forschergruppe ein Maus-Modell des Multiplen Myeloms zu Verfügung, das kürzlich in der Arbeitsgruppe Beilhack entwickelt wurde.^[142] Im Unterscheid zu anderen murinen MM-Modellen basiert dieses Modell auf MOPC-315.BM-Luciferase⁺-Zellen, womit die Tumorentwicklung nicht-invasiv durch ein Biolumineszenz-Bildgebungsverfahren *in vivo* verfolgt werden kann. Zur Abschätzung der erforderlichen Wirkstoff-Dosis wurde in der Arbeitsgruppe Meinel eine Simulation der Pharmakokinetik durchgeführt, für die eine physikochemische Charakterisierung des Wirkstoffs notwendig war.

5.6.1 Bestimmung physikochemischer Parameter ausgewählter Isochinolinon-Derivate

Für die in enger Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe Meinel (A. Sakalis) durchgeführte Ermittlung der physikochemischen Parameter pK_a, logP und Löslichkeit, wurden zwei Isochinolinon-Derivate ausgewählt. Dabei handelte es sich zum einen um das Carboxamid *trans*-24i, das an INA-6-Zellen mit einem EC₅₀-Wert von 0.4 µM zu den potentesten Verbindungen zählt, jedoch eine geringe Löslichkeit besitzt und zum anderen um

das Natriumcarboxylat *trans*-**39c**, dessen geringere Aktivität ($EC_{50} = 1.8 \mu\text{M}$) mit einer besseren Löslichkeit gepaart ist. Zusätzlich zu diesen Parametern wurde in unserer Arbeitsgruppe (A. Hörst) die Plasma-Protein-Bindung ermittelt.

Die Bestimmung der pK_a - und $\log P$ -Werte sowie die Ermittlung der Löslichkeit wurde mit Hilfe eines Sirius T3 PhysChem Messsystems durchgeführt. Da die experimentelle Bestimmung der Löslichkeit und des $\log P$ -Wertes von einer präzisen Ermittlung der pK_a -Werte abhängt, wurden im ersten Schritt die pK_a -Werte beider Verbindungen bestimmt.

5.6.1.1 Bestimmung der pK_a -Werte

Mit Hilfe des Sirius-Systems kann die Ermittlung von pK_a -Werten auf zwei unterschiedliche Methoden erfolgen. Bei der potentiometrischen Bestimmung wird die Konzentration freier Protonen im Lauf der Titration konventionell durch eine pH-Elektrode detektiert. Durch Differenzmessung mit und ohne Analysenprobe lässt sich die Anzahl der durch die Substanz gebundenen Protonen ermitteln. Normalisiert man diesen Wert auf die mittlere Molekülladung des Analyten (+1 Kation, 0 Neutral-Spezies, -1 Anion) und trägt dies im sogenannten Bjerrum-Plot gegen den pH-Wert auf, lässt sich der pK_a -Wert ablesen. Bei einprotonigen Säuren oder Basen entspricht der pK_a -Wert dem pH-Wert, an dem 50% der Substanz ionisiert vorliegen (Abb. 49). Für eine pH-metrische Bestimmung von pK_a -Werten ist eine Mindestkonzentration der Probe von 0.5 mM in wässriger Lösung notwendig.^[143]

Demgegenüber ist für die zweite Methode, bei der der pK_a -Wert einer Substanz UV-metrische ermittelt wird, eine Proben-Konzentration von 20 μM ausreichend. Voraussetzung für dieses Messverfahren ist ein Chromophor, der maximal 3–4 Bindungslängen von der Ionisierungsstelle entfernt ist. Da der Ionisationsgrad in diesem Fall den molaren Extinktionskoeffizienten des Chromophors beeinflusst, lässt sich ein pH-abhängiges Absorptionsprofil aufnehmen. Mit Hilfe mathematischer Verfahren kann aus den drei Größen pH-Wert, Absorption und Wellenlänge die Konzentration der einzelnen Spezies bei unterschiedlichen pH-Werten errechnet werden (Abb. 50). Liegen bei einem bestimmten pH-Wert zwei aufeinanderfolgende Spezies in gleichen Konzentrationen vor, entspricht dieser pH-Wert dem pK_a -Wert.^[143]

Für eine pH-metrische Bestimmung der pK_a -Werte von *trans*-**39c** (1.9 mM) wurde eine Titration beginnend im hohen pH-Bereich durchgeführt. Hier liegt *trans*-**39c** als geladenes Carboxylat-Ion vor und ist damit besser löslich als die im niedrigen pH-Bereich vorliegende protonierte Carbonsäure. Bei Erreichen des pH-Wertes von 3.8 begann jedoch die neutrale Spezies zu präzipitieren, weshalb eine zuverlässige Bestimmung des pK_a -Wertes mit der pH-metrischen Messmethode nicht möglich war. Legt man ungeachtet dessen für eine Regression der Bjerrum-Kurve die Messpunkte zwischen pH 3.8 und 10.7 zugrunde, wird ein pK_a -Wert von 2.9 vorhergesagt (Abb. 49).

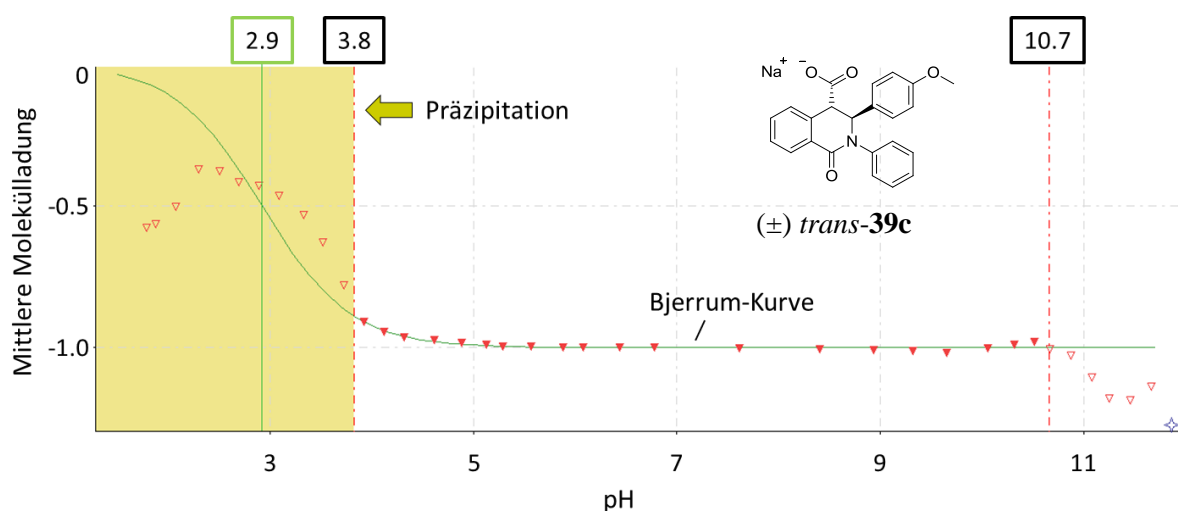


Abbildung 49: Bjerrum-Plot der pH-metrischen Titration von *trans*-**39c**.

Für eine UV-metrischen Bestimmung des pK_a -Wertes wurde eine 0.1 mM-Lösung von *trans*-**39c** verwendet. Bei dieser Konzentration bildeten sich im gesamten pH-Bereich von 2–12 keine Präzipitate. Unabhängig davon, ob die Titration im hohen oder niedrigen pH-Bereich begonnen wurde, konnte mit dieser Methode reproduzierbar ein pK_a -Wert von 3.2 ermittelt werden (Abb. 50). Mit der Carbonylfunktion und dem CH-aciden Proton des Isochinolin-Grundgerüsts wären für *trans*-**39c** allerdings zwei pK_a -Werte zu erwarten gewesen. Während der pK_a von 3.2 die Säurestärke der Carboxylgruppe beschreibt, ist die Acidität der CH-Gruppe im Carbonsäurederivat *trans*-**39c** offensichtlich so gering, dass der entsprechende pK_a -Wert außerhalb des Messbereichs von pH 2–12 liegt. Den Grund für die geringe CH-Acidität stellt der mangelnde elektronenziehende Charakter des Carboxylats dar. Diese Erklärung stimmt mit den experimentellen Bedingungen für die Epimerisierung der *cis*-Carbonsäuren in die entsprechenden *trans*-Derivate überein (vgl. Kapitel 5.3.2). So wurde bei der Umsetzung von *cis*-Carbonsäuren mit Natriumhydrogencarbonat-Lösung (1 M,

pH = 10.3) das entsprechende *cis*-konfigurierte Natriumcarboxylat erhalten. Für die Epimerisierung zum *trans*-konfigurierten Natriumcarboxylat und die zugrunde liegende Deprotonierung der CH-Einheit war hingegen eine Umsetzung mit konzentrierter Natronlauge (8 M, pH = 14.9) erforderlich.

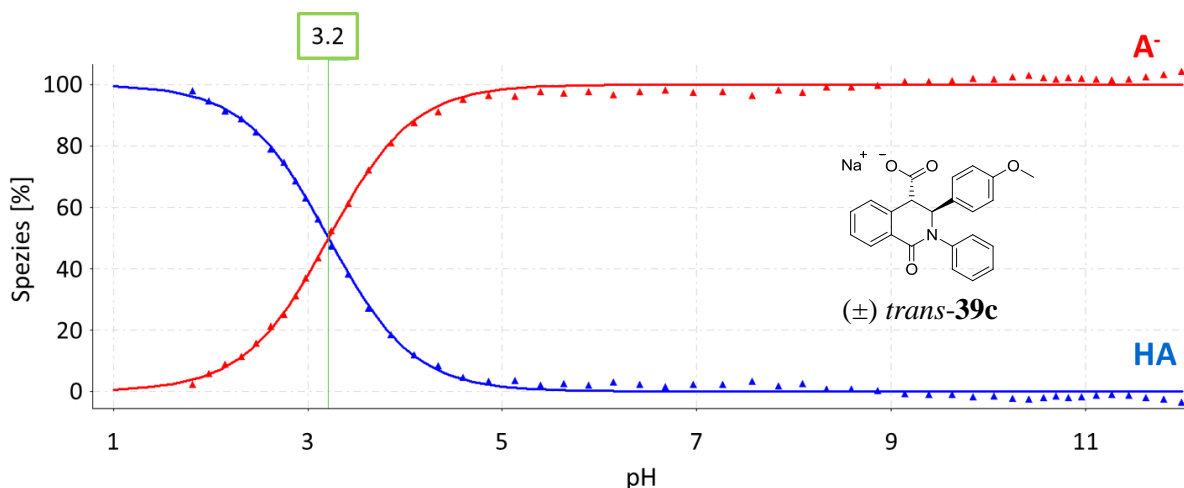


Abbildung 50: Die UV-metrische Titration von *trans*-39c liefert einen pK_a-Wert von 3.2. Die neutrale Spezies ist mit HA gekennzeichnet, die anionische Spezies mit A⁻.

Aufgrund der geringen Löslichkeit des Carboxamids *trans*-24i gestaltete sich auch die pK_a-Bestimmung mit der empfindlicheren UV-metrischen Methode problematisch. Selbst bei einer Konzentration von 20 μM kam es zur vollständigen Präzipitation, was durch einen Absorptionsverlust im UV-Spektrum zu erkennen war. Erst die Zugabe von 1% Polyvinylpyrrolidon (PVP), das unter anderem als Additiv zur Verbesserung der Löslichkeit organischer Substanzen verwendet wird,^[144] machte eine UV-metrische Titration möglich (Abb. 51).

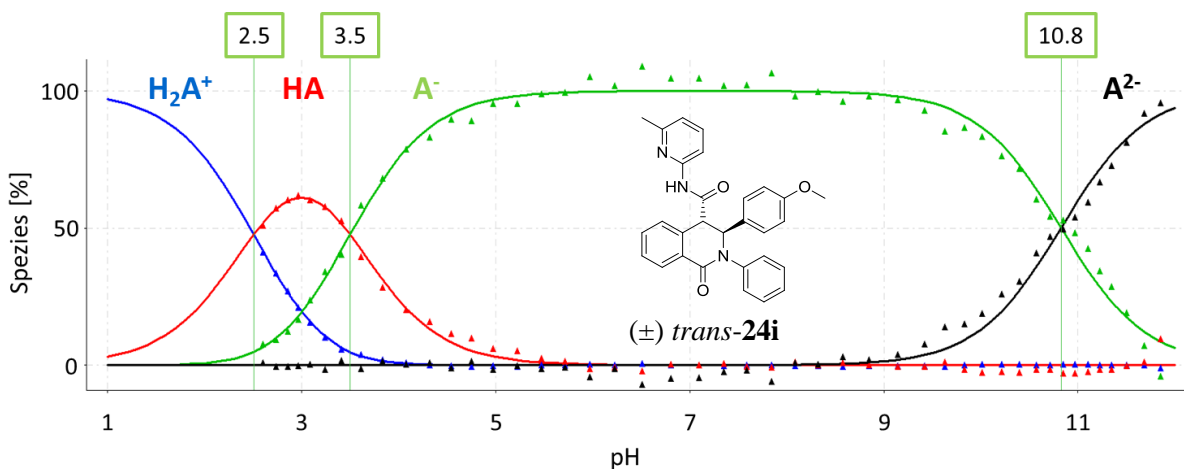


Abbildung 51: Die UV-metrische Titration von *trans*-24i lieferte drei pK_a-Werte. Die protonierte Spezies ist mit H₂A⁺, die neutrale Spezies mit HA, die einfach deprotonierte Spezies mit A⁻ und die zweifach deprotonierte Spezies mit A²⁻ gekennzeichnet.

Wie erwartet wurden für *trans*-**24i** drei pK_a -Werte gefunden. Während der pK_a -Wert von 2.5 den Pyridinsubstituenten als sehr schwache Base ausweist, macht der pK_a -Wert von 3.5 die Säurestärke des CH-aciden Protons in Position 4 des Isochinolin-Grundgerüsts deutlich. Wie die Struktur des Tautomers veranschaulicht, handelt es sich bei den Carboxamiden **24** um phenyloge Carbaminsäure-Derivate, was die hohe Acidität erklärt. Der dritte pK_a -Wert von 10.8 zeigt, dass es sich bei der sekundären Amidstruktur um eine sehr schwache Säure handelt (Abb. 52).

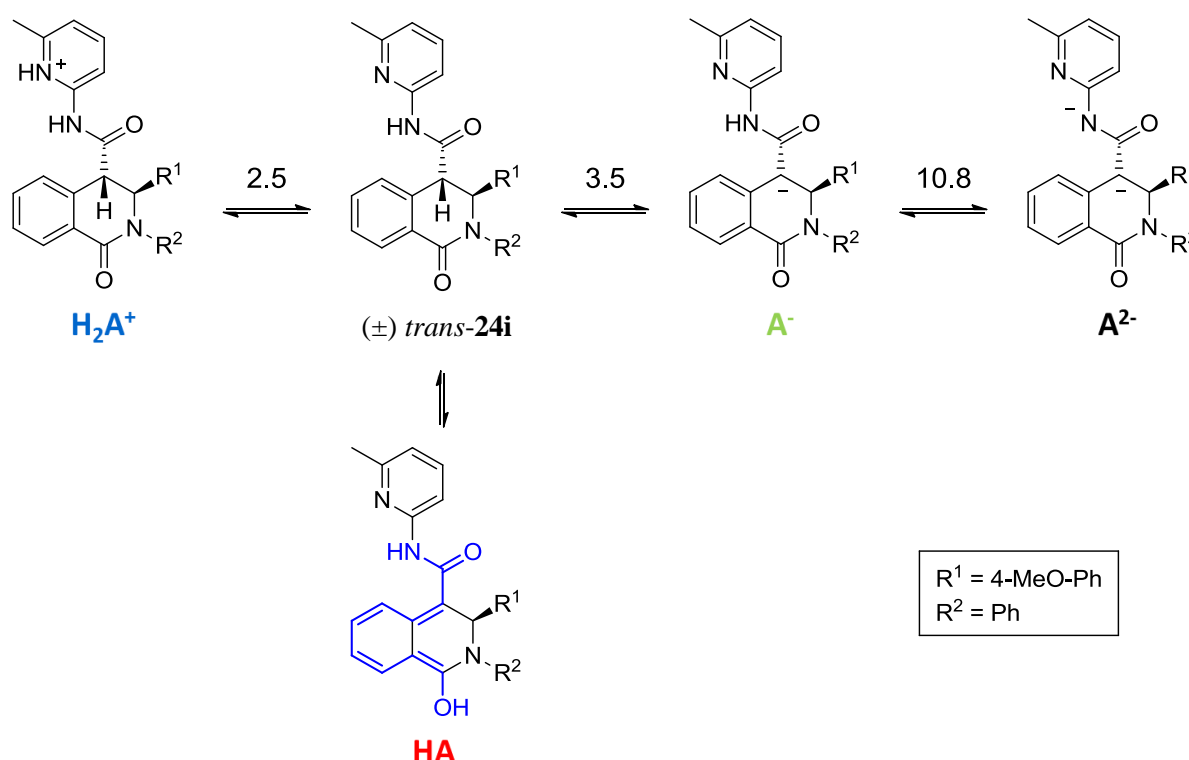


Abbildung 52: Die vier Protonierungszustände H_2A^+ , HA, A^- und A^{2-} . Das Tautomer von *trans*-**24i** stellt ein phenyloges Carbaminsäure-Derivat dar.

Da die experimentelle Bestimmung des $\log P$ -Wertes und der Löslichkeit nur im pH-metrischen Messbetrieb durchgeführt werden kann, *trans*-**24i** jedoch auch unter Verwendung von PVP als Additiv nicht in der erforderlichen Konzentration von 0.5 mM löslich ist, wurde eine weitere Charakterisierung der Carboxamid-Verbindung ausgesetzt. Im Hinblick auf die *In-vivo*-Untersuchung wurde stattdessen das besser lösliche Carboxylat *trans*-**39c** für eine weitere physikochemische Charakterisierung ausgewählt.

5.6.1.2 Bestimmung des $\log P$ -Wertes von *trans*-39c

Die potentiometrische Bestimmung des Verteilungskoeffizienten $\log P$ beruht auf der Veränderung des pK_a -Wertes in dem 2-Phasensystem aus Octanol und Wasser (Abb. 53). Während der pK_a -Wert das Dissoziationsgleichgewicht einer Säure in Wasser wiedergibt (I), stellt der $\log P$ -Wert den Verteilungskoeffizient der neutralen Spezies in einem 2-Phasensystem aus Octanol und Wasser dar (II). In Zusammenhang damit steht das Verteilungsgleichgewicht des Anions zwischen den beiden Phasen, das als $\log P_{\text{Ion}}$ bezeichnet wird (III), und das Dissoziationsgleichgewicht der Säure in Octanol, das als p_oK_a -Wert angegeben wird (IV).

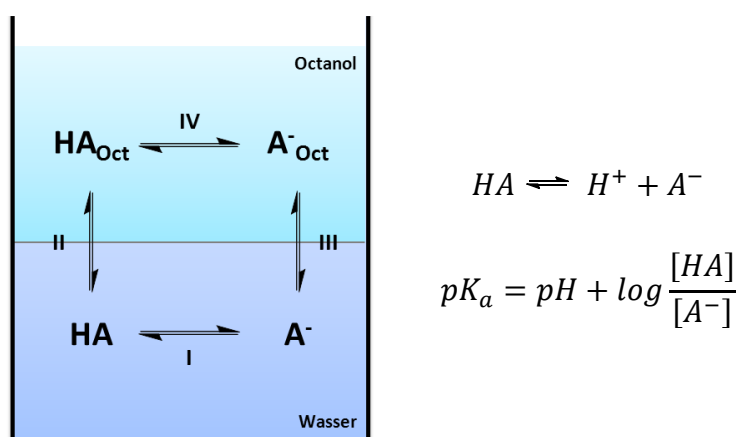


Abbildung 53: Das Ionisationsgleichgewicht am Beispiel einer Säure in einem 2-Phasensystem aus Octanol und Wasser. Abbildung erstellt in Anlehnung an Lit. [143].

Durch den Verteilungsprozess der protonierten Säure zwischen den beiden Phasen wird die neutrale Spezies HA dem wässrigen Gleichgewicht I entzogen, woraufhin sich das Gleichgewicht nach dem Prinzip von Le Chatelier auf die Seite der Säure verschiebt. Diese Gleichgewichtsverschiebung führt im Fall von Säuren zu einer Vergrößerung des pK_a -Wertes verglichen mit dem pK_a -Wert in rein wässrigem Milieu. Im Gegensatz dazu führt die Verteilung von basischen Verbindungen in einem 2-Phasensystem zu einer Reduktion des pK_a -Wertes. Da die Verschiebungsdifferenz des pK_a -Wertes damit direkt von der Lipophilie einer Verbindung abhängt, kann der $\log P$ -Wert für Säuren und Basen potentiometrisch bestimmt werden, wenn der pK_a -Wert in reinem Wasser bekannt ist.^[143]

Für die Ermittlung des $\log P$ -Wertes von *trans*-39c wurde eine pK_a -Bestimmung bei unterschiedlichen Mischungsverhältnissen von Octanol und Wasser durchgeführt. Während der pK_a in rein wässrigem Milieu 3.2 beträgt, wurde bei Zugabe von 1% Octanol ein pK_a von

4.4 ermittelt. Bei 5%-igem Octanol-Anteil ergab sich ein pK_a -Wert von 4.9 und bei 40% Octanol ein pK_a -Wert von 5.9 (Abb. 54). Für die neutrale Carbonsäure wird aus der Verschiebung der pK_a -Werte ein $\log P$ -Wert von 3.2 errechnet.

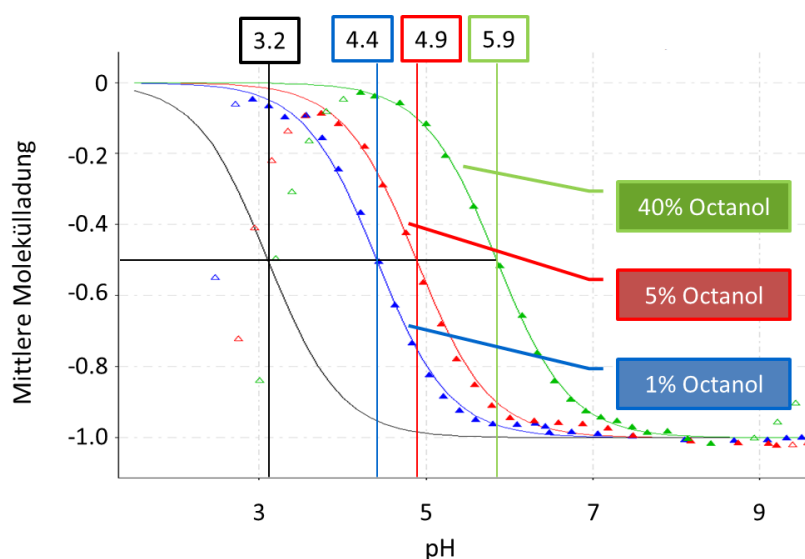


Abbildung 54: Bjerrum-Plot der pH-metrischen Titration von *trans*-**39c** bei unterschiedlichen Volumina an Octanol. Die schwarze Kurve stellt den Titrationsverlauf in reinem Wasser dar.

5.6.1.3 Bestimmung der Löslichkeit von *trans*-**39c**

Zur Beschreibung der Löslichkeit von ionisierbaren Verbindungen werden verschiedene Löslichkeitsbegriffe voneinander unterschieden. So bezeichnet die thermodynamische Löslichkeit die Sättigungskonzentration aller ionisierbaren Spezies einer Verbindung. Für eine einprotonige Säure setzt sie sich demnach aus der Konzentration der Neutral-Spezies HA und der Konzentration des Anions A^- zusammen.

$$S_{therm} = [HA] + [A^-]$$

Da der Dissoziationsgrad ionisierbarer Verbindungen vom pH-Wert abhängt, ist so auch die thermodynamische Löslichkeit eine pH-abhängige Größe.

Demgegenüber beschreibt die intrinsische Löslichkeit die Sättigungskonzentration der Neutral-Spezies, im Fall einer Säure also die Konzentration der protonierten Form.

$$S_{intr} = [HA]$$

Damit handelt es sich bei der intrinsischen Löslichkeit um eine pH-unabhängige Größe. Bei einem pH-Wert, bei dem eine ionisierbare Verbindung ausschließlich in der neutralen Form vorliegt, sind die thermodynamische Löslichkeit und die intrinsische Löslichkeit identisch.

Für die experimentelle Bestimmung der Löslichkeit macht man sich den Umstand zu Nutze, dass es bei einer potentiometrischen Titration in Folge einer Präzipitation zu einer Abweichung von der Bjerrum-Titrationskurve der vollständig gelösten Probe kommt (Abb. 55).^[143]

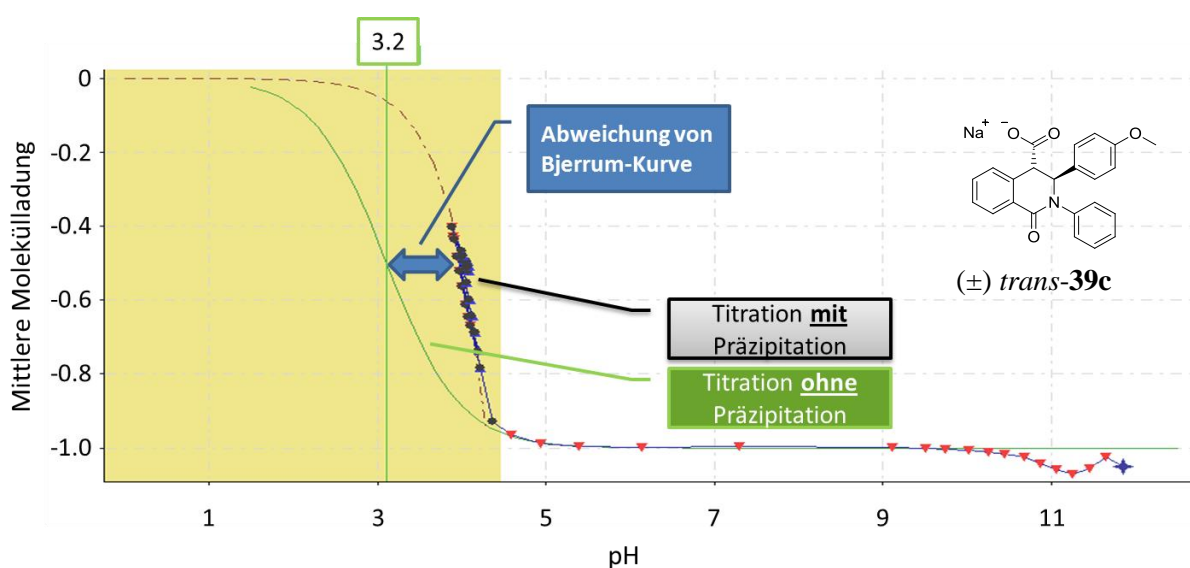


Abbildung 55: Titrationsprofil für *trans*-39c. Im Vergleich zu einer 0.1 mM Probe, die über den gesamten pH-Bereich vollständig gelöst bleibt, bilden sich bei einer 3.8 mM Probe ab einem pH-Wert von 4.5 die ersten Präzipitate. Durch die Präzipitation kommt es zu einer Abweichung von der Bjerrum-Kurve der gelösten Probe.

Mit Hilfe der Henderson-Hasselbalch-Gleichung lässt sich bei Kenntnis des pK_a -Wertes der Verbindung, der eingesetzten Substanzmenge und dem pH-Wert, bei dem es zur Präzipitation der Probe gekommen ist, die Löslichkeit der untersuchten Verbindung in Wasser ermitteln.

$$pK_a = pH + \log \frac{[HA]}{[A^-]}$$

Für das Carbonsäurederivat *trans*-39c wurde auf diese Weise eine intrinsische Wasserlöslichkeit von 310 μM berechnet. Anhand des thermodynamischen Löslichkeitsprofils kann die Löslichkeit von *trans*-39c bei unterschiedlichen pH-Wert abgelesen

werden (Abb. 56). Für pH-Werte, die um eine Einheit größer sind als der pK_a -Wert der Verbindung ($pH = pK_a + 1$), lässt sich ein linearer Zusammenhang zwischen $\log S$ und pH beobachten, bis die maximale Löslichkeit der ionisierten Spezies erreicht ist.^[145] Ab dieser Konzentration flacht die Kurve der thermodynamischen Löslichkeit ab und läuft horizontal fort.^[146] Während Proben, deren Konzentrationen unterhalb der Löslichkeitskurve liegen, bei dem jeweiligen pH-Wert löslich sind, sind Proben mit einer Konzentration oberhalb der Löslichkeitskurve unlöslich. Die für die Ermittlung der Löslichkeit von *trans*-**39c** verwendete Probelösung hatte beispielsweise eine Konzentration von 3.8 mM und bildete ab einem pH-Wert von 4.5 die ersten Präzipitate. In Übereinstimmung mit dem ermittelten Löslichkeitsprofil ist auch die Beobachtung, die während der pH-metrischen Bestimmung des pK_a -Wertes gemacht wurde. Die 1.9 mM-Probelösung bildete bei einem pH-Wert von 3.8 Präzipitate (vgl. Kapitel 5.6.1.1).

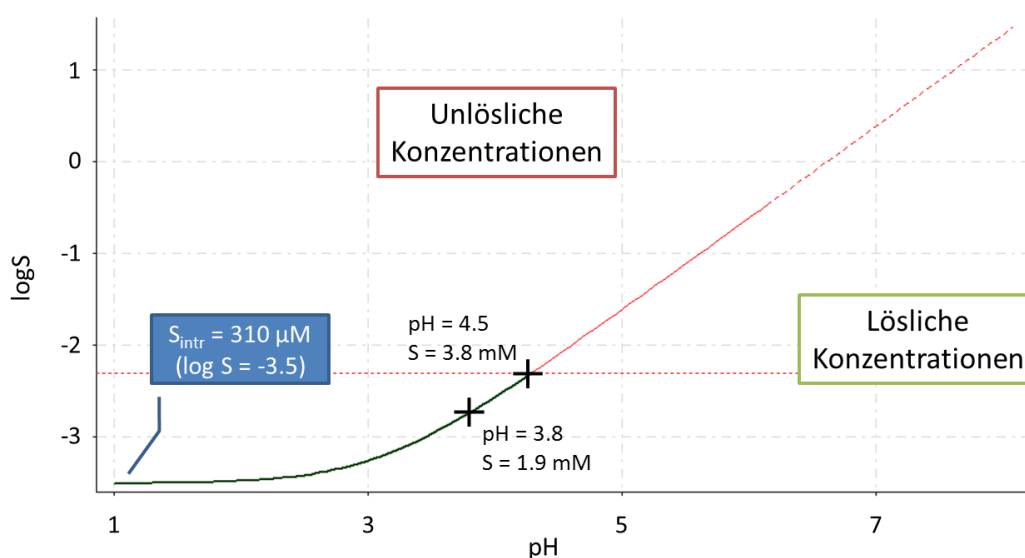


Abbildung 56: Thermodynamisches Löslichkeitsprofil von *trans*-**39c** in Wasser.

Um die Wasserlöslichkeit organischer Verbindungen zu verbessern, hat sich das nicht-toxische PVP als Additiv bewährt. So lässt sich beispielsweise in einer 8%-igen PVP-Lösung die Löslichkeit des Wirkstoffs Paracetamol von 14 mg/mL auf 27 mg/mL steigern.^[147] Als eine erste Strategie zur Verbesserung der Löslichkeit von *trans*-**39c** wurde deshalb der Einfluss einer 1%-igen PVP-Lösung untersucht. Dabei zeigte sich, dass mit dieser Formulierung eine Steigerung der intrinsischen Löslichkeit von 310 µM auf 650 µM erreicht werden konnte (Abb. 57). Eine 5.3 mM *trans*-**39c**-Probe erreichte bei einem pH-Wert von 4.1 die maximale Löslichkeit in der 1%-igen PVP-Lösung und präzipitierte.

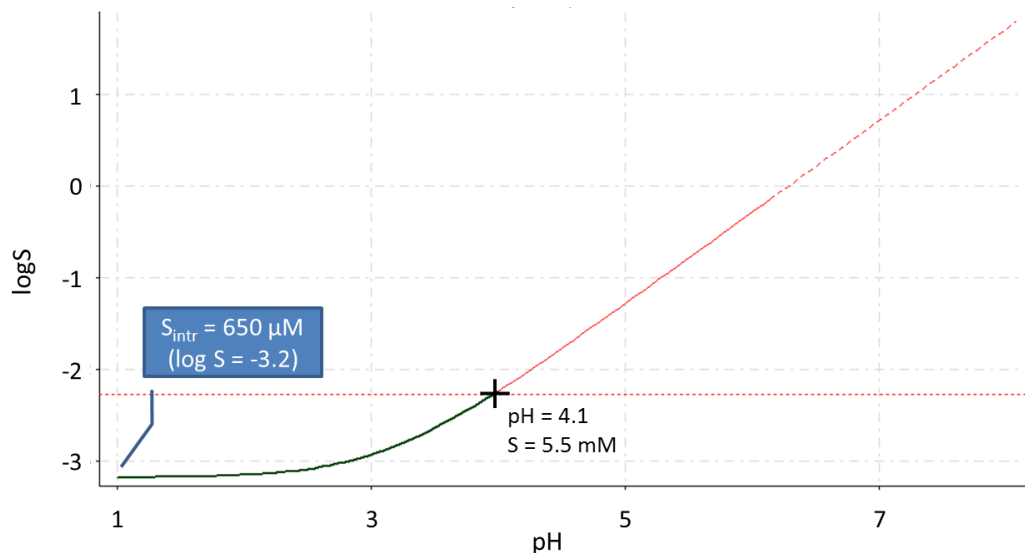


Abbildung 57: Thermodynamisches Löslichkeitsprofil von *trans-39c* in einer 1%-igen PVP Lösung.

5.6.1.4 Bestimmung der Plasmaproteinbindung von *trans-39c*

Plasma-Proteine, die mit 60–80 g/L den größten Teil der im Blutplasma gelösten Substanzen ausmachen und sich in Albumine und Globuline unterteilen lassen, haben verschiedenste Funktion im Organismus. Neben der Aufrechterhaltung des osmotischen Drucks und der Stabilisierung des Blut-pH-Wertes sind sie auch für den Transport von Substanzen mit geringer Wasserlöslichkeit verantwortlich. Nach der Aufnahme von Arzneistoffen in den Blutkreislauf werden diese häufig an Plasmaproteine gebunden, womit sich der Anteil an freiem Wirkstoff reduziert. Da jedoch nur der ungebundene Anteil einer Verbindung an Enzymen oder Rezeptoren wirken kann, ist die Kenntnis der Plasmaproteinbindung eine wichtige Größe für die Ermittlung der therapeutischen Wirkstoffdosis.^[148]

Die Ermittlung der Plasmaproteinbindung erfolgt in unserem Arbeitskreis (A. Hörst) mit Hilfe der kontinuierlichen Ultrafiltrationsmethode. Zentraler Bestandteil der analytischen Anlage zur Bestimmung der Proteinbindung ist eine Filtrationszelle, die mit einer Ultrafiltrationsmembran ausgestattet ist und die nur von niedermolekularen Plasmabestandteilen wie Wirkstoffmolekülen passierbar ist. Im ersten Schritt wird das mit einem Phosphatpuffer (pH = 7.4) gefüllte Messsystem in einem kontinuierlichen Pumpvorgang mit Wirkstoff beladen und der Konzentrationsanstieg UV-metrisch detektiert (Abb. 58, A). Sobald die maximale Konzentration erreicht ist und sich im UV-Spektrum ein Plateau einstellt, wird der Wirkstoff wieder mit Pufferlösung aus dem Messsystem

ausgespült. Im zweiten Schritt wird Serumalbumin mit Hilfe einer Pumpe in die Messzelle gespült und dort von der Filtermembran zurückgehalten (Abb. 58, B). Über die Konzentration der verwendeten Albumin-Lösung und das geförderte Volumen lässt sich die Menge an Plasmaprotein ermitteln, das sich zu diesem Zeitpunkt in der Filtrationszelle befindet. Ist der Protein-Ladevorgang abgeschlossen, wird erneut die Wirkstofflösung in das mit Protein befüllte System gepumpt und die Elution UV-metrisch gemessen. Durch die Interaktion des Wirkstoffs mit dem in der Messzelle befindlichen Albumins kommt es im Vergleich zur Messung ohne Plasmaprotein zu einem verzögerten Anstieg der Elution (Abb. 58, C). Die Differenz aus beiden Messungen spiegelt die Plasmaproteinbindung des Wirkstoffs wider und kann so für verschiedene Wirkstoff-Protein-Verhältnisse ermittelt werden.

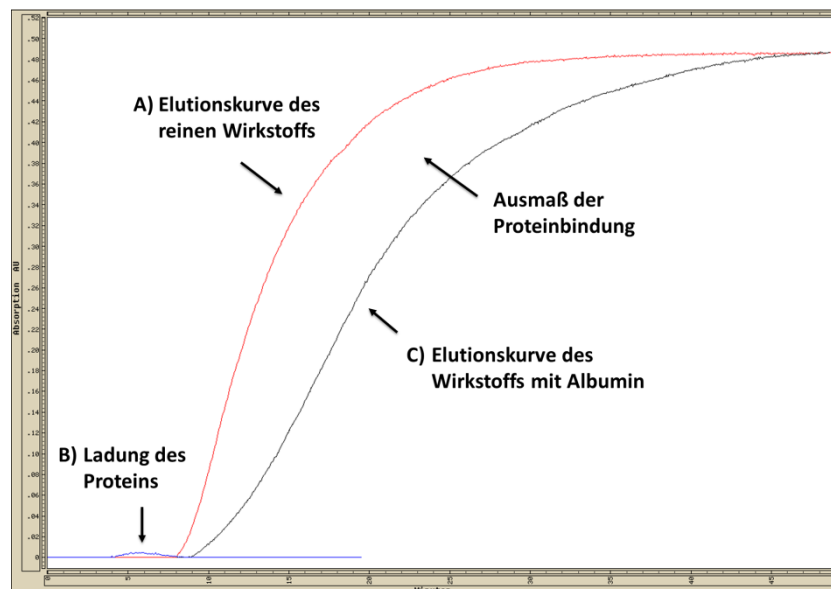


Abbildung 58: Bestimmung der Plasmaproteinbindung mit Hilfe der kontinuierlichen Ultrafiltration.

Die Plasmaproteinbindung des Isochinolin-Derivats *trans*-**39c** an humanem Serumalbumin wurde nach diesem Verfahren in vier unabhängigen Messungen bestimmt. Dabei zeigte sich, dass der Wirkstoff bei einem Wirkstoff-Protein-Verhältnis von $1:10^3$ zu 91% an Albumin gebunden wird und zu 9% frei im Plasma vorliegt. Für die Bindungsaffinität von *trans*-**39c** an humanem Albumin ergibt sich im Durchschnitt ein pK-Wert von 4.26 (Tabelle 26).

#	Proteinbindung	pK
1	88.7	4.12
2	89.4	4.15
3	93.6	4.38
4	93.4	4.37
Mittelwert	91.3	4.26
sdv	2.6	0.14
rel sdv [%]	2.8	3.27

Tabelle 26: Die Plasmaproteinbindung von *trans*-**39c** an humanem Serumalbumin.

5.6.2 Aktivitätsuntersuchung an MOPC-MM-Zellen und erweiterte Toxizitätsprüfung

Während das Aktivitäts-Screening der synthetisierten Isochinolin-Derivate an MM-Zellen der INA-6-Zelllinie durchgeführt wurde, basiert das murine *In-vivo*-Modell auf der Multiplen Myelom-Zelllinie MOPC-315. Da die Wirksamkeit an unterschiedlichen Zelllinien variieren kann, wurde für das Natriumcarboxylat *trans*-**39c**, dessen Aktivität *in vivo* untersucht werden sollte, zusätzlich die effektive Wirksamkeit an MOPC-Zellen *in vitro* ermittelt.

Dabei zeigte sich, dass der EC₅₀-Wert an MOPC-315-Zellen mit 6.3 µM etwas höher liegt, als der EC₅₀-Wert an INA-6-Zellen (1.8 µM). Um den Anteil viabler MM-Zellen auf 10% zu reduzieren (EC₉₀), war bei INA-6-Zellen eine Wirkstoffkonzentration von 3.0 µM nötig. Bei MOPC-315-Zellen lag der EC₉₀-Wert bei 14 µM (Abb. 59).

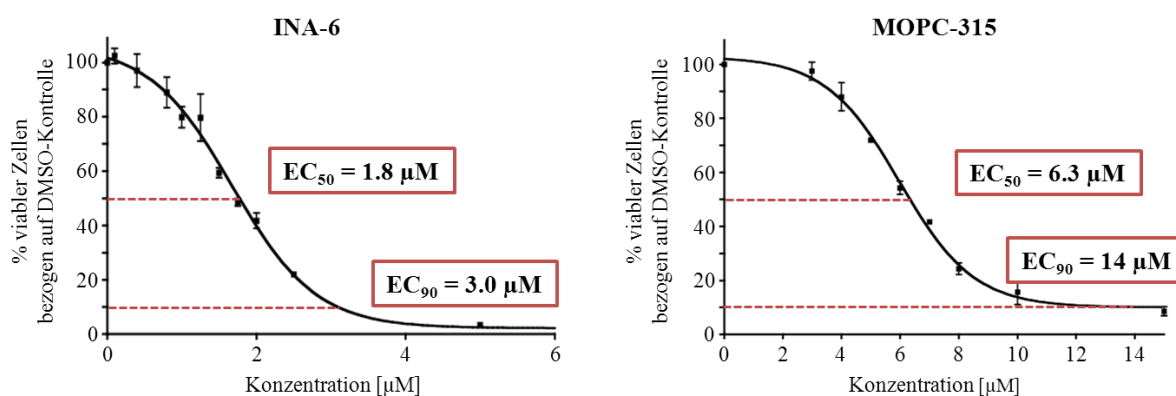


Abbildung 59: Viabilitätsverlauf für die Behandlung von INA-6- und MOPC-315-Zellen mit *trans*-**39c**.

Durch Vergleich der Wirksamkeiten der synthetisierten Isochinolinon-Derivate an Multiplen Myelom-Zellen und an PBMCs konnte bereits eine unspezifisch zelltoxische Wirkung ausgeschlossen werden (vgl. Kapitel 5.5). Um im Vorfeld der *In-vivo*-Studie das Toxizitätspotenzial von *trans*-**39c** weiter einzugrenzen, wurde neben dessen Hämolyseaktivität auch der Effekt auf die Viabilität von Leber- und Nierenzellen untersucht. Dabei wurde festgestellt, dass das Carboxylat *trans*-**39c** keine zytotoxische Aktivität an humanen embryonalen Nierenepithelzellen (HEK293T) und an humanen Leberzellen (HepG2) zeigt. Auch eine Zersetzung der Erythrozyten konnte bis zu einer Wirkstoffkonzentration von 100 μM nicht beobachtet werden (Tabelle 27). Aufgrund der vorliegenden *In-vitro*-Daten sollte sich das Carboxylat *trans*-**39c** für eine Untersuchung der Wirksamkeit *in vivo* eignen.

Verbindung	INA-6 EC ₅₀ (\pm sdv) [μM]	MOPC-315 EC ₅₀ (\pm sdv) [μM]	PBMC EC ₅₀ [μM]	HEK293T EC ₅₀ [μM]	HepG2 EC ₅₀ [μM]	Erythrozyten EC ₅₀ [μM]
(\pm) <i>trans</i> - 39c	1.8 (\pm 0.1)	6.3 (\pm 0.1)	> 100	> 160	> 160	> 160

Tabelle 27: Während die Aktivität von *trans*-**39c** an MM-Zellen im einstelligen mikromolaren Bereich liegt, zeigt die Verbindung bis 100 μM bzw. 160 μM keine toxischen Nebenwirkungen.

5.6.3 Design und Ergebnisse der *In-vivo*-Studie

Unter Verwendung der ermittelten physikochemischen Parameter von *trans*-**39c** wurde in der Arbeitsgruppe Meinel mit Hilfe des Programms Simcyp Simulator[®] eine Simulation der Pharmakokinetik im Mausorganismus durchgeführt. Darauf aufbauend wurde für verschiedene Wirkstoffdosen ein Konzentrationsprofil von *trans*-**39c** im Blutplasma ermittelt. Dabei zeigte sich, dass bei einer Verabreichung von 40 μg im Abstand von 12 h ein mittlerer Plasmaspiegel von 25 μM zu erwarten ist. Da diese Konzentration etwas über dem EC₉₀-Wert an MOPC-Zellen liegt, wurde eine Dosis von 40 μg als potenziell wirksam betrachtet. Um ein unteres Dosislimit für eine *In-vivo*-Behandlung zu bestimmen, wurde eine zweite Dosis mit 4 μg vorgeschlagen. Bei Verabreichung im Abstand von 12 h ist eine systemische Konzentration im Plasma von 3 μM zu erwarten. Da diese Konzentration unterhalb der wirksamen Dosis liegt, sollte hierbei kein therapeutischer Effekt zu beobachten sein (Abb. 60).

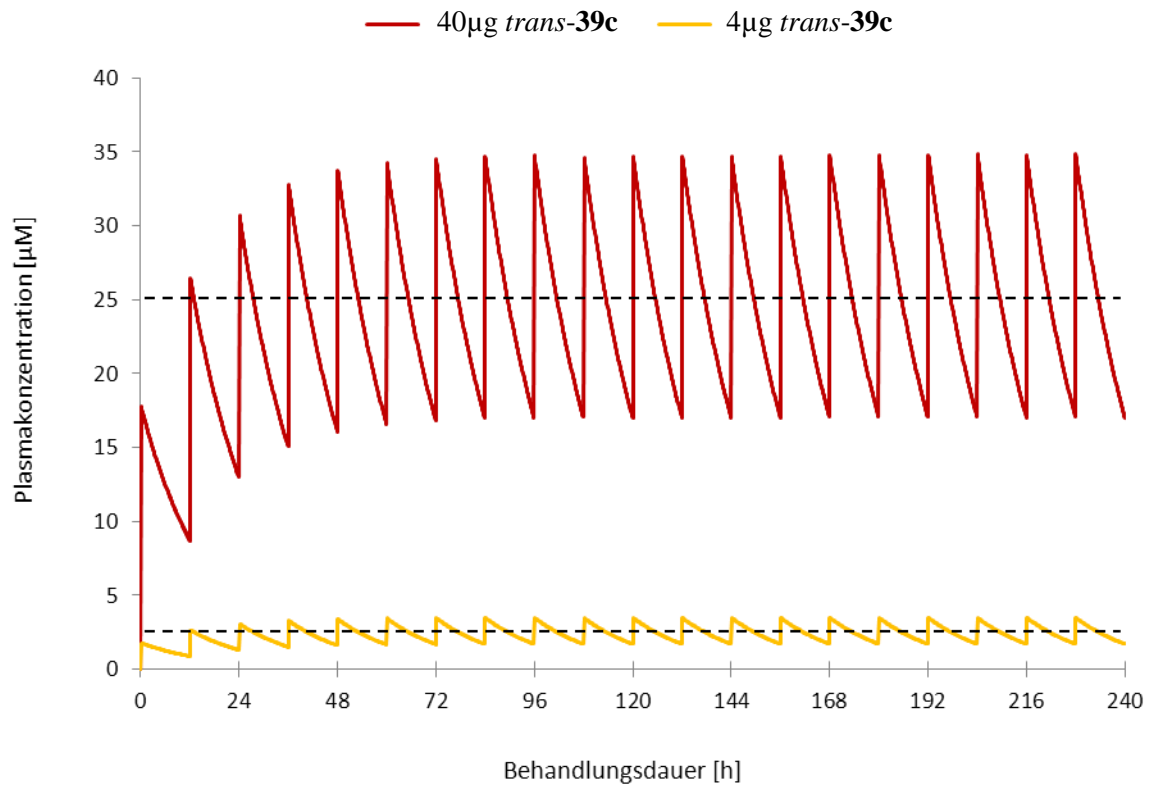
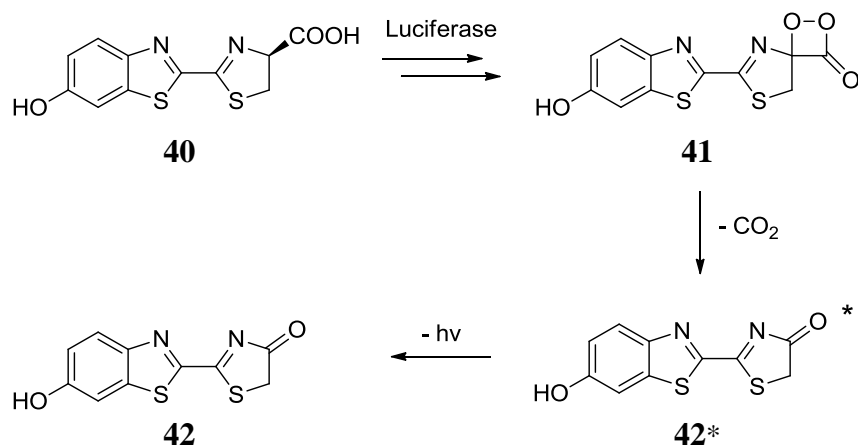


Abbildung 60: Konzentrationsprofile für *trans-39c* im Blutplasma. Während bei 12-stündiger Gabe von 4 µg *trans-39c* eine mittlere Konzentration von 3 µM erwartet wird, sagt die Simulation für die 40 µg-Dosis eine mittlere Konzentration von 25 µM voraus.

Die Applikation des Wirkstoffs erfolgt in der Arbeitsgruppe Beilhack standardmäßig intraperitoneal. Als Vehikel kommt dabei ein Phosphatpuffer (pH = 7.4) in 0.9% Natriumchlorid-Lösung (PBS-Puffer) zum Einsatz, der damit den physiologischen Bedingungen entspricht. Bei einem maximalen Injektionsvolumen von 200 µL ergibt sich bei einer Dosis von 40 µg für die Injektionslösung eine Wirkstoffkonzentration von 0.5 mM. Da die intrinsische Löslichkeit von *trans-39c* bei Verwendung einer 1%-igen PVP-Lösung auf 0.6 mM gesteigert werden konnte, wurde dem PBS-Puffer für die *In-vivo*-Studie 1% PVP zugesetzt. Auf diese Weise wurde die Löslichkeit der ungeladenen Carbonsäure, die für die Permeation von Zellmembranen relevant ist, erhöht.

Obwohl sich *trans-39c* bei *In-vitro*-Untersuchungen als untoxisch herausgestellt hatte, sollte im Vorfeld der eigentlichen *In-vivo*-Studie eine akute *In-vivo*-Toxizität ausgeschlossen werden. Dazu wurden drei gesunden Mäusen im Abstand von 12 h jeweils zweimal 40 µg appliziert und die Viabilität der Tiere für eine Woche beobachtet. Da alle Tiere die Behandlung tolerierten, konnte geschlussfolgert werden, dass *trans-39c* auch *in vivo* nicht akut toxisch wirkt.

Die Bestimmung des Tumorwachstums basiert im verwendeten MM-Maus-Modell auf dem Prinzip der Biolumineszenz von Firefly-Luciferin.^[142] Unter Verbrauch von Sauerstoff setzt das Enzym Luciferase das Benzothiazol-Derivat Luciferin (**40**) zum entsprechenden Dioxetan (**41**) um, welches *via* Decarboxylierung zum energetisch angeregten Oxyluciferin (**42***) reagiert. Durch Emission von Licht im Bereich von 500–650 nm gelangt das Oxyluciferin aus dem angeregten Zustand in den entsprechenden Grundzustand (Schema 11).^[149]



Schema 11: Die Biolumineszenz von Luciferin (**40**) beruht auf der Lichtemission von Oxyluciferin (**42***).

Um das Wachstum der MM-Zellen im lebenden Organismus sichtbar zu machen, wurden in der Arbeitsgruppe Beilhack MOPC-Zellen mit einem Plasmid transfiziert, das das Firefly-Luciferase-Gen trägt. Die so modifizierten Zellen exprimieren damit das Enzym Luciferase, weshalb es in Anwesenheit von Luciferin zur Lumineszenz der MM-Tumorzellen kommt.

Für die Untersuchung der *In-vivo*-Wirksamkeit von *trans*-**39c** wurden vier Gruppen mit jeweils fünf Tieren verwendet, die 11 Tage vor Versuchsbeginn mit MOPC-315.BM-Luciferase⁺-Zellen infiziert wurden. Während die erste Gruppe unbehandelt blieb, wurde der zweiten Gruppe nur der PBS/PVP-Vehikel ohne Wirkstoff appliziert. Im Gegensatz zu diesen beiden Kontrollgruppen wurde die dritte Gruppe alle 12 h mit 40 µg *trans*-**39c** behandelt (Hochdosisgruppe, HD) und der vierten Gruppe im selben Zeitintervall 4 µg des Wirkstoffs verabreicht (Niedrigdosisgruppe, ND). Das Wachstum der Tumorzellen wurde für zehn Tage im Abstand von 24 h mit Hilfe des Biolumineszenz-Bildgebungsverfahren (BLI) bestimmt (Abb. 61). Dazu wurden die Tiere zunächst anästhesiert und die BLI-Messung 10 Minuten nach Injektion von Luciferin durchgeführt. Das am Tag des Behandlungsbeginns gemessene Lumineszenz-Signal, das der initialen Tumorlast entspricht, wurde für die Auswertung auf

den Wert 1 gesetzt und das BLI-Signal der folgenden Messungen als n-fache Änderung in Bezug auf Tag null angegeben.

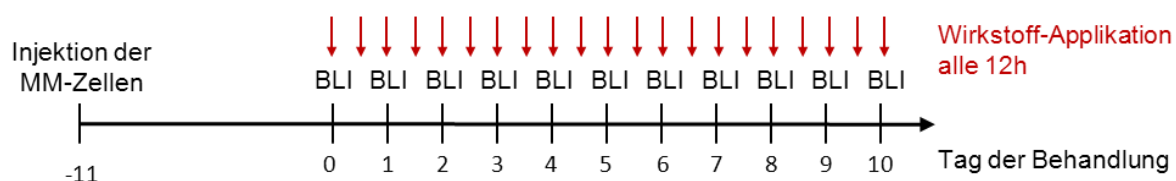


Abbildung 61: Schematisches Design der *In-vivo*-Studie. Elf Tage nach Injektion der MM-Zellen wurde die Behandlung mit *trans-39c* begonnen und der Wirkstoff im Abstand von 12 h verabreicht. BLI-Messungen wurden alle 24 h während der Behandlung durchgeführt.

Als erstes positives Signal für eine gelungene Studie wurde der Umstand betrachtet, dass alle Tiere die Versuchsdauer überlebten, womit eine statistisch signifikante Auswertung der experimentellen Daten möglich ist. Vergleicht man die BLI-Aufnahmen von jeweils drei repräsentativen Tieren der unbehandelten Kontrollgruppe mit denen der Hochdosisgruppe, zeigt sich bereits optisch, dass durch die Behandlung mit *trans-39c* das Tumorwachstum und die Tumorausbreitung reduziert werden konnte (Abb. 62A). Diese Beobachtung bestätigt sich, wenn man die mittlere Änderung des BLI-Signals der unbehandelten Kontrollgruppe mit dem BLI-Verlauf der Hochdosisgruppe vergleicht (Abb. 62B). So zeigt das quantifizierte Biolumineszenz-Signal eine signifikante Differenz zwischen der Tumorlast der unbehandelten Kontrollgruppe und der Hochdosisgruppe. Wie bereits aufgrund des errechneten Plasmaspiegels erwartet, führt dagegen die niedrigere Dosis von 4 µg des Wirkstoffs *trans-39c in vivo* noch zu keinem wachstumshemmenden Effekt bei Myelom-Zellen.

Die während der Behandlung mit 40 µg *trans-39c in vivo* beobachtete Reduktion des Tumorwachstum konnte auch in einer im Anschluss durchgeführten pathologischen Untersuchung bestätigt werden. Dabei wurde die Menge an MM-Zellen in verschiedenen Knochen und Organen mit Hilfe des BLI-Verfahrens *ex vivo* quantifiziert (Abb. 63). Vergleicht man die Resultate der unbehandelten Kontrollgruppe mit der Hochdosisgruppe, so zeigt sich, dass die Tumorlast nach Behandlung mit *trans-39c* deutlich geringer liegt. Dies gilt sowohl für den Level an Myelom-Zellen im Knochengewebe von Oberschenkel, Unterschenkel und Brustbein als auch in den Organen Leber, Lunge und Milz.

Die Ergebnisse der *In-vivo*-Studie zeigen somit, dass mit dem Isochinolin-Carboxylat *trans-39c* eine äußerst vielversprechende Leitstruktur für die Entwicklung von HSP70-

Inhibitoren erhalten wurde. Ein noch größerer Behandlungserfolg dürfte sich einstellen, sobald es gelingt die Löslichkeit der deutlich potenteren Carboxamide (vgl. Kapitel 5.4.2) zu steigern.

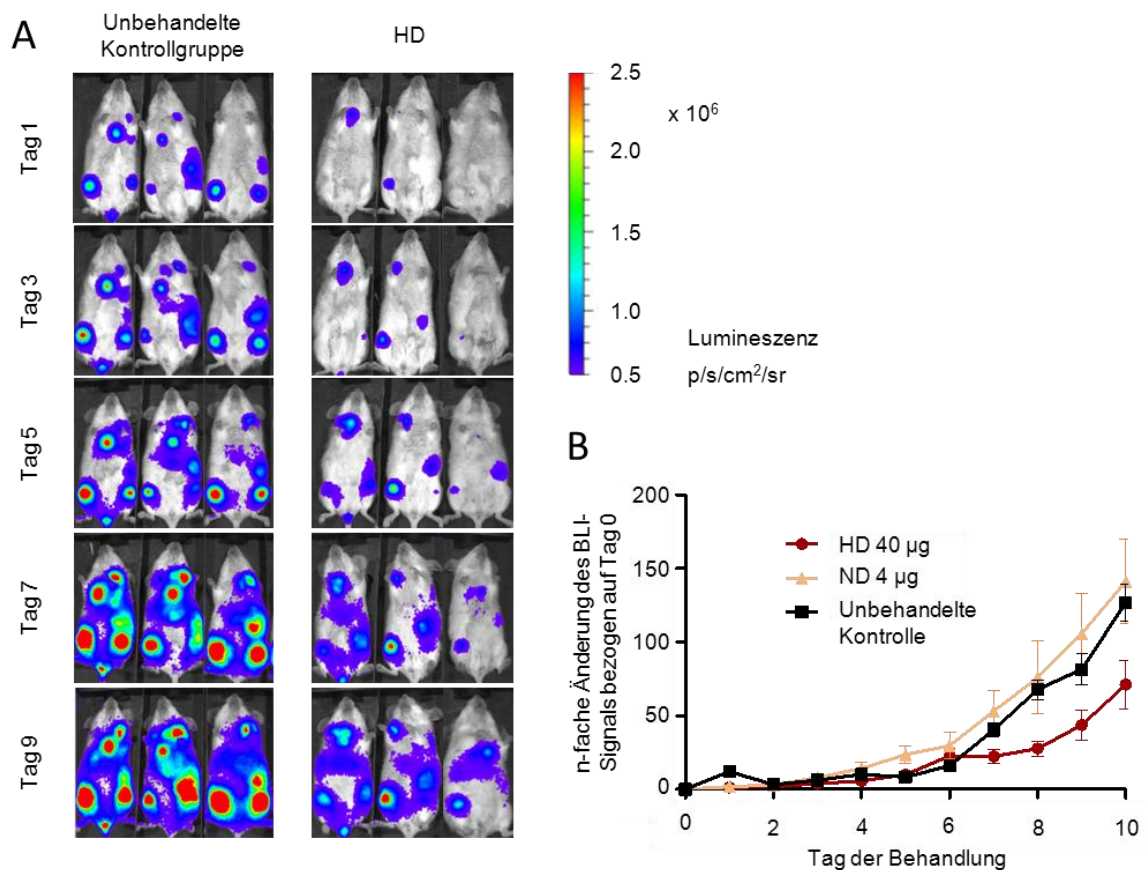


Abbildung 62: Das Wachstum von MOPC-315 Myelom-Zellen *in vivo*. (A) BLI-Aufnahmen von drei repräsentativen Tieren der unbehandelten Kontrollgruppe und der Hochdosisgruppe. (B) Quantifizierung der Biolumineszenz im zeitlichen Verlauf.

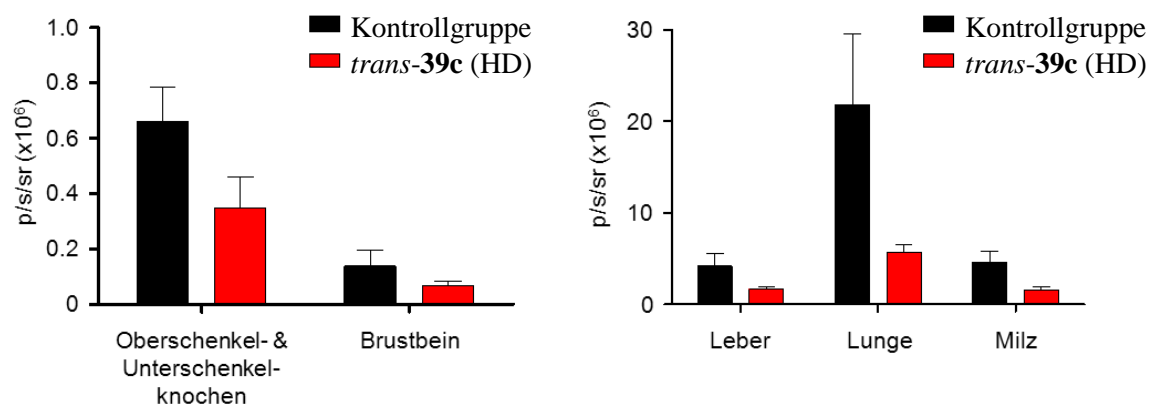


Abbildung 63: *Ex-vivo*-Analyse der Quantität von MM-Tumorzellen in verschiedenen Knochen und Organen.

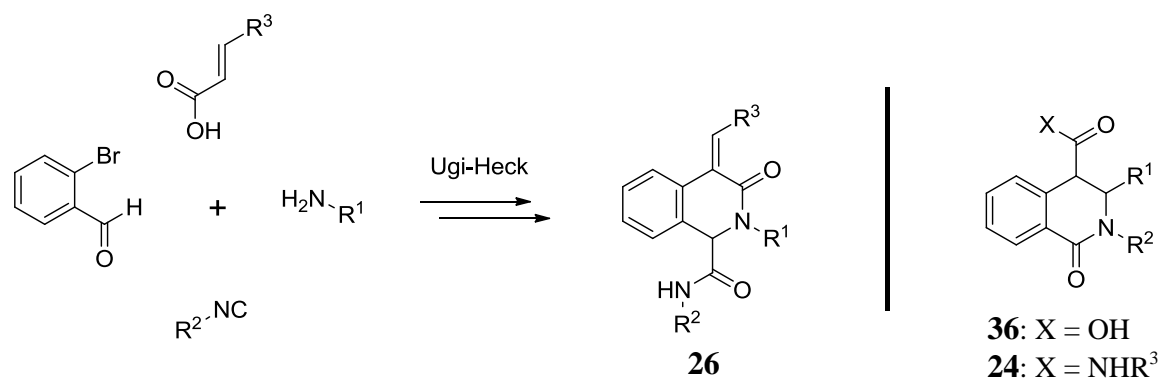
6 Zusammenfassung

Das Multiple Myelom (MM) zeichnet sich durch eine krankhafte Entartung der Plasmazellen im Knochenmark aus und gilt heute trotz zahlreicher Behandlungsfortschritte immer noch als unheilbar. Als attraktive Zielstrukturen für neue Therapiemöglichkeiten haben sich in den vergangenen Jahren „Heat-Shock“-Proteine etabliert. Diese liegen häufig überexprimiert vor und sind bei der Stabilisierung mehrerer onkogener Signalwege des MM von zentraler Bedeutung. Zunächst wurden von Pharmaunternehmen verschiedene Inhibitoren von HSP90 entwickelt, die sich in präklinischen MM-Studien als erfolgreich herausstellten, in klinischen Studien jedoch nur eine begrenzte Wirksamkeit zeigten, da eine Inhibition von HSP90 zu einer schnellen HSF-1-vermittelten Hochregulation der HSP70-Expression führt. Dies kompensiert die Inhibition von HSP90 und führt damit zu einer Abschwächung der Anti-Tumoraktivität. Eine duale Hemmung von HSP90 und des HSF-1/HSP70-Systems wird daher als vielversprechende Strategie für eine wirksame Behandlung des MM betrachtet.

Die vorliegende Arbeit, die im Rahmen der klinischen Forschergruppe 216 erstellt wurde, befasst sich daher mit der Entwicklung von Inhibitoren des HSF-1/HSP70-Systems. Hierzu wurden zwei unabhängige Strategien verfolgt. Neben einem indirekten Ansatz, der auf einer blockierten HSP70-Expression *via* Inhibition des HSF-1-Signalwegs beruht, stand die direkte Inhibition von HSP70 im Fokus.

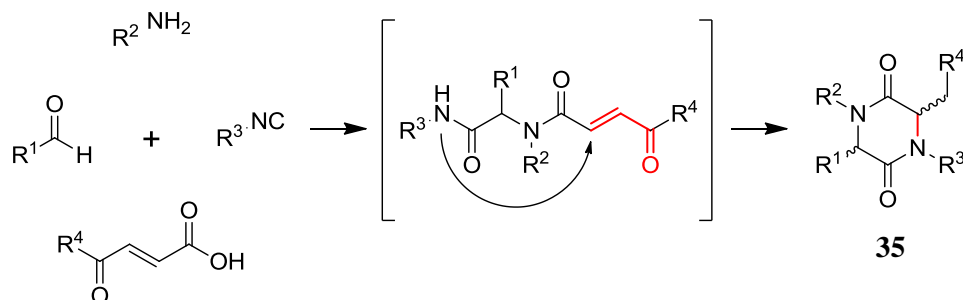
Die erzielten Ergebnisse im Einzelnen:

- 1) In Anlehnung an den HSF-1-Inhibitor NZ28 (**12**) sollte untersucht werden, ob das dort enthaltene Tetrahydroisochinolin-Gerüst eine Leitstruktur für die Entwicklung von Hemmstoffen des HSF-1-Signalwegs darstellt. Hierzu wurde eine Reihe unterschiedlich substituierter Tetrahydroisochinolinon-Derivate hergestellt. Die Synthese erfolgte über eine sequenzielle Ugi-Heck-Reaktion, da hierbei drei Substituenten des Tetrahydroisochinolin-Gerüsts hochflexibel und unabhängig voneinander variiert werden können und sich so leicht ein breites Spektrum verschiedener Tetrahydroisochinolinon-Derivate aufbauen lässt. Eine Bioaktivitätsanalyse zeigte jedoch, dass keine der so erhaltenen Verbindungen (**26**) die HSF-1-vermittelte HSP70-Expression zu inhibieren vermochte.



Um den Einfluss des spezifischen Substitutionsmusters der *via* Ugi-Heck-Reaktion erhaltenen Produkte zu untersuchen, wurde außerdem eine Auswahl der als HSP70-Inhibitoren synthetisierten Tetrahydroisochinolinone (**24** und **36**) im HSF-1-Assay getestet. Da auch für diese Verbindungen keine Inhibition des Signalwegs beobachtet werden konnte, besteht Grund zur Annahme, dass substituierte Tetrahydroisochinolin-Derivate nicht als Leitstruktur für die Entwicklung von HSF-1-Inhibitoren geeignet sind.

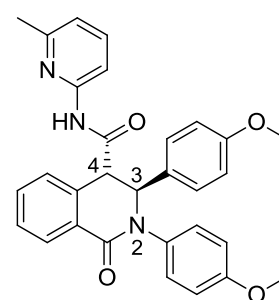
- 2) Im Gegensatz zu den synthetisierten Tetrahydroisochinolinonen zeigten einige der als Zwischenprodukte der Ugi-Heck-Reaktion isolierten α -Acylaminocarboxamide, die durch ein Michael-System charakterisiert sind, eine Inhibition der HSF-1-vermittelten HSP70-Expression. Zwar konnten keine eindeutigen Struktur-Wirkungsbeziehungen bezüglich einzelner Substituenten abgeleitet werden, aber es zeigte sich, dass die beobachtete Bioaktivität nicht vom enthaltenen Michael-System abhängig ist. Dem Wirkprinzip der α -Acylaminocarboxamide scheint somit keine kovalente Bindung mit nukleophilen Seitenketten von Proteinen zugrunde zu liegen, was das Potenzial unspezifischer Interaktionen reduziert.
- 3) Bei der Ugi-Multikomponentenreaktion wurden als Carbonsäurederivate auch β -Acylsubstituierte Acrylsäuren eingesetzt. Dabei wurde beobachtet, dass dieser Austausch zur Bildung von pharmakologisch interessanten 2,5-Diketopiperazinderivaten (**35**) führt. Die in nur einem Reaktionsschritt erhaltenen 2,5-DKPs zeigten eine spezifische und dosisabhängige antiproliferative Wirkung auf aktivierte T-Zellen, was sie als potenzielle Wirkstoffkandidaten für die Behandlung von unbeabsichtigten T-Zell-vermittelten Autoimmunantworten interessant macht (AG Topp).



Eine Analyse der Struktur-Wirkungsbeziehungen zeigte unter anderem eine Präferenz für *trans*-konfigurierte 2,5-DKPs. Die Aktivität der potentesten Verbindungen der synthetisierten Serie lag in derselben Größenordnung wie die der Positiv-Kontrolle 17-Dimethoxyaminoethylamino-17-demethoxygeldanamycin (17-DMAG, **4b**).

- 4) Ausgangspunkt für die Entwicklung neuartiger HSP70-Inhibitoren war das Ergebnis eines virtuellen Screenings (AG Sotriffer), das darauf abzielte die Proteinfunktion durch eine Interaktion mit dem Interdomänen-Interface von HSP70 zu blockieren. Im ersten Schritt wurde eine diastereoselektive und hochflexible Reaktionssequenz zum virtuelle Screening-Hits (*trans*-**24a**) etabliert, mit der im zweiten Schritt eine Bibliothek verwandter Substanzen aufgebaut wurde. Gezielte strukturelle Modifikationen erlaubten dabei wesentliche Strukturelemente zu identifizieren sowie Informationen für die Generierung von Derivaten mit höherer Aktivität zu gewinnen. Die wichtigsten Erkenntnisse dabei waren:

- Ausschließlich *trans*-konfigurierte Tetrahydroisochinolin-Derivate sind wirksam.
- Carboxamide (Pos. 4) sind aktiver als analoge Carbonsäuren.
- Die Methoxyfunktion am Phenylsubstituenten in Pos. 3 ist für die Aktivität wichtig, dagegen führt das Entfernen der OCH₃-Gruppe am Phenylring in Pos. 2 zu einer Aktivitätssteigerung.
- Eine aliphatische MeNH-Einheit am exozyklischen Amid reduziert die Aktivität gegenüber Arylamidsubstituenten um eine Zehnerpotenz. Darüber hinaus führt ein tertiärer Dimethylcarboxamid-Rest zum vollständigen Aktivitätsverlust.



(±) *trans*-**24a**

Zur Falsifizierung der postulierten Bindetasche wurden zusätzlich gezielt Derivate mit sterisch anspruchsvollen Substituenten (Tetrahydronaphthyl, Phenoxyphenyl) hergestellt, die nicht in der Lage sein sollten im berechneten Bindemodus am Interdomänen-Interface

zu binden. Dabei stand das so ermittelte verfügbare Platzangebot in Einklang mit den aufgrund der Docking-Analysen getroffenen Annahmen.

Um die Enantioselektivität der Aktivität der *trans*-Verbindungen zu prüfen, wurde für zwei repräsentative Carboxamide (**24a** und **24i**) eine Enantiomerentrennung mittels chiraler HPLC durchgeführt und die Enantiomere einzeln getestet. Dabei erwiesen sich die *R,R*-Derivate als Träger der Anti-MM-Wirksamkeit.

Zur Abschätzung der Permeabilität wurden die PSA-Werte der Carboxamide (**24**) berechnet. Mit Ausnahme der hydroxylsubstituierten Verbindung **24r** lagen die Werte aller Derivate (**24a-q**) in einem Bereich von 65–88 Å², was einen akzeptablen Resorptionsanteil von 55–90% erwarten lässt. Die Bestimmung der Lipophilie der hergestellten Carboxamide mittels HPLC ergab einen logD-Bereich von 1–3, in dem Wirkstoffe einen ausgewogenen lipophilen Charakter besitzen. Die Effizienz der hergestellten Inhibitoren wurde darüber hinaus anhand der ermittelten LE- (*engl.* ligand efficiency) und LLE-Werte (*engl.* ligand lipophilic efficiency) beurteilt. Die günstigste Kombination aus LE und LLE wurde für Verbindung **24j** (EC₅₀ = 0.20 µM) ermittelt. Dieses Derivat zeichnet sich durch einen Phenylsubstituenten in Position 2 des Tetrahydroisochinolin-Gerüsts, einen Methoxyphenylrest in Position 3 und einen Pyrimidinsubstituenten am exozyklischen Amid aus.

Zur Beurteilung unspezifisch toxischer Effekte wurde neben der Wirksamkeit an MM-Zellen auch der Einfluss der Tetrahydroisochinolin-Derivate auf die Viabilität von mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMCs) untersucht (AG Chatterjee). Während die aktivsten Carboxamide an MM-Zellen im submikromolaren Bereich wirksam waren, zeigte mit Ausnahme des phenolsubstituierten Derivats *trans*-**24r** keine der getesteten Verbindungen toxische Effekte an PBMCs (EC₅₀ > 100 µM). Darüber hinaus legen detaillierte Westernblot-Analysen einen HSP70-spezifischen Wirkmechanismus nahe. Außerdem führte eine duale Hemmung von HSP70 und HSP90 durch gleichzeitige Inkubation mit *trans*-**24i** und NVP-AUY922 (**5**) zu einem additiven pro-apoptischen Effekt bei MM-Zellen.

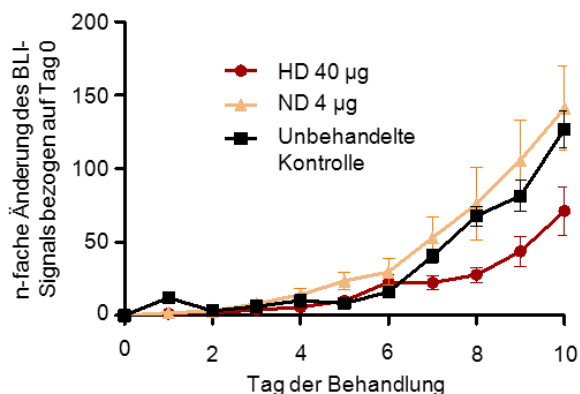
Aufgrund der vielversprechenden *In-vitro*-Ergebnisse und seiner guten Löslichkeit wurde *trans*-**39c** *in vivo* untersucht. Zu diesem Zweck wurden zunächst die physikochemischen Parameter pK_a, logP und Löslichkeit sowie die Plasma-Proteinbindung ermittelt (in

Kooperation mit AG Meinel). Auf Basis einer im Anschluss durchgeführten Pharmakokinetik-Simulation wurden zwei unterschiedliche Dosierungen gewählt.

Toxizitätsuntersuchungen von *trans*-**39c** zeigten keine Hämolyseaktivität und keinen Effekt auf die Viabilität von Leber- und Nierenzellen (H. Bruhn).

Für die *In-vivo*-Studie wurde ein murines MM-Modell verwendet, das auf MOPC-315.BM-Luciferase⁺-Zellen basiert und eine nicht-invasive *In-vivo*-Bestimmung der Tumorentwicklung *via* Biolumineszenz ermöglicht (AG Beilhack). Über einen Zeitraum

von zehn Tagen wurde zwei Gruppen mit jeweils fünf Tieren behandelt. Dazu wurde *trans*-**39c** (4 bzw. 40 µg) im Abstand von 12 h intraperitoneal appliziert. Alle Versuchstiere tolerierten die Behandlung und die mit einer Dosis von 40 µg therapierte Gruppe zeigte eine signifikante Reduktion des Tumor-



wachstums gegenüber einer unbehandelten Kontrollgruppe. Dieses Ergebnis konnte zusätzlich durch eine im Anschluss durchgeführte *Ex-vivo*-Untersuchung bestätigt werden, bei der die Tumorlast in verschiedenen Knochen und Geweben ermittelt wurde.

Die Tetrahydroisochinolinon-Derivate haben sich damit als ausgezeichnete Leitstruktur für die Weiterentwicklung als HSP70-Inhibitoren erwiesen und könnten in Zukunft zu einem deutlichen Fortschritt bei der Behandlung des Multiplen Myeloms beitragen.

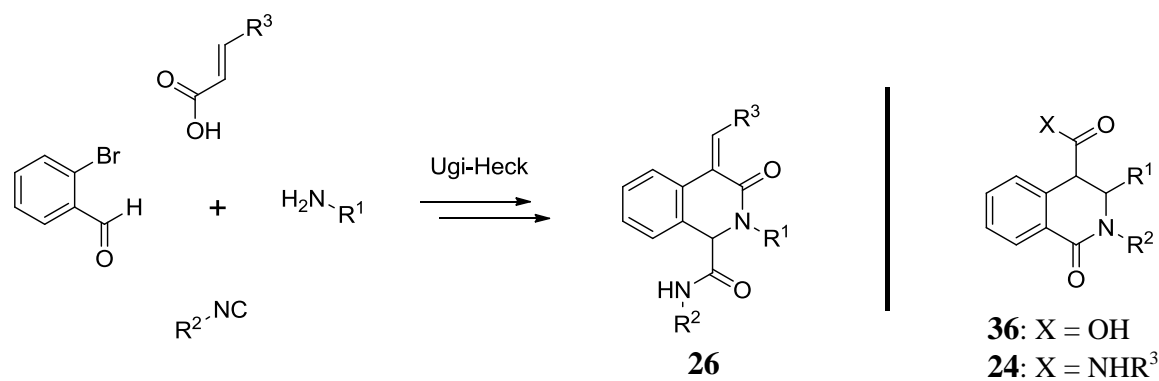
7 Summary

Multiple Myeloma (MM) is generally characterized by a malignant disorder of the plasma cells within the bone marrow. Despite some progress made in treatment, it still remains incurable. Since the past years heat shock proteins (HSPs) have been established as attractive targets for new therapies. HSPs are frequently overexpressed in MM and play an important role in stabilizing multiple oncogene signaling pathways. Initially pharmaceutical companies had developed various inhibitors of HSP90, which proved to be successful in preclinical MM studies. However, in clinical therapies they just showed limited potency since the inhibition of HSP90 leads to a strong and fast HSF-1-mediated upregulation of the HSP70 expression. This response is compensating the inhibition of HSP90 and leads to an attenuation of the antitumor activity. Therefore a dual depletion of HSP90 and the HSF-1/HSP70 system is regarded as a promising strategy for an efficient treatment of MM.

The present work, established within the Clinical Research Unit 216, deals with the development of inhibitors of the HSF-1/HSP70 system. Therefore two independent strategies were implemented, i.e. an inhibition of the HSF-1 signaling pathway and the direct inhibition of HSP70.

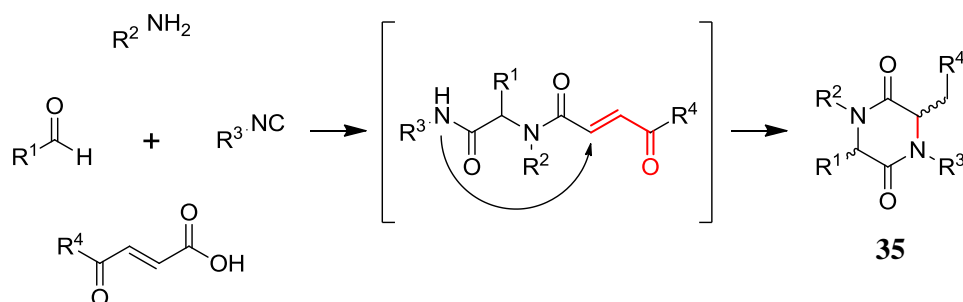
The obtained results in detail:

- 1) According to the HSF-1 inhibitor NZ28 (**12**) it was tested whether its tetrahydroisoquinoline-scaffold can serve as a lead structure for the development of HSF-1 pathway inhibitors. Hence a series of variously substituted tetrahydroisoquinolinone derivatives was prepared. The synthesis followed a sequential Ugi-Heck reaction, as this procedure offers the opportunity to vary three substituents of the tetrahydroisoquinoline-scaffold independently and highly flexible and therefore gives access to a library of different tetrahydroisoquinolinones. However, bioactivity analysis revealed that none of the obtained compounds (**26**) was able to inhibit the HSF-1-mediated HSP70 expression.



In order to analyze the influence of the specific substitution pattern of the products from the Ugi-Heck reaction, a variety of the tetrahydroisoquinolinones (**24** and **36**) synthesized as inhibitors of HSP70 were additionally tested with the HSF-1 assay. As these compounds also showed no inhibition of the signaling pathway, it is supposed that substituted tetrahydroisoquinolines are no suitable lead structures for the development of HSF-1 inhibitors.

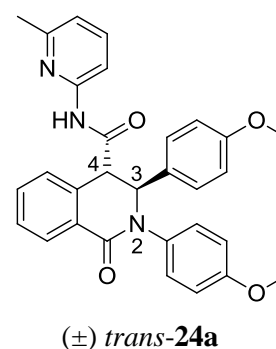
- 2) In contrast to the synthesized tetrahydroisoquinolinones, several α -acylamino-carboxamides showed an inhibition of the HSF-1-mediated HSP70 expression. These compounds were obtained as intermediates of the Ugi-Heck reaction and are characterized through a Michael system. Although no distinct structure-activity relationship could be derived with regard to individual substituents, it could be shown that the observed bioactivity is independent from the Michael system included. Thus, the activity of the α -acylamino-carboxamides is apparently not restricted to a covalent bond formed along with nucleophilic protein side chains. This reduces the potential of unspecific interactions.
- 3) The Ugi reaction was also performed with β -acyl-substituted acrylic acids. Making use of such carbonic acids, access to pharmacological interesting 2,5-diketopiperazines (**35**) was gained in just one reaction step. The products obtained showed specific anti-proliferative properties towards activated T-cells in a dose-dependent manner. Therefore they represent potential candidates for treating unwanted T cell-mediated immune responses (explored in the group of Prof. Topp).



Analyzing the structure-activity relationship revealed an explicit preference for *trans*-configured 2,5-DKPs. Moreover, the activity of the most potent compound was of the same magnitude as the positive control 17-dimethoxyaminoethylamino-17-demethoxygeldanamycin (17-DMAG, **4b**)

4) For the development of novel HSP70 inhibitors it was aimed to prevent the protein function by an interaction with the interdomain interface of HSP70. A corresponding Virtual Screening (performed in the group of Prof. Sotriffer) yielded the tetrahydroisoquinolinone *trans*-**24a** as most potent compound. Initially a diastereoselective and highly flexible reaction sequence to the virtual screening hit (*trans*-**24a**) was established which was then utilized to create a library of modified compounds. By means of systemic structural modifications significant moieties were identified and furthermore detailed information for creating derivatives with higher potency were collected. The most important results were:

- Exclusively *trans*-configured tetrahydroisoquinolinones are highly active against MM cells.
- Carboxamides (Pos. 4) are more potent than the corresponding carbonic acid and carboxylate analogues.
- The methoxy function at the phenyl substituent in pos. 3 is important for the activity, whereas its absence at the phenyl ring in pos. 2 increases the potency.
- An aliphatic MeNH-group at the exocyclic amide is reducing the activity against arylamide substituents by an order of magnitude. Moreover, a tertiary dimethyl-carboxamide moiety causes the complete loss of activity.



To falsify the postulated binding pocket, specific derivatives bearing structural challenging substituents (tetrahydronaphthyl, phenoxyphenyl) were synthesized additionally. They should not be able to bind to the interdomain interface in the calculated binding mode. As a result the available space was in good agreement with the assumptions made upon the docking analyses.

In order to prove whether the activity of the *trans*-compounds is induced by only one enantiomer, two representative carboxamides (**24a** und **24i**) were subjected to an enantioseparation by means of chiral HPLC. Exclusively the *R,R*-compounds were active.

To estimate the compounds' permeability, the PSA values of the carboxamides (**24**) were calculated. With exception of the hydroxyl substituted compound **24r**, the values of all other derivatives (**24a-q**) ranged between 65–88 Å². Thus, the fraction of absorption is expected to be 55–90%. The lipophilicity determined by means of HPLC yielded logD-values of 1–3, complying to a well-balanced lipophilic character. The efficiency of the synthesized inhibitors was evaluated by means of the calculated ligand efficiency (LE) and lipophilic ligand efficiency (LLE). The most favorable combination of LE and LLE was found for compound **24j** (EC₅₀ = 0.20 μM). It is characterized by a phenyl substituent in position 2 of the tetrahydroisoquinoline-scaffold, a methoxyphenyl group in position 3 and a pyrimidine substituent at the exocyclic amide.

In addition to the analyzed potency against MM cells, the influence of the tetrahydroisoquinolines on peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) was determined in order to appraise unspecific toxic effects (performed in the group of Dr. Chatterjee). While the most potent carboxamides showed activity against MM cells in a submicromolar concentration range, none of the tested compounds showed toxic effects against PBMCs (EC₅₀ > 100 μM) with exception of the phenol substituted derivative *trans*-**24r**. Furthermore, detailed Westernblot analyses suggest a HSP70 specific mode of action. As expected the dual inhibition of HSP70 and HSP90 by means of concomitant incubation with *trans*-**24i** and NVP-AUY922 (**5**) yielded an additive pro-apoptotic effect against MM cells.

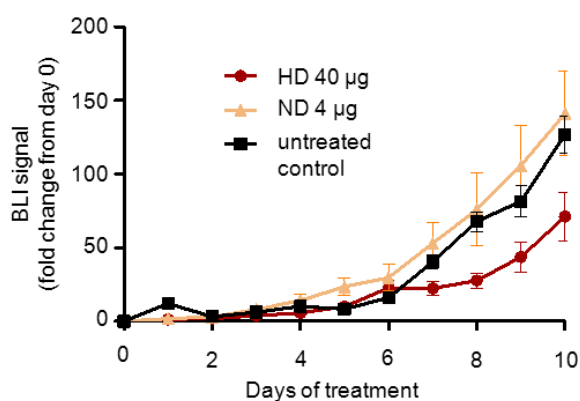
Based on these promising *in vitro* results compound *trans*-**39c** was subjected to an *in vivo* study. For this purpose the physicochemical parameters pK_a, logP and solubility were

determined initially (in collaboration with the group of Prof. Meinel) as well as the degree of plasma protein binding. Pharmacokinetic simulations were the fundamental for the two different dosages selected afterwards.

In order to evaluate the potential of toxicity in more detail, the compounds' hemolysis activity and its impact on the viability of liver and kidney cells were determined by H. Bruhn. These analyses did not reveal any cytotoxic effect.

The *in vivo* study was performed with a novel murine MM model that based on MOPC-315.BM luciferase⁺ cells and therefore allows the none-invasive determination of tumor growth by means of bioluminescence imaging (developed and performed in the group of Prof. Beilhack). Two groups of five animals each were treated over a period of ten days. Therefore *trans*-**39c** (4 and 40 μg , respectively) was injected intraperitoneal every 12 h. The therapy was well tolerated by all animals and the group treated with the higher dose of 40 μg showed a significant reduction of tumor growth compared to the untreated control group. This result could be supplemented by *ex vivo* analyses performed subsequently where the tumor burden in different bones and tissues was determined.

Ultimately the tetrahydroisoquinolinones have been established as excellent lead structures for an advanced development as HSP70 inhibitors and may contribute to a considerable progress in treatment of Multiple Myeloma in the future.



EXPERIMENTELLER TEIL

8 Allgemeine Methoden

8.1 Verwendete Apparaturen und Messgeräte

Circulardichroismus-Spektroskopie (CD): Die CD-Spektren wurden an einem J-715-Spectropolarimeter (Fa. *Jasco*, Gross-Umstadt, Deutschland) aufgenommen und mit der zugehörigen *Jasco*-Software verarbeitet. Bei einer Bandbreite von 1 nm betrug die Scangeschwindigkeit 200 nm min⁻¹. Die aufgezeichneten differentiellen Absorptionskoeffizienten $\Delta\epsilon$ [cm² mol⁻¹] wurden über den angegebenen Wellenlängenbereich gemessen und das Lösungsmittelspektrum von den gemessenen Spektren subtrahiert.

Elementaranalyse (CHNS): Die Elementaranalysen wurden an einem EURO EA 3000 Elemental Analyzer Instrument (Fa. *Eurovektor Instruments*, Milan, Italien) aufgenommen.

Gefriertrocknung: Zur Trocknung wässriger Proben wurde die Gefriertrocknungsanlage Alpha 1-4 LD plus (Fa. *Christ*, Osterode am Harz, Deutschland) mit einer RZ 6 Drehschieberpumpe (Fa. *Vacuubrand*, Wertheim, Deutschland) verwendet.

Infrarotspektroskopie (IR): Die Aufnahme der Infrarotspektren erfolgte mit einem *JASCO*-FT/IR-6100-Spektrometer (Fa. *Jasco*, Gross-Umstadt, Deutschland). Die Spektren wurden mit Hilfe einer Diamant-ATR-Einheit aufgenommen. Die Wellenzahl ist mit ν bezeichnet und in cm⁻¹ angegeben.

Kernresonanzspektroskopie (¹H-NMR, ¹³C-NMR): ¹H (400.132 MHz) und ¹³C (100.613 MHz) NMR-Spektren wurden bei 300 K an einem *Bruker* AV 400 NMR-Spektrometer (Fa. *Bruker Biospin*, Karlsruhe, Deutschland) aufgenommen. Als interner Standard wurden die Residualprotonen und die ¹³C-Resonanzsignale der deuterierten Lösungsmittel verwendet (CDCl₃: ¹H 7.26 ppm, ¹³C 77.16; CD₃CN: ¹H 1.94 ppm, ¹³C 1.32, 118.26; C₆D₆: ¹H 7.16 ppm, ¹³C 128.06; DMSO-d₆: ¹H 2.50 ppm, ¹³C 39.43 ppm). Die chemische Verschiebung (δ) ist in ppm ($\delta_{\text{TMS}} = 0$) und die Kopplungskonstante (J) ist in Hz angegeben. Für die Signalmultiplizität wurden die folgenden Abkürzungen verwendet: s = Singulett, d = Dublett, t = Triplett, q = Quartett, dd = Dublett von Dublett, ddd = Dublett von Dublett von Dublett, dt = Dublett von Triplett, m = Multiplett, br = breites Signal. Die Zuordnung der Protonen- und Kohlenstoffsignale erfolgt unter Verwendung von 2D-NMR Experimenten.

Massenspektrometrie (MS): Die Elektrosprayionisations-Massenspektren (ESI) wurden an einer Agilent 1100 LC/MSD Ionenfalle (Fa. Agilent Technologies, Böblingen, Deutschland) aufgenommen (Kapillarspannung: 3.5 kV, Druck Vernebelungsgas: 20 psi, Trockengas: N₂, Flussrate: 5 L/min, Temperatur: 325 °C). Die Injektion erfolgte mit Hilfe einer KDS100 Spritzenpumpe (Fa. KD Scientific, Holliston, USA). Die verwendete Ionenpolarität ist mit „+“ (positiv) und „-“ (negativ) gekennzeichnet. Die hochaufgelösten Massenspektren (HRMS) wurden an einem micrOTOF focus II (Fa. Bruker Daltonik, Bremen, Deutschland) aufgenommen.

Röntgenbeugungsanalysen: Die Intensität der Röntgenbeugungsreflexe wurde an einem APEX-CCD Diffraktometer (Fa. Bruker AXS, Karlsruhe, Deutschland) mit D8 3-Kreis Goniometer und monochromatischer MoK α -Strahlung vermessen.

Schmelzpunkte (Schmp.): Die angegebenen Schmelzpunkte wurde am Schmelzpunkt-Messgerät SMP3 (Fa. Bibby Scientific, Staffordshire, Großbritannien) gemessen. Die angegebenen Werte sind nicht korrigiert.

Vakuumkonzentrator: Für die Substanzisolierung nach präparativer HPLC-Trennung wurde der Concentrator 5301 (Fa. Eppendorf, Hamburg, Deutschland) verwendet.

Physikochemische Charakterisierung: Die Ermittlung physikochemischer Parameter wie pK_a, logP (alternative Bestimmung *via* HPLC – siehe Chromatographische Methoden) und der exakten Löslichkeit wurde an einem Sirius T3 PhysChem Messsystem (Fa. Sirius Analytical, East Sussex, Großbritannien) durchgeführt.

8.2 Chromatographische Methoden

Dünnschichtchromatographie (DC): Für die Dünnschichtchromatographie wurden kieselgelbeschichtete Glasplatten (SIL G-25 UV₂₅₄) (Fa. Macherey Nagel, Düren, Deutschland) mit einer Schichtdicke von 0.25 mm verwendet. Je nach Anforderung wurde für die Detektion die Eigenfluoreszenz bei 366 nm, die Fluoreszenzlöschung bei 254 nm oder das Anfärbeverhalten mit verschiedenen Sprühreagenzien (Ehrlichs Reagenz, Dragendorfs Reagenz, Kaliumpermanganat Reagenz) verwendet.

Säulenchromatographie (SC): Als Säulenfüllmaterial wurde standardmäßig Kieselgel mit einer Korngröße von 0.063–0.200 mm und in speziellen Fällen mit einer Korngröße von

< 0.063 mm (bezeichnet als Flash-Kieselgel) (Fa. *Merck*, Darmstadt, Deutschland) verwendet. Alle Säulen wurden nass gefüllt und die Fließmittelzusammensetzung ist als Volumenprozent (v/v) angegeben.

Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC): Für analytische Zwecke kamen *Agilent* HPLC-Systeme (1100 Serie) (Fa. *Agilent Technologies*, Böblingen, Deutschland) mit Entgasungseinheit (Degasser G1322A), binärer Pumpe (BinPump G1312A), Säulenofen (Colcom G1316A), Probenwechsler (ALS G1313A) und DAD-Detektor (DAD G1315B) zum Einsatz. Zur Auswertung wurde die *Agilent ChemStation* Software (Release B.03.02) verwendet. Die Retentionszeit der Verbindungen ist mit t_R abgekürzt. Die Detektionswellenlänge ist bei den jeweiligen Verbindungen angegeben.

Methode zur Reinheitsanalytik (Methode I)

HPLC-Säule: Inertsil ODS-2 C18 (5 μ m, 150 \times 4.6 mm)
(Fa. *MZ-Analysetechnik*, Mainz, Deutschland).
Eluent: Phosphat-Puffer (10 mM, pH = 7.4, **A**) und Methanol (**B**).
Gradient: 0–25 min 10% auf 90% **B**
25–30 min 90% **B**
30–32 min 90% auf 10% **B**
32–35 min 10% **B**.
Flussrate: 1.0 mL/min.
Temperatur: 25 °C.

Methode zur Bestimmung der logP-Werte (Methode II)

HPLC-Säule: Inertsil ODS-2 C18 (5 μ m, 150 \times 4.6 mm)
(Fa. *MZ-Analysetechnik*, Mainz, Deutschland).
Eluent: Phosphat-Puffer (10 mM, pH = 7.4) : Methanol mit 0.02% *N,N*-Dimethylhexylamin = 30:70.
Flussrate: 1.0 mL/min.
Temperatur: Raumtemperatur.

Methodenen zur Enantiomerentrennung

HPLC-Säule: Lux Cellulose-1 (5 μ m, 250 \times 4.6 mm)
(Fa. *Phenomenex*, Aschaffenburg, Deutschland)
Eluent: Wasser (**A**) und Acetonitril (**B**).
Isokratisch: **A/B** 20:80 (Methode III).
A/B 40:60 (Methode IV).

Flussrate: 1.0 mL/min.

Temperatur: 25 °C.

Die präparativen Enantiomeren-Trennungen wurde an einem HPLC-System (1100 Serie) bestehend aus zwei präparativen Pumpen (PrepPump G1361 A), einem Probenwechsler (PrepALS G2260A), einem MWD-Detektor (MWD G1365B) und einem Fraktionssammler (PrepFC G1364B) (Fa. *Agilent Technologies*, Böblingen, Deutschland) durchgeführt. Die Steuerung und Spektrenauswertung erfolgte mit der *Agilent ChemStation* Software (Release B.01.03).

Methoden zur Enantiomerentrennung

HPLC-Säule: Lux Cellulose-1 (5 µm, 250 × 21.2 mm)
(Fa. *Phenomenex*, Aschaffenburg, Deutschland)

Eluent: Wasser (**A**) und Acetonitril (**B**).

Isokratisch: **A/B** 50:50 (Methode V).

A/B 58:42 (Methode VI).

Flussrate: 21.0 mL/min.

Temperatur: Raumtemperatur.

8.3 Chemikalien

Lösungsmittel: Das für HPLC-Anwendungen verwendete Wasser wurde mittels einer Milli-Q-Synthesis-Anlage (Fa. *Merck Millipore*, Billerica, USA) gereinigt und deionisiert. Als organische Komponente wurde Acetonitril (Chromasolv[®], HPLC gradient grade, Fa. *Sigma-Aldrich*, Taufkirchen, Deutschland) und Methanol (LiChrosolv[®], HPLC gradient grade, Fa. *Merck*, Darmstadt, Deutschland) verwendet. Die für die Säulenchromatographie verwendeten Lösungsmittel Chloroform, Dichlormethan, Ethanol, Methanol, *n*-Hexan und Petrolether (40–60 °C) wurden kommerziell erworben und ohne weitere Reinigung verwendet. Ethylacetat wurde vor Verwendung destilliert. Für Reaktionen mit luft- und/oder feuchtigkeitsempfindlichen Substanzen kamen absolutierte Lösungsmittel zum Einsatz, die nach Standardverfahren gewonnen und über Molekularsieb (3.6 Å) unter Argon-Atmosphäre gelagert wurden.^[150]

Sonstige Chemikalien: Alle eingesetzten Chemikalien wurden von den folgenden Unternehmen erworben und wie erhalten verwendet: *Alfa-Aesar* (Karlsruhe, Deutschland),

Fisher Scientific (Schwerte, Deutschland), *Fluka* (Buchs, Schweiz), *Merck* (Darmstadt, Deutschland) *Sigma-Aldrich* (Schnelldorf, Deutschland), *VWR International* (Darmstadt, Deutschland).

9 Synthesen

9.1 Synthese der potenziellen HSF-1-Inhibitoren

9.1.1 Synthese von α -Acylaminocarboxamid-Derivaten

N-[2-(Benzylamino)-1-(2-bromphenyl)-2-oxoethyl]-*N*-methylzimtsäureamid (**26a**)

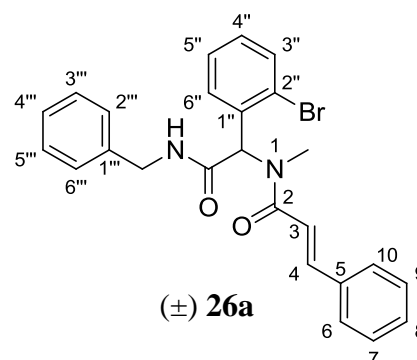
Zu einer Lösung von 2-Brombenzaldehyd (230 μ L, 2.0 mmol) in abs. MeOH (2 mL) wurde unter Argon-Atmosphäre Methylamin (1.0 mL, 2.0 mmol, 2 M in MeOH) zugegeben und bei RT 20 min gerührt. Anschließend wurde Benzylisocyanid (280 μ L, 2.4 mmol) und *trans*-Zimtsäure (300 mg, 2.0 mmol) zugegeben und die Reaktionslösung bei RT 20 h gerührt. Der ausgefallene Feststoff wurde abfiltriert, in CH₂Cl₂ aufgenommen und mit ges. NaHCO₃-Lsg. extrahiert. Die organische Phase wurde über wasserfr. Na₂SO₄ getrocknet, danach eingedampft und der zurückgebliebene Feststoff aus CH₂Cl₂ umkristallisiert.

Farbloser Feststoff

C₂₅H₂₃BrN₂O₂ 463.4 g/mol

Ausbeute: 755 mg (1.54 mmol, 77%).

Schmp: 187–188 °C (CH₂Cl₂).



IR (ATM, $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹]): 3303, 3064, 1677, 1637, 1585, 1539, 1400, 1216, 1110, 978, 761, 699.

¹H NMR (CDCl₃, δ [ppm], *J* [Hz]): 7.68 (d, 15.4 Hz, 1 H, 4-H), 7.59 (dd, 7.8 Hz, 1.0 Hz, 1 H, 3''-H), 7.55 (d, 7.8 Hz, 1 H, 6''-H), 7.51–7.45 (m, 2 H, 6/10-H), 7.39–7.16 (m, 10 H, 8-H, 7/9-H, 4''-H, 5''-H, 2''/6''-H, 3''/5''-H, 4''-H), 6.86 (d, 15.4 Hz, 1 H, 3-H), 6.55 (br. s, 1 H, CONH), 6.35 (s, 1 H, C-1''-CH), 4.56 (dd, 14.8 Hz, 6.0 Hz, 1 H, C-1''-C^aH), 4.43 (dd, 14.8 Hz, 5.2 Hz, 1 H, C-1''-C^bH), 2.95 (s, 3 H, N-CH₃).

¹³C NMR (CDCl₃, δ [ppm], *J* [Hz]): 169.3 (CONH), 167.3 (C-2), 143.8 (C-4), 137.8 (C-1'''), 135.1 (C-5), 134.2 (C-1''), 133.5 (C-3''), 131.2 (C-6''), 130.1 (C-4''), 129.8 (C-8), 128.8 (2 C, C-3'''/5'''), 128.6 (2 C, C-7/9), 127.9 (2 C, C-2'''/6'''), 127.7 (2 C, C-6/10), 127.6 (C-5'' oder C-4'''), 127.4 (C-5'' oder C-4''), 125.7 (C-2''), 117.1 (C-3), 61.9 (C-1''-CH), 43.7 (C-1''-CH₂), 32.9 (N-CH₃).

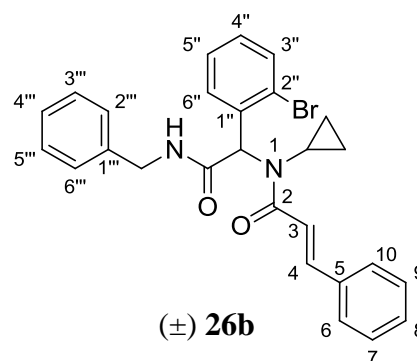
MS (ESI⁺): $m/z = 462 / 464$ [M]⁺.

N-[2-(Benzylamino)-1-(2-bromphenyl)-2-oxoethyl]-*N*-cyclopropylzimtsäureamid (**26b**)

Zu einer Lösung von 2-Brombenzaldehyd (230 μ L, 2.0 mmol) in abs. MeOH (3 mL) wurde unter Argon-Atmosphäre *c*-Propylamin (140 μ L, 2.0 mmol) zugegeben und bei RT 20 min gerührt. Anschließend wurde Benzylisocyanid (280 μ L, 2.4 mmol) und *trans*-Zimtsäure (300 mg, 2.0 mmol) zugegeben und die Reaktionslösung bei RT 3 d gerührt. Der ausgefallene Feststoff wurde abfiltriert, in CH₂Cl₂ aufgenommen und mit ges. NaHCO₃-Lsg. extrahiert. Die organische Phase wurde über wasserfr. Na₂SO₄ getrocknet und anschließend eingedampft.

Hellbrauner Feststoff

C₂₇H₂₅BrN₂O₂ 489.4 g/mol
 Ausbeute: 558 mg (1.14 mmol, 57%).
 Schmp: 169–172 °C.



IR (ATM, $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹]): 3338, 1685, 1645, 1589, 1527, 1398, 1348, 1234, 1021, 977, 765, 697.

¹H NMR (CDCl₃, δ [ppm], J [Hz]): 7.58 (d, 15.4 Hz, 1 H, 4-H), 7.55 (d, 7.6 Hz, 1 H, 6''-H), 7.48 (d, 7.6 Hz, 1 H, 3''-H), 7.45–7.40 (m, 2 H, 6/10-H), 7.31–7.12 (m, 10 H, 3-H, 7/9-H, 8-H, 5''-H, 2''/6'''-H, 3'''/5'''-H, 4'''-H), 7.08 (t, 7.6 Hz, 1 H, 4''-H), 6.49 (t, 5.7 Hz, 1 H, CONH), 5.91 (s, 1 H, C-1''-CH), 4.41 (d, 5.7 Hz, 2 H, C-1'''-CH₂), 2.45–2.39 (m, 1 H, N-CH_{c-propyl}), 1.06–0.98 (m, 1 H, C^aH_{2 c-propyl}), 0.84–0.76 (m, 1 H, C^aH_{2 c-propyl}), 0.76–0.69 (m, 1 H, C^bH_{2 c-propyl}), 0.46–0.35 (m, 1 H, C^bH_{2 c-propyl}).

¹³C NMR (CDCl₃, δ [ppm], J [Hz]): 169.6 (CONH), 169.4 (C-2), 142.9 (C-4), 138.0 (C-1'''), 135.2 (C-5), 134.9 (C-1''), 132.9 (C-3'''), 132.0 (C-6''), 129.8 (C-8), 129.7 (C-4''), 128.7 (2 C, C-3'''/5'''), 128.5 (2 C, C-7/9), 127.9 (2 C, C-6/10), 127.6 (2 C, C-2'''/6'''), 127.3 (C-5'' oder C-4'''), 127.2 (C-5'' oder C-4'''), 125.6 (C-2''), 118.6 (C-3), 65.7 (C-1''-CH), 43.7 (C-1'''-CH₂), 29.3 (N-CH_{c-propyl}), 10.7 (CH_{2 c-propyl}), 9.1 (C^aH_{2 c-propyl}).

MS (ESI⁺): $m/z = 488 / 490$ [M]⁺.

N-Benzyl-*N*-[2-(benzylamino)-1-(2-bromphenyl)-2-oxoethyl]zimtsäureamid (**26c**)

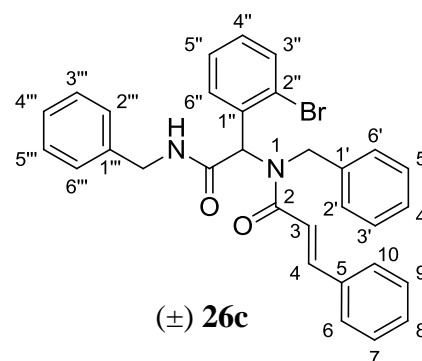
Zu einer Lösung von 2-Brombenzaldehyd (120 μL , 1.0 mmol) in abs. MeOH (2 mL) wurde unter Argon-Atmosphäre Benzylamin (110 μL , 1.0 mmol) zugegeben und bei RT 15 min gerührt. Anschließend wurde Benzylisocyanid (130 μL , 1.1 mmol) und *trans*-Zimtsäure (150 mg, 1.0 mmol) zugegeben und die Reaktionslösung bei RT 20 h gerührt. Der ausgefallene Feststoff wurde abfiltriert und mit wenig kaltem MeOH gewaschen.

Farbloser Feststoff

$\text{C}_{31}\text{H}_{27}\text{BrN}_2\text{O}_2$ 539.5 g/mol

Ausbeute: 405 mg (0.75 mmol, 75%).

Schmp: 170–172 °C.



IR (ATM, $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}]): 3268, 3079, 1682, 1639, 1587, 1560, 1427, 1201, 980, 766, 755, 692.

^1H NMR (CDCl_3 , δ [ppm], J [Hz]): 7.82 (d, 15.3 Hz, 1 H, 4-H), 7.64 (d, 6.8 Hz, 2 H, 3''-H, 6''-H), 7.42–7.01 (m, 17 H, 6/10-H, 7/9-H, 8-H, 2'/6'-H, 3'/5'-H, 4'-H, 4''-H, 5''-H, 2'''/6'''-H, 3'''/5'''-H, 4'''-H), 6.81 (d, 15.3 Hz, 1 H, 3-H), 6.41 (s, 1 H, C-1''-CH), 6.20 (br. s, 1 H, CONH), 4.90 (d, 17.8 Hz, 1 H, C-1'-C^aH), 4.69 (d, 17.8 Hz, 1 H, C-1'-CH), 4.55 (dd, 13.6 Hz, 4.5 Hz, 1 H, C-1'''-C^aH), 4.43 (dd, 13.6 Hz, 4.2 Hz, 1 H, C-1'''-C^bH).

^{13}C NMR (CDCl_3 , δ [ppm], J [Hz]): 169.3 (CONH), 168.2 (C-2), 144.4 (C-4), 137.8 (C-1'''), 137.2 (C-1'), 135.0 (C-5), 134.2 (C-1''), 131.2 (C-6''), 133.1 (C-3''), 130.2 (C-4''), 129.8 (C-8), 128.7 (2 C, C-3'''/5'''), 128.6 (4 C, C-7/9, C-3'/5'), 128.0 (2 C, C-2'/6'), 127.7 (2 C, C-6/10), 127.6 (C-2'''/6'''), 127.4 (C-5'' oder C-4'''), 127.0 (C-5'' oder C-4'''), 126.6 (C-2''), 126.3 (C-4'), 117.7 (C-3), 62.4 (C-1''-CH), 49.8 (C-1'-CH₂), 43.8 (C-1'''-CH₂).

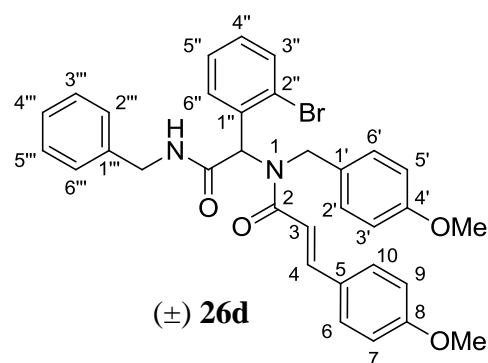
MS (ESI⁺): m/z = 538 / 540 [M]⁺.

N-[2-(Benzylamino)-1-(2-bromphenyl)-2-oxoethyl]-*N*-(4-methoxybenzyl)-3-(4-methoxyphenyl)acrylamid (**26d**)

Zu einer Lösung von 2-Brombenzaldehyd (230 μ L, 2.0 mmol) in abs. MeOH (5 mL) wurde unter Argon-Atmosphäre 4-Methoxybenzylamin (260 μ L, 2.0 mmol) zugegeben und bei RT 20 min gerührt. Anschließend wurde Benzylisocyanid (290 μ L, 2.4 mmol) und *trans*-4-Methoxyzimtsäure (360 mg, 2.0 mmol) zugegeben und die Reaktionslösung bei RT gerührt. Das Lösungsmittel wurde nach 46 h entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch gereinigt (Kieselgel, *n*-Hexan/EtOAc 1:1, $R_f = 0.27$).

Farbloser Feststoff

$C_{33}H_{31}BrN_2O_4$ 599.5 g/mol
 Ausbeute: 723 mg (1.21 mmol, 60%).
 Schmp: 132–134 °C.



IR (ATM, $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}]): 3346, 3008, 2963, 1670, 1631, 1598, 1510, 1397, 1246, 1032, 964, 808, 754, 696.

^1H NMR (CD_3CN , δ [ppm], J [Hz]): 7.66 (d, 15.0 Hz, 1 H, 4-H), 7.52–7.38 (m, 4 H, 6/10-H, 3''-H, 6''-H), 7.35–7.19 (m, 6 H, 5''-H, 2''/6''-H, 3'''/5'''-H, 4''-H), 7.17–7.05 (m, 2 H, CONH, 4''-H), 6.99 (d, 7.1 Hz, 2 H, 2'/6'-H), 6.90 (d, 8.1 Hz, 2 H, 7/9-H), 6.78 (d, 15.0 Hz, 1 H, 3-H), 6.68 (d, 7.1 Hz, 2 H, 3'/5'-H), 6.40 (s, 1 H, C-1''-CH), 4.87 (d, 17.4 Hz, 1 H, C-1'-C^aH), 4.56 (d, 17.4 Hz, 1 H, C-1'-C^bH), 4.37 (dd, 15.3 Hz, 5.8 Hz, 1 H, C-1'''-C^aH), 4.29 (dd, 15.3 Hz, 5.8 Hz, 1 H, C-1'''-C^bH), 3.79 (s, 3 H, C-8-OCH₃), 3.68 (s, 3 H, C-4'-OCH₃).

^{13}C NMR (CD_3CN , δ [ppm], J [Hz]): 170.4 (CONH), 168.5 (C-2), 162.0 (C-8), 159.4 (C-4'), 143.5 (C-4), 140.0 (C-1'''), 136.2 (C-1''), 133.8 (C-3''), 132.3 (C-6''), 131.2 (C-1'), 131.1 (C-4''), 130.5 (2 C, C-6/10), 129.3 (2 C, C-3'''/5'''), 128.7 (C-5), 128.6 (C-5''), 128.5 (2 C, C-2'/6'), 128.4 (2 C, C-2'''/6'''), 127.9 (C-4'''), 127.2 (C-2''), 117.1 (C-3), 115.2 (2 C, C-7/9), 114.3 (2 C, C-3'/5'), 63.3 (C-1''-CH), 56.0 (C-8-OCH₃), 55.7 (C-4'-OCH₃), 49.3 (C-1'-CH₂), 43.7 (C-1'''-CH₂).

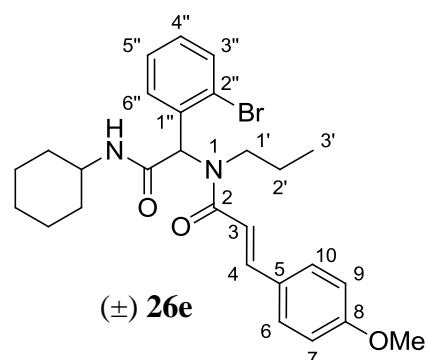
MS (ESI⁺): $m/z = 598 / 600$ [M]⁺.

N-[1-(2-Bromphenyl)-2-(cyclohexylamino)-2-oxoethyl]-3-(4-methoxyphenyl)-*N*-propylacrylamid (**26e**)

Zu einer Lösung von 2-Brombenzaldehyd (230 μ L, 2.0 mmol) in abs. MeOH (5 mL) wurde unter Argon-Atmosphäre *n*-Propylamin (160 μ L, 2.0 mmol) zugegeben und bei RT 20 min gerührt. Anschließend wurde *c*-Hexylisocyanid (250 μ L, 2.4 mmol) und *trans*-4-Methoxyzimtsäure (360 mg, 2.0 mmol) zugegeben und die Reaktionslösung bei RT 48 h gerührt. Der ausgefallene Feststoff wurde abfiltriert.

Farbloser Feststoff

$C_{27}H_{33}BrN_2O_3$ 513.5 g/mol
 Ausbeute: 744 mg (1.45 mmol, 72%).
 Schmp: 171–175 °C.



IR (ATM, $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}]): 3008, 2970, 1631, 1480, 1423, 1397, 1341, 962, 747.

1H NMR (CD_3CN , δ [ppm], J [Hz]): 7.66 (dd, 7.8 Hz, 1.2 Hz, 1 H, 3''-H), 7.62 (d, 17.3 Hz, 1 H, 4-H), 7.59 (d, 8.7 Hz, 2 H, 6/10-H), 7.44 (dd, 7.8 Hz, 1.9 Hz, 1 H, 6''-H), 7.39 (td, 7.8 Hz, 1.2 Hz, 1 H, 5''-H), 7.29 (td, 7.8 Hz, 1.9 Hz, 1 H, 4''-H), 6.95 (d, 8.7 Hz, 2 H, 7/9-H), 6.84 (d, 17.3 Hz, 1 H, 3-H), 6.54 (d, 4.8 Hz, 1 H, CONH), 6.21 (s, 1 H, C-1''-CH), 3.82 (s, 3 H, C-8-OCH₃), 3.74–3.64 (m, 1 H, N-CH_{c-hexyl}), 3.44–3.20 (m, 2 H, 1'-H), 1.86–1.75 (m, 2 H, CH_{2 c-hexyl}), 1.73–1.62 (m, 2 H, CH_{2 c-hexyl}), 1.61–1.53 (m, 1 H, CH_{2 c-hexyl}), 1.53–1.41 (m, 1 H, 2'-^aH), 1.40–1.27 (m, 2 H, CH_{2 c-hexyl}), 1.26–1.04 (m, 3 H, CH_{2 c-hexyl}), 0.95–0.78 (m, 1 H, 2'-^bH), 0.62 (t, 7.3 Hz, 3 H, 3'-H).

^{13}C NMR (CD_3CN , δ [ppm], J [Hz]): 169.4 (CONH), 167.5 (C-2), 162.0 (C-8), 143.0 (C-4), 137.2 (C-1''), 133.9 (C-3''), 132.1 (C-6''), 131.0 (C-4''), 130.5 (2 C, C-6/10), 128.9 (C-5), 128.7 (C-5''), 127.1 (C-2''), 116.8 (C-3), 115.1 (2 C, C-7/9), 62.9 (C-1''-CH), 56.0 (C-8-OCH₃), 49.4 (N-CH_{c-hexyl}), 48.3 (C-1'), 33.3 (CH_{2 c-hexyl}), 33.2 (CH_{2 c-hexyl}), 26.2 (CH_{2 c-hexyl}), 25.6 (CH_{2 c-hexyl}), 25.5 (CH_{2 c-hexyl}), 24.4 (C-2'), 11.3 (C-3').

MS (ESI⁺): m/z = 512 / 514 [M+H]⁺.

N-[1-(2-Bromphenyl)-2-(cyclohexylamino)-2-oxoethyl]-*N*-(furan-2-ylmethyl)but-2-enamid
(**26f**)

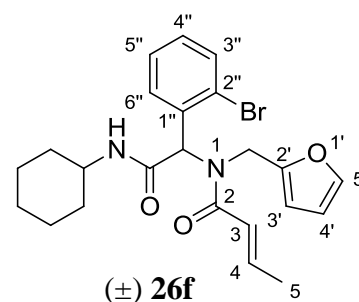
Zu einer Lösung von 2-Brombenzaldehyd (230 μ L, 2.0 mmol) in abs. MeOH (5 mL) wurde unter Argon-Atmosphäre Furfurylamin (180 μ L, 2.0 mmol) zugegeben und bei RT 20 min gerührt. Anschließend wurde *c*-Hexylisocyanid (300 μ L, 2.4 mmol) und Crotonsäure (170 mg, 2.0 mmol) zugegeben und die Reaktionslösung bei RT gerührt. Das Lösungsmittel wurde nach 18 h entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch gereinigt (Kieselgel, *n*-Hexan/EtOAc 1:1, $R_f = 0.33$).

Farbloser Feststoff

$C_{23}H_{27}BrN_2O_3$ 459.4 g/mol

Ausbeute: 746 mg (1.62 mmol, 81%).

Schmp: 148–149 °C.



IR (ATM, $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}]): 3256, 3008, 2963, 2931, 1630, 1557, 1397, 1341, 1164, 963, 809.

^1H NMR (CD_3CN , δ [ppm], J [Hz]): 7.48 (d, 7.6 Hz, 1 H, 3''-H), 7.38 (dd, 7.7 Hz, 2.1 Hz, 1 H, 6''-H), 7.34 (t, 7.6 Hz, 1 H, 5''-H), 7.28–7.11 (m, 1 H, 5'-H), 7.20 (t, 7.6 Hz, 1 H, 4''-H), 6.91 (dd, 14.1 Hz, 7.0 Hz, 1 H, 4-H), 6.56 (d, 14.1 Hz, 1 H, 3-H), 6.50 (s, 1 H, CONH), 6.18 (s, 1 H, C-1''-CH), 6.12 (dd, 3.2 Hz, 1.9 Hz, 1 H, 4'-H), 5.59 (s, 1 H, 3'-H), 4.62 (d, 17.7 Hz, 1 H, C-2'-C^aH), 4.47 (d, 17.7 Hz, 1 H, C-2'-C^bH), 3.72–3.60 (s, 1 H, N-CH_{*c*}-hexyl), 1.87 (dd, 7.0 Hz, 1.7 Hz, 3 H, 5-H), 1.84–1.72 (m, 2 H, CH_{*c*}-hexyl), 1.71–1.61 (m, 2 H, CH_{*c*}-hexyl), 1.60–1.57 (m, 1 H, CH_{*c*}-hexyl), 1.40–1.25 (m, 2 H, CH_{*c*}-hexyl), 1.22–1.00 (m, 3 H, CH_{*c*}-hexyl).

^{13}C NMR (CD_3CN , δ [ppm], J [Hz]): 169.3 (CONH), 168.0 (C-2), 152.6 (C-2'), 143.6 (C-4), 142.8 (C-5'), 136.5 (C-1''), 133.8 (C-3''), 132.0 (C-6''), 131.0 (C-4''), 128.6 (C-5''), 127.4 (C-2''), 123.3 (C-3), 111.1 (C-4'), 107.8 (C-3'), 62.4 (C-1''-CH), 49.4 (N-CH_{*c*}-hexyl), 43.1 (C-2'-CH₂), 33.2 (CH_{*c*}-hexyl), 33.1 (CH_{*c*}-hexyl), 26.2 (CH_{*c*}-hexyl), 25.53 (CH_{*c*}-hexyl), 25.47 (CH_{*c*}-hexyl), 18.3 (C-5).

MS (ESI⁺): $m/z = 458 / 460$ [M]⁺.

N-[1-(2-Bromphenyl)-2-oxo-2-(pentylamino)ethyl]-*N*-(3,4-dimethoxyphenethyl)acrylamid
(**26g**)

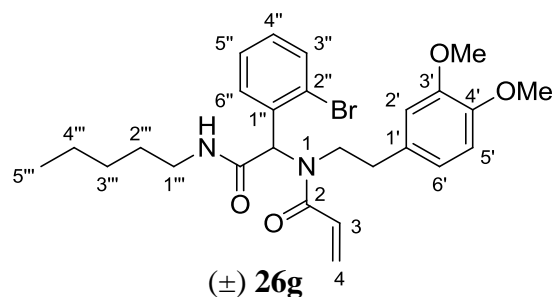
Zu einer Lösung von 2-Brombenzaldehyd (350 μ L, 3.0 mmol) in abs. MeOH (5 mL) wurde unter Argon-Atmosphäre 3,4-Dimethoxyphenethylamin (510 μ L, 3.0 mmol) zugegeben und bei RT 20 min gerührt. Anschließend wurde *n*-Pentanisocyanid (450 μ L, 3.6 mmol) und Acrylsäure (210 mg, 3.0 mmol) zugegeben und die Reaktionslösung bei RT gerührt. Das Lösungsmittel wurde nach 12 h entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch gereinigt (Kieselgel, *n*-Hexan/EtOAc 1:1, $R_f = 0.16$). Zur Entfernung restlicher Verunreinigungen wurde das erhaltene klare Öl in CHCl_3 aufgenommen und mit ges. NaHCO_3 -Lsg. extrahiert. Die organische Phase wurde über wasserfr. Na_2SO_4 getrocknet und anschließend eingedampft.

Farbloser amorpher Feststoff

$\text{C}_{26}\text{H}_{33}\text{BrN}_2\text{O}_4$ 517.5 g/mol

Ausbeute: 940 mg (1.82 mmol, 61%).

Schmp: 85–87 °C.



IR (ATM, $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}]): 3302, 2954, 2931, 1680, 1646, 1608, 1514, 1420, 1233, 1026, 755.

^1H NMR (CDCl_3 , δ [ppm], J [Hz]): 7.74 (d, 7.6 Hz, 1 H, 6''-H), 7.66 (dd, 7.6 Hz, 1.0 Hz, 1 H, 3''-H), 7.40 (t, 7.6 Hz, 1 H, 5''-H), 7.28 (t, 7.6 Hz, 1 H, 4''-H), 6.70 (d, 8.1 Hz, 1 H, 5'-H), 6.56 (dd, 16.5 Hz, 10.1 Hz, 1 H, 3-H), 6.44 (d, 16.5 Hz, 1 H, 4^a-H), 6.43–6.38 (m, 1 H, 6'-H), 6.32 (s, 1 H, 2'-H), 6.21 (s, 1 H, C-1''-CH), 5.91 (t, 5.3 Hz, 1 H, CONH), 5.75 (dd, 10.1 Hz, 1.8 Hz, 1 H, 4^b-H), 3.81 (s, 3 H, C-4'-OCH₃), 3.79 (s, 3 H, C-3'-OCH₃), 3.59–3.43 (m, 2 H, N-CH₂), 3.37–3.18 (m, 2 H, 1'''-H), 2.73–2.61 (m, 1 H, C-1'-C^aH), 2.25–2.11 (m, 1 H, C-1'-C^bH), 1.55–1.44 (m, 2 H, 2'''-H), 1.35–1.22 (m, 4 H, 3'''-H, 4'''-H), 0.87 (t, 6.9 Hz, 3 H, 5'''-H).

^{13}C NMR (CDCl_3 , δ [ppm], J [Hz]): 169.1 (CONH), 166.8 (C-2), 148.9 (C-3'), 147.7 (C-4'), 134.8 (C-1''), 133.5 (C-3''), 131.4 (C-6''), 130.4 (C-4''), 129.2 (C-4), 128.3 (C-1'), 127.7 (C-3), 126.7 (C-2''), 126.4 (C-5''), 120.4 (C-6'), 113.3 (C-5'), 111.9 (C-2'), 62.1 (C-1''-CH), 55.88 (C-3'-OCH₃ oder C-4'-OCH₃), 55.85 (C-3'-OCH₃ oder C-4'-OCH₃), 48.1 (N-CH₂), 39.8 (C-1'''), 36.0 (C-1'-CH₂), 29.0 (2 C, C-2''', C-3'''), 22.4 (C-4'''), 13.9 (C-5''').

MS (ESI⁺): $m/z = 516 / 518$ [M]⁺.

N-[1-(2-Bromphenyl)-2-(*tert*-butylamino)-2-oxoethyl]-*N*-(2-chlorbenzyl)but-2-enamid (**26h**)

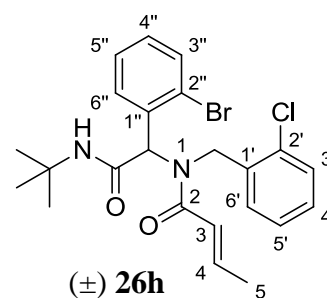
Zu einer Lösung von 2-Brombenzaldehyd (230 μ L, 2.0 mmol) in abs. MeOH (5 mL) wurde unter Argon-Atmosphäre 2-Chlorbenzylamin (240 μ L, 2.0 mmol) zugegeben und bei RT 20 min gerührt. Anschließend wurde *t*-Butylisocyanid (230 μ L, 2.0 mmol) sowie Crotonsäure (170 mg, 2.0 mmol) zugegeben und die Reaktionslösung bei RT gerührt. Nachdem eine Reaktionskontrolle (DC, *n*-Hexan/EtOAc 1:1) nach 36 h noch unumgesetztes Edukt anzeigte, wurde die Reaktionsmischung weitere 24 h bei 40 °C gerührt. Im Anschluss wurde das Lösungsmittel entfernt und der erhaltene Rückstand aus EtOAc umkristallisiert.

Farbloser Feststoff

C₂₃H₂₆BrClN₂O₂ 477.8 g/mol

Ausbeute: 661 mg (1.38 mmol, 69%).

Schmp: 193–196 °C (EtOAc).



IR (ATM, $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹]): 3008, 2972, 1673, 1632, 1603, 1542, 1423, 962, 745.

¹H NMR (CD₃CN, δ [ppm], J [Hz]): 7.38 (d, 7.2 Hz, 2 H, 3''-H, 6''-H), 7.33 (d, 7.0 Hz, 1 H, 3'-H), 7.23 (t, 7.2 Hz, 1 H, 5''-H), 7.21–7.07 (m, 3 H, 6'-H, 5'-H, 4'-H), 7.03 (t, 7.2 Hz, 1 H, 4''-H), 6.96 (dd, 14.7 Hz, 6.9 Hz, 1 H, 4-H), 6.42 (s, 1 H, CONH), 6.32 (s, 1 H, C-1''-CH), 6.09 (d, 14.7 Hz, 1 H, 3-H), 4.83 (d, 18.9 Hz, 1 H, C-1'-C^aH), 4.77 (d, 18.9 Hz, 1 H, C-1'-C^bH), 1.78 (d, 6.9 Hz, 3 H, 5-H), 1.20 (s, 9 H, CH₃ *t*-butyl).

¹³C NMR (CD₃CN, δ [ppm], J [Hz]): 169.4 (CONH), 168.3 (C-2), 144.5 (C-4), 136.6 (C-1'), 136.3 (C-1''), 133.7 (C-3''), 132.2 (C-2'), 131.4 (C-6''), 130.7 (C-4''), 129.6 (C-6'), 129.0 (C-3'), 128.6 (2 C, C-5'', C-4' oder C-5'), 127.4 (C-4' oder C-5'), 127.0 (C-2''), 122.9 (C-3), 62.6 (C-1''-CH), 52.2 (N-CH_{*t*}-butyl), 47.6 (C-1'-CH₂), 28.5 (3 C, CH₃ *t*-butyl), 18.1 (C-5).

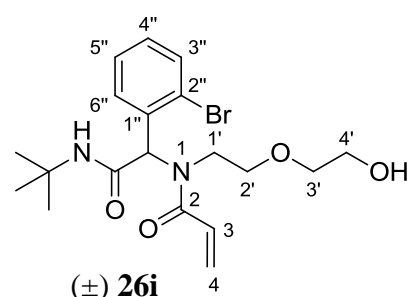
MS (ESI⁺): $m/z = 476 / 478$ [M]⁺.

N-[1-(2-Bromphenyl)-2-(*tert*-butylamino)-2-oxoethyl]-*N*-[2-(2-hydroxyethoxy)ethyl]-acrylamid (**26i**)

Zu einer Lösung von 2-Brombenzaldehyd (230 μ L, 2.0 mmol) in abs. MeOH (5 mL) wurde unter Argon-Atmosphäre 2-(2-Aminoethoxy)ethanol (200 μ L, 2.0 mmol) zugegeben und bei RT 20 min gerührt. Anschließend wurde *t*-Butylisocyanid (230 μ L, 2.0 mmol) sowie Acrylsäure (140 mg, 2.0 mmol) zugegeben und die Reaktionslösung bei RT gerührt. Nachdem eine Reaktionskontrolle (DC, *n*-Hexan/EtOAc 1:1) nach 36 h noch unumgesetztes Edukt anzeigte, wurde die Reaktionsmischung weitere 24 h bei 40 °C gerührt. Das Lösungsmittel wurde entfernt, der Rückstand säulenchromatographisch gereinigt (Kieselgel, *n*-Hexan/EtOAc 1:10, $R_f = 0.20$) und aus Et₂O umkristallisiert.

Farbloser Feststoff

C₁₉H₂₇BrN₂O₄ 427.3 g/mol
 Ausbeute: 352 mg (0.82 mmol, 41%).
 Schmp: 111–112 °C (Et₂O).



IR (ATM, $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹]): 3266, 3009, 2963, 1678, 1631, 1425, 1341, 963.

¹H NMR (CD₃CN, δ [ppm], J [Hz]): 7.67 (d, 7.8 Hz, 1 H, 3''-H), 7.44 (d, 7.8 Hz, 1 H, 6''-H), 7.41 (t, 7.8 Hz, 1 H, 5''-H), 7.30 (t, 7.8 Hz, 1 H, 4''-H), 6.84 (dd, 16.6 Hz, 10.6 Hz, 1 H, 3-H), 6.48 (s, 1 H, CONH), 6.26 (br. d, 16.6 Hz, 1 H, 4-^aH), 6.03 (s, 1 H, C-1''-CH), 5.70 (dd, 10.6 Hz, 2.2 Hz, 1 H, 4-^bH), 4.21 (td, 5.8 Hz, 5.1 Hz, 2 H, 4'-H), 3.57–3.48 (m, 1 H, 1'-^aH), 3.37 (td, 15.5 Hz, 6.5 Hz, 1 H, 1'-^bH), 3.28 (t, 5.1 Hz, 2 H, 3'-H), 3.22–3.11 (m, 1 H, 2'-^aH), 3.04 (td, 9.9 Hz, 6.6 Hz, 1 H, 2'-^bH), 2.72 (t, 5.8 Hz, 1 H, C-4'-OH), 1.30 (s, 9 H, CH₃ *t*-butylH).

¹³C NMR (CD₃CN, δ [ppm], J [Hz]): 169.6 (CONH), 167.7 (C-2), 136.7 (C-1''), 134.1 (C-3''), 132.1 (C-6''), 131.2 (C-4''), 129.8 (C-3), 128.9 (C-5''), 128.4 (C-4), 127.2 (C-2''), 73.2 (C-3'), 70.1 (C-2'), 63.6 (C-1''-CH), 61.7 (C-4'), 52.1 (N-CH₃ *t*-butyl), 45.9 (C-1'), 28.7 (3 C, CH₃ *t*-butyl).

MS (ESI⁺): $m/z = 426 / 428$ [M]⁺.

N-Benzyl-*N*-{1-(2-bromphenyl)-2-[(2-morpholinethyl)amin]-2-oxoethyl}-3-(2,4-dichlorphenyl)acrylamid (**26j**)

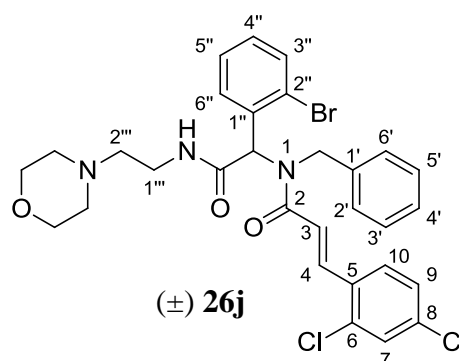
Zu einer Lösung von 2-Brombenzaldehyd (350 μ L, 3.0 mmol) in abs. MeOH (5 mL) wurde unter Argon-Atmosphäre Benzylamin (330 μ L, 3.0 mmol) zugegeben und bei RT 20 min gerührt. Anschließend wurde 2-Morpholinethylisocyanid (580 μ L, 4.2 mmol) sowie *trans*-2,4-Dichlorzimtsäure (650 mg, 3.0 mmol) zugegeben und die Reaktionslösung bei RT gerührt. Nach 15 d wurde das Lösungsmittel entfernt, der Rückstand in CHCl_3 aufgenommen und mit ges. NaHCO_3 -Lsg. extrahiert. Die organische Phase wurde über wasserfr. Na_2SO_4 getrocknet und anschließend eingedampft. Anschließend wurde der Rückstand säulenchromatographisch gereinigt (Kieselgel, CHCl_3/i -Propanol 10:1, $R_f = 0.45$). Der erhaltene Feststoff wurde in wenig Toluol gelöst und die Kristallisation durch Zugabe von *n*-Hexan eingeleitet.

Farbloser Feststoff

$\text{C}_{30}\text{H}_{30}\text{BrCl}_2\text{N}_3\text{O}_3$ 631.4 g/mol

Ausbeute: 689 mg (1.09 mmol, 36%).

Schmp: 173–177 °C (Toluol).



IR (ATM, $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}]): 3393, 2952, 1655, 1613, 1514, 1472, 1435, 1118, 984, 750, 692.

^1H NMR (CDCl_3 , δ [ppm], J [Hz]): 8.08 (d, 15.4 Hz, 1 H, 4-H), 7.63 (d, 7.1 Hz, 1 H, 6''-H), 7.44 (d, 7.1 Hz, 1 H, 3''-H), 7.39 (d, 1.8 Hz, 1 H, 7-H), 7.28–7.23 (m, 2 H, 10-H, 5''-H), 7.21–7.18 (m, 2 H, 3'/5'-H), 7.18–7.15 (m, 3 H, 2'/6'-H, 4'-H), 7.14–7.11 (m, 1 H, 9-H), 7.10 (t, 7.1 Hz, 1 H, 4''-H), 6.79 (d, 15.4 Hz, 1 H, 3-H), 6.47 (br. s, 1 H, CONH), 6.18 (s, 1 H, C-1''-CH), 4.89 (d, 17.9 Hz, 1 H, C-1'-C^aH), 4.62 (d, 17.9 Hz, 1 H, C-1'-C^bH), 3.67–3.55 (m, 4 H, O-CH₂ morpholin), 3.49–3.34 (m, 2 H, 1'''-H), 2.60–2.24 (m, 6 H, 2'''-H, N-CH₂ morpholin).

^{13}C NMR (CDCl_3 , δ [ppm], J [Hz]): 168.8 (CONH), 167.4 (C-2), 138.7 (C-4), 136.9 (C-1'), 135.8 (C-6), 135.3 (C-8), 134.5 (C-1''), 133.1 (C-3''), 131.9 (C-5), 131.0 (C-6''), 130.2 (C-4''), 129.9 (C-7), 128.5 (C-10), 128.4 (2 C, C-3'/5'), 127.7 (C-9), 127.4 (C-4' oder C-5''), 127.2 (C-4' oder C-5''), 126.41 (C-2''), 126.38 (2 C, C-2'/6'), 121.1 (C-3), 66.6 (2 C, O-CH₂ morpholin), 63.4 (C-1''-CH), 56.6 (C-2'''), 53.1 (2 C, N-CH₂ morpholin), 50.4 (C-1'-CH₂), 35.8 (C-1''').

N-{1-(2-Bromphenyl)-2-[(2-morpholinethyl)amino]-2-oxoethyl}-*N*-propylzimtsäureamid
(**26k**)

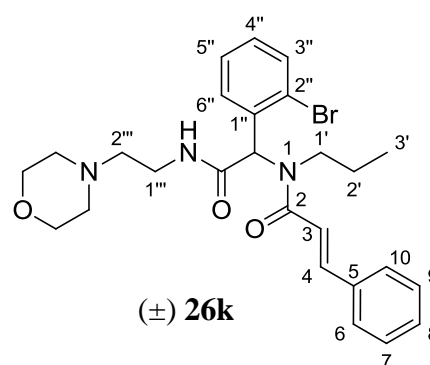
Zu einer Lösung von 2-Brombenzaldehyd (350 μ L, 3.0 mmol) in abs. MeOH (5 mL) wurde unter Argon-Atmosphäre Propylamin (250 μ L, 3.0 mmol) zugegeben und bei RT 20 min gerührt. Anschließend wurde 2-Morpholinethylisocyanid (410 μ L, 3.0 mmol) sowie *trans*-Zimtsäure (440 mg, 3.0 mmol) zugegeben und die Reaktionslösung bei RT 12 d gerührt. Das Lösungsmittel wurde entfernt, der Rückstand in CHCl_3 aufgenommen und mit ges. NaHCO_3 -Lsg. extrahiert. Die organische Phase wurde über wasserfr. MgSO_4 getrocknet und anschließend eingedampft. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch gereinigt (Kieselgel, $\text{CHCl}_3/2$ -Propanol 15:1, $R_f = 0.19$) und aus Toluol umkristallisiert.

Farbloser Feststoff

$\text{C}_{26}\text{H}_{32}\text{BrN}_3\text{O}_3$ 514.5 g/mol

Ausbeute: 572 mg (1.12 mmol, 37%).

Schmp: 121–123 $^\circ\text{C}$ (Toluol).



IR (ATM, $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}]): 3272, 2967, 1676, 1642, 1588, 1118, 752, 704.

^1H NMR (CDCl_3 , δ [ppm], J [Hz]): 7.77 (d, 15.4 Hz, 1 H, 4-H), 7.67 (d, 7.7 Hz, 1 H, 6''-H), 7.61 (d, 7.7 Hz, 1 H, 3''-H), 7.50 (dd, 7.8 Hz, 2.1 Hz, 2 H, 6/10-H), 7.40–7.30 (m, 4 H, 7/9-H, 8-H, 5''-H), 7.23 (t, 7.7 Hz, 1.4 Hz, 1 H, 4''-H), 6.84 (d, 15.4 Hz, 1 H, 3-H), 6.47 (br. s, 1 H, CONH), 6.11 (s, 1 H, C-1''-CH), 3.50–3.28 (m, 4 H, 1'''-H), 2.58 (t, 4.4 Hz, 4 H, O- CH_2 morpholin), 2.45 (m, 2 H, 2'''-H), 2.38 (t, 4.4 Hz, 4 H, N- CH_2 morpholin), 1.57 (m, 1 H, 2'- ^aH), 1.15 (m, 1 H, 2'- ^bH), 0.73 (t, 7.2 Hz, 3 H, 3'-H).

^{13}C NMR (CDCl_3 , δ [ppm], J [Hz]): 168.9 (CONH), 166.9 (C-2), 143.7 (C-4), 135.2 (C-5 oder C-1''), 135.1 (C-5 oder C-1''), 133.2 (C-3''), 131.1 (C-6''), 130.1 (C-4''), 129.7 (C-8), 128.8 (2 C, C-7/9), 127.8 (2 C, C-6/10), 127.6 (C-5''), 126.2 (C-2''), 117.3 (C-3), 66.8 (2 C, O- CH_2 morpholin), 63.2 (C-1''-CH), 55.6 (C-2'''), 53.1 (2 C, N- CH_2 morpholin), 48.8 (C-1'), 35.9 (C-1'''), 23.4 (C-2'), 11.2 (C-3').

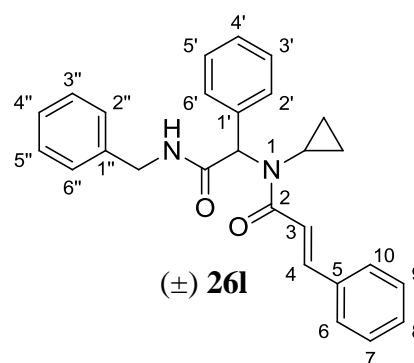
MS (ESI^+): $m/z = 513 / 515$ [M] $^+$.

N-[2-(Benzylamino)-2-oxo-1-phenylethyl]-*N*-cyclopropylzimtsäureamid (**26l**)

Zu einer Lösung von Benzaldehyd (300 μ L, 2.0 mmol) in abs. MeOH (3 mL) wurde unter Argon-Atmosphäre *c*-Propylamin (170 μ L, 3.0 mmol) zugegeben und bei RT 20 min gerührt. Anschließend wurde Benzylisocyanid (430 μ L, 3.6 mmol) und *trans*-Zimtsäure (440 mg, 3.0 mmol) zugegeben und die Reaktionslösung bei RT gerührt. Nach 24 h wurde das Lösungsmittel entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch gereinigt (Kieselgel, CHCl₃/2-Propanol 10:1, R_f = 0.78). Das Rohprodukt wurde in Toluol aufgenommen und die Kristallisation durch Zugabe von Petrolether initiiert.

Farbloser Feststoff

C₂₇H₂₆N₂O₂ 410.5 g/mol
 Ausbeute: 900 mg (2.19 mmol, 73%).
 Schmp: 143–146 °C (Toluol/PE).



IR (ATM, $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹]): 3212, 1650, 1570, 1509, 1239, 1031, 971, 697.

¹H NMR (CH₃CN, δ [ppm], *J* [Hz]): 7.64 (dd, 7.6 H, 1.8 Hz, 2 H, 6/10-H), 7.59 (d, 15.7 Hz, 1 H, 4-H), 7.46–7.28 (m, 12 H, 7/9-H, 8-H, 2'/6'-H, 3'/5'-H, 4'-H, 2''/6''-H, 3''/5''-H), 7.42 (d, 15.7 Hz, 1 H, 3-H), 7.28–7.22 (m, 1 H, 4''-H), 7.04 (t, 6.1 Hz, 1 H, CONH), 5.76 (s, 1 H, C-1'-CH), 4.39 (d, 6.1 Hz, 2 H, C-1''-CH₂), 2.62 (m, 1 H, N-CH_{c-propyl}), 1.05–0.97 (m, 1 H, C^aH_{2 c-propyl}), 0.92–0.83 (m, 1 H, C^aH_{2 c-propyl}), 0.77–0.69 (m, 1 H, C^bH_{2 c-propyl}), 0.68–0.58 (m, 1 H, C^bH_{2 c-propyl}).

¹³C NMR (CH₃CN, δ [ppm], *J* [Hz]): 170.9 (CONH), 169.6 (C-2), 142.3 (C-4), 140.4 (C-1''), 137.4 (C-1'), 136.4 (C-5), 130.7 (C-8), 130.6 (2 C, C-2'/6'), 129.8 (2 C, C-7/9), 129.3 (2 C, C-3''/5''), 129.1 (2 C, C-3'/5'), 128.8 (2 C, C-6/10), 128.6 (C-4'), 128.3 (2 C, C-2''/6''), 127.8 (C-4''), 121.0 (C-3), 66.9 (C-1'-CH), 43.7 (C-1''-CH₂), 30.8 (N-CH_{c-propyl}), 11.0 (CH_{2 c-propyl}), 10.1 (C^bH_{2 c-propyl}).

N-Benzyl-3-(2,4-dichlorphenyl)-*N*-{2-[(2-morpholinoethyl)amino]-2-oxo-1-phenylethyl}acrylamid (**26m**)

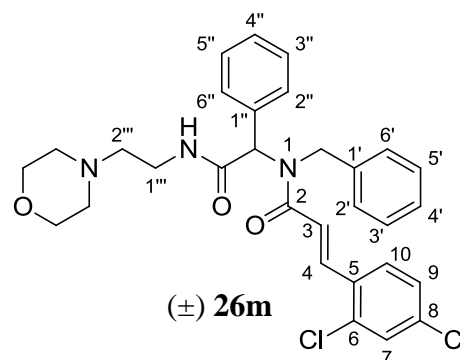
Zu einer Lösung von Benzaldehyd (300 μ L, 3.0 mmol) in abs. MeOH (5 mL) wurde unter Argon-Atmosphäre Benzylamin (330 μ L, 3.0 mmol) zugegeben und bei RT 20 min gerührt. Anschließend wurde 2-Morpholinethylisocyanid (580 μ L, 4.2 mmol) sowie *trans*-2,4-Dichlorzimtsäure (650 mg, 3.0 mmol) zugegeben und die Reaktionslösung bei RT gerührt. Nach 24 h wurde das Lösungsmittel entfernt, der Rückstand in CHCl_3 aufgenommen und mit ges. NaHCO_3 -Lsg. extrahiert. Die organische Phase wurde über wasserfr. MgSO_4 getrocknet und anschließend eingedampft. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch gereinigt (Kieselgel, $\text{CHCl}_3/2$ -Propanol 10:1, $R_f = 0.31$). Der Rückstand wurde in Toluol aufgenommen und die Kristallisation durch Zugabe von Petrolether initiiert.

Farbloser Feststoff

$\text{C}_{30}\text{H}_{31}\text{Cl}_2\text{N}_3\text{O}_3$ 552.5 g/mol

Ausbeute: 870 mg (1.58 mmol, 53%).

Schmp: 145–149 °C (Toluol/PE).



IR (ATM, $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}]): 3268, 2950, 1653, 1617, 1583, 1461, 1113, 972, 746, 696.

^1H NMR (CH_3CN , δ [ppm], J [Hz]): 7.88 (d, 15.2 Hz, 1 H, 4-H), 7.50 (d, 1.9 Hz, 1 H, 7-H), 7.44–7.34 (m, 3 H, 2''/6''-H, 4''-H), 7.31–7.22 (m, 4 H, 3''/5''-H, 9-H, 10-H), 7.19 (tt, 7.1 Hz, 1.8 Hz, 2 H, 3'/5'-H), 7.14 (t, 7.1 Hz, 1 H, 4'-H), 7.08 (d, 7.1 Hz, 2 H, 2'/6'-H), 6.82 (d, 15.2 Hz, 1 H, 3-H), 6.69 (br. s, 1 H, CONH), 6.06 (br. s, 1 H, C-1''-CH), 4.95 (d, 18.0 Hz, 1 H, C-1'-C^aH), 4.65 (d, 18.0 Hz, 1 H, C-1'-C^bH), 3.53 (t, 4.5 Hz, 4 H, O-CH₂ morpholin), 3.38–3.27 (m, 1 H, 1'''-^aH), 3.26–3.15 (m, 1 H, 1'''-^bH), 2.43–2.28 (m, 6 H, 2'''-H, N-CH₂ morpholin).

^{13}C NMR (CH_3CN , δ [ppm], J [Hz]): 170.2 (CONH), 167.7 (C-2), 139.5 (C-1'), 137.7 (C-4), 136.7 (C-1''), 136.2 (C-6 oder C-8), 135.6 (C-6 oder C-8), 133.0 (C-5), 130.9 (2 C, C-2''/6''), 130.4 (C-7), 129.8 (C-10), 129.3 (C-9), 129.1 (4 C, C-3'/5', C-3''/5''), 128.5 (C-4'), 127.7 (C-4'), 127.2 (2 C, C-2'/6'), 123.4 (C-3), 67.5 (2 C, O-CH₂ morpholin), 64.2 (C-1''-CH), 57.7 (C-2'''), 54.1 (2 C, N-CH₂ morpholin), 50.2 (C-1'-CH₂), 36.9 (C-1''').

N-{1-(2-Bromphenyl)-2-oxo-2-[(tosylmethyl)amino]ethyl}-*N*-(pyridin-3-ylmethyl)zimtsäureamid (**26n**)

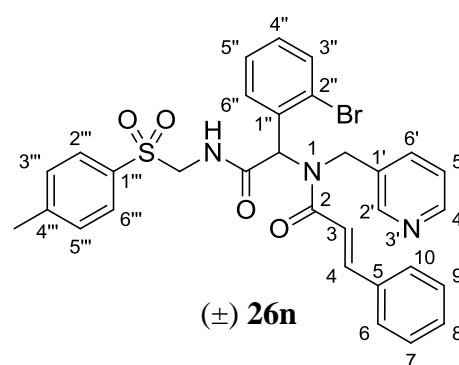
Zu einer Lösung von 2-Brombenzaldehyd (350 μ L, 3.0 mmol) in abs. MeOH (5 mL) wurde unter Argon-Atmosphäre 3-(Aminomethyl)pyridin (300 μ L, 3.0 mmol) zugegeben und bei RT 20 min gerührt. Anschließend wurde Tosylmethyloisocyanid (700 mg, 3.6 mmol) sowie *trans*-Zimtsäure (440 mg, 3.0 mmol) zugegeben und die Reaktionslösung bei RT gerührt. Nach 10 d wurde das Lösungsmittel entfernt, der Rückstand in CHCl_3 aufgenommen und mit ges. NaHCO_3 -Lsg. extrahiert. Die organische Phase wurde über wasserfr. Na_2SO_4 getrocknet und anschließend eingedampft. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch gereinigt (Kieselgel, Toluol/EtOAc 1:3, $R_f = 0.16$).

Farbloser amorpher Feststoff

$\text{C}_{31}\text{H}_{28}\text{BrN}_3\text{O}_4\text{S}$ 618.5 g/mol

Ausbeute: 310 mg (0.50 mmol, 17%).

Schmp: 184–186 °C.



IR (ATM, $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}]): 2952, 1689, 1643, 1594, 1415, 1320, 1288, 1138, 816, 762, 704.

^1H NMR (CDCl_3 , δ [ppm], J [Hz]): 8.31 (d, 3.4 Hz, 1 H, 4'-H), 8.10 (s, 1 H, 2'-H), 7.85 (d, 15.3 Hz, 1 H, 4-H), 7.71 (d, 8.0 Hz, 2 H, 2'''/6'''-H), 7.51 (br. s, 1 H, CONH), 7.40 (br. s, 3 H, 6/10-H, 6'-H), 7.36–7.31 (m, 2 H, 7/9-H), 7.27 (d, 8.0 Hz, 2 H, 3'''/5'''-H), 7.36–7.00 (m, 6 H, 8-H, 5'-H, 3''-H, 4''-H, 5''-H, 6''-H), 6.69 (d, 15.3 Hz, 1 H, 3-H), 6.54 (s, 1 H, C-1''-CH), 4.91 (dd, 13.7 Hz, 7.3 Hz, 1 H, NH-C^aH), 4.80 (d, 18.0 Hz, 1 H, C-1'-C^aH), 4.63–4.49 (m, 2 H, NH-C^bH, C-1'-C^bH), 2.39 (s, 3 H, C-4'''-CH₃).

^{13}C NMR (CDCl_3 , δ [ppm], J [Hz]): 169.6 (CONH), 167.8 (C-2), 147.7 (C-4'), 147.1 (C-2'), 145.6 (C-4), 145.2 (C-4'''), 134.6 (C-5), 134.5 (C-6'), 134.0 (C-1'''), 133.2 (C-3''), 132.9 (C-1' oder C-1''), 132.7 (C-1' oder C-1''), 131.3 (C-6''), 130.8 (C-4''), 130.2 (2 C, C-7/9), 130.0 (2 C, C-3'''/5'''), 128.9 (2 C, C-2'''/6'''), 128.6 (C-2''), 128.2 (C-8), 128.1 (2 C, C-6/10), 127.8 (C-5''), 123.2 (C-5'), 116.4 (C-3), 61.2 (C-1''-CH), 60.3 (NH-CH₂), 46.8 (C-1'-CH₂), 21.7 (C-4'''-CH₃).

CHNS: ber. C 60.20, H 4.56, N 6.79, S 5.18; gem. C 60.04, H 4.60, N 6.88, S 5.01.

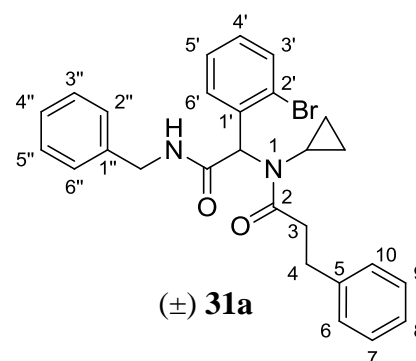
MS (ESI⁺): $m/z = 617 / 619 [M]^+$.

N-[2-(Benzylamino)-1-(2-bromphenyl)-2-oxoethyl]-*N*-cyclopropyl-3-phenylpropanamid
(**31a**)

Zu einer Lösung von 2-Brombenzaldehyd (230 μ L, 2.0 mmol) in abs. MeOH (3 mL) wurde unter Argon-Atmosphäre *c*-Propylamin (140 μ L, 2.0 mmol) zugegeben und bei RT 20 min gerührt. Anschließend wurde Benzylisocyanid (280 μ L, 2.4 mmol) und 3-Phenylpropionsäure (300 mg, 2.0 mmol) zugegeben und die Reaktionslösung bei RT gerührt. Nach 48 h wurde das Lösungsmittel entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch gereinigt (1. Kieselgel, *n*-Hexan/EtOAc 2:1, $R_f = 0.24$; 2. Kieselgel, *n*-Hexan/2-Propanol 10:1, $R_f = 0.39$). Das erhaltene farblose Öl wurde in Et₂O aufgenommen und die Kristallisation durch Zugabe von Petrolether initiiert.

Farbloser Feststoff

C₂₇H₂₇BrN₂O₂ 491.4 g/mol
Ausbeute: 588 mg (1.20 mmol, 60%).
Schmp: 95–97 °C (Et₂O/PE).



IR (ATM, $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹]): 3258, 1693, 1662, 1574, 1394, 1028, 753, 696.

¹H NMR (CH₃CN, δ [ppm], J [Hz]): 7.61 (d, 7.7 Hz, 1 H, 3'-H), 7.36–7.31 (m, 2 H, 3''/5''-H), 7.31–7.24 (m, 9 H, 7/9-H, 6/10-H, 5'-H, 6'-H, 4''-H, 2''/6''-H), 7.24–7.21 (m, 1 H, 4'-H), 7.21–7.15 (m, 1 H, 8-H), 7.01 (t, 6.0 Hz, 1 H, CONH), 5.87 (s, 1 H, C-1'-CH), 4.39 (d, 6.0 Hz, 2 H, C-1''-CH₂), 3.00–2.86 (m, 4 H, 3-H, 4-H), 2.20–2.14 (m, 1 H, N-CH_{c-propyl}), 1.03–0.94 (m, 1 H, C^aH_{2 c-propyl}), 0.77–0.63 (m, 2 H, C^{a/b'}H_{2 c-propyl}), 0.29–0.18 (m, 1 H, C^bH_{2 c-propyl}).

¹³C NMR (CH₃CN, δ [ppm], J [Hz]): 176.5 (C-2), 170.5 (CONH), 143.0 (C-5), 140.1 (C-1''), 136.8 (C-1'), 133.6 (C-3'), 133.1 (C-6'), 130.6 (C-4'), 129.5 (2 C, C-6/10), 129.3 (2 C, C-7/9 oder C-3''/5''), 129.2 (2 C, C-7/9 oder C-3''/5''), 128.4 (2 C, C-2''/6''), 128.1 (C-4''), 127.9 (C-5'), 126.8 (C-8), 126.3 (C-2'), 66.0 (C-1'-CH), 43.7 (C-1''-CH₂), 36.6 (C-3), 31.6 (C4), 29.4 (N-CH_{c-propyl}), 10.9 (CH_{2 c-propyl}), 9.8 (CH_{2 c-propyl}).

N-Benzyl-*N*-{1-(2-bromphenyl)-2-[(2-morpholinoethyl)amino]-2-oxoethyl}-3-(2,4-dichlorphenyl)propanamid (**31b**)

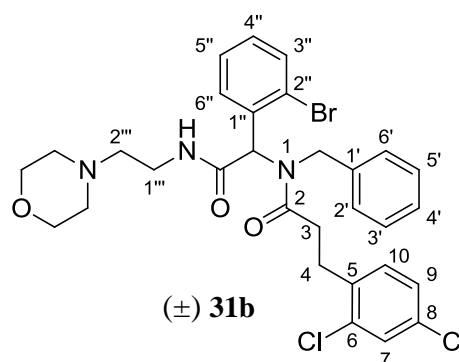
Zu einer Lösung von 2-Brombenzaldehyd (230 μL , 2.0 mmol) in abs. MeOH (5 mL) wurde unter Argon-Atmosphäre Benzylamin (220 μL , 2.0 mmol) zugegeben und bei RT 20 min gerührt. Anschließend wurde 2-Morpholinethylylisocyanid (390 μL , 2.8 mmol) sowie 3-(2,4-Dichlorphenyl)propionsäure (430 mg, 2.0 mmol) zugegeben und die Reaktionslösung bei RT gerührt. Der ausgefallene Feststoff wurde nach 48 h abfiltriert, in Et₂O aufgenommen und die Kristallisation durch Zugabe von *n*-Hexan ausgelöst.

Farbloser Feststoff

C₃₀H₃₂BrCl₂N₃O₃ 633.4 g/mol

Ausbeute: 794 mg (1.25 mmol, 62%).

Schmp: 130–132 °C (Et₂O/*n*-Hexan).



IR (ATM, $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹]): 3277, 2946, 1650, 1637, 1566, 1469, 1117, 753, 698.

¹H NMR (C₆D₆, δ [ppm], *J* [Hz]): 7.72 (d, 7.5 Hz, 1 H, 6''-H), 7.13–7.11 (m, 1 H, 3''-H), 7.11 (s, 1 H, 7-H), 7.05–6.94 (m, 4 H, 2'/6'-H, 3'/5'-H), 6.91 (tt, 6.9 Hz, 1.7 Hz, 1 H, 4'-H), 6.84–6.80 (m, 2 H, 9-H, 10-H), 6.78 (t, 7.5 Hz, 1 H, 5''-H), 6.51 (t, 7.5 Hz, 1 H, 4''-H), 6.44 (s, 1 H, C-1''-CH), 5.76 (br. s, 1 H, CONH), 4.53 (d, 17.7 Hz, 1 H, C-1'-C^aH), 4.45 (d, 17.7 Hz, 1 H, C-1'-C^bH), 3.47–3.37 (m, 4 H, O-CH₂ morpholin), 3.29–3.15 (m, 1 H, 1'''-^aH), 3.13–3.00 (m, 3 H, 4-H, 1'''-^bH), 2.60–2.37 (m, 2 H, 3-H), 2.02–1.93 (m, 4 H, N-CH₂ morpholin), 1.93–1.86 (m, 2 H, 2'''-H).

¹³C NMR (C₆D₆, δ [ppm], *J* [Hz]): 173.0 (C-2), 169.0 (CONH), 137.8 (C-1'), 135.8 (C-1''), 134.9 (C-5 oder C-6), 133.2 (C-3''), 132.7 (C-5 oder C-6), 132.4 (C-10), 131.6 (C-6''), 130.1 (C-4''), 129.3 (C-7), 128.7 (C-8), 128.5 (2 C, C-3'/5'), 127.6 (C-5''), 127.18 (C-9 oder C-4'), 127.14 (C-9 oder C-4'), 126.9 (C-2''), 126.5 (2 C, C-2'/6'), 66.9 (2 C, O-CH₂ morpholin), 63.2 (C-1''-CH), 56.8 (C-2'''), 53.4 (2 C, N-CH₂ morpholin), 50.3 (C-1'-CH₂), 36.3 (C-1'''), 33.5 (C-3), 29.0 (C-4).

9.1.2 Synthese von Tetrahydroisochinolin-1-carboxamid-Derivaten

Allgemeine Synthesevorschrift für die Palladium-katalysierte Heck-Kupplung

Zu einer Lösung aus abs. Triethylamin (3 Äq) in abs. THF wurde unter Argon-Atmosphäre das entsprechende α -Acylaminocarboxamid-Derivat (1 Äq), Silberphosphat (2 Äq), Palladiumacetat (0.05 Äq) sowie Triphenylphosphin (0.1 Äq) zugegeben und im Glasbombenrohr auf 80 °C erhitzt. Nachdem die Reaktionskontrolle (DC) die vollständige Umsetzung des Edukts anzeigte, wurden die anorganischen Feststoffe abfiltriert und das Filtrat eingengt. Je nach Anforderung wurde das Produkt anschließend *via* Säulenchromatographie oder Filtration isoliert und gegebenenfalls durch Umkristallisation gereinigt.

(Z)-*N*-Benzyl-4-benzyliden-2-methyl-3-oxo-1,2,3,4-tetrahydroisochinolin-1-carboxamid (**25a**)

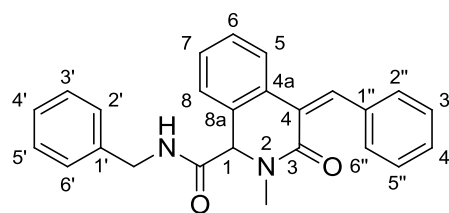
Verbindung **26a** (115 mg, 0.25 mmol) wurde mit NEt₃ (100 μ L, 0.75 mmol), Silberphosphat (210 mg, 0.50 mmol), Palladiumacetat (3 mg, 13 μ mol) und Triphenylphosphin (7 mg, 25 μ mol) in abs. THF (5 mL) umgesetzt. Nachdem die Reaktionskontrolle (DC, *n*-Hexan/*i*-Propanol 6:1) nach 24 h eine vollständige Umsetzung des Edukts anzeigte, wurde die Reaktion beendet und die anorganischen Feststoffe abfiltriert. Durch Zugabe von wenig Et₂O zum eingengten Filtrat wurde das Rohprodukt ausgefällt und anschließend aus EtOAc umkristallisiert.

Farbloser Feststoff

C₂₅H₂₂N₂O₂ 382.5 g/mol

Ausbeute: 48 mg (0.13 mmol, 50%).

Schmp: 206–207 °C (EtOAc).



(\pm) **Z-25a**

IR (ATM, $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹]): 3276, 1651, 1606, 1562, 1445, 1391, 1225, 752, 695.

¹H NMR (DMSO, δ [ppm], *J* [Hz]): 8.93 (t, 5.8 Hz, 1 H, CONH), 7.76 (d, 7.4 Hz, 1 H, 5-H), 7.67 (d, 7.4 Hz, 2 H, 2''/6''-H), 7.64 (d, 7.4 Hz, 1 H, 8-H), 7.41 (dt, 7.4 Hz, 1.3 Hz, 1 H, 6-H), 7.36 (dt, 7.4 Hz, 1.0 Hz, 1 H, 7-H), 7.32 (t, 7.4 Hz, 2 H, 3''/5''-H), 7.30–7.20 (m, 4 H, 4''-H),

7.19 (s, 1 H, C-1''-CH), 7.16 (d, 6.8 Hz, 2 H, 2'/6'-H), 5.21 (s, 1 H, 1-H), 4.34 (dd, 15.3 Hz, 5.8 Hz, 1 H, C-1'-C^aH), 4.23 (dd, 15.3 Hz, 5.8 Hz, 1 H, C-1'-C^bH), 2.97 (s, 3 H, N-CH₃).

¹³C NMR (DMSO, δ [ppm], J [Hz]): 168.2 (CONH), 164.5 (C-3), 138.7 (C-1'), 136.3 (C-1''), 134.8 (2 C, C-4a, C-1''-CH), 131.0 (C-8a), 129.9 (2 C, C-2''/6''), 128.8 (C-4), 128.3 (C-6), 128.2 (2 C, C-3'/5'), 127.5 (C-4''), 127.3 (2 C, C-3''/5''), 127.2 (C-7), 126.9 (2 C, C-2'/6'), 126.8 (C-4'), 126.0 (C-8), 123.4 (C-5), 65.3 (C-1), 42.4 (C-1'-CH₂), 33.3 (N-CH₃).

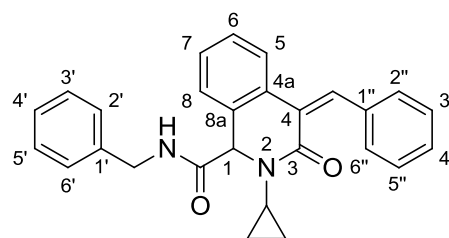
MS (ESI⁺): *m/z* = 383 [M+H]⁺.

(Z)-*N*-Benzyl-4-benzyliden-2-cyclopropyl-3-oxo-1,2,3,4-tetrahydroisochinolin-1-carboxamid
(**25b**)

Verbindung **26b** (120 mg, 0.25 mmol) wurde mit NEt₃ (100 μL, 0.75 mmol), Silberphosphat (210 mg, 0.50 mmol), Palladiumacetat (3 mg, 13 μmol) und Triphenylphosphin (7 mg, 25 μmol) in abs. THF (5 mL) umgesetzt. Nach 24 h zeigte die Reaktionskontrolle (DC, *n*-Hexan/*i*-Propanol 6:1) kein Edukt mehr an. Die anorganischen Feststoffe wurden abfiltriert und das Lösungsmittel entfernt. Das erhaltene Rohprodukt wurde aus EtOAc umkristallisiert.

Farbloser Feststoff

C₂₇H₂₄N₂O₂ 408.5 g/mol
Ausbeute: 58 mg (0.14 mmol, 57%).
Schmp: 218–219 °C (EtOAc).



(±) *Z*-**25b**

IR (ATM, $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹]): 3283, 1652, 1607, 1563, 1444, 1406, 1246, 749, 694.

¹H NMR (DMSO, δ [ppm], J [Hz]): 8.92 (t, 5.6 Hz, 1 H, CONH), 7.73 (dd, 7.6 Hz, 1.0 Hz, 1 H, 5-H), 7.67 (d, 7.6 Hz, 3 H, 8-H, 2''/6''-H), 7.40 (dt, 7.6 Hz, 1.4 Hz, 1 H, 6-H), 7.37–7.19 (m, 7 H, 7-H, 3'/5'-H, 4'-H, 3''/5''-H, 4''-H), 7.16 (br. s, 1 H, C-1''-CH), 7.15 (d, 8.1 Hz, 2 H, 2'/6'-H), 5.22 (s, 1 H, 1-H), 4.35 (dd, 15.3 Hz, 5.6 Hz, 1 H, C-1'-C^aH), 4.21 (dd, 15.3 Hz, 5.6 Hz, 1 H, C-1'-C^bH), 2.72 (m, 1 H, N-CH_{c-propyl}), 0.86–0.79 (m, 1 H, C^aH_{2 c-propyl}), 0.79–0.69 (m, 1 H, C^aH_{2 c-propyl}), 0.66–0.56 (m, 2 H, C^bH_{2 c-propyl}, C^bH_{2 c-propyl}).

^{13}C NMR (DMSO, δ [ppm], J [Hz]): 168.8 (CONH), 166.0 (C-3), 138.7 (C-1'), 136.5 (C-1''), 134.8 (C-1''-CH), 134.6 (C-4a), 134.4 (C-4), 129.8 (2 C, C-2''/6''), 129.6 (C-8a), 128.3 (C-6), 128.2 (2 C, C-3'/5'), 127.4 (C-4''), 127.3 (2 C, C-3''/5''), 127.2 (C-7), 126.9 (2 C, C-2'/6'), 126.8 (C-4'), 126.0 (C-8), 123.3 (C-5), 64.0 (C-1), 42.4 (C-1'-CH₂), 29.1 (N-CH₂-*c*-propyl), 7.3 (CH₂ *c*-propyl), 5.4 (C'H₂ *c*-propyl).

MS (ESI⁺): $m/z = 409$ [M+H]⁺.

(*Z*)-*N*,2-Dibenzyl-4-benzyliden-3-oxo-1,2,3,4-tetrahydroisochinolin-1-carboxamid (**25c**)

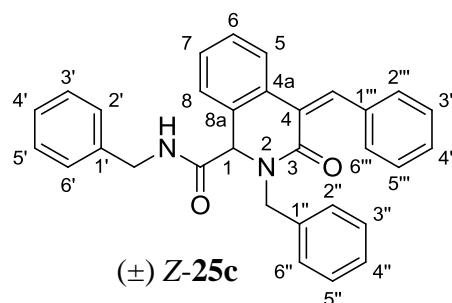
Verbindung **26c** (100 mg, 0.18 mmol) wurde mit NEt₃ (80 μ L, 0.55 mmol), Silberphosphat (150 mg, 0.37 mmol), Palladiumacetat (2 mg, 9 μ mol) und Triphenylphosphin (5 mg, 18 μ mol) in abs. THF (5 mL) umgesetzt. Nachdem die Reaktionskontrolle (DC, *n*-Hexan/*i*-Propanol 6:1) nach 24 h eine vollständige Umsetzung des Edukts anzeigte, wurde die Reaktion beendet, die anorganischen Feststoffe abfiltriert und das Filtrat eingengt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch gereinigt (Kieselgel, *n*-Hexan/*i*-Propanol 6:1, $R_f = 0.26$).

Farbloser Feststoff

C₃₁H₂₆N₂O₂ 458.6 g/mol

Ausbeute: 65 mg (0.14 mmol, 77%).

Schmp: 101–103 °C.



IR (ATM, $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹]): 3280, 3065, 1980, 1645, 1608, 1541, 1496, 1446, 1225, 734, 695.

^1H NMR (DMSO, δ [ppm], J [Hz]): 8.85 (t, 5.8 Hz, 1 H, CONH), 7.78 (d, 7.5 Hz, 1 H, 5-H), 7.71 (d, 7.5 Hz, 2 H, 2'''/6'''-H), 7.07 (d, 6.9 Hz, 2 H, 2'/6'-H), 7.55 (d, 7.5 Hz, 1 H, 8-H), 7.41 (t, 7.5 Hz, 1 H, 6-H), 7.38–7.20 (m, 13 H, 7-H, 3'/5'-H, 4'-H, 2''/6''-H, 3''/5''-H, 4''-H, C-1'''-CH, 3'''/5'''-H, 4'''-H), 5.19 (s, 1 H, 1-H), 5.10 (d, 15.4 Hz, 1 H, C-1''-C^aH), 4.26 (dd, 15.3 Hz, 5.8 Hz, 1 H, C-1''-C^aH), 4.19 (d, 15.4 Hz, 1 H, C-1''-C^bH), 4.14 (dd, 15.3 Hz, 5.8 Hz, 1 H, C-1''-C^bH).

^{13}C NMR (DMSO, δ [ppm], J [Hz]): 168.2 (CONH), 164.6 (C-3), 138.5 (C-1'), 134.94 (1'''-CH), 134.85 (C-4a), 136.9 (C-1''), 136.3 (C-1'''), 131.1 (C-8a), 129.8 (2 C, C-2'''/6'''), 129.30 (C-4), 128.40 (C-6), 128.37 (2 C, C-3'''/5'''), 128.2 (2 C, C-3'/5'), 127.54 (2 C, C-2''/6''), 127.47 (C-4'''), 127.37 (2 C, C-3'''/5'''), 127.2 (C-4''), 126.89 (2 C, C-2'/6'), 126.85 (C-4'), 126.77 (C-7), 125.8 (C-8), 123.5 (C-5), 63.1 (C-1), 48.6 (C-1''-CH₂), 42.4 (C-1'-CH₂).

MS (ESI⁺): m/z = 458 [M]⁺.

(*Z*)-*N*-Benzyl-2-(4-methoxybenzyl)-4-(4-methoxybenzyliden)-3-oxo-1,2,3,4-tetrahydroiso-chinolin-1-carboxamid (**25d**)

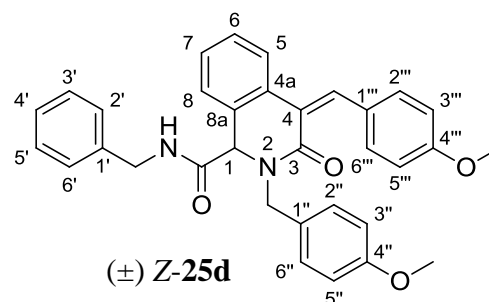
Verbindung **26d** (550 mg, 0.92 mmol) wurde mit NEt₃ (380 μL , 2.8 mmol), Silberphosphat (770 mg, 1.8 mmol), Palladiumacetat (10 mg, 46 μmol) und Triphenylphosphin (24 mg, 0.09 mmol) in abs. THF (20 mL) umgesetzt. Nach 24 h zeigte die Reaktionskontrolle (DC, *n*-Hexan/*i*-Propanol 6:1) kein Edukt mehr an. Die anorganischen Feststoffe wurden abfiltriert und das Lösungsmittel entfernt. Das erhaltene Rohprodukt wurde in wenig CHCl₃ gelöst und die Kristallisation durch Zugabe von Et₂O eingeleitet.

Farbloser Feststoff

C₃₃H₃₀N₂O₄ 518.6 g/mol

Ausbeute: 419 mg (0.81 mmol, 88%).

Schmp: 176–177 °C.



IR (ATM, $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹]): 3299, 1657, 1608, 1509, 1443, 1237, 1031, 834, 747, 698.

^1H NMR (DMSO, δ [ppm], J [Hz]): 8.81 (t, 5.6 Hz, 1 H, CONH), 7.77 (d, 8.8 Hz, 2 H, 2'''/6'''-H), 7.70 (d, 7.4 Hz, 1 H, 4-H), 7.53 (d, 7.4 Hz, 1 H, 7-H), 7.38 (dt, 7.4 Hz, 0.9 Hz, 1 H, 5-H), 7.28 (dt, 7.4 Hz, 0.9 Hz, 1 H, 6-H), 7.24 (d, 7.4 Hz, 2 H, 3'/5'-H), 7.23–7.20 (m, 1 H, 4'-H), 7.18 (d, 8.7 Hz, 2 H, 2''/6''-H), 7.14 (s, 1 H, C-1'''-CH), 7.06 (d, 7.4 Hz, 2 H, 2'/6'-H), 6.93 (d, 8.8 Hz, 2 H, 3'''/5'''-H), 6.88 (d, 8.7 Hz, 2 H, 3''/5''-H), 5.15 (s, 1 H, 1-H), 5.03 (d, 15.0 Hz, 1 H, C-1''-C^aH), 4.25 (dd, 15.3 Hz, 5.6 Hz, 1 H, C-1'-C^aH), 4.14 (d, 15.0 Hz, 1 H, C-1''-C^bH), 4.11 (dd, 15.3 Hz, 5.6 Hz, 1 H, C-1'-C^bH), 3.80 (s, 3 H, C-4'''-OCH₃), 3.72 (s, 3 H, C-4''-OCH₃).

^{13}C NMR (DMSO, δ [ppm], J [Hz]): 168.2 (CONH), 164.8 (C-3), 159.1 (C-4'''), 158.5 (C-4''), 138.6 (C-1'), 135.4 (C-4a), 135.0 (C-1'''-CH), 132.0 (2 C, C-2'''/6'''), 131.0 (C-8a), 129.1 (2 C, C-2''/6''), 128.8 (C-1''), 128.4 (C-1'''), 128.3 (C-5), 128.1 (2 C, C-3'/5'), 126.9 (3 C, C-6, C-2'/6'), 126.8 (C-4'), 127.3 (C-4), 125.8 (C-7), 123.2 (C-4), 113.8 (2 C, C-3''/5''), 112.9 (2 C, C-3'''/5'''), 62.9 (C-1), 55.0 (C-4'''-OCH₃), 54.9 (C-4''-OCH₃), 48.0 (C-1'-CH₂), 42.4 (C-1'-CH₂).

MS (ESI⁺): $m/z = 518$ [M]⁺.

N-Cyclohexyl-4-(4-methoxybenzyliden)-3-oxo-2-propyl-1,2,3,4-tetrahydroisochinolin-1-carboxamid (**25e**)

Verbindung **26e** (510 mg, 1.0 mmol) wurde mit NEt₃ (420 μL , 3.0 mmol), Silberphosphat (840 mg, 2.0 mmol), Palladiumacetat (11 mg, 50 μmol) und Triphenylphosphin (26 mg, 0.10 mmol) in abs. THF (20 mL) umgesetzt. Die Reaktionskontrolle (DC, *n*-Hexan/EtOAc 1:2) zeigte nach 24 h eine vollständige Umsetzung des Edukts an. Die anorganischen Feststoffe wurden abfiltriert und das Filtrat eingengt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch gereinigt (Flash-Kieselgel, *n*-Hexan/EtOAc 1:2) und so *Z*-**25e** ($R_f = 0.46$) und *E*-**25e** ($R_f = 0.38$) getrennt. Die Feststoffe wurden anschließend aus Et₂O umkristallisiert.

(\pm) **Z-25e**

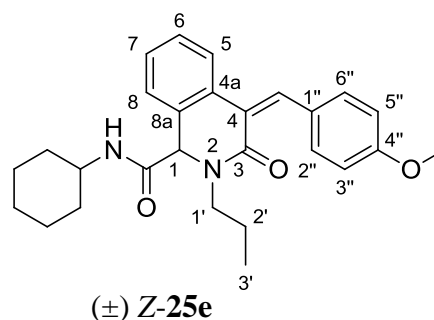
Farbloser Feststoff

C₂₇H₃₂N₂O₃ 432.6 g/mol

Ausbeute: 229 mg (0.53 mmol, 53%).

Schmp: 197–199 °C (Et₂O).

NOESY: 5-H \leftrightarrow C-1''-CH (\rightarrow *Z*).



IR (ATM, $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹]): 3296, 2930, 2854, 1653, 1605, 1530, 1509, 1446, 1247, 1031, 829, 744.

^1H NMR (DMSO, δ [ppm], J [Hz]): 8.25 (d, 7.8 Hz, 1 H, CONH), 7.71 (d, 8.9 Hz, 2 H, 2''/6''-H), 7.68 (d, 7.5 Hz, 1 H, 5-H), 7.53 (dd, 7.5 Hz, 1.2 Hz, 1 H, 8-H), 7.36 (dt, 7.5 Hz, 1.2 Hz, 1 H, 6-H), 7.30 (dt, 7.5 Hz, 1.0 Hz, 1 H, 7-H), 7.05 (s, 1 H, C-1''-CH), 6.89 (d, 8.9 Hz, 2 H, 3''/5''-H), 5.11 (s, 1 H, 1-H), 3.79 (s, 3 H, C-4''-OCH₃), 3.47 (ddd, 13.3 Hz, 8.2 Hz, 6.4 Hz, 1 H, 1'-^aH), 3.43–3.45 (m, 1 H, N-CH_{c-hexyl}), 3.25 (ddd, 13.5 Hz, 8.2 Hz,

6.4 Hz, 1 H, 1'-^bH), 1.83–1.41 (m, 7 H, 2'-H, CH₂_{c-hexyl}), 1.32–1.02 (m, 5 H, CH₂_{c-hexyl}), 0.84 (t, 7.4 Hz, 3 H, 3'-H).

¹³C NMR (DMSO, δ [ppm], *J* [Hz]): 167.7 (CONH), 164.5 (C-3), 158.9 (C-4''), 135.4 (C-4a), 134.2 (C-1''-CH), 131.9 (2 C, C-2''/6''), 131.4 (C-8a), 128.5 (C-1''), 128.1 (C-6), 127.7 (C-4), 126.7 (C-7), 125.4 (C-8), 123.1 (C-5), 112.8 (2 C, C-3''/5''), 63.8 (C-1), 55.0 (C-4''-OCH₃), 47.8 (N-C_{c-hexyl}), 47.5 (C-1'), 32.5 (CH₂_{c-hexyl}), 31.8 (CH₂_{c-hexyl}), 25.0 (CH₂_{c-hexyl}), 24.2 (CH₂_{c-hexyl}), 24.1 (CH₂_{c-hexyl}), 20.5 (C-2'), 11.2 (C-3').

MS (ESI⁺): *m/z* = 433 [M+H]⁺.

(±) *E*-25e

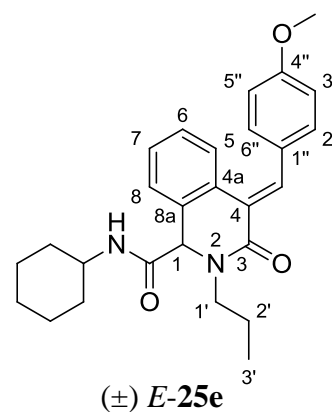
Farbloser Feststoff

C₂₇H₃₂N₂O₃ 432.6 g/mol

Ausbeute: 49 mg (0.11 mmol, 11%).

Schmp: 169–171 °C (Et₂O).

NOESY: 5-H ↔ 2''/5''-H (→ *E*).



IR (ATM, $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹]): 3290, 2932, 2854, 1653, 1604, 1541, 1509, 1448, 1248, 1031, 831, 747.

¹H NMR (DMSO, δ [ppm], *J* [Hz]): 8.32 (d, 7.6 Hz, 1 H, CONH), 7.50 (d, 7.9 Hz, 1 H, 8-H), 7.49 (s, 1 H, C-1''-CH), 7.26–7.21 (m, 2 H, 5-H, 7-H), 7.29 (d, 8.7 Hz, 2 H, 2''/6''-H), 7.08 (dt, 7.9 Hz, 1.2 Hz, 1 H, 6-H), 6.88 (d, 8.7 Hz, 2 H, 3''/5''-H), 5.09 (s, 1 H, 1-H), 3.76 (s, 3 H, C-4''-OCH₃), 3.60 (ddd, 13.7 Hz, 8.5 Hz, 6.2 Hz, 1 H, 1'-^aH), 3.49–3.39 (m, 1 H, N-CH_{c-hexyl}), 3.11 (ddd, 13.7 Hz, 8.5 Hz, 6.2 Hz, 1 H, 1'-^bH), 1.88–1.41 (m, 7 H, 2'-H, CH₂_{c-hexyl}), 1.31–1.09 (m, 5 H, CH₂_{c-hexyl}), 0.83 (t, 7.4 Hz, 3 H, 3'-H).

¹³C NMR (DMSO, δ [ppm], *J* [Hz]): 167.9 (CONH), 165.6 (C-3), 159.1 (C-4''), 132.8 (C-4a), 132.2 (C-1''-CH), 131.9 (C-5 oder C-7), 130.9 (C-8a), 130.3 (2 C, C-2''/6''), 127.94 (C-4 oder C-1''), 127.90 (C-4 oder C-1''), 127.4 (C-5 oder C-7), 126.8 (C-6), 126.1 (C-8), 113.9 (2 C, C-3''/5''), 63.6 (C-1), 55.0 (C-4''-OCH₃), 47.9 (N-CH_{c-hexyl}), 47.8 (C-1'), 32.3 (CH₂_{c-hexyl}), 31.8 (CH₂_{c-hexyl}), 25.0 (CH₂_{c-hexyl}), 24.12 (CH₂_{c-hexyl}), 24.10 (CH₂_{c-hexyl}), 20.4 (C-2'), 11.1 (C-3').

MS (ESI⁺): $m/z = 433$ [M+H]⁺.

(*Z*)-*N*-Cyclohexyl-4-ethyliden-2-(furan-2-ylmethyl)-3-oxo-1,2,3,4-tetrahydroisochinolin-1-carboxamid (**25f**)

Verbindung **26f** (460 mg, 1.0 mmol) wurde mit NEt₃ (420 μL, 3.0 mmol), Silberphosphat (840 mg, 2.0 mmol), Palladiumacetat (11 mg, 50 μmol) und Triphenylphosphin (26 mg, 0.10 mmol) in abs. THF (20 mL) umgesetzt. Die Reaktionskontrolle (DC, *n*-Hexan/EtOAc 1:1) zeigte nach 24 h eine vollständige Umsetzung des Edukts an. Die anorganischen Feststoffe wurden abfiltriert und das Filtrat eingeeengt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch gereinigt (Kieselgel, *n*-Hexan/EtOAc 1:1, R_f = 0.24).

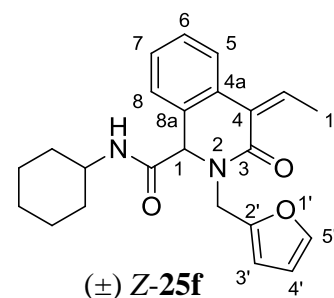
Hellgelber Feststoff

C₂₃H₂₆N₂O₃ 378.5 g/mol

Ausbeute: 71 mg (0.19 mmol, 19%).

Schmp: 140–143 °C.

NOESY: 5-H ↔ C-1''-CH (→ *Z*).



IR (ATM, $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹]): 3304, 2931, 2855, 1654, 1538, 1447, 1225, 747.

¹H NMR (DMSO, δ [ppm], J [Hz]): 8.22 (d, 7.7 Hz, 1 H, CONH), 7.57 (dd, 1.8 Hz, 0.7 Hz, 1 H, 5'-H), 7.49 (dd, 7.6 Hz, 1.3 Hz, 2 H, 5-H, 8-H), 7.29 (dt, 7.6 Hz, 1.3 Hz, 1 H, 6-H), 7.25 (dt, 7.6 Hz, 1.3 Hz, 1 H, 7-H), 6.56 (q, 7.3 Hz, 1 H, C-1''-CH), 6.40 (dd, 3.9 Hz, 1.8 Hz, 1 H, 4'-H), 6.29 (d, 3.0 Hz, 1 H, 3'-H), 5.06 (s, 1 H, 1-H), 5.02 (d, 15.6 Hz, 1 H, C-2'-C^aH), 4.05 (d, 15.6 Hz, 1 H, C-2'-C^bH), 3.39–3.30 (m, 1 H, N-CH_{c-hexyl}), 2.34 (d, 7.3 Hz, 3 H, 1''-H), 1.77–1.42 (m, 5 H, CH_{2 c-hexyl}), 1.28–0.97 (m, 5 H, CH_{2 c-hexyl}).

¹³C NMR (DMSO, δ [ppm], J [Hz]): 167.1 (CONH), 164.6 (C-3), 150.1 (C-2'), 142.6 (C-5'), 134.9 (C-1''-CH), 133.9 (C-4a), 130.2 (C-8a), 128.5 (C-4), 128.1 (C-6), 126.8 (C-7), 125.6 (C-8), 123.0 (C-5), 110.4 (C-4'), 108.7 (C-3'), 62.9 (C-1), 47.9 (N-CH_{c-hexyl}), 41.0 (C-2'-CH₂), 32.3 (CH_{2 c-hexyl}), 31.8 (CH_{2 c-hexyl}), 25.0 (CH_{2 c-hexyl}), 24.2 (CH_{2 c-hexyl}), 24.1 (CH_{2 c-hexyl}), 15.7 (C-1'').

MS (ESI⁺): $m/z = 378$ [M]⁺.

2-(3,4-Dimethoxyphenethyl)-4-methylen-3-oxo-N-pentyl-1,2,3,4-tetrahydroisochinolin-1-carboxamid (**25g**)

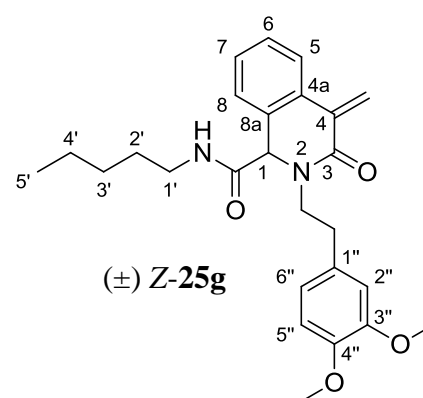
Verbindung **26g** (520 mg, 1.0 mmol) wurde mit NEt_3 (420 μL , 3.0 mmol), Silberphosphat (840 mg, 2.0 mmol), Palladiumacetat (11 mg, 50 μmol) und Triphenylphosphin (26 mg, 0.10 mmol) in abs. THF (20 mL) umgesetzt. Die Reaktionskontrolle (DC, *n*-Hexan/EtOAc 1:3) zeigte nach 24 h eine vollständige Umsetzung des Edukts an. Die anorganischen Feststoffe wurden abfiltriert und das Filtrat eingengt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch gereinigt (Kieselgel, *n*-Hexan/EtOAc 1:3, $R_f = 0.27$) und anschließend aus Et_2O umkristallisiert.

Farbloser Feststoff

$\text{C}_{26}\text{H}_{32}\text{N}_2\text{O}_4$ 436.5 g/mol

Ausbeute: 42 mg (96 μmol , 10%).

Schmp: 150–151 °C (Et_2O).



IR (ATM, $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}]): 3289, 2938, 1651, 1609, 1513, 1445, 1232, 1028, 794, 764.

^1H NMR (DMSO, δ [ppm], J [Hz]): 8.52 (t, 5.6 Hz, 1 H, CONH), 7.75–7.72 (m, 1 H, 5-H), 6.72–7.68 (m, 2 H, 2''-H, 6''-H), 7.47–7.42 (m, 1 H, 8-H), 7.40–7.31 (m, 2 H, 6-H, 7-H), 6.83 (d, 8.7 Hz, 1 H, 5''-H), 6.21 (d, 1.1 Hz, 1 H, C-4-C^aH), 6.12 (d, 1.1 Hz, 1 H, C-4-C^bH), 5.13 (s, 1 H, 1-H), 3.70 (s, 3 H, C-4''-OCH₃), 3.59 (s, 3 H, C-3''-OCH₃), 3.10–2.93 (m, 2 H, 1'-H), 2.88–2.77 (m, 2 H, CON-C^aH, C-1''-C^aH), 2.76–2.65 (m, 1 H, C-1''-C^bH), 1.41–1.32 (m, 2 H, 2'-H), 1.26–1.10 (m, 5 H, CON-C^bH, 3'-H, 4'-H), 0.78 (t, 7.0 Hz, 3 H, 5'-H).

^{13}C NMR (DMSO, δ [ppm], J [Hz]): 168.7 (CONH), 163.5 (C-3), 148.5 (C-3''), 147.2 (C-4''), 135.0 (C-4a), 131.2 (C-1''), 130.9 (C-8a), 130.3 (C-4), 128.1 (C-6), 127.9 (C-7), 125.7 (C-8), 123.9 (C-5), 120.2 (C-2'' oder C-6''), 118.1 (C-4-CH₂), 112.2 (C-2'' oder C-6''), 111.9 (C-5''), 63.7 (C-1), 55.4 (C-4''-OCH₃), 55.0 (C-3''-OCH₃), 47.8 (N-CH₂), 38.7 (C-1'), 32.3 (C-1''-CH₂), 28.33 (C-2'), 28.28 (C-3'), 21.6 (C-4'), 13.7 (C-5').

MS (ESI⁺): $m/z = 437$ [M+H]⁺.

N-(*tert*-Butyl)-2-(2-chlorbenzyl)-4-ethyliden-3-oxo-1,2,3,4-tetrahydroisochinolin-1-carboxamid (**25h**)

Verbindung **26h** (480 mg, 1.0 mmol) wurde mit NEt_3 (420 μL , 3.0 mmol), Silberphosphat (840 mg, 2.0 mmol), Palladiumacetat (11 mg, 50 μmol) und Triphenylphosphin (26 mg, 0.10 mmol) in abs. THF (20 mL) umgesetzt. Nachdem die Reaktionskontrolle (DC, *n*-Hexan/EtOAc 1:2) nach 24 h nur noch Spuren des Edukts enthielt, wurde die Reaktion beendet, die anorganischen Feststoffe abfiltriert und das Filtrat eingengt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch gereinigt (Kieselgel, *n*-Hexan/EtOAc 1:1) und so *Z*-**25h** ($R_f = 0.55$) und *E*-**25h** ($R_f = 0.41$) getrennt voneinander isoliert. Die Feststoffe wurden anschließend aus EtOAc umkristallisiert.

(±) *Z*-**25h**

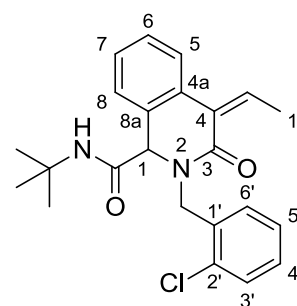
Farbloser Feststoff

$\text{C}_{23}\text{H}_{25}\text{ClN}_2\text{O}_2$ 396.9 g/mol

Ausbeute: 86 mg (0.22 mmol, 22%).

Schmp: 224–225 °C (EtOAc).

NOESY: 5-H \leftrightarrow C-1''-CH (\rightarrow *Z*).



(±) *Z*-**25h**

IR (ATM, $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}]): 3286, 2967, 1686, 1647, 1604, 1544, 1448, 1222, 1039, 745.

^1H NMR (DMSO, δ [ppm], J [Hz]): 8.05 (s, 1 H, CONH), 7.57 (dd, 7.6 Hz, 0.7 Hz, 1 H, 5-H), 7.48 (dd, 7.2 Hz, 2.0 Hz, 1 H, 3'-H), 7.45 (dd, 7.6 Hz, 1.3 Hz, 1 H, 8-H), 7.33 (td, 7.6 Hz, 1.3 Hz, 1 H, 6-H), 7.32–7.24 (m, 3 H, 4'-H, 5'-H), 7.08 (dd, 7.2 Hz, 2.3 Hz, 1 H, 6'-H), 6.66 (q, 7.3 Hz, 1 H, C-1''-CH), 5.20 (d, 16.2 Hz, 1 H, C-1'-C^aH), 5.03 (s, 1 H, 1-H), 4.04 (d, 16.2 Hz, 1 H, C-1'-C^bH), 2.27 (d, 7.3 Hz, 3 H, 1''-H), 1.16 (s, 9 H, CH_3 *t*-butyl).

^{13}C NMR (DMSO, δ [ppm], J [Hz]): 167.7 (CONH), 165.0 (C-3), 135.0 (C-1''-CH), 134.2 (C-2'), 133.8 (C-4a), 132.2 (C-1'), 129.9 (C-8a), 129.3 (C-3'), 128.8 (C-4' oder C-5'), 128.2 (C-6'), 128.1 (C-6), 128.0 (C-4), 127.3 (C-4' oder C-5'), 126.9 (C-7), 125.5 (C-8), 123.1 (C-5), 63.9 (C-1), 50.5 (N-C_{*t*}-butyl), 45.9 (C-1'-CH₂), 28.1 (3 C, CH_3 *t*-butyl), 15.8 (C-1'').

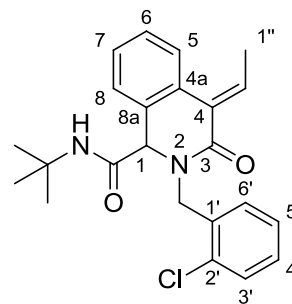
(±) E-25h

Hellgelber Feststoff

C₂₃H₂₅ClN₂O₂ 396.9 g/mol

Ausbeute: 60 mg (0.15 mmol, 15%).

Schmp: 197–200 °C (EtOAc).

NOESY: 5-H ↔ 1''-H (→ *E*).**(±) E-25h**IR (ATM, $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹]): 3303, 2970, 1686, 1654, 1610, 1525, 1443, 1216, 1040, 745.

¹H NMR (DMSO, δ [ppm], *J* [Hz]): 8.07 (s, 1 H, CONH), 7.57 (d, 7.5 Hz, 1 H, 5-H), 7.53 (d, 7.4 Hz, 1.1 Hz, 1 H, 8-H), 7.47 (dd, 7.4 Hz, 1.7 Hz, 1 H, 3'-H), 7.39 (dt, 7.7 Hz, 1.1 Hz, 1 H, 6-H), 7.32 (dt, 7.4 Hz, 0.9 Hz, 1 H, 7-H), 7.29–7.24 (m, 2 H, 4'-H, 5'-H), 7.07 (dd, 7.2 Hz, 2.0 Hz, 1 H, 6'-H), 6.95 (q, 7.7 Hz, 1 H, C-1''-CH), 5.20 (d, 16.2 Hz, 1 H, C-1'-C^aH), 4.06 (d, 16.2 Hz, 1 H, C-1'-C^bH), 5.02 (s, 1 H, 1-H), 2.12 (d, 7.7 Hz, 3 H, 1''-H), 1.16 (s, 9 H, CH₃ *t*-butyl).

¹³C NMR (DMSO, δ [ppm], *J* [Hz]): 167.7 (CONH), 166.3 (C-3), 134.1 (C-2'), 132.8 (C-1''-CH), 132.3 (C-1'), 131.6 (C-8a), 130.7 (C-4a), 129.3 (C-3'), 128.9 (C-4), 128.8 (C-4' oder C-5'), 128.4 (C-6'), 127.5 (C-6), 127.3 (C-4' oder C-5'), 127.14 (C-5 oder C-7), 127.07 (C-5 oder C-7), 126.0 (C-8), 63.8 (C-1), 50.6 (N-C_{*t*}-butyl), 46.4 (C-1'-CH₂), 28.2 (3 C, CH₃ *t*-butyl), 15.5 (C-1'').

9.2 Synthese der 2,5-Diketopiperazin-Derivate

3-(2-Bromophenyl)-6-(2-oxo-2-phenylethyl)-4-(pyridin-3-ylmethyl)-1-(tosylmethyl)piperazin-2,5-dion (**35a**)

Zu einer Lösung von 2-Brombenzaldehyd (470 μL , 4.0 mmol) in abs. MeOH (10 mL) wurde unter Argon-Atmosphäre 3-(Aminomethyl)pyridin (410 μL , 4.0 mmol) zugegeben und bei RT 30 min gerührt. Anschließend wurde Tosylmethylisocyanid (940 mg, 4.8 mmol) und 3-Benzoylacrylsäure (710 mg, 4.0 mmol) zugegeben und die Reaktionslösung 6 Tage bei 55 °C gerührt bis die Reaktionskontrolle (DC, $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 10:0.25) nur noch Spuren der Edukte zeigte. Das Lösungsmittel wurde entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch gereinigt (1. Kieselgel, *n*-Hexan/EtOAc 1:20, $R_f = 0.27$). Dabei wurde das Diastereomerenmisch aus *cis*- und *trans*-Produkt in einer Ausbeute von 915 mg (1.42 mmol, 35%) erhalten. In einer weiteren säulenchromatographischen Trennung (2. Flash-Kieselgel, $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeOH}$ 10:0.25, $R_f(\textit{cis}) = 0.13$, $R_f(\textit{trans}) = 0.16$) wurden beide Diastereomeren voneinander getrennt.

(\pm) *cis*-**35a**

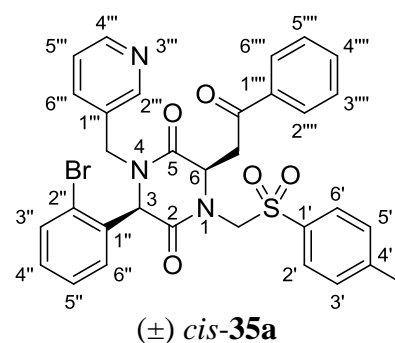
Farbloser amorpher Feststoff

$\text{C}_{32}\text{H}_{28}\text{BrN}_3\text{O}_5\text{S}$ 646.6 g/mol

Ausbeute: 161 mg (0.25 mmol, 6%).

Schmp: 99–100 °C.

NOESY: 6"-H \leftrightarrow C-6-C^{a/b}H (\rightarrow *cis*).



IR (ATM, $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}]): 1657, 1595, 1422, 1323, 1140, 1084, 761, 688.

^1H NMR (DMSO, δ [ppm], J [Hz]): 8.48 (dd, 4.7 Hz, 1.7 Hz, 1 H, 4'''-H), 8.24 (d, 1.7 Hz, 1 H, 2'''-H), 8.10 (d, 9.3 Hz, 1.2 Hz, 2 H, 2'''/6'''-H), 7.84 (dd, 7.8 Hz, 1.3 Hz, 1 H, 6''-H), 7.70 (tt, 7.4 Hz, 1.2 Hz, 1 H, 4'''-H), 7.63–7.56 (m, 4 H, 2'/6'-H, 3'''/5'''-H), 7.56 (dd, 7.8 Hz, 1.0 Hz, 1 H, 3''-H), 7.51 (dt, 7.9 Hz, 1.7 Hz, 1 H, 6'''-H), 7.45 (td, 7.8 Hz, 1.0 Hz, 1 H, 5''-H), 7.34 (dd, 7.9 Hz, 4.7 Hz, 1 H, 5'''-H), 7.27 (td, 7.8 Hz, 1.3 Hz, 1 H, 4''-H), 7.19 (d, 8.1 Hz, 2 H, 3'/5'-H), 5.24 (s, 1 H, 3-H), 5.06–5.00 (m, 1 H, 6-H), 5.12 (d, 14.7 Hz, 1 H, C-1-C^aH), 5.01 (d, 14.7 Hz, 1 H, C-1-C^bH), 4.87 (d, 15.5 Hz, 1 H, C-4-C^aH), 4.21 (dd, 18.7 Hz, 4.4 Hz,

1 H, C-6-C^aH), 3.99 (dd, 18.7 Hz, 4.1 Hz, 1 H, C-6-C^bH), 3.76 (d, 15.5 Hz, 1 H, C-4-C^bH), 2.26 (s, 3 H, C-4'-CH₃).

¹³C NMR (DMSO, δ [ppm], J [Hz]): 196.9 (C-1''''-CO), 165.2 (C-5), 163.9 (C-2), 149.1 (C-2'''), 148.6 (C-4'''), 144.7 (C-4'), 136.1 (C-1''''), 135.6 (C-6'''), 135.0 (C-1''), 134.1 (C-1'), 133.4 (C-4''''), 132.7 (C-3'''), 131.1 (C-1'''), 130.4 (C-4''), 129.8 (C-6''), 129.6 (2 C, C-3'/5'), 128.6 (2 C, C-2'/6 oder C-3''''/5''''), 128.4 (C-5''), 128.3 (2 C, C-2'/6' oder C-3''''/5''''), 128.1 (2 C, C-2''''/6''''), 124.7 (C-2''), 123.4 (C-5'''), 63.9 (C-1-CH₂), 61.4 (C-3), 56.0 (C-6), 44.9 (C-4-CH₂), 40.6 (C-6-CH₂), 21.0 (C-4-CH₃).

MS (ESI⁺): m/z = 645 / 647 [M]⁺.

HRMS (ESI⁺-TOF): ber. für C₃₂H₂₉BrN₃O₅S [M+H]⁺ 646.1006; gem. 646.1008.

(±) *trans*-35a

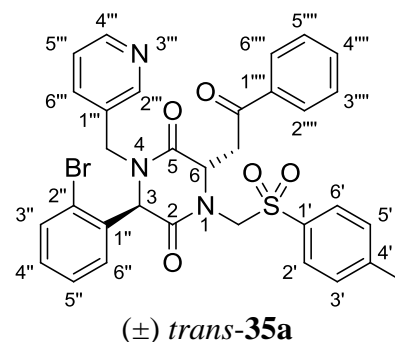
Farbloser amorpher Feststoff

C₃₂H₂₈BrN₃O₅S 646.6 g/mol

Ausbeute: 341 mg (0.53 mmol, 13%).

Schmp: 111–114 °C.

NOESY: 6''-H ↔ 6-H (→ *trans*).



IR (ATM, $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹]): 1657, 1596, 1422, 1319, 1140, 1085, 762, 688.

¹H NMR (DMSO, δ [ppm], J [Hz]): 8.40 (dd, 4.8 Hz, 1.6 Hz, 1 H, 4'''-H), 8.06 (d, 1.8 Hz, 1 H, 2'''-H), 8.02 (dd, 7.8 Hz, 1.2 Hz, 2 H, 2''''/6''''-H), 7.71 (d, 8.1 Hz, 2 H, 2'/6'-H), 7.70 (tt, 7.8 Hz, 1.2 Hz, 1 H, 4''''-H), 7.58 (t, 7.8 Hz, 2 H, 3''''/5''''-H), 7.55 (dd, 7.7 Hz, 1.3 Hz, 1 H, 3''-H), 7.37–7.29 (m, 2 H, 5''-H, 6''-H), 7.35 (d, 8.1 Hz, 2 H, 3'/5'-H), 7.26 (td, 7.7 Hz, 1.7 Hz, 1 H, 4''-H), 7.23 (dd, 7.8 Hz, 4.8 Hz, 1 H, 5'''-H), 7.13 (dd, 7.7 Hz, 1.7 Hz, 1 H, 6''-H), 5.68 (s, 1 H, 3-H), 5.36 (d, 14.8 Hz, 1 H, C-1-C^aH), 4.97 (d, 14.8 Hz, 1 H, C-1-C^bH), 4.96–4.92 (m, 1 H, 6-H), 4.84 (d, 15.4 Hz, 1 H, C-4-C^aH), 4.33 (dd, 19.1 Hz, 1 H, C-6-C^aH), 3.92 (dd, 19.1 Hz, 1 H, C-6-C^bH), 3.74 (d, 15.4 Hz, 1 H, C-4-C^bH), 2.34 (s, 3 H, C-4'-CH₃).

¹³C NMR (DMSO, δ [ppm], J [Hz]): 197.6 (C-1''''-CO), 165.9 (C-5), 164.5 (C-2), 149.1 (C-2'''), 148.4 (C-4'''), 144.7 (C-4'), 135.8 (C-1''''), 135.6 (C-6'''), 135.2 (C-1''), 135.0 (C-1'),

133.7 (C-4'''), 132.8 (C-3''), 130.9 (C-1'''), 130.6 (C-6''), 130.3 (C-4''), 129.8 (2 C, C-3'/5'), 128.6 (2 C, C-3'''/5'''), 128.1 (4 C, C-2'/6', C-2'''/6'''), 128.0 (C-5''), 124.1 (C-2''), 123.1 (C-5'''), 62.8 (C-1-CH₂), 62.4 (C-3), 55.9 (C-6), 45.0 (C-4-CH₂), 39.9 (C-6-CH₂), 21.0 (C-4'-CH₃).

MS (ESI⁺): $m/z = 645 / 647$ [M]⁺.

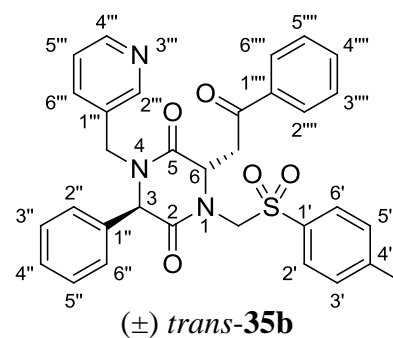
HRMS (ESI⁺-TOF): ber. für C₃₂H₂₉BrN₃O₅S [M+H]⁺ 646.1006; gem. 646.1001.

6-(2-Oxo-2-phenylethyl)-3-phenyl-1-(pyridin-3-ylmethyl)-4-(tosylmethyl)piperazin-2,5-dion (35b)

Zu einer Lösung von Benzaldehyd (900 µL, 8.9 mmol) in abs. MeOH (25 mL) wurde unter Argon-Atmosphäre 3-(Aminomethyl)pyridin (910 µL, 8.9 mmol) zugegeben und bei RT 20 min gerührt. Anschließend wurde Tosylmethylisocyanid (1.74 g, 8.9 mmol) und 3-Benzoylacrylsäure (1.60 g, 8.9 mmol) zugegeben und die Reaktionslösung bei RT gerührt. Der ausgefallene Feststoff wurde nach 18 h abfiltriert, in CH₂Cl₂ aufgenommen und durch Zugabe von Et₂O zum Kristallisieren gebracht.

Farbloser Feststoff

C₃₂H₂₉N₃O₅S 567.7 g/mol
 Ausbeute: 2.28 g (4.01 mmol, 45%).
 Schmp: 204–205 °C.
 NOESY: 2''/6''-H ↔ 6-H,
 3-H ↔ C-6-C^{a/b}H (→ *trans*).



IR (ATM, $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹]): 2952, 1662, 1597, 1429, 1418, 1319, 1289, 1141, 1087, 757, 713, 691.

¹H NMR (DMSO, δ [ppm], J [Hz]): 8.42 (dd, 4.9 Hz, 1.6 Hz, 1 H, 4'''-H), 8.17 (d, 1.6 Hz, 1 H, 2'''-H) 8.00 (d, 7.5 Hz, 2 H, 2'''/6'''-H), 7.69 (t, 7.5 Hz, 1 H, 4'''-H), 7.63 (d, 8.3 Hz, 2 H, 2'/6'-H), 7.57 (t, 7.5 Hz, 2 H, 3'''/5'''-H), 7.41 (dt, 7.5 Hz, 1.6 Hz, 1 H, 6'''-H), 7.39–7.30 (m, 1 H, 4''-H), 7.33 (d, 7.8 Hz, 2 H, 3'/5'-H), 7.27 (d, 8.3 Hz, 2 H, 3'/5'-H), 7.25 (dd, 7.5 Hz, 4.9 Hz, 1 H, 5'''-H), 7.08 (dd, 7.8 Hz, 1.2 Hz, 2 H, 2''/6''-H), 5.48 (d, 14.9 Hz, 1 H, C-1-C^aH), 5.20 (s, 1 H, 3-H), 4.93 (dd, 4.4 Hz, 3.5 Hz, 1 H, 6-H), 4.88 (d, 14.9 Hz, 1 H, C-1-C^bH), 4.86

(d, 15.3 Hz, 1 H, C-4-C^aH), 4.23 (dd, 18.9 Hz, 4.4 Hz, 1H, C-6-C^aH), 3.88 (dd, 18.9 Hz, 3.5 Hz, 1 H, C-6-C^bH), 3.79 (d, 15.3 Hz, 1 H, C-4-C^bH), 2.34 (s, 3 H, C-4'-CH₃).

¹³C NMR (DMSO, δ [ppm], J [Hz]): 197.3 (C-1'''-C=O), 165.7 (C-2), 165.5 (C-5), 149.0 (C-2'''), 148.3 (C-4'''), 144.7 (C-4'), 135.9 (C-1'''), 135.7 (C-1''), 135.4 (C-6'''), 134.6 (C-1'), 133.6 (C-4'''), 131.4 (C-1'''), 129.8 (2 C, C-3'/5'), 128.6 (2 C, C-3'''/5'''), 128.5 (2 C, C-3''/5''), 128.3 (C-4''), 128.03 (2 C, C-2'/6' oder C-2''/6'' oder C-2'''/6'''), 127.97 (2 C, C-2'/6' oder C-2''/6'' oder C-2'''/6'''), 127.90 (2 C, C-2'/6' oder C-2''/6'' oder C-2'''/6'''), 123.1 (C-5'''), 63.4 (C-3), 61.7 (C-1-CH₂), 55.4 (C-6), 45.2 (C-4-CH₂), 37.9 (C-6-CH₂), 21.0 (C-4-CH₃).

CHNS: ber. C 67.71, H 5.15, N 7.40, S 5.65; gem. C 67.39, H 5.11, N 7.33, S 5.54.

MS (ESI⁺): *m/z* = 567 [M]⁺.

3-(2-Chlorphenyl)-6-(2-oxo-2-phenylethyl)-4-(pyridin-3-ylmethyl)-1-(tosylmethyl)piperazin-2,5-dion (**35c**)

Zu einer Lösung von 2-Chlorbenzaldehyd (230 µL, 2.0 mmol) in abs. MeOH (5 mL) wurde unter Argon-Atmosphäre 3-(Aminomethyl)pyridin (200 µL, 2.0 mmol) zugegeben und bei RT 20 min gerührt. Anschließend wurde Tosylmethylisocyanid (390 mg, 2.0 mmol) und 3-Benzoylacrylsäure (350 mg, 2.0 mmol) zugegeben und die Reaktionslösung 48 h bei 60 °C gerührt bis die Reaktionskontrolle (DC, n-Hexan/EtOAc 1:2) nur noch Spuren der Edukte zeigte. Das Lösungsmittel wurde entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch gereinigt (1. Kieselgel, CH₂Cl₂/MeOH 10:0.5, R_f = 0.26). Dabei wurde das Diastereomerenmisch aus *cis*- und *trans*-Produkt in einer Ausbeute von 440 mg (0.73 mmol, 37%) erhalten. In einer weiteren säulenchromatographischen Trennung (2. Flash-Kieselgel, CHCl₃:EtOH 10:1, R_f (*cis*) = 0.16, R_f (*trans*) = 0.22) wurden beide Diastereomeren voneinander getrennt.

(±) *cis*-**35c**

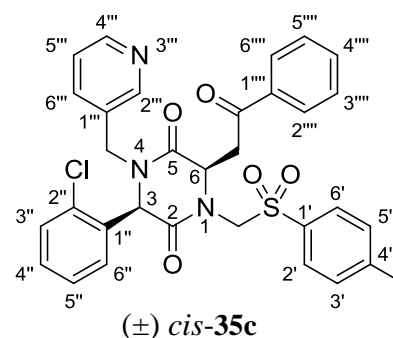
Hellgelber Feststoff

C₃₂H₂₈ClN₃O₅S 602.1 g/mol

Ausbeute: 103 mg (0.17 mmol, 9%).

Schmp: 79–82 °C.

NOESY: 6''-H ↔ C-6-C^{a/b}H (→ *cis*).



IR (ATM, $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹]): 2934, 1657, 1596, 1423, 1326, 1141, 1085, 1028, 815, 752, 688.

¹H NMR (DMSO, δ [ppm], J [Hz]): 8.48 (dd, 4.7 Hz, 1.7 Hz, 1 H, 4'''-H), 8.22 (d, 1.7 Hz, 1 H, 2'''-H), 8.09 (d, 7.5 Hz, 2 H, 2'''/6'''-H), 7.83 (d, 7.8 Hz, 1 H, 6''-H), 7.70 (tt, 7.5 Hz, 1.2 Hz, 1 H, 4''''-H), 7.60 (d, 8.0 Hz, 2 H, 2'/6'-H), 7.59 (t, 7.5 Hz, 2 H, 3'''/5'''-H), 7.51 (dt, 7.9 Hz, 1.7 Hz, 1 H, 6'''-H), 7.44–7.36 (m, 3 H, 3''-H, 4''-H, 5''-H), 7.36–7.32 (m, 1 H, 5'''-H), 7.18 (d, 8.0 Hz, 2 H, 3'/5'-H), 5.23 (s, 1 H, 3-H), 5.12 (d, 14.5 Hz, 1 H, C-1-C^aH), 5.03 (dd, 4.4 Hz, 4.2 Hz, 1 H, 6-H), 5.00 (d, 14.5 Hz, 1 H, C-1-C^bH), 4.88 (d, 15.4 Hz, 1 H, C-4-C^aH), 4.19 (dd, 18.7 Hz, 4.4 Hz, 1 H, C-6-C^aH), 3.98 (dd, 18.7 Hz, 4.2 Hz, 1 H, C-6-C^bH), 3.77 (d, 15.4 Hz, 1 H, C-4-C^bH), 2.26 (s, 3 H, C-4'-CH₃).

¹³C NMR (DMSO, δ [ppm], J [Hz]): 196.9 (C-1'''-C=O), 165.3 (C-5), 163.9 (C-2), 149.1 (C-2'''), 148.6 (C-4'''), 144.7 (C-4'), 136.1 (C-1''''), 135.6 (C-6'''), 134.1 (C-1'), 133.8 (C-2''), 133.4 (C-4''''), 133.2 (C-1''), 131.0 (C-1'''), 130.2 (C-4''), 129.8 (C-6''), 129.6 (2 C, C-3'/5'), 129.4 (C-3'' oder C-5''), 128.6 (2 C, C-3'''/5'''), 128.3 (2 C, C-2'/6'), 128.1 (2 C, C-2''''/6'''), 127.8 (C-3'' oder C-5''), 123.3 (C-5'''), 63.9 (C-1-C₂H₂), 58.9 (C-3), 56.0 (C-6), 45.0 (C-4-CH₂), 40.7 (C-6-CH₂), 20.9 (C-4'-CH₃).

HRMS (ESI⁺-TOF): ber. für C₃₂H₂₉ClN₃O₅S [M+H]⁺ 602.1511; gem. 602.1513.

(±) *trans*-35c

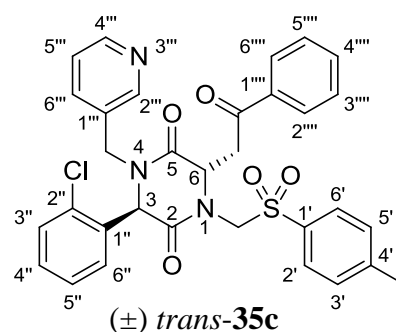
Hellgelber Feststoff

C₃₂H₂₈ClN₃O₅S 602.1 g/mol

Ausbeute: 102 mg (0.17 mmol, 9%).

Schmp: 135–138 °C.

NOESY: 6''-H ↔ 6-H (→ *trans*).



IR (ATM, $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹]): 2940, 1652, 1596, 1433, 1324, 1141, 1086, 1029, 815, 753, 689.

¹H NMR (DMSO, δ [ppm], J [Hz]): 8.40 (dd, 4.7 Hz, 1.7 Hz, 1 H, 4'''-H), 8.05 (d, 1.7 Hz, 1 H, 2'''-H), 8.01 (dd, 7.7 Hz, 1.2 Hz, 2 H, 2'''/6'''-H), 7.71 (d, 8.3 Hz, 2 H, 2'/6'-H), 7.69 (tt, 7.7 Hz, 1.2 Hz, 1 H, 4''''-H), 7.57 (t, 7.7 Hz, 2 H, 3'''/5'''-H), 7.38–7.31 (m, 5 H, 3''-H, 4''-H, 6'''-H, 3'/5'-H), 7.30–7.25 (m, 1 H, 5''-H), 7.23 (dd, 7.8 Hz, 4.7 Hz, 1 H, 5'''-H), 7.17 (d, 7.0 Hz, 1 H, 6''-H), 5.66 (s, 1 H, 3-H), 5.38 (d, 14.8 Hz, 1 H, C-1-C^aH), 4.97 (d, 14.8 Hz, 1 H,

C-1-C^bH), 4.94 (dd, 4.2 Hz, 3.4 Hz, 1 H, 6-H), 4.83 (d, 15.4 Hz, 1 H, C-4-C^aH), 4.31 (dd, 19.1 Hz, 4.2 Hz, 1 H, C-6-C^aH), 3.92 (dd, 19.1 Hz, 3.4 Hz, 1 H, C-6-C^bH), 3.77 (d, 15.4 Hz, 1 H, C-4-C^bH), 2.34 (s, 3 H, C-4'-CH₃).

¹³C NMR (DMSO, δ [ppm], J [Hz]): 197.6 (C-1^{'''}-CO), 165.9 (C-5), 164.6 (C-2), 149.1 (C-2^{'''}), 148.4 (C-4^{'''}), 144.7 (C-4'), 135.8 (C-1^{'''}), 135.5 (C-6^{'''}), 135.0 (C-1'), 133.7 (C-4^{'''}), 133.5 (C-1'' oder C-2''), 133.4 (C-1'' oder C-2''), 130.9 (C-1^{'''}), 130.7 (C-6^{'''}), 130.1 (C-4^{'''}), 129.8 (2 C, C-3'/5'), 129.6 (C-3^{'''}), 128.6 (2 C, C-3^{'''}/5^{'''}), 128.07 (2 C, C-2'/6' oder C-2^{'''}/6^{'''}), 128.05 (2 C, C-2'/6' oder C-2^{'''}/6^{'''}), 127.4 (C-5^{'''}), 123.1 (C-5^{'''}), 62.8 (C-1-CH₂), 60.4 (C-3), 55.9 (C-6), 45.0 (C-4-CH₂), 39.9 (C-6-CH₂), 21.0 (C-4'-CH₃).

HRMS (ESI⁺-TOF): ber. für C₃₂H₂₉ClN₃O₅S [M+H]⁺ 602.1511; gem. 602.1510.

3-(2-Iodphenyl)-6-(2-oxo-2-phenylethyl)-4-(pyridin-3-ylmethyl)-1-(tosylmethyl)piperazin-2,5-dion (**35d**)

Zu einer Lösung von 2-Iodbenzaldehyd (464 mg, 2.0 mmol) in abs. MeOH (5 mL) wurde unter Argon-Atmosphäre 3-(Aminomethyl)pyridin (200 µL, 2.0 mmol) zugegeben und bei RT 40 min gerührt. Anschließend wurde Tosylmethylisocyanid (390 mg, 2.0 mmol) und 3-Benzoylacrylsäure (350 mg, 2.0 mmol) zugegeben und die Reaktionslösung 4 Tage bei 75 °C gerührt bis die Reaktionskontrolle (DC, n-Hexan/EtOAc 1:20) nur noch Spuren der Edukte zeigte. Das Lösungsmittel wurde entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch gereinigt (1. Kieselgel, CH₂Cl₂/MeOH 10:0.5, R_f = 0.15). Dabei wurde das Diastereomerenmisch aus *cis*- und *trans*-Produkt in einer Ausbeute von 591 mg (0.85 mmol, 43%) erhalten. In einer weiteren säulenchromatographischen Trennung (2. Flash-Kieselgel, CHCl₃:EtOH 10:0.2, R_f (*cis*) = 0.15, R_f (*trans*) = 0.29) wurden beide Diastereomeren voneinander getrennt.

(±) *cis*-**35d**

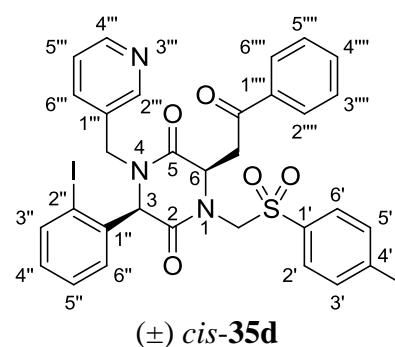
Farbloser amorpher Feststoff

C₃₂H₂₈IN₃O₅S 693.6 g/mol

Ausbeute: 75 mg (0.11 mmol, 5%).

Schmp: 115–118 °C.

NOESY: 6''-H ↔ C-6-C^{a/b}H (→ *cis*).



IR (ATM, $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹]): 2933, 1657, 1596, 1579, 1421, 1323, 1140, 1085, 1012, 814, 754, 688.

¹H NMR (DMSO, δ [ppm], J [Hz]): 8.47 (dd, 4.8 Hz, 1.9 Hz, 1 H, 4'''-H), 8.26 (d, 1.9 Hz, 1 H, 2'''-H), 8.10 (dd, 7.7 Hz, 1.2 Hz, 2 H, 2'''/6'''-H), 7.82 (dd, 7.8 Hz, 1.1 Hz, 1 H, 3''-H), 7.78 (dd, 7.8 Hz, 1.3 Hz, 1 H, 6''-H), 7.70 (tt, 7.7 Hz, 1.2 Hz, 1 H, 4''''-H), 7.62–7.57 (m, 4 H, 2'/6'-H, 3''''/5''''-H), 7.52 (dt, 8.0 Hz, 1.9 Hz, 1 H, 6''-H), 7.45 (td, 7.8 Hz, 1.1 Hz, 1 H, 5''-H), 7.35 (dd, 8.0 Hz, 4.8 Hz, 1 H, 5'''-H), 7.20 (d, 8.0 Hz, 2 H, 3'/5'-H), 7.08 (td, 7.8 Hz, 1.3 Hz, 1 H, 4''-H), 5.14 (s, 1 H, 3-H), 5.11 (d, 14.5 Hz, 1 H, C-1-C^aH), 5.04 (dd, 4.4 Hz, 3.9 Hz, 1 H, 6-H), 5.00 (d, 14.5 Hz, 1 H, C-1-C^bH), 4.85 (d, 15.4 Hz, 1 H, C-4-C^aH), 4.19 (dd, 18.8 Hz, 4.4 Hz, 1 H, C-6-C^aH), 3.99 (dd, 18.8 Hz, 3.9 Hz, 1 H, C-6-C^bH), 3.73 (d, 15.4 Hz, 1 H, C-4-C^bH), 2.27 (s, 3 H, C-4'-CH₃).

¹³C NMR (DMSO, δ [ppm], J [Hz]): 196.9 (C-1''''-C=O), 165.2 (C-5), 164.0 (C-2), 149.0 (C-2'''), 148.5 (C-4'''), 144.8 (C-4'), 139.4 (C-3''), 138.3 (C-1''), 136.1 (C-1'''), 135.6 (C-6'''), 134.0 (C-1'), 133.4 (C-4'''), 131.1 (C-1'''), 130.3 (C-4''), 129.7 (2 C, C-3'/5'), 129.0 (C-5''), 128.8 (C-6''), 128.6 (2 C, C-2'/6' oder C-3''''/5''''), 128.3 (2 C, C-2'/6' oder C-3''''/5''''), 128.1 (2 C, C-2''''/6''''), 123.4 (C-5'''), 102.5 (C-2''), 66.0 (C-3), 63.9 (C-1-CH₂), 55.9 (C-6), 44.9 (C-4-CH₂), 40.8 (C-6-CH₂), 21.1 (C-4'-CH₃).

HRMS (ESI⁺-TOF): ber. für C₃₂H₂₉IN₃O₅S [M+H]⁺ 694.0867; gem. 694.0868.

(±) *trans*-35d

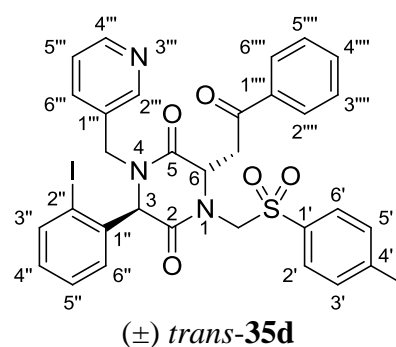
Farbloser amorpher Feststoff

C₃₂H₂₈IN₃O₅S 693.6 g/mol

Ausbeute: 210 mg (0.30 mmol, 15%).

Schmp: 101–104 °C.

NOESY: 6''-H ↔ 6-H (→ *trans*).



IR (ATM, $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹]): 2929, 1657, 1596, 1580, 1422, 1318, 1140, 1085, 1013, 815, 759, 688.

¹H NMR (DMSO, δ [ppm], J [Hz]): 8.41 (dd, 4.8 Hz, 1.7 Hz, 1 H, 4'''-H), 8.08 (d, 1.7 Hz, 1 H, 2'''-H), 8.02 (dd, 7.9 Hz, 1.3 Hz, 2 H, 2'''/6'''-H), 7.81 (dd, 7.7 Hz, 1.4 Hz, 1 H, 3''-H), 7.73–7.67 (m, 1 H, 4''''-H), 7.71 (d, 8.2 Hz, 2 H, 2'/6'-H), 7.58 (t, 7.9 Hz, 2 H, 3''''/5''''-H), 7.37–7.33 (m, 1 H, 6''-H), 7.35 (d, 8.2 Hz, 2 H, 3'/5'-H), 7.32 (td, 7.7 Hz, 1.1 Hz, 1 H, 4''-H),

7.25 (dd, 7.9 Hz, 4.8 Hz, 1 H, 5''-H), 7.07 (td, 7.7 Hz, 1.4 Hz, 1 H, 5''-H), 7.03 (dd, 7.7 Hz, 1.1 Hz, 1 H, 6''-H), 5.61 (s, 1 H, 3-H), 5.39 (d, 14.7 Hz, 1 H, C-1-C^aH), 4.96–4.93 (m, 1 H, 6-H), 4.95 (d, 14.7 Hz, 1 H, C-1-C^bH), 4.86 (d, 15.5 Hz, 1 H, C-4-C^aH), 4.35 (dd, 19.1 Hz, 4.1 Hz, 1 H, C-6-C^aH), 3.91 (dd, 19.1 Hz, 3.2 Hz, 1 H, C-6-C^bH), 3.67 (d, 15.5 Hz, 1 H, C-4-C^bH), 2.34 (s, 3 H, C-4'-CH₃).

¹³C NMR (DMSO, δ [ppm], *J* [Hz]): 197.7 (C-1''-CO), 165.9 (C-5), 164.6 (C-2), 149.1 (C-2'''), 148.4 (C-4'''), 144.7 (C-4'), 139.4 (C-3'''), 138.4 (C-1''), 135.8 (C-1'''), 135.6 (C-6'''), 134.8 (C-1'), 133.7 (C-4'''), 132.2 (C-5'''), 130.8 (C-1'''), 130.2 (C-4''), 129.8 (2 C, C-3'/5'), 129.4 (C-6''), 128.6 (2 C, C-3''''/5'''), 128.1 (5 C, C-2'/6', C-5'', C-2''''/6'''), 101.7 (C-2''), 66.4 (C-3), 62.5 (C-1-CH₂), 55.9 (C-6), 44.9 (C-4-CH₂), 38.8 (C-6-CH₂), 21.0 (C-4'-CH₃).

HRMS (ESI⁺-TOF): ber. für C₃₂H₂₉N₃O₅S [M+H]⁺ 694.0867; gem. 694.0864.

3-(4-Fluorphenyl)-6-(2-oxo-2-phenylethyl)-4-(pyridin-3-ylmethyl)-1-(tosylmethyl)piperazin-2,5-dion (35e)

Zu einer Lösung von 4-Fluorbenzaldehyd (200 µL, 2.0 mmol) in abs. MeOH (5 mL) wurde unter Argon-Atmosphäre 3-(Aminomethyl)pyridin (200 µL, 2.0 mmol) zugegeben und bei RT 40 min gerührt. Anschließend wurde Tosylmethylisocyanid (390 mg, 2.0 mmol) und 3-Benzoylacrylsäure (350 mg, 2.0 mmol) zugegeben und die Reaktionslösung bei RT gerührt. Der ausgefallene Feststoff wurde nach 21 h abfiltriert und im Ultraschallbad in MeOH suspendiert.

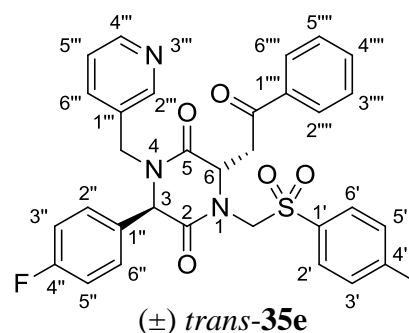
Farbloser Feststoff

C₃₂H₂₈FN₃O₅S 585.7 g/mol

Ausbeute: 494 mg (0.84 mmol, 42%).

Schmp: 174–175 °C.

NOESY: 2''/6''-H ↔ 6-H,
3-H ↔ C-6-C^{a/b}H (→ *trans*).



IR (ATM, $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹]): 2984, 1684, 1652, 1597, 1579, 1510, 1422, 1329, 1221, 1145, 1088, 812, 753, 687.

^1H NMR (DMSO, δ [ppm], J [Hz]): 8.41 (dd, 4.9 Hz, 1.8 Hz, 1 H, 4'''-H), 8.17 (d, 1.8 Hz, 1 H, 2'''-H), 7.98 (d, 7.7 Hz, 2 H, 2''''/6''''-H), 7.69 (tt, 7.7 Hz, 1.1 Hz, 1 H, 4''''-H), 7.65 (d, 8.2 Hz, 2 H, 2'/6'-H), 7.57 (t, 7.7 Hz, 2 H, 3''''/5''''-H), 7.41 (dt, 8.0 Hz, 1.8 Hz, 1 H, 6'''-H), 7.28 (d, 8.2 Hz, 2 H, 3'/5'-H), 7.25 (dd, 8.0 Hz, 4.9 Hz, 1 H, 5'''-H), 7.12 (d, 7.3 Hz, 4 H, 2''/6''-H, 3''/5''-H), 5.49 (d, 14.9 Hz, 1 H, C-1-C^aH), 5.24 (s, 1 H, 3-H), 4.93 (dd, 4.2 Hz, 3.5 Hz, 1 H, 6-H), 4.88 (d, 14.9 Hz, 1 H, C-1-C^bH), 4.82 (d, 15.3 Hz, 1 H, C-4-C^aH), 4.25 (dd, 18.9 Hz, 4.2 Hz, 1 H, C-6-C^aH), 3.89 (dd, 18.9 Hz, 3.5 Hz, 1 H, C-6-C^bH), 3.84 (d, 15.3 Hz, 1 H, C-4-C^bH), 2.34 (s, 3 H, C-4'-CH₃).

^{13}C NMR (DMSO, δ [ppm], J [Hz]): 197.4 (C-1'''-C=O), 165.6 (C-2 oder C-5), 165.3 (C-2 oder C-5), 161.9 (d, $^1J_{\text{CF}} = 244.9$ Hz, C-4''), 149.0 (C-2'''), 148.3 (C-4'''), 144.7 (C-4'), 135.9 (C-1''''), 135.5 (C-6'''), 134.5 (C-1'), 133.6 (C-4''''), 132.1 (d, $^4J_{\text{CF}} = 3.0$ Hz, C-1''), 131.4 (C-1'''), 130.2 (d, $^3J_{\text{CF}} = 8.6$ Hz, 2 C, C-2''/6''), 129.7 (2 C, C-3'/5'), 128.6 (2 C, C-3''''/5''''), 128.0 (4 C, C-2'/6', C-2''''/6''''), 123.1 (C-5'''), 115.2 (d, $^2J_{\text{CF}} = 21.9$ Hz, 2 C, C-3''/5''), 62.7 (C-3), 61.5 (C-1-CH₂), 55.4 (C-6), 45.2 (C-4-CH₂), 38.0 (C-6-CH₂), 20.9 (C-4'-CH₃).

CHNS: ber. C 65.63, H 4.82, N 7.18, S 5.48; gem. C 65.95, H 4.88, N 7.27, S 5.36.

MS (ESI⁺): $m/z = 586$ [M+H]⁺.

4-Benzyl-6-(2-oxo-2-phenylethyl)-3-phenyl-1-(tosylmethyl)piperazin-2,5-dion (**35f**)

Zu einer Lösung von Benzaldehyd (200 μL , 2.0 mmol) in abs. MeOH (5 mL) wurde unter Argon-Atmosphäre Benzylamin (220 μL , 2.0 mmol) zugegeben und bei RT 30 min gerührt. Anschließend wurde Tosylmethylisocyanid (390 mg, 2.0 mmol) und 3-Benzoylacrylsäure (350 mg, 2.0 mmol) zugegeben und die Reaktionslösung bei RT gerührt. Der ausgefallene Feststoff wurde nach 24 h abfiltriert und mehrmals mit kaltem MeOH gewaschen.

Farbloser Feststoff

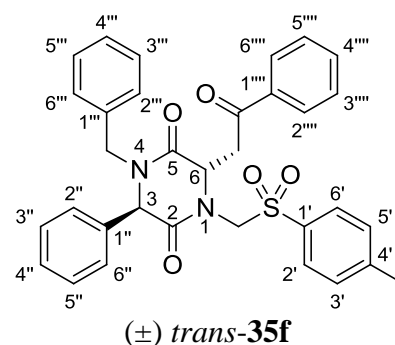
$\text{C}_{33}\text{H}_{30}\text{N}_2\text{O}_5\text{S}$ 566.7 g/mol

Ausbeute: 628 mg (1.11 mmol, 55%).

Schmp: 201–203 °C.

NOESY: 2''/6''-H \leftrightarrow 6-H,

3-H \leftrightarrow C-6-C^{a/b}H (\rightarrow *trans*).



IR (ATM, $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹]): 2929, 1662, 1598, 1421, 1318, 1143, 1087, 814, 749, 691.

¹H NMR (DMSO, δ [ppm], J [Hz]): 8.01 (dd, 7.4 Hz, 1.5 Hz, 2 H, 2'''/6'''-H), 7.69 (tt, 7.4 Hz, 1.5 Hz, 1 H, 4'''-H), 7.62 (d, 8.3 Hz, 2 H, 2'/6'-H), 7.58 (t, 7.4 Hz, 2 H, 3'''/5'''-H), 7.41–7.31 (m, 3 H, 3''/5''-H, 4''-H), 7.27–7.22 (m, 5 H, 3'/5'-H, 3'''/5'''-H, 4''-H), 7.05 (dd, 7.8 Hz, 1.4 Hz, 2 H, 2''/6''-H), 7.00 (dd, 6.6 Hz, 2.9 Hz, 2 H, 2'''/6'''-H), 5.48 (d, 14.9 Hz, 1 H, C-1-C^aH), 5.05 (d, 15.2 Hz, 1 H, C-4-C^aH), 5.04 (s, 1 H, 3-H), 4.92 (t, 3.7 Hz, 1 H, 6-H), 4.87 (d, 14.9 Hz, 1 H, C-1-C^bH), 4.20 (dd, 18.8 Hz, 3.7 Hz, 1 H, C-6-C^aH), 3.90 (dd, 18.8 Hz, 3.7 Hz, 1 H, C-6-C^bH), 3.57 (d, 15.2 Hz, 1 H, C-4-C^bH), 2.34 (s, 3 H, C-4'-CH₃).

¹³C NMR (DMSO, δ [ppm], J [Hz]): 197.2 (C-1'''-CO), 165.5 (C-2 oder C-5), 165.4 (C-2 oder C-5), 144.7 (C-4'), 136.0 (C-1''''), 135.5 (C-1''), 135.4 (C-1'''), 134.5 (C-1'), 133.6 (C-4''''), 129.7 (2 C, C-3'/5'), 128.6 (2 C, C-3'''/5'''), 128.5 (2 C, C-3'''/5'''), 128.3 (C-4''), 128.2 (2 C, C-3''/5''), 128.02 (2 C, C-2'''/6'''), 127.97 (2 C, C-2'/6'), 127.7 (4 C, C-2''/6'', C-2'''/6'''), 127.2 (C-4'''), 62.9 (C-3), 61.5 (C-1-CH₂), 55.4 (C-6), 46.9 (C-4-CH₂), 37.7 (C-6-CH₂), 21.0 (C-4'-CH₃).

CHNS: ber. C 69.94, H 5.34, N 4.94, S 5.66; gem. C 70.10, H 5.35, N 5.07, S 5.60.

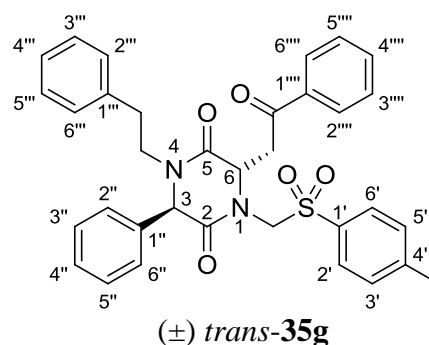
MS (ESI⁺): $m/z = 567$ [M+H]⁺.

6-(2-Oxo-2-phenylethyl)-4-phenethyl-3-phenyl-1-(tosylmethyl)piperazin-2,5-dion (35g)

Zu einer Lösung von Benzaldehyd (200 μ L, 2.0 mmol) in abs. MeOH (5 mL) wurde unter Argon-Atmosphäre 2-Phenethylamin (250 μ L, 2.0 mmol) zugegeben und bei RT 30 min gerührt. Anschließend wurde Tosylmethylisocyanid (390 mg, 2.0 mmol) und 3-Benzoylacrylsäure (350 mg, 2.0 mmol) zugegeben und die Reaktionslösung bei RT gerührt. Der ausgefallene Feststoff wurde nach 14 h abfiltriert, mit kaltem MeOH gewaschen und aus EtOAc umkristallisiert. Der Feststoff wurde anschließend in CH₂Cl₂ aufgenommen und mit ges. NaHCO₃-Lsg. extrahiert. Die organische Phase wurde über wasserfr. Na₂SO₄ getrocknet und danach eingedampft.

Farbloser Feststoff

$C_{34}H_{32}N_2O_5S$ 580.7 g/mol
 Ausbeute: 135 mg (0.23 mmol, 12%).
 Schmp: 198–201 °C.
 NOESY: 2''/6''-H \leftrightarrow 6-H,
 3-H \leftrightarrow C-6-C^{a/b}H (\rightarrow *trans*).



IR (ATM, $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹]): 2931, 1685, 1655, 1597, 1427, 1326, 1142, 1087, 813, 752, 689.

¹H NMR (DMSO, δ [ppm], *J* [Hz]): 8.02 (dd, 7.5 Hz, 1.3 Hz, 2 H, 2'''/6'''-H), 7.69 (tt, 7.5 Hz, 1.3 Hz, 1 H, 4'''-H), 7.65 (d, 8.2 Hz, 2 H, 2'/6'-H), 7.57 (t, 7.5 Hz, 2 H, 3'''/5'''-H), 7.39–7.34 (m, 3 H, 3''/5''-H, 4''-H), 7.31 (d, 8.2 Hz, 2 H, 3'/5'-H), 7.21 (t, 7.2 Hz, 2 H, 3''/5''-H), 7.17 (dd, 7.1 Hz, 2.2 Hz, 2 H, 2''/6''-H), 7.14 (tt, 7.2 Hz, 1.4 Hz, 1 H, 4''-H), 7.00 (dd, 7.2 Hz, 1.4 Hz, 2 H, 2'''/6'''-H), 5.49 (d, 14.8 Hz, 1 H, C-1-C^aH), 5.36 (s, 1 H, 3-H), 4.88 (d, 14.8 Hz, 1 H, C-1-C^bH), 4.84 (dd, 4.4 Hz, 3.6 Hz, 1 H, 6-H), 4.15 (dd, 18.7 Hz, 4.4 Hz, 1 H, C-6-C^aH), 3.83 (dd, 18.7 Hz, 3.6 Hz, 1 H, C-6-C^bH), 3.71 (ddd, 13.3 Hz, 10.7 Hz, 5.3 Hz, 1 H, C-4-C^aH), 2.80 (ddd, 12.7 Hz, 10.5 Hz, 5.3 Hz, 1H, C-1'''-C^aH), 2.65 (ddd, 13.3 Hz, 10.5 Hz, 5.6 Hz, 1 H, C-4-C^bH), 2.40 (ddd, 12.7 Hz, 10.7 Hz, 5.6 Hz, 1 H, C-1'''-C^bH), 2.36 (s, 3 H, C-4'-CH₃).

¹³C NMR (DMSO, δ [ppm], *J* [Hz]): 197.1 (C-1'''-CO), 165.8 (C-2), 164.9 (C-5), 144.7 (C-4'), 138.5 (C-1'''), 136.6 (C-1''), 135.9 (C-1'''), 134.6 (C-1'), 133.6 (C-4'''), 129.8 (2 C, C-3'/5'), 128.6 (2 C, C-3'''/5'''), 128.5 (2 C, C-2'''/6'''), 128.33 (2 C, C-3''/5''), 128.28 (2 C, C-3''/5''), 128.2 (C-4''), 128.1 (2 C, C-2'''/6'''), 128.0 (4 C, C-2'/6', C-2''/6''), 126.1 (C-4'''), 63.2 (C-3), 61.8 (C-1-CH₂), 55.4 (C-6), 46.1 (C-4-CH₂), 38.1 (C-6-CH₂), 31.6 (C-1'''-CH₂), 21.0 (C-4'-CH₃).

CHNS: ber. C 70.32, H 5.55, N 4.82, S 5.52; gem. C 70.44, H 5.68, N 4.93, S 5.52.

4-(4-Methoxybenzyl)-6-(2-oxo-2-phenylethyl)-3-phenyl-1-(tosylmethyl)piperazin-2,5-dion (**35h**)

Zu einer Lösung von Benzaldehyd (200 μ L, 2.0 mmol) in abs. MeOH (5 mL) wurde unter Argon-Atmosphäre 4-Methoxybenzylamin (260 μ L, 2.0 mmol) zugegeben und bei RT 40 min gerührt. Anschließend wurde Tosylmethylisocyanid (390 mg, 2.0 mmol) und

3-Benzoylacrylsäure (350 mg, 2.0 mmol) zugegeben und die Reaktionslösung bei RT gerührt. Der ausgefallene Feststoff wurde nach 20 h abfiltriert und mehrmals mit kaltem MeOH gewaschen.

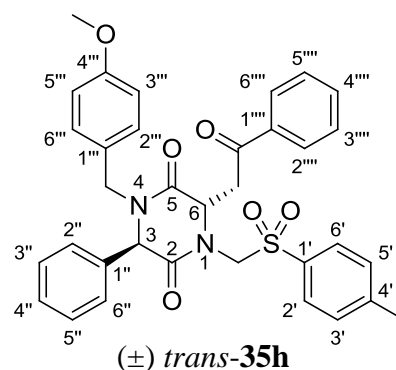
Farbloser Feststoff

$C_{34}H_{32}N_2O_6S$ 596.7 g/mol

Ausbeute: 460 mg (0.77 mmol, 39%).

Schmp: 241–243 °C.

NOESY: 2''/6''-H \leftrightarrow 6-H,
3-H \leftrightarrow C-6-C^{a/b}H (\rightarrow *trans*).



IR (ATM, $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}]): 2930, 1659, 1611, 1598, 1611, 1598, 1510, 1432, 1318, 1247, 1178, 1144, 1088, 824, 754, 690.

1H NMR (DMSO, δ [ppm], J [Hz]): 8.00 (dd, 7.6 Hz, 1.2 Hz, 2 H, 2'''/6'''-H), 7.69 (tt, 7.6 Hz, 1.2 Hz, 1 H, 4'''-H), 7.60 (d, 8.1 Hz, 2 H, 2'/6'-H), 7.58 (t, 7.6 Hz, 2 H, 3'''/5'''-H), 7.42–7.33 (m, 3 H, 3'/5'-H, 4''-H), 7.24 (d, 8.1 Hz, 2 H, 3'/5'-H), 7.05 (dd, 7.7 Hz, 1.6 Hz, 2 H, 2''/6''-H), 6.92 (d, 8.7 Hz, 2 H, 2'''/6'''-H), 6.80 (d, 8.7 Hz, 2 H, 3'''/5'''-H), 5.47 (d, 14.9 Hz, 1 H, C-1-C^aH), 5.04 (d, 14.9 Hz, 1 H, C-4-C^aH), 4.98 (s, 1 H, 3-H), 4.90 (dd, 4.5 Hz, 3.7 Hz, 1 H, 6-H), 4.86 (d, 14.9 Hz, 1 H, C-1-C^bH), 4.18 (dd, 18.7 Hz, 4.5 Hz, 1 H, C-6-C^aH), 3.88 (dd, 18.7 Hz, 3.7 Hz, 1 H, C-6-C^bH), 3.72 (s, 3 H, C-4'-OCH₃), 3.44 (d, 14.9 Hz, 1 H, C-4-C^bH), 2.33 (s, 3 H, C-4'-CH₃).

^{13}C NMR (DMSO, δ [ppm], J [Hz]): 197.1 (C-1'''-C=O), 165.6 (C-2 oder C-5), 165.3 (C-2 oder C-5), 158.5 (C-4'''), 144.6 (C-4'), 136.0 (C-1'''), 135.6 (C-1''), 134.5 (C-1'), 133.5 (C-4'''), 129.7 (2 C, C-3'/5'), 129.3 (2 C, C-2'''/6'''), 128.6 (2 C, C-3'''/5'''), 128.5 (2 C, C-3'/5''), 128.2 (C-4''), 128.02 (2 C, C-2'''/6'''), 127.96 (2 C, C-2'/6'), 127.7 (2 C, C-2''/6''), 127.1 (C-1'''), 113.6 (2 C, C-3'''/5'''), 62.6 (C-3), 61.5 (C-1-CH₂), 55.4 (C-6), 54.9 (C-4''-OCH₃), 46.2 (C-4-CH₂), 37.6 (C-6-CH₂), 21.0 (C-4'-CH₃).

CHNS: ber. C 68.44, H 5.41, N 4.69, S 5.37; gem. C 68.47, H 5.43, N 4.86, S 5.40.

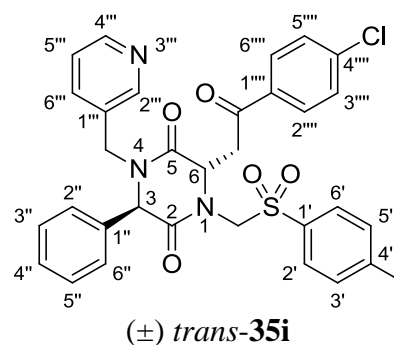
MS (ESI⁺): $m/z = 596$ [M]⁺.

6-[2-(4-Chlorphenyl)-2-oxoethyl]-3-phenyl-4-(pyridin-3-ylmethyl)-1-(tosylmethyl)piperazin-2,5-dion (**35i**)

Zu einer Lösung von Benzaldehyd (200 μ L, 2.0 mmol) in abs. MeOH (5 mL) wurde unter Argon-Atmosphäre 3-(Aminomethyl)pyridin (200 μ L, 2.0 mmol) zugegeben und bei RT 20 min gerührt. Anschließend wurde Tosylmethylisocyanid (390 mg, 2.0 mmol) und 3-(4-Chlorbenzoyl)acrylsäure (420 mg, 2.0 mmol) zugegeben und die Reaktionslösung bei RT gerührt. Der ausgefallene Feststoff wurde nach 3 Tagen abfiltriert, in EtOAc aufgenommen und durch Zugabe von *n*-Hexan zur Kristallisation gebracht.

Farbloser Feststoff

$C_{32}H_{28}ClN_3O_5S$ 602.1 g/mol
 Ausbeute: 449 mg (0.75 mmol, 37%).
 Schmp: 233–234 °C.
 NOESY: 2''/6''-H \leftrightarrow 6-H (\rightarrow *trans*).



IR (ATM, $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}]): 2940, 1686, 1651, 1591, 1576, 1435, 1325, 1142, 815, 754, 699.

1H NMR (DMSO, δ [ppm], J [Hz]): 8.46 (dd, 4.7 Hz, 1.8 Hz, 1 H, 4'''-H), 8.17 (d, 1.8 Hz, 1 H, 2'''-H), 7.99 (ddd, 8.6 Hz, 2.4 Hz, 1.8 Hz, 2 H, 2'''/6'''-H), 7.64 (ddd, 8.8 Hz, 2.4 Hz, 1.8 Hz, 2 H, 3'''/5'''-H), 7.62 (d, 8.5 Hz, 2 H, 2'/6'-H), 7.41 (dt, 7.9 Hz, 1.8 Hz, 1 H, 6'''-H), 7.37–7.29 (m, 3 H, 3'''/5'''-H, 4''-H), 7.26 (d, 8.5 Hz, 2 H, 3'/5'-H), 7.26–7.23 (m, 1 H, 5'''-H), 7.07 (dd, 7.8 Hz, 1.1 Hz, 2 H, 2''/6''-H), 5.46 (d, 14.9 Hz, 1 H, C-1-C^aH), 5.18 (s, 1 H, 3-H), 4.93 (dd, 4.4 Hz, 3.6 Hz, 1 H, 6-H), 4.88 (d, 14.9 Hz, 1 H, C-1-C^bH), 4.86 (d, 15.3 Hz, 1 H, C-4-C^aH), 4.21 (dd, 18.9 Hz, 4.4 Hz, 1 H, C-6-C^aH), 3.88 (dd, 18.9 Hz, 3.6 Hz, 1 H, C-6-C^bH), 3.79 (d, 15.3 Hz, 1 H, C-4-C^bH), 2.34 (s, 3 H, C-4'-CH₃).

^{13}C NMR (DMSO, δ [ppm], J [Hz]): 196.4 (C-1'''-C=O), 165.6 (C-2 oder C-5), 165.4 (C-2 oder C-5), 149.0 (C-2'''), 148.3 (C-4'''), 144.7 (C-4'), 128.7 (2 C, C-3'''/5'''), 138.5 (C-4'''), 135.6 (C-1''), 135.4 (C-6'''), 134.6 (C-1'''), 134.5 (C-1'), 131.4 (C-1'''), 129.9 (2 C, C-2'''/6'''), 129.7 (2 C, C-3'/5'), 128.5 (2 C, C-3'''/5'''), 128.3 (C-4''), 127.98 (2 C, C-2'/6' oder C-2''/6''), 127.92 (2 C, C-2'/6' oder C-2''/6''), 123.2 (C-5'''), 63.4 (C-3), 61.7 (C-1-CH₂), 55.4 (C-6), 45.3 (C-4-CH₂), 38.0 (C-6-CH₂), 21.0 (C-4'-CH₃).

MS (ESI⁺): m/z = 602 [M+H]⁺.

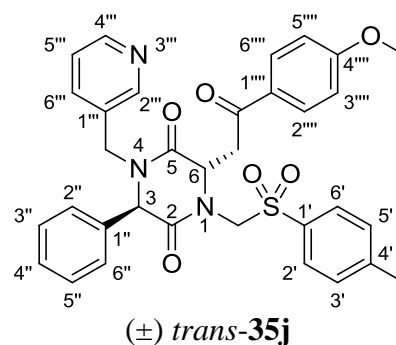
HRMS (ESI⁺-TOF): ber. für C₃₂H₂₉ClN₃O₅S [M+H]⁺ 602.1511; gem. 602.1515.

6-[2-(4-Methoxyphenyl)-2-oxoethyl]-3-phenyl-4-(pyridin-3-ylmethyl)-1-(tosylmethyl)-piperazin-2,5-dion (**35j**)

Zu einer Lösung von Benzaldehyd (200 µL, 2.0 mmol) in abs. MeOH (5 mL) wurde unter Argon-Atmosphäre 3-(Aminomethyl)pyridin (200 µL, 2.0 mmol) zugegeben und bei RT 40 min gerührt. Anschließend wurde Tosylmethylisocyanid (390 mg, 2.0 mmol) und 3-(4-Methoxybenzoyl)acrylsäure (410 mg, 2.0 mmol) zugegeben und die Reaktionslösung bei RT gerührt. Der ausgefallene Feststoff wurde nach 3 Tagen abfiltriert und durch Suspendieren in frischem MeOH gereinigt.

Farbloser Feststoff

C₃₃H₃₁N₃O₆S 597.7 g/mol
 Ausbeute: 434 mg (0.73 mmol, 36%).
 Schmp: 250–252 °C.
 NOESY: 2''/6''-H ↔ 6-H (→ *trans*).



IR (ATM, $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹]): 2938, 1650, 1601, 1576, 1510, 1437, 1327, 1261, 1171, 1142, 1089, 825, 754, 699.

¹H NMR (DMSO, δ [ppm], *J* [Hz]): 8.41 (dd, 4.8 Hz, 1.8 Hz, 1 H, 4'''-H), 8.15 (d, 1.8 Hz, 1 H, 2'''-H), 7.97 (d, 9.0 Hz, 2 H, 2''''/6''''-H), 7.64 (d, 8.2 Hz, 2 H, 2'/6'-H), 7.39 (dt, 7.9 Hz, 1.8 Hz, 1 H, 6'''-H), 7.36-7.30 (m, 3 H, 3''/5''-H, 4''-H), 7.24 (dd, 7.9 Hz, 4.8 Hz, 1 H, 5'''-H), 7.28 (d, 8.2 Hz, 2 H, 3'/5'-H), 7.08 (d, 9.0 Hz, 2 H, 3''''/5''''-H), 7.06 (dd, 8.3 Hz, 1.4 Hz, 2 H, 2''/6''-H), 5.48 (d, 14.8 Hz, 1 H, C-1-C^aH), 5.17 (s, 1 H, 3-H), 4.89 (dd, 4.3 Hz, 3.2 Hz, 1 H, 6-H), 4.85 (d, 15.4 Hz, 1 H, C-4-C^aH), 4.84 (d, 14.8 Hz, 1 H, C-1-C^bH), 4.18 (18.7 Hz, 4.3 Hz, 1 H, C-6-C^aH), 3.87 (s, 3 H, C-4'''-OCH₃), 3.81 (18.7 Hz, 3.2 Hz, 1 H, C-6-C^bH), 3.78 (d, 15.4 Hz, 1 H, C-4-C^bH), 2.34 (s, 3 H, C-4'-CH₃).

¹³C NMR (DMSO, δ [ppm], *J* [Hz]): 195.6 (C-1'''-CO), 165.8 (C-2 oder C-5), 165.6 (C-2 oder C-5), 163.5 (C-4''''), 149.0 (C-2'''), 148.3 (C-4'''), 144.7 (C-4'), 136.0 (C-1''), 135.4 (C-6'''), 134.6 (C-1'), 131.4 (C-1'''), 130.4 (2 C, C-2''''/6''''), 129.8 (2 C, C-3'/5'), 128.9 (C-1''''), 128.4 (2 C, C-3''/5''), 128.3 (C-4''), 128.04 (2 C, C-2'/6' oder C-2''/6''), 128.00 (2 C, C-2'/6')

oder C-2''/6''), 123.1 (C-5'''), 113.8 (2 C, C-3''''/5''''), 63.4 (C-3), 61.6 (C-1-CH₂), 55.52 (C-6 oder C-4''''-OCH₃), 55.50 (C-6 oder C-4''''-OCH₃), 45.2 (C-4-CH₂), 37.5 (C-6-CH₂), 21.0 (C-4'-CH₃).

MS (ESI⁺): $m/z = 598$ [M+H]⁺.

HRMS (ESI⁺-TOF): ber. für C₃₃H₃₂N₃O₆S [M+H]⁺ 598.2006; gem. 598.2006.

9.3 Synthese der HSP70-Inhibitoren

9.3.1 Synthese von Arylaldimin-Derivaten

Allgemeine Synthesevorschrift für die Herstellung von Arylaldimin

Methode A: Zu einer Lösung eines Anilin-Derivats (1 Äq.) in abs. EtOH wurde bei RT der entsprechende Benzaldehyd (1 Äq.) zugegeben und die Lösung anschließend 3 h gerührt. Das Lösungsmittel wurde entfernt und das Rohprodukt gegebenenfalls durch Umkristallisation gereinigt.

Methode B^[107, 151]: Das Anilin-Derivat (1 Äq.) wurde in einem Lösungsmittelgemisch aus L-Ethyllactat und Wasser (Mischungsverhältnis ist beim jeweiligen Imin angegeben) gelöst und anschließend der entsprechende Benzaldehyd (1 Äq.) unter Rühren zugegeben. Nachdem sich eine homogene Lösung gebildet hatte, wurde das Rühren nach 3–5 min beendet. Das kristallisierende Produkt wurde nach 3 h abfiltriert, mit kaltem Wasser gewaschen und im Vakuum getrocknet.

4-Methoxy-N-(4-methoxybenzyliden)anilin (38a)

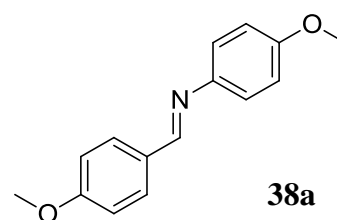
Methode B: *p*-Anisaldehyd (9.1 mL, 75.0 mmol) wurde mit *p*-Anisidin (9.2 g, 75.0 mmol) in L-Ethyllactat/H₂O (100 mL, 9:1) umgesetzt.

Graue Kristalle

C₁₅H₁₅NO₂ 241.3 g/mol

Ausbeute: 18.0 g (74.6 mmol, 99%); Lit.^[107] 93%.

Schmp: 150–153 °C; Lit.^[107] 144 °C.



Die gemessenen physikalischen und spektroskopischen Daten stimmen mit den Angaben in der Literatur überein.^[107]

N-Benzyliden-4-methoxyanilin (**38b**)

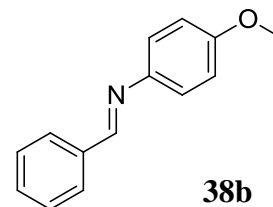
Methode A: Benzaldehyd (10.1 mL, 0.10 mmol) wurde mit *p*-Anisidin (12.3 g, 0.10 mmol) in Ethanol (140 mL) umgesetzt. Nach Entfernen des Lösungsmittels war keine weitere Aufreinigung notwendig.

Graue Kristalle

C₁₄H₁₃NO 211.3 g/mol

Ausbeute: 19.5 g (92.4 mmol, 92%); Lit.^[152] 90%.

Schmp: 72–73 °C; Lit.^[152] 70–71 °C.



Die gemessenen physikalischen und spektroskopischen Daten stimmen mit den Angaben in der Literatur überein.^[152]

N-(4-Methoxybenzyliden)anilin (**38c**)

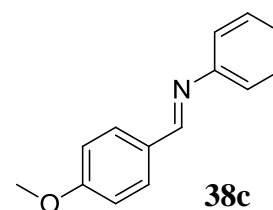
Methode A: *p*-Anisaldehyd (12.2 mL, 0.10 mol) wurde mit Anilin (9.1 mL, 0.10 mmol) in Ethanol (130 mL) umgesetzt. Nach Entfernen des Lösungsmittels war keine weitere Aufreinigung notwendig.

Hellgelbe Kristalle

C₁₄H₁₃NO 211.3 g/mol

Ausbeute: 20.5 g (97.2 mmol, 97%); Lit.^[152] 79%.

Schmp: 62–64 °C (EtOH); Lit.^[152] 55–56 °C.



Die gemessenen physikalischen und spektroskopischen Daten stimmen mit den Angaben in der Literatur überein.^[152]

N-Benzylidenanilin (**38d**)

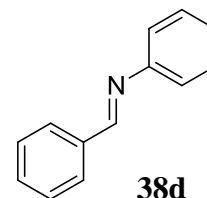
Methode A: Benzaldehyd (10.1 mL, 0.10 mol) wurde mit Anilin (9.1 mL, 0.10 mol) in Ethanol (200 mL) umgesetzt. Das Rohprodukt wurde aus *n*-Hexan/EtOH umkristallisiert.

Hellgelbe Kristalle

C₁₃H₁₁N 181.2 g/mol

Ausbeute: 15.0 g (82.9 mmol, 83%); Lit.^[106] 83%.

Schmp: 56–58 °C (*n*-Hexan/EtOH); Lit.^[106] 51–52 °C.



Die gemessenen physikalischen und spektroskopischen Daten stimmen mit den Angaben in der Literatur überein.^[106]

4-Fluor-*N*-(4-fluorbenzyliden)anilin (**38e**)

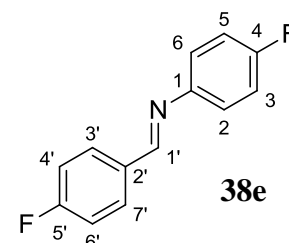
Methode B: *p*-Fluoranilin (1.9 mL, 19.3 mmol) wurde mit *p*-Fluorbenzaldehyd (2.0 mL, 19.3 mmol) in L-Ethyllactat/H₂O (10 mL, 8:2) umgesetzt.

Farblose Kristalle

C₁₃H₉F₂N 217.2 g/mol

Ausbeute: 3.94 g (18.1 mmol, 94%); Lit.^[151] 95%.

Schmp: 71–73 °C; Lit.^[151] 64–65 °C.



IR (ATM, $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹]): 1626, 1602, 1508, 1240, 831.

¹H NMR (DMSO, δ [ppm], *J* [Hz]): 8.63 (br. s, 1 H, 1'-H), 8.00 (dd, 8.5 Hz, ⁴J_{HF} = 5.8 Hz, 2 H, 2/6-H), 7.40–7.30 (m, 4 H, 3/5-H, 3'/7'-H), 7.29–7.20 (m, 2 H, 4'/6'-H).

¹³C NMR (DMSO, δ [ppm], *J* [Hz]): 163.9 (d, ¹J_{CF} = 249.5 Hz, C-4), 160.4 (d, ¹J_{CF} = 242.3 Hz, C-5'), 159.3 (d, ⁵J_{CF} = 1.0 Hz, C-1'), 147.5 (d, ⁴J_{CF} = 2.8 Hz, C-2'), 132.5 (d, ⁴J_{CF} = 2.9 Hz, C-1), 130.9 (d, ³J_{CF} = 9.0 Hz, 2 C, C-3'/7'), 122.7 (d, ³J_{CF} = 8.4 Hz, 2 C, C-2/6), 115.9 (d, ²J_{CF} = 22.0 Hz, 2 C, C-3/5 oder C-4'/6'), 115.7 (d, ²J_{CF} = 22.4 Hz, 2 C, C-3/5 oder C-4'/6').

4-Chlor-N-(4-chlorbenzyliden)anilin (38f)

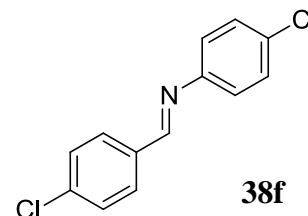
Methode B: *p*-Chloranilin (2.0 g, 15.7 mmol) wurde mit *p*-Chlorbenzaldehyd (2.2 g, 15.7 mmol) in L-Ethyllactat/H₂O (10 mL, 8:2) umgesetzt.

Farblose Kristalle

C₁₃H₉Cl₂N 250.1 g/mol

Ausbeute: 3.32 g (13.3 mmol, 85%); Lit.^[107] 97%.

Schmp: 118–119 °C; Lit.^[107] 110–111 °C.



Die gemessenen physikalischen und spektroskopischen Daten stimmen mit den Angaben in der Literatur überein.^[107]

N-(3,5-Dimethylbenzyliden)-3,5-dimethylanilin (38g)

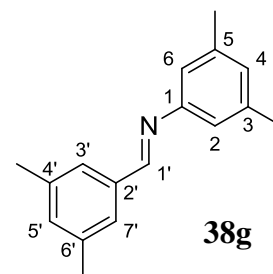
Methode B: 3,5-Dimethylanilin (1.9 mL, 15.0 mmol) wurde mit 3,5-Dimethylbenzaldehyd (2.0 mL, 15.0 mmol) in L-Ethyllactat/H₂O (10 mL, 8:2) umgesetzt.

Hellgelber Feststoff

C₁₇H₁₉N 237.3 g/mol

Ausbeute: 3.46 g (14.6 mmol, 97%).

Schmp: 94–96 °C.



IR (ATM, $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹]): 2914, 2867, 1627, 1600, 1579, 846, 694.

¹H NMR (DMSO, δ [ppm], *J* [Hz]): 8.49 (s, 1 H, 1'-H), 7.52 (s, 2 H, 3'/7'-H), 7.16 (s, 1 H, 5'-H), 6.87 (s, 1 H, 4-H), 6.84 (s, 2 H, 2/6-H), 2.34 (s, 6 H, C-4'/6'-CH₃), 2.29 (s, 6 H, C-3/5-CH₃).

¹³C NMR (DMSO, δ [ppm], *J* [Hz]): 160.1 (C-1'), 151.5 (C-1), 138.1 (2 C, C-3/5), 137.8 (2 C, C-4'/6'), 136.0 (C-2'), 132.7 (C-5'), 127.2 (C-4), 126.2 (2 C, C-3'/7'), 118.5 (2 C, C-2/6), 20.8 (2 C, C-3/5-CH₃), 20.7 (2 C, C-4'/6'-CH₃).

N-(4-Methoxybenzyliden)-4-phenoxyanilin (**38h**)

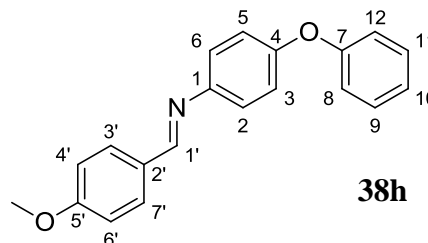
Methode B: *p*-Phenoxyanilin (2.1 g, 11.6 mmol) wurde mit *p*-Anisaldehyd (1.4 mL, 11.6 mmol) in L-Ethyllactat/H₂O (15 mL, 8:2) umgesetzt.

Graue Kristalle

C₂₀H₁₇NO₂ 303.4 g/mol

Ausbeute: 3.43 g (11.3 mmol, 98%); Lit.^[151] 96%.

Schmp: 121–123 °C; Lit.^[151] 114–116 °C.



IR (ATM, $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹]): 2839, 1621, 1604, 1586, 1488, 1457, 1249, 1159, 1029, 850, 764, 692.

¹H NMR (DMSO, δ [ppm], *J* [Hz]): 8.46 (s, 1 H, 1'-H), 7.88 (d, 8.8 Hz, 2 H, 3'/7'-H), 7.43–7.37 (m, 2 H, 9/11-H), 7.29 (d, 8.7 Hz, 2 H, 2/6-H), 7.14 (t, 7.4 Hz, 1 H, 10-H), 7.09–7.00 (m, 6 H, 3/5-H, 8/12-H, 4'/6'-H), 3.84 (s, 3 H, C-5'-OCH₃).

¹³C NMR (DMSO, δ [ppm], *J* [Hz]): 161.7 (C-5'), 159.1 (C-1'), 156.9 (C-7), 154.4 (C-4), 147.1 (C-1), 130.2 (2 C, C-3'/7'), 129.9 (2 C, C-9/11), 128.9 (C-2'), 123.2 (C-10), 122.4 (2 C, C-2/6), 119.3 (2 C, C-3/5), 118.2 (2 C, C-8/12), 114.1 (2 C, C-4'/6'), 55.3 (C-5'-OCH₃).

9.3.2 Synthese von Tetrahydroisochinolin-4-carbonsäure-Derivaten

Allgemeine Synthesevorschrift für die Herstellung von *cis*-Isochinolincarbonsäuren

Das entsprechende Imin-Derivat (1 Äq) wurde in abs. CHCl₃ unter Argon-Atmosphäre vorgelegt, Homophthalsäureanhydrid (1 Äq) zugegeben und die Lösung anschließend bei Raumtemperatur 2 h gerührt. Der ausgefallene Feststoff wurde abfiltriert und das Rohprodukt durch Umkristallisation gereinigt.

Allgemeine Synthesevorschrift für die Herstellung von *trans*-Isochinolincarbonsäuren

Homophthalsäureanhydrid (1 Äq) wurde unter Argon-Atmosphäre in abs. CH₂Cl₂ vorgelegt, auf 0 °C gekühlt und TiCl₄ (1 Äq) unter Rühren zugegeben. Nach 5 min wurde *N,N*-Diisopropylethylamin (1 Äq) zugegeben und weitere 30 min gerührt. Anschließend wurde das in CH₂Cl₂ gelöste entsprechende Imin (1.5 Äq) bei 0 °C langsam zugetropft. Während des

Rührens (3 h) konnte sich die Reaktionslösung auf Raumtemperatur erwärmen. Das Lösungsmittel wurde entfernt und das Produkt säulenchromatographisch isoliert.

Der angegeben Diastereomerenüberschuss (*engl.* diastereomeric excess; d.e.) wurde aus ^1H -NMR Spektren der jeweiligen Rohprodukte ermittelt. Dazu wurden die Protonen in 3- und 4-Position des Tetrahydroisochinolingerüsts von *cis*-Produkt ($^3J = 5\text{--}6\text{ Hz}$) und *trans*-Produkt ($^3J = 0\text{--}2\text{ Hz}$) integriert und der d.e.-Wert wie folgt berechnet:

$$d.e._{cis} = \frac{|(\int 3\text{-H}_{cis} + \int 4\text{-H}_{cis}) - (\int 3\text{-H}_{trans} + \int 4\text{-H}_{trans})|}{(\int 3\text{-H}_{cis} + \int 4\text{-H}_{cis}) + (\int 3\text{-H}_{trans} + \int 4\text{-H}_{trans})} \cdot 100\%$$

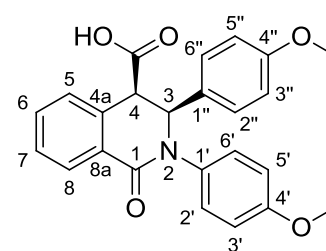
$$d.e._{trans} = \frac{|(\int 3\text{-H}_{trans} + \int 4\text{-H}_{trans}) - (\int 3\text{-H}_{cis} + \int 4\text{-H}_{cis})|}{(\int 3\text{-H}_{trans} + \int 4\text{-H}_{trans}) + (\int 3\text{-H}_{cis} + \int 4\text{-H}_{cis})} \cdot 100\%$$

(*cis*)-2,3-Bis(4-methoxyphenyl)-1-oxo-1,2,3,4-tetrahydroisochinolin-4-carbonsäure (*cis*-**36a**)

Homophthalsäureanhydrid (4.9 g, 30.0 mmol) wurde mit **38a** (7.2 g, 30.0 mmol) in CHCl_3 (40 mL) umgesetzt. Das Rohprodukt wurde durch Umkristallisation aus EtOH gereinigt.

Farbloser Feststoff

$\text{C}_{24}\text{H}_{21}\text{NO}_5$ 403.4 g/mol
 D.e.: 87% (siehe oben).
 Ausbeute: 5.30 g (13.1 mmol, 44%).
 Schmp: 232–233 °C (EtOH).
 Reinheit: 99% (HPLC-Methode I, $\lambda = 254\text{ nm}$,
 $t_{\text{R}} = 16.0\text{ min}$).



(±) *cis*-**36a**

IR (ATM, $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}]): 3015, 1726, 1630, 1610, 1588, 1578, 1508, 1227, 1172, 1028, 819, 722.

^1H NMR (DMSO, δ [ppm], J [Hz]): 12.94 (s, 1 H, COOH), 8.06 (dd, 7.6 Hz, 1.1 Hz, 1 H, 8-H), 7.62 (d, 7.6 Hz, 1 H, 5-H), 7.57 (dt, 7.6 Hz, 1.1 Hz, 1 H, 6-H), 7.48 (t, 7.6 Hz, 1 H,

7-H), 7.08 (ddd, 8.9 Hz, 3.2 Hz, 1.9 Hz, 2 H, 2'/6'-H), 6.91 (6.91, d, 8.7 Hz, 2 H, 2''/6''-H), 6.86 (ddd, 8.9 Hz, 3.2 Hz, 1.9 Hz, 2 H, 3'/5'-H), 6.72 (d, 8.7 Hz, 2 H, 3''/5''-H), 4.93 (d, 5.8 Hz, 1 H, 4-H), 5.34 (d, 5.8 Hz, 1 H, 3-H), 3.71 (s, 3 H, C-4'-CH₃), 3.65 (s, 3 H, C-4''-CH₃).

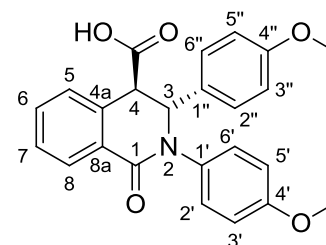
¹³C NMR (DMSO, δ [ppm], J [Hz]): 170.3 (COOH), 162.7 (C-1), 158.7 (C-4''), 157.5 (C-4'), 134.4 (C-1'), 134.1 (C-4a), 132.0 (C-6), 129.1 (C-8a), 129.0 (C-1''), 128.9 (2 C, C-2''/6''), 128.4 (2 C, C-2'/6'), 127.7 (C-5), 127.6 (C-8), 127.4 (C-7), 113.7 (2 C, C-3'/5'), 113.4 (2 C, C-3''/5''), 64.2 (C-3), 55.1 (C-4'-CH₃), 54.8 (C-4''-CH₃), 48.8 (C-4).

(trans)-2,3-Bis(4-methoxyphenyl)-1-oxo-1,2,3,4-tetrahydroisochinolin-4-carbonsäure
(*trans*-**36a**)

Homophthalsäureanhydrid (3.1 g, 18.8 mmol) wurde mit *N,N*-Diisopropylethylamin (3.2 mL, 18.8 mmol), TiCl₄ (2.1 mL, 18.8 mmol) und **38a** (6.8 g, 28.2 mmol) in CH₂Cl₂ (40 mL) umgesetzt. Die Reaktionslösung wurde 15 h bei RT gerührt und anschließend das Lösungsmittel entfernt. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch gereinigt (Kieselgel, CHCl₃/EtOH/HCO₂H 10:0.3:0.1, R_f = 0.32).

Farbloser Feststoff

C₂₄H₂₁NO₅ 403.4 g/mol
D.e.: 87% (siehe S. 166).
Ausbeute: 3.53 g (8.8 mmol, 47%).
Schmp: 201–203 °C.
Reinheit: > 99% (HPLC-Methode I, λ = 254 nm,
t_R = 17.6 min).



(±) *trans*-**36a**

IR (ATM, $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹]): 2938, 2844, 1720, 1622, 1599, 1569, 1509, 1248, 1171, 1026, 824, 721.

¹H NMR (DMSO, δ [ppm], J [Hz]): 13.11 (br. s, 1 H, COOH), 7.99 (dd, 7.5 Hz, 1.5 Hz, 1 H, 8-H), 7.48 (dt, 7.5 Hz, 1.5 Hz, 1 H, 6-H), 7.43 (dt, 7.5 Hz, 1.1 Hz, 1 H, 7-H), 7.29 (dd, 7.5 Hz, 1.1 Hz, 1 H, 5-H), 7.23 (ddd, 8.9 Hz, 3.3 Hz, 2.1 Hz, 2 H, 2'/6'-H), 7.08 (ddd, 8.7 Hz, 3.0 Hz, 1.8 Hz, 2 H, 2''/6''-H), 6.93 (ddd, 8.9 Hz, 3.3 Hz, 2.1 Hz, 2 H, 3'/5'-H), 6.79 (ddd, 8.7 Hz, 3.0 Hz, 1.8 Hz, 2 H, 3''/5''-H), 5.56 (br. s, 1 H, 3-H), 4.16 (d, 1.4 Hz, 1 H, 4-H), 3.73 (s, 3 H, C-4'-CH₃), 3.65 (s, 3 H, C-4''-CH₃).

^{13}C NMR (DMSO, δ [ppm], J [Hz]): 172.0 (COOH), 162.5 (C-1), 157.5 (C-4'), 158.4 (C-4''), 135.0 (C-1'), 133.8 (C-4a), 132.1 (C-6), 130.9 (C-1''), 129.6 (C-5), 129.1 (C-8a), 127.9 (C-7), 127.5 (2 C, C-2'/6'), 127.3 (2 C, C-2''/6''), 127.2 (C-8), 113.9 (2 C, C-3'/5'), 113.8 (2 C, C-3''/5''), 64.0 (C-3), 55.2 (C-4'- $\underline{\text{C}}\text{H}_3$), 54.9 (C-4''- $\underline{\text{C}}\text{H}_3$), 51.1 (C-4).

cis-2-(4-Methoxyphenyl)-1-oxo-3-phenyl-1,2,3,4-tetrahydroisochinolin-4-carbonsäure
(*cis*-**36b**)

Homophthalsäureanhydrid (6.5 g, 40.0 mmol) wurde mit **38b** (12.7 g, 60.0 mmol) in CHCl_3 (40 mL) umgesetzt. Das Rohprodukt wurde durch Umkristallisation aus EtOAc gereinigt.

Farbloser Feststoff

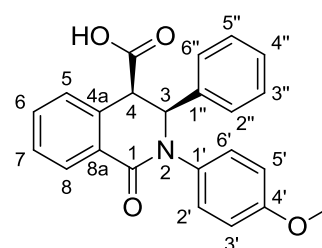
$\text{C}_{23}\text{H}_{19}\text{NO}_4$ 373.4 g/mol

D.e.: 85% (siehe S. 166).

Ausbeute: 7.11 g (19.0 mmol, 48%); Lit.^[111] 91%.

Schmp: 208–209 °C (EtOAc); Lit.^[111] 180–181 °C.

Reinheit: 96% (HPLC-Methode I, $\lambda = 254$ nm, $t_{\text{R}} = 15.8$ min).



(±) *cis*-**36b**

Die gemessenen physikalischen und spektroskopischen Daten stimmen mit den Angaben in der Literatur überein.^[111]

trans-2-(4-Methoxyphenyl)-1-oxo-3-phenyl-1,2,3,4-tetrahydroisochinolin-4-carbonsäure
(*trans*-**36b**)

Homophthalsäureanhydrid (5.0 g, 30.8 mmol) wurde mit *N,N*-Diisopropylethylamin (5.3 mL, 30.8 mmol), TiCl_4 (3.4 mL, 30.8 mmol) und **38b** (9.8 g, 46.3 mmol) in CH_2Cl_2 (60 mL) umgesetzt (d.e. 71%). Die Reaktionslösung wurde 16 h bei RT gerührt und anschließend das Lösungsmittel entfernt. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch gereinigt (1. Kieselgel, $\text{CHCl}_3/\text{EtOH}/\text{HCO}_2\text{H}$ 10:0.3:0.1, $R_f = 0.29$; 2. Kieselgel, $\text{CHCl}_3/\text{EtOAc}/n$ -Hexan/ HCO_2H 7:5:0.25:0.05, $R_f = 0.26$) danach in CH_3CN aufgenommen und durch Zugabe von Et_2O ausgefällt.

Farbloser amorpher Feststoff

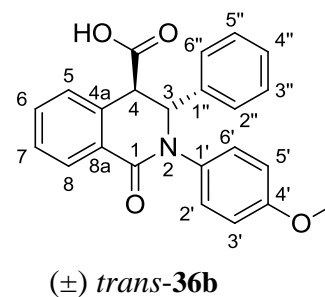
$C_{23}H_{19}NO_4$ 373.4 g/mol

D.e.: 71% (siehe S. 166); Lit.^[111] 94%.

Ausbeute: 5.04 g (13.5 mmol, 44%); Lit.^[111] 63%.

Schmp: 106–118 °C (CH₃CN/Et₂O); Lit.^[111] 236 °C.

Reinheit: 99% (HPLC-Methode I, $\lambda = 254$ nm,
 $t_R = 18.0$ min).



Die gemessenen physikalischen und spektroskopischen Daten stimmen mit den Angaben in der Literatur überein.^[111]

trans-3-(4-Methoxyphenyl)-1-oxo-2-phenyl-1,2,3,4-tetrahydroisochinolin-4-carbonsäure
(*trans*-**36c**)

Homophthalsäureanhydrid (2.4 g, 15.0 mmol) wurde mit *N,N*-Diisopropylethylamin (2.6 mL, 15.0 mmol), TiCl₄ (1.7 mL, 15.0 mmol) und **38c** (4.8 g, 22.5 mmol) in CH₂Cl₂ (30 mL) umgesetzt. Die Reaktionslösung wurde 3 h bei RT gerührt und anschließend das Lösungsmittel entfernt. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch gereinigt (1. Kieselgel, CHCl₃/EtOH/HCO₂H 10:0.3:0.1, $R_f = 0.19$; 2. Kieselgel, CHCl₃/EtOAc/*n*-Hexan/HCO₂H 7:5:0.25:0.05, $R_f = 0.33$), danach in CH₃CN aufgenommen und das Produkt durch Zugabe von Et₂O zur Kristallisation gebracht. Um im Kristall eingeschlossenes Lösungsmittel zu entfernen, wurde der farblose kristalline Feststoff in CHCl₃ aufgenommen und das Lösungsmittel anschließend wieder entfernt.

Farbloser Feststoff

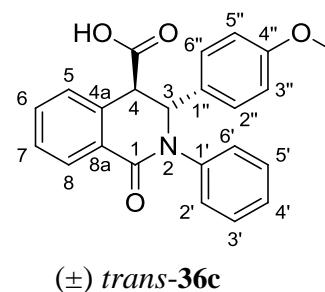
$C_{23}H_{19}NO_4$ 373.4 g/mol

D.e.: 74% (siehe S. 166).

Ausbeute: 2.44 g (6.5 mmol, 44%).

Schmp: 171–173 °C.

Reinheit: 98% (HPLC-Methode I, $\lambda = 254$ nm,
 $t_R = 16.4$ min).



IR (ATM, $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹]): 1658, 1622, 1603, 1575, 1499, 1246, 1172, 1029, 832, 752, 719, 693.

^1H NMR (DMSO, δ [ppm], J [Hz]): 13.13 (br. s, 1 H, COOH), 8.00 (dd, 7.5 Hz, 1.5 Hz, 1 H, 8-H), 7.49 (dt, 7.5 Hz, 1.5 Hz, 1 H, 6-H), 7.44 (dt, 7.5 Hz, 1.4 Hz, 1 H, 7-H), 7.41–7.35 (m, 2 H, 3'/5'-H), 7.35–7.28 (m, 3 H, 5-H, 2'/6'-H), 7.25 (tt, 7.2 Hz, 1.4 Hz, 1 H, 4'-H), 7.11 (ddd, 8.7 Hz, 3.0 Hz, 1.9 Hz, 2 H, 2''/6''-H), 6.80 (ddd, 8.7 Hz, 3.0 Hz, 1.9 Hz, 2 H, 3''/5''-H), 5.63 (br. s, 1 H, 3-H), 4.20 (d, 1.6 Hz, 1 H, 4-H), 3.65 (s, 3 H, C-4''-OCH₃).

^{13}C NMR (DMSO, δ [ppm], J [Hz]): 172.0 (COOH), 162.4 (C-1), 158.4 (C-4''), 142.3 (C-1'), 133.8 (C-4a), 132.2 (C-6), 130.9 (C-1''), 129.6 (C-5), 129.1 (C-8a), 128.6 (2 C, C-3'/5'), 127.9 (C-7), 127.2 (C-8), 127.3 (2 C, C-2''/6''), 126.4 (C-4'), 126.2 (2 C, C-2'/6'), 113.9 (2 C, C-3''/5''), 63.7 (C-3), 54.9 (C-4''-OCH₃), 51.1 (C-4).

trans-2,3-Diphenyl-1-oxo-1,2,3,4-tetrahydroisochinolin-4-carbonsäure (*trans*-**36d**)

Homophthalsäureanhydrid (2.4 g, 15.0 mmol) wurde mit *N,N*-Diisopropylethylamin (2.6 mL, 15.0 mmol), TiCl₄ (1.7 mL, 15.0 mmol) und **38d** (4.1 g, 22.5 mmol), CH₂Cl₂ (30 mL) umgesetzt. Die Reaktionslösung wurde 24 h bei RT gerührt und das Lösungsmittel anschließend entfernt. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch aufgereinigt (Kieselgel, CHCl₃/EtOAc/*n*-Hexan/HCO₂H 7:5:0.25:0.05, R_f = 0.34) und danach aus CHCl₃ umkristallisiert.

Farbloser Feststoff

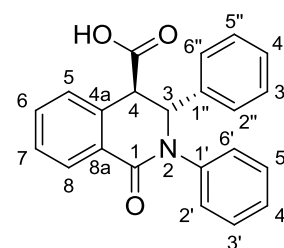
C₂₂H₁₇NO₃ 343.4 g/mol

D.e.: nicht bestimmbar (*cis*-Produkt nicht identifizierbar)

Ausbeute: 2.13 g (6.2 mmol, 41%); Lit.^[114] 47%.

Schmp: 226–229 °C (CHCl₃).

Reinheit: > 99% (HPLC-Methode I, λ = 254 nm, t_R = 18.6 min).



(±) *trans*-**36d**

IR (ATM, $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹]): 1717, 1625, 1603, 1571, 1489, 738, 709, 691.

^1H NMR (DMSO, δ [ppm], J [Hz]): 13.18 (s, 1 H, COOH), 8.01 (dd, 7.4 Hz, 1.6 Hz, 1 H, 8-H), 7.48 (dt, 7.4 Hz, 1.6 Hz, 1 H, 6-H), 7.44 (dt, 7.4 Hz, 1.4 Hz, 1 H, 7-H), 7.41–7.32 (m, 4 H, 2'/6'-H oder 3'/5'-H, 3''/5''-H), 7.29 (dd, 7.4 Hz, 1.4 Hz, 1 H, 5-H), 7.28–7.15 (m, 6 H, 2'/6'-H oder 3'/5'-H, 4'-H, 2''/6''-H, 4''-H), 5.71 (br. s, 1 H), 4.26 (d, 1.5 Hz, 1 H).

^{13}C NMR (DMSO, δ [ppm], J [Hz]): 171.9 (COOH), 162.5 (C-1), 142.2 (C-1'), 139.1 (C-1''), 133.7 (C-4a), 132.2 (C-6), 129.6 (C-5), 129.0 (C-8a), 128.7 (2 C, C-2'/6' oder C-3'/5' oder C-3''/5''), 128.5 (2 C, C-2''/6''), 127.9 (C-7), 127.4 (C-4' oder C-4''), 127.3 (C-8), 126.4 (C-4' oder C-4''), 126.2 (2 C, C-2'/6' oder C-3'/5' oder C-3''/5''), 126.1 (2 C, C-2''/6'' oder C-3''/5''), 64.2 (C-3), 51.0 (C-4).

trans-2,3-Bis(4-fluorphenyl)-1-oxo-1,2,3,4-tetrahydroisochinolin-4-carbonsäure (*trans*-**36e**)

Homophthalsäureanhydrid (2.2 g, 13.4 mmol) wurde mit *N,N*-Diisopropylethylamin (2.3 mL, 13.4 mmol), TiCl_4 (1.5 mL, 13.4 mmol) und **38e** (3.5 g, 16.1 mmol) in CH_2Cl_2 (25 mL) umgesetzt. Die Reaktionslösung wurde 3 h bei RT gerührt und anschließend das Lösungsmittel entfernt. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch gereinigt (Kieselgel, $\text{CHCl}_3/\text{EtOH}/\text{HCO}_2\text{H}$ 10:0.3:0.1, $R_f = 0.29$) und das Produkt im Anschluss aus dem Lösungsmittelgemisch Toluol/Benzol/ Et_2O 9:3:0.5 kristallisiert.

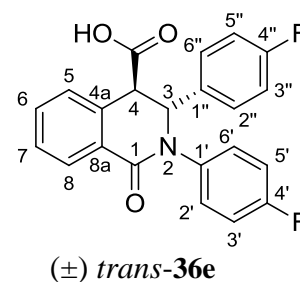
Farbloser Feststoff

$\text{C}_{22}\text{H}_{15}\text{F}_2\text{NO}_3$ 379.4 g/mol

D.e.: 85% (siehe S. 166).

Ausbeute: 2.49 g (6.6 mmol, 49%).

Schmp: 116–118 °C (Toluol/Benzol/ Et_2O 9:3:0.5).



IR (ATM, $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}]): 1721, 1624, 1603, 1574, 1506, 1217, 1155, 833, 717.

^1H NMR (DMSO, δ [ppm], J [Hz]): 13.18 (br. s, 1 H, COOH), 8.00 (dd, 7.5 Hz, 1.5 Hz, 1 H, 8-H), 7.51 (dt, 7.5 Hz, 1.5 Hz, 1 H, 6-H), 7.45 (dt, 7.5 Hz, 1.3 Hz, 1 H, 7-H), 7.37 (dd, 9.0 Hz, $^4J_{\text{HF}} = 5.1$ Hz, 2 H, 2'/6'-H), 7.32 (dd, 7.5 Hz, 1.3 Hz, 1 H, 5-H), 7.29–7.19 (m, 4 H, 3'/5'-H, 2''/6''-H), 7.08 (t, 8.8 Hz, 2 H, 3''/5''-H), 5.68 (br. s, 1 H, 3-H), 4.23 (d, 1.6 Hz, 1 H, 4-H).

^{13}C NMR (DMSO, δ [ppm], J [Hz]): 171.8 (COOH), 162.5 (C-1), 161.3 (d, $^1J_{\text{CF}} = 244.0$ Hz, C-4''), 160.2 (d, $^1J_{\text{CF}} = 243.7$ Hz, C-4'), 138.3 (d, $^4J_{\text{CF}} = 2.9$ Hz, C-1'), 135.1 (d, $^4J_{\text{CF}} = 3.0$ Hz, C-1''), 133.4 (C-4a), 132.4 (C-6), 129.6 (C-5), 128.7 (C-8a), 128.5 (d, $^3J_{\text{CF}} = 8.7$ Hz, 2 C, C-2'/6'), 128.3 (d, $^3J_{\text{CF}} = 8.3$ Hz, 2 C, C-2''/6''), 128.1 (C-7), 127.3 (C-8), 115.5 (d, $^2J_{\text{CF}} = 22.5$ Hz, 2 C, C-3'/5'), 115.3 (d, $^2J_{\text{CF}} = 21.3$ Hz, 2 C, C-3''/5''), 63.5 (C-3), 50.8 (C-4).

trans-2,3-Bis(4-chlorphenyl)-1-oxo-1,2,3,4-tetrahydroisochinolin-4-carbonsäure (*trans*-**36f**)

Homophthalsäureanhydrid (1.5 g, 9.3 mmol) wurde mit *N,N*-Diisopropylethylamin (1.6 mL, 9.3 mmol), TiCl₄ (1.0 mL, 9.3 mmol) und **38f** (2.8 g, 11.2 mmol) in CH₂Cl₂ (25 mL) umgesetzt. Die Reaktionslösung wurde 3 h bei RT gerührt und anschließend das Lösungsmittel entfernt. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch gereinigt (1. Kieselgel, CHCl₃/EtOH/HCO₂H 10:0.3:0.1, R_f = 0.31; 2. Kieselgel, CHCl₃/EtOAc/*n*-Hexan/HCO₂H 7:5:0.25:0.05, R_f = 0.35, 3. Kieselgel, Petrolether/EtOAc/HCO₂H 3:2:0.1, R_f = 0.30).

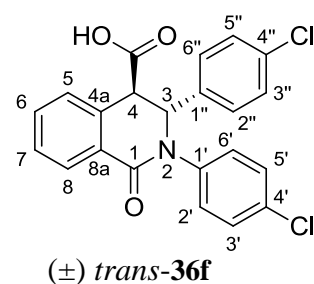
Farblos amorpher Feststoff

C₂₂H₁₅Cl₂NO₃ 412.3 g/mol

D.e.: 74% (siehe S. 166).

Ausbeute: 1.51 g (3.7 mmol, 39%).

Schmp: 116–127 °C.



IR (ATM, $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹]): 1727, 1627, 1602, 1575, 1491, 1092, 826, 721.

¹H NMR (DMSO, δ [ppm], *J* [Hz]): 13.22 (br. s, 1 H, COOH), 7.99 (dd, 7.5 Hz, 1.5 Hz, 1 H, 8-H), 7.51 (dt, 7.5 Hz, 1.5 Hz, 1 H, 6-H), 7.48–7.42 (m, 3 H, 7-H, 3'/5'-H), 7.37 (ddd, 8.9 Hz, 3.0 Hz, 2.2 Hz, 2 H, 2'/6'-H), 7.33–7.29 (m, 3 H, 5-H, 3''/5''-H), 7.23 (ddd, 8.6 Hz, 2.4 Hz, 1.7 Hz, 2 H, 2''/6''-H), 5.71 (d, 1.3 Hz, 1 H, 3-H), 4.25 (d, 1.3 Hz, 1 H, 4-H).

¹³C NMR (DMSO, δ [ppm], *J* [Hz]): 171.7 (COOH), 162.4 (C-1), 140.8 (C-1'), 137.9 (C-1''), 133.6 (C-4a), 132.5 (C-6), 132.2 (C-4''), 130.8 (C-4'), 129.6 (C-5 oder C-7), 128.8 (2 C, C-3'/5'), 128.54 (C-8a), 128.53 (2 C, C-3''/5''), 128.10 (2 C, C-2''/6''), 128.07 (C-5 oder C-7), 128.0 (2 C, C-2'/6'), 127.4 (C-8), 63.3 (C-3), 50.6 (C-4).

trans-2,3-Bis(3,5-dimethylphenyl)-1-oxo-1,2,3,4-tetrahydroisochinolin-4-carbonsäure (*trans*-**36g**)

Homophthalsäureanhydrid (1.8 g, 11.2 mmol) wurde mit *N,N*-Diisopropylethylamin (1.9 mL, 11.2 mmol), TiCl₄ (1.2 mL, 11.2 mmol) und **38g** (3.2 g, 13.5 mmol) in CH₂Cl₂ (25 mL) umgesetzt. Die Reaktionslösung wurde 3 h bei RT gerührt, das Lösungsmittel anschließend entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch gereinigt (Kieselgel,

$\text{CHCl}_3/\text{EtOH}/\text{HCO}_2\text{H}$ 10:0.3:0.1, $R_f = 0.30$). Das Rohprodukt wurde danach in CH_3CN aufgenommen und die Kristallisation des Produkts durch Zugabe von Petrolether ausgelöst.

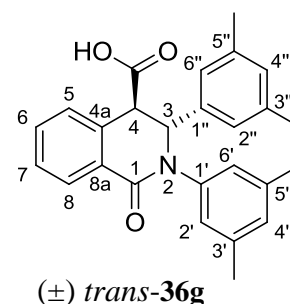
Farbloser Feststoff

$\text{C}_{26}\text{H}_{25}\text{NO}_3$ 399.5 g/mol

D.e.: 60% (siehe S. 166).

Ausbeute: 2.59 g (6.5 mmol, 58%).

Schmp: 269–271 °C ($\text{CH}_3\text{CN}/\text{Petrolether}$).



IR (ATM, $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}]): 2912, 1734, 1621, 1599, 1570, 1469, 1154, 849, 718, 695.

^1H NMR (DMSO, δ [ppm], J [Hz]): 13.13 (br. s, 1 H, COOH), 7.98 (dd, 7.3 Hz, 1.7 Hz, 1 H, 8-H), 7.47 (dt, 7.3 Hz, 1.7 Hz, 1 H, 6-H), 7.43 (dt, 7.3 Hz, 1.5 Hz, 1 H, 7-H), 7.27 (dd, 7.3 Hz, 1.5 Hz, 1 H, 5-H), 6.94 (s, 2 H, 2'/6'-H), 6.89 (s, 1 H, 4'-H), 6.79 (s, 1 H, 4''-H), 6.78 (s, 2 H, 2''/6''-H), 5.57 (br. s, 1 H, 3-H), 4.20 (d, 1.4 Hz, 1 H, 4-H), 2.23 (s, 6 H, C-3'/5'- CH_3), 2.13 (s, 6 H, C-3''/5''- CH_3).

^{13}C NMR (DMSO, δ [ppm], J [Hz]): 172.0 (COOH), 162.5 (C-1), 142.2 (C-1'), 139.2 (C-1''), 137.6 (2 C, C-3'/5'), 133.7 (C-4a), 137.4 (2 C, C-3''/5''), 132.0 (C-6), 129.5 (C-5), 129.3 (C-8a), 128.8 (C-4''), 127.9 (2C, C-7, C-4'), 127.1 (C-8), 123.9 (2 C, C-2'/6'), 123.8 (2 C, C-2''/6''), 64.3 (C-3), 51.1 (C-4), 20.8 (4C, C-3'/5'- CH_3 , C-3''/5''- CH_3).

trans-3-(4-Methoxyphenyl)-1-oxo-2-(4-phenoxyphenyl)-1,2,3,4-tetrahydroisochinolin-4-carbonsäure (*trans*-**36h**)

Homophthalsäureanhydrid (1.3 g, 8.2 mmol) wurde mit *N,N*-Diisopropylethylamin (1.4 mL, 8.2 mmol), TiCl_4 (1.6 mL, 8.2 mmol) und **38h** (3.0 g, 9.9 mmol) in CH_2Cl_2 (20 mL) umgesetzt. Die Reaktionslösung wurde 3 h bei RT gerührt und das Lösungsmittel anschließend entfernt. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch gereinigt (1. Kieselgel, $\text{CHCl}_3/\text{EtOH}/\text{HCO}_2\text{H}$ 10:0.3:0.1, $R_f = 0.28$; 2. Kieselgel, $\text{CHCl}_3/\text{EtOAc}/n\text{-Hexan}/\text{HCO}_2\text{H}$ 7:5:0.25:0.05, $R_f = 0.45$, 3. Kieselgel, Petrolether/ $\text{EtOAc}/\text{HCO}_2\text{H}$ 3:2:0.1, $R_f = 0.20$).

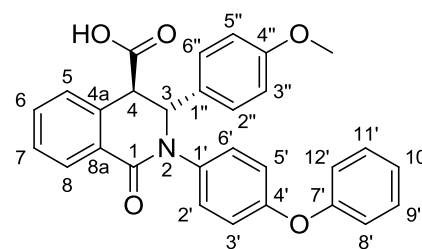
Farbloser amorpher Feststoff

$C_{29}H_{23}NO_5$ 465.5 g/mol

D.e.: 55% (siehe S. 166).

Ausbeute: 1.76 g (3.8 mmol, 46%).

Schmp: 109–115 °C.



(±) *trans*-**36h**

IR (ATM, $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}]): 2927, 1726, 1625, 1603, 1575, 1504, 1463, 1224, 1164, 1015, 828, 744, 692.

1H NMR (DMSO, δ [ppm], J [Hz]): 13.12 (br. s, 1 H, COOH), 7.99 (dd, 7.4 Hz, 1.6 Hz, 1 H, 8-H), 7.49 (dt, 7.4 Hz, 1.6 Hz, 1 H, 6-H), 7.44 (dt, 7.4 Hz, 1.3 Hz, 1 H, 7-H), 7.39 (dd, 8.6 Hz, 7.4 Hz, 2 H, 9'/11'-H), 7.33 (ddd, 9.0 Hz, 3.3 Hz, 2.2 Hz, 2 H, 2'/6'-H), 7.29 (dd, 7.4 Hz, 1.3 Hz, 1 H, 5-H), 7.15 (tt, 7.4 Hz, 1.0 Hz, 1 H, 10'-H), 7.11 (ddd, 8.8 Hz, 3.0 Hz, 1.9 Hz, 2 H, 2''/6''-H), 7.05–6.98 (m, 4 H, 3'/5'-H, 8'/12'-H), 6.80 (ddd, 8.8 Hz, 3.0 Hz, 1.9 Hz, 2 H, 3''/5''-H), 5.62 (d, 1.2 Hz, 1 H, 3-H), 4.19 (d, 1.2 Hz, 1 H, 4-H), 3.65 (s, 3 H, C-4''-OCH₃).

^{13}C NMR (DMSO, δ [ppm], J [Hz]): 172.0 (COOH), 162.5 (C-1), 158.4 (C-4''), 156.3 (C-7'), 154.8 (C-4'), 137.5 (C-1'), 133.9 (C-4a), 132.2 (C-6), 130.8 (C-1''), 130.0 (2 C, C-9'/11'), 129.6 (C-5), 129.0 (C-8a), 127.94 (2 C, C-2'/6'), 127.88 (C-7), 127.3 (2 C, C-2''/6''), 127.2 (C-8), 123.5 (C-10'), 118.6 (2 C, C-3'/5' oder C-8'/12'), 118.5 (2 C, C-3''/5'' oder C-8''/12''), 113.9 (2 C, C-3''/5''), 63.8 (C-3), 54.9 (C-4''-OCH₃), 51.1 (C-4).

9.3.3 Synthese von Natrium Tetrahydroisochinolin-4-carboxylaten

Natrium *cis*-2,3-Bis(4-methoxyphenyl)-1-oxo-1,2,3,4-tetrahydroisochinolin-4-carboxylat (*cis*-**39a**)

Die freie Säure *cis*-**36a** (200 mg, 0.50 mmol) wurde in EtOH (5 mL) suspendiert und eine NaHCO₃-Lsg. (500 μ L, 0.50 mmol, 1 M) bei RT unter Rühren zugetropft. Nach 30 min wurde das Lösungsmittel entfernt.

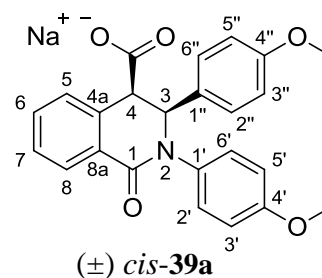
Farbloser Feststoff

$C_{24}H_{20}NNaO_5$ 425.4 g/mol

Ausbeute: 206 mg (0.48 mmol, 98%).

Schmp: 208–209 °C.

Reinheit: 99% (HPLC-Methode I, $\lambda = 254$ nm,
 $t_R = 14.9$ min).



IR (ATM, $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}]): 1598, 1509, 1386, 1247, 1178, 1031, 829, 701.

1H NMR (DMSO, δ [ppm], J [Hz]): 8.29 (d, 7.6 Hz, 1 H, 5-H), 7.93 (dd, 7.6 Hz, 1.4 Hz, 1 H, 8-H), 7.41 (dt, 7.6 Hz, 1.4 Hz, 1 H, 6-H), 7.29 (t, 7.6 Hz, 1 H, 7-H), 7.10 (ddd, 9.0 Hz, 3.4 Hz, 2.2 Hz, 2 H, 2'/6'-H), 6.99 (ddd, 8.8 Hz, 3.0 Hz, 2.0 Hz, 2 H, 2''/6''-H), 6.87 (ddd, 9.0 Hz, 3.4 Hz, 2.2 Hz, 2 H, 3'/5'-H), 6.62 (ddd, 8.8 Hz, 3.0 Hz, 2.0 Hz, 2 H, 3''/5''-H), 5.39 (d, 5.4 Hz, 1 H, 3-H), 4.31 (d, 5.4 Hz, 1 H, 4-H), 3.72 (s, 3 H, C-4'- \underline{CH}_3), 3.62 (s, 3 H, C-4''- \underline{CH}_3).

^{13}C NMR (DMSO, δ [ppm], J [Hz]): 170.6 (COONa), 163.7 (C-1), 157.9 (C-4''), 157.1 (C-4'), 139.0 (C-4a), 135.4 (C-1'), 131.1 (C-1''), 131.0 (C-6), 129.7 (C-8a), 129.2 (2 C, C-2''/6''), 129.1 (C-5), 127.7 (2 C, C-2'/6'), 126.7 (C-8), 125.6 (C-7), 113.6 (2 C, C-3'/5'), 112.7 (2 C, C-3''/5''), 65.6 (C-3), 55.1 (C-4'- \underline{CH}_3), 54.7 (C-4''- \underline{CH}_3), 51.5 (C-4).

Natrium trans-2,3-Bis(4-methoxyphenyl)-1-oxo-1,2,3,4-tetrahydroisochinolin-4-carboxylat
(*trans*-**39a**)

Die freie Säure *cis*-**36a** (400 mg, 1.0 mmol) wurde in EtOH (5 mL) suspendiert und eine NaOH-Lsg. (125 μ L, 1.0 mmol, 8 M) bei RT unter Rühren zugegeben. Nach 30 min wurde das Lösungsmittel entfernt.

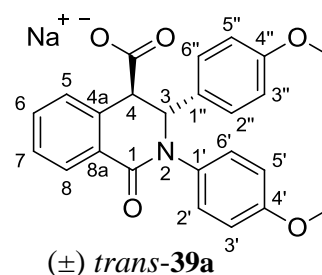
Farbloser Feststoff

$C_{24}H_{20}NNaO_5$ 425.4 g/mol

Ausbeute: 378 mg (0.89 mmol, 89%).

Schmp: 216–218 °C.

Reinheit: > 99% (HPLC-Methode I, $\lambda = 254$ nm,
 $t_R = 17.6$ min).



IR (ATM, $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}]): 1636, 1597, 1509, 1367, 1247, 1177, 1032, 830, 739.

^1H NMR (DMSO, δ [ppm], J [Hz]): 7.88 (dd, 7.5 Hz, 1.2 Hz, 1 H, 8-H), 7.40 (ddd, 9.0 Hz, 3.3 Hz, 2.1 Hz, 2 H, 2'/6'-H), 7.33 (dt, 7.5 Hz, 1.2 Hz, 1 H, 6-H), 7.24 (dt, 7.5 Hz, 1.0 Hz, 1 H, 7-H), 7.12 (d, 7.5 Hz, 1 H, 5-H), 6.99 (ddd, 8.7 Hz, 2.9 Hz, 1.9 Hz, 2 H, 2''/6''-H), 6.87 (ddd, 9.0 Hz, 3.3 Hz, 2.1 Hz, 2 H, 3'/5'-H), 6.74 (ddd, 8.7 Hz, 2.9 Hz, 1.9 Hz, 2 H, 3''/5''-H), 5.77 (s, 1 H, 3-H), 3.72 (s, 3 H, C-4'- CH_3), 3.63 (s, 3 H, C-4''- CH_3), 3.47 (s, 1 H, 4-H).

^{13}C NMR (DMSO, δ [ppm], J [Hz]): 171.6 (COONa), 162.9 (C-1), 157.8 (C-4'), 157.0 (C-4''), 139.2 (C-4a), 136.0 (C-1'), 133.7 (C-1''), 130.8 (C-6), 130.0 (C-5), 128.6 (C-8a), 128.1 (2 C, C-2'/6'), 126.8 (2 C, C-2''/6''), 126.3 (C-8), 125.5 (C-7), 113.6 (2 C, C-3''/5''), 113.4 (2 C, C-3'/5'), 66.0 (C-3), 55.7 (C-4), 55.1 (C-4'- CH_3), 54.8 (C-4''- CH_3).

Natrium cis-2-(4-Methoxyphenyl)-1-oxo-3-phenyl-1,2,3,4-tetrahydroisochinolin-4-carboxylat (cis-39b)

Die freie Säure *cis-36b* (500 mg, 1.34 mmol) wurde in EtOH (5 mL) suspendiert und eine NaHCO_3 -Lsg. (1.34 mL, 1.34 mmol, 1 M) bei RT unter Rühren zugegeben. Nach 30 min wurde das Lösungsmittel entfernt.

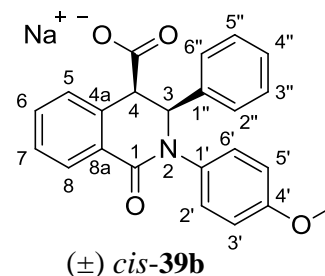
Farbloser Feststoff

$\text{C}_{23}\text{H}_{18}\text{NNaO}_4$ 395.4 g/mol

Ausbeute: 517 mg (1.31 mmol, 98%).

Schmp: 234–236 °C.

Reinheit: 99% (HPLC-Methode I, $\lambda = 254$ nm, $t_{\text{R}} = 14.7$ min).



IR (ATM, $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}]): 1618, 1600, 1462, 1395, 1242, 1173, 1032, 823, 726, 699.

^1H NMR (DMSO, δ [ppm], J [Hz]): 8.30 (d, 7.6 Hz, 1 H, 5-H), 7.93 (dd, 7.6 Hz, 1.5 Hz, 1 H, 8-H), 7.41 (dt, 7.6 Hz, 1.5 Hz, 1 H, 6-H), 7.29 (t, 7.6 Hz, 1 H, 7-H), 7.11 (ddd, 9.0 Hz, 3.4 Hz, 2.2 Hz, 2 H, 2'/6'-H), 7.11–7.04 (m, 5 H, 2''/6''-H, 3''/5''-H, 4''-H), 6.86 (ddd, 9.0 Hz, 3.4 Hz, 2.2 Hz, 2 H, 3'/5'-H), 5.45 (d, 5.4 Hz, 1 H, 3-H), 4.36 (d, 5.4 Hz, 1 H, 4-H), 3.72 (s, 3 H, C-4'- OCH_3).

^{13}C NMR (DMSO, δ [ppm], J [Hz]): 170.4 (COONa), 163.7 (C-1), 157.1 (C-4'), 139.2 (C-1''), 139.0 (C-4a), 135.4 (C-1'), 131.1 (C-6), 129.7 (C-8a), 129.0 (C-5), 128.2 (2 C,

C-2''/6''), 127.7 (2 C, C-2'/6'), 127.3 (2 C, C-3''/5''), 126.7 (C-8), 126.6 (C-4''), 125.6 (C-7), 113.6 (2 C, C-3'/5'), 66.1 (C-3), 55.1 (C-4'-OCH₃), 51.4 (C-4).

Natrium trans-2-(4-Methoxyphenyl)-1-oxo-3-phenyl-1,2,3,4-tetrahydroisochinolin-4-carboxylat (trans-39b)

Die freie Säure *cis*-**36b** (200 mg, 0.54 mmol) wurde in EtOH (5 mL) suspendiert und eine NaOH-Lsg. (70 µL, 0.54 mmol, 8 M) bei RT unter Rühren zugegeben. Nach 30 min wurde das Lösungsmittel entfernt.

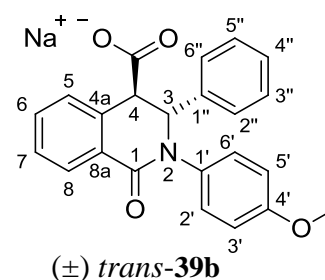
Farbloser Feststoff

C₂₃H₁₈NNaO₄ 395.4 g/mol

Ausbeute: 205 mg (0.52 mmol, 97%).

Schmp: 207–209 °C.

Reinheit: > 99% (HPLC-Methode I, λ = 254 nm, t_R = 16.9 min).



IR (ATM, $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹]): 2837, 1635, 1597, 1509, 1462, 1382, 1245, 1178, 1031, 823, 751, 724, 699.

¹H NMR (DMSO, δ [ppm], *J* [Hz]): 7.89 (dd, 7.5 Hz, 1.4 Hz, 1 H, 8-H), 7.42 (ddd, 9.0 Hz, 3.3 Hz, 2.2 Hz, 2 H, 2'/6'-H), 7.32 (dt, 7.5 Hz, 1.4 Hz, 1 H, 6-H), 7.24 (dt, 7.5 Hz, 1.3 Hz, 1 H, 7-H), 7.22–7.15 (m, 2 H, 3''/5''-H), 7.13–7.07 (m, 4 H, 5-H, 2''/6''-H, 4''-H), 6.87 (ddd, 9.0 Hz, 3.3 Hz, 2.2 Hz, 2 H, 3'/5'-H), 5.84 (br. s, 1 H, 3-H), 3.72 (s, 3 H, C-4'-OCH₃), 3.51 (d, 1.2 Hz, 1 H, 4-H).

¹³C NMR (DMSO, δ [ppm], *J* [Hz]): 171.5 (COONa), 163.0 (C-1), 157.1 (C-4'), 141.9 (C-1''), 139.0 (C-4a), 135.9 (C-1'), 130.8 (C-6), 130.0 (C-5), 128.5 (C-8a), 128.2 (2 C, C-3''/5''), 128.1 (2 C, C-2'/6'), 126.5 (C-4''), 126.4 (C-8), 125.8 (2 C, C-2''/6''), 125.5 (C-7), 113.4 (2 C, C-3'/5'), 66.6 (C-3), 55.7 (C-4), 55.1 (C-4'-OCH₃).

Natrium trans-3-(4-Methoxyphenyl)-1-oxo-2-phenyl-1,2,3,4-tetrahydroisochinolin-4-carboxylat (trans-39c)

Die freie Säure *trans-36c* (150 mg, 0.40 mmol) wurde in EtOH (5 mL) suspendiert und eine NaHCO₃-Lsg. (400 µL, 0.40 mmol, 1 M) bei RT unter Rühren zugegeben. Nach 30 min wurde das Lösungsmittel entfernt.

Farbloser Feststoff

C₂₃H₁₈NNaO₄ 395.4 g/mol

Ausbeute: 153 mg (0.39 mmol, 96%).

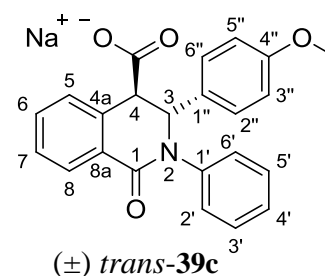
Schmp: 97–99 °C.

Reinheit: > 99% (HPLC-Methode I, λ = 254 nm, t_R = 16.2 min).

LogP: 3.2

pK_a: 3.2

Löslichkeit: 317 µM (intrinsische Löslichkeit).



IR (ATM, $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹]): 1635, 1597, 1587, 1511, 1367, 1247, 1174, 1030, 830, 739, 694.

¹H NMR (DMSO, δ [ppm], *J* [Hz]): 7.89 (dd, 7.6 Hz, 1.4 Hz, 1 H, 8-H), 7.49 (dd, 7.9 Hz, 1.3 Hz, 2 H, 2'/6'-H), 7.37–7.29 (m, 3 H, 6-H, 3'/5'-H), 7.25 (dt, 7.6 Hz, 1.1 Hz, 1 H, 7-H), 7.18 (tt, 7.9 Hz, 1.3 Hz, 1 H, 4'-H), 7.12 (dd, 7.6 Hz, 1.1 Hz, 1 H, 5-H), 7.01 (ddd, 8.7 Hz, 2.9 Hz, 1.9 Hz, 2 H, 2''/6''-H), 6.75 (ddd, 8.7 Hz, 2.9 Hz, 1.9 Hz, 2 H, 3''/5''-H), 5.83 (br. s, 1 H, 3-H), 3.63 (s, 3 H, C-4''-OCH₃), 3.50 (d, 1.2 Hz, 1 H, 4-H).

¹³C NMR (DMSO, δ [ppm], *J* [Hz]): 171.4 (COONa), 162.9 (C-1), 157.8 (C-4''), 143.2 (C-1'), 139.2 (C-4a), 133.7 (C-1''), 130.9 (C-6), 130.0 (C-5), 128.5 (C-8a), 128.1 (2 C, C-3'/5'), 126.9 (2 C, C-2'/6'), 126.8 (2 C, C-2''/6''), 126.4 (C-8), 125.7 (C-4'), 125.5 (C-7), 113.7 (2 C, C-3''/5''), 65.8 (C-3), 55.8 (C-4), 54.8 (C-4''-OCH₃).

9.3.4 Synthese von Tetrahydroisochinolin-4-carboxamid-Derivaten

Allgemeine Synthesevorschrift für die Herstellung der Carboxamide

Das entsprechende 1-Oxo-1,2,3,4-tetrahydroisochinolin-4-carbonsäure-Derivat (1 Äq.) wurde in abs. CH₃CN unter Argon-Atmosphäre gelöst, auf 0 °C gekühlt und festes NaHCO₃ bzw.

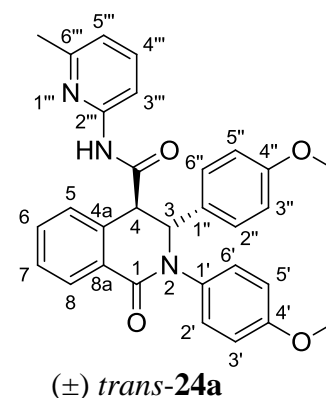
NEt₃ zugegeben. Nach der Zugabe von *i*-Butylchlorformiat bzw. 2,2,2,-Trichlor-1,1-dimethylethylchlorformiat (1.5 Äq.) wurde die Reaktionslösung 30 min bei 0 °C gerührt. Anschließend wurde das entsprechende Amin (1.5 Äq.) zugegeben und weitere 2 h gerührt; dabei erwärmte die Lösung auf RT. Je nach Anforderung wurde das Produkt *via* Säulenchromatographie oder Filtration isoliert und anschließend gegebenenfalls durch Umkristallisation gereinigt.

trans-2,3-Bis(4-methoxyphenyl)-*N*-(6-methylpyridin-2-yl)-1-oxo-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline-4-carboxamid (*trans*-**24a**)

Trans-**36a** (1.40 g, 3.5 mmol) wurde mit NaHCO₃ (585 mg, 6.9 mmol), 2,2,2,-Trichlor-1,1-dimethylethylchlorformiat (1.25 g, 5.2 mmol) und 2-Amino-6-picolin (525 µL, 5.2 mmol) in CH₃CN (5 mL) umgesetzt. Der ausgefallene Feststoff wurde abfiltriert und das Produkt mittels kontinuierlicher Soxhlet-Extraktion (CHCl₃, 24 h) von restlichem NaHCO₃ befreit. Die erhaltene organische Phase wurde eingedampft und der zurückgebliebene Feststoff aus MeOH umkristallisiert.

Farbloser Feststoff

C ₃₀ H ₂₇ N ₃ O ₄	493.6 g/mol
Ausbeute:	1.22 g (2.5 mmol, 71%).
Schmp:	252–254 °C (MeOH).
Reinheit:	> 99% (HPLC-Methode I, λ = 254 nm, t _R = 23.4 min).
logD _{7.4} :	2.8 (HPLC-Methode II).
PSA:	84.4 Å ²



IR (ATM, $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹]): 3274, 1683, 1628, 1602, 1577, 1508, 1440, 1243, 1179, 1032, 834, 790, 745.

¹H NMR (DMSO, δ [ppm], *J* [Hz]): 10.97 (s, 1 H, CONH), 8.01 (dd, 7.4 Hz, 1.5 Hz, 1 H, 8-H), 7.88 (d, 7.9 Hz, 1 H, 3'''-H), 7.67 (t, 7.9 Hz, 1 H, 4'''-CH₃), 7.50–7.40 (m, 2 H, 6-H, 7-H), 7.37 (dd, 7.1 Hz, 1.4 Hz, 1 H, 5-H), 7.22 (d, 8.7 Hz, 2 H, 2''/6''-H), 7.16 (ddd, 9.0 Hz, 3.2 Hz, 2.0 Hz, 2 H, 2'/6'-H), 6.99 (d, 7.9 Hz, 1 H, 5'''-H), 6.89 (ddd, 9.0 Hz, 3.2 Hz, 2.0 Hz,

2 H, 3'/5'-H), 6.82 (d, 8.7 Hz, 2 H, 3''/5''-H), 5.41 (s, 1 H, 3-H), 4.41 (s, 1 H, 4-H), 3.71 (s, 3 H, C-4'-OCH₃), 3.67 (s, 3 H, C-4''-OCH₃), 2.43 (s, 3 H, C-6'''-CH₃).

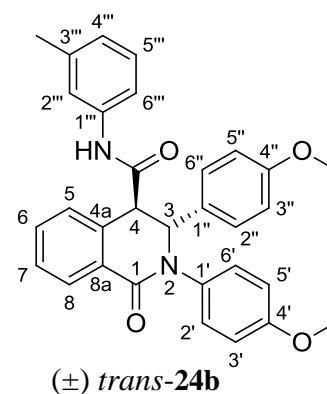
¹³C NMR (DMSO, δ [ppm], J [Hz]): 169.8 (CONH), 162.7 (C-1), 158.4 (C-4''), 157.4 (C-4'), 156.5 (C-6'''), 151.1 (C-2'''), 138.5 (C-4'''), 135.5 (C-1'), 134.1 (C-4a), 132.1 (C-6), 131.7 (C-1''), 130.1 (C-8a), 128.2 (C-5), 127.8 (C-7), 127.6 (2 C, C-2'/6'), 127.5 (2 C, C-2''/6''), 127.3 (C-8), 118.8 (C-5'''), 113.9 (2 C, C-3'/5'), 113.7 (2 C, C-3''/5''), 110.4 (C-3'''), 64.5 (C-3), 55.1 (C-4'-OCH₃), 54.9 (C-4''-OCH₃), 51.4 (C-4), 23.4 (C-6'''-CH₃).

trans-2,3-Bis(4-methoxyphenyl)-1-oxo-*N*-(*m*-tolyl)-1,2,3,4-tetrahydroisochinolin-4-carboxamid (*trans*-**24b**)

Trans-**36a** (810 mg, 2.0 mmol) wurde mit NaHCO₃ (450 mg, 5.3 mmol), *i*-Butylchlorformiat (520 μL, 4.0 mmol) und *m*-Toluidin (430 μL, 4.0 mmol) in DMF (5 mL) umgesetzt. Nach 39 h wurde das Lösungsmittel entfernt, der Rückstand in CHCl₃ aufgenommen und mit wässriger Ameisensäure (5%) extrahiert. Die organische Phase wurde über wasserfr. Na₂SO₄ getrocknet und anschließend bis auf wenige mL eingengt. Die Kristallisation des Produkt wurde durch Zugabe von Et₂O ausgelöst.

Farbloser Feststoff

C₃₁H₂₈N₂O₄ 492.6 g/mol
 Ausbeute: 631 mg (1.3 mmol, 64%).
 Schmp: 254–256 °C (CHCl₃/Et₂O).
 Reinheit: 99% (HPLC-Methode I, λ = 254 nm,
 t_R = 23.7 min).
 logD_{7.4}: 2.9 (HPLC-Methode II).
 PSA: 72.1 Å²



IR (ATM, $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹]): 3247, 1678, 1623, 1608, 1576, 1545, 1464, 1249, 1176, 1032, 834, 735.

¹H NMR (DMSO, δ [ppm], J [Hz]): 10.28 (s, 1 H, CONH), 8.02 (dd, 7.5 Hz, 1.6 Hz, 1 H, 8-H), 7.51–7.38 (m, 4 H, 6-H, 7-H, 2'''-H, 6'''-H), 7.36 (dd, 7.3 Hz, 1.3 Hz, 1 H, 5-H), 7.24–7.15 (m, 5 H, 2'/6'-H, 2''/6''-H, 5'''-H), 6.93–6.88 (m, 3 H, 3'/5'-H, 4'''-H), 6.83 (ddd, 8.6 Hz, 3.0 Hz, 1.9 Hz, 2 H, 3''/5''-H), 5.40 (br. s, 1 H, 3-H), 4.21 (d, 1.3 Hz, 1 H, 4-H), 3.71 (s, 3 H, C-4'-OCH₃), 3.68 (s, 3 H, C-4''-OCH₃), 2.28 (s, 3 H, C-3'''-CH₃).

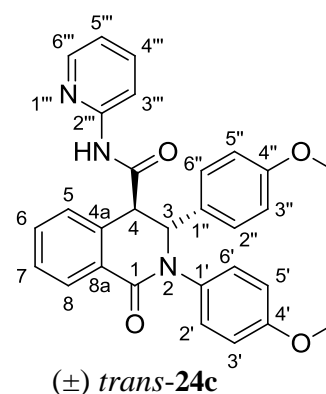
^{13}C NMR (DMSO, δ [ppm], J [Hz]): 169.0 (CONH), 162.6 (C-1), 158.4 (C-4''), 157.4 (C-4'), 138.7 (C-1'''), 137.9 (C-3'''), 135.5 (C-1'), 134.2 (C-4a), 132.1 (C-6), 131.9 (C-1''), 130.0 (C-8a), 128.5 (C-5'''), 128.0 (C-5), 127.80 (C-7), 127.76 (2 C, C-2'/6'), 127.5 (2 C, C-2''/6''), 127.4 (C-8), 124.2 (C-4'''), 119.8 (C-2'''), 116.5 (C-6'''), 113.8 (2 C, C-3'/5'), 113.7 (2 C, C-3''/5''), 64.5 (C-3), 55.1 (C-4'-OCH₃), 54.9 (C-4''-OCH₃), 51.9 (C-4), 21.0 (C-3'''-CH₃).

trans-2,3-Bis(4-methoxyphenyl)-1-oxo-*N*-(pyridin-2-yl)-1,2,3,4-tetrahydroisochinolin-4-carboxamid (*trans*-**24c**)

Trans-**36a** (810 mg, 2.0 mmol) wurde mit NaHCO₃ (335 mg, 4.0 mmol), *i*-Butylchlorformiat (390 μL , 3.0 mmol) und 2-Aminopyridin (280 mg, 3.0 mmol) in CH₃CN (5 mL) umgesetzt. Der ausgefallene Feststoff wurde nach 12 h abfiltriert, in CHCl₃ aufgenommen und mit Wasser extrahiert. Die organische Phase wurde über wasserfr. Na₂SO₄ getrocknet und anschließend eingedampft. Der erhaltene Feststoff wurde aus EtOAc umkristallisiert.

Farbloser Feststoff

C₂₉H₂₅N₃O₄ 479.5 g/mol
 Ausbeute: 593 mg (1.2 mmol, 62%).
 Schmp: 219–220 °C (EtOAc).
 Reinheit: > 99% (HPLC-Methode I, $\lambda = 254$ nm, $t_{\text{R}} = 22.5$ min).
 logD_{7.4}: 2.4 (HPLC-Methode II).
 PSA: 85.1 Å²



IR (ATM, $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹]): 3258, 1685, 1627, 1602, 1576, 1507, 1463, 1429, 1244, 1173, 1032, 836, 732.

^1H NMR (DMSO, δ [ppm], J [Hz]): 11.02 (s, 1 H, CONH), 8.35 (dd, 4.9 Hz, 1.9 Hz, 1 H, 6'''-H), 8.07 (d, 8.4 Hz, 1 H, 3'''-H), 8.02 (dd, 7.4 Hz, 1.6 Hz, 1 H, 8-H), 7.79 (ddd, 8.4 Hz, 7.4 Hz, 1.9 Hz, 1 H, 4'''-H), 7.50–7.41 (m, 2 H, 6-H, 7-H), 7.39 (dd, 7.2 Hz, 1.4 Hz, 1 H, 5-H), 7.22 (ddd, 8.8 Hz, 2.9 Hz, 1.8 Hz, 2 H, 2''/6''-H), 7.17 (ddd, 9.0 Hz, 3.4 Hz, 2.2 Hz, 2 H, 2'/6'-H), 7.13 (ddd, 7.4 Hz, 4.9 Hz, 0.9 Hz, 1 H, 5'''-H), 6.89 (ddd, 9.0 Hz, 3.4 Hz, 2.2 Hz, 2 H, 3'/5'-H), 6.82 (ddd, 8.8 Hz, 2.9 Hz, 1.8 Hz, 2 H, 3''/5''-H), 5.44 (s, 1 H, 3-H), 4.43 (s, 1 H, 4-H), 3.71 (s, 3 H, C-4'-OCH₃), 3.67 (s, 3 H, C-4''-OCH₃).

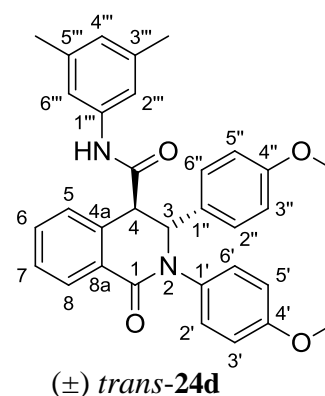
^{13}C NMR (DMSO, δ [ppm], J [Hz]): 169.9 (CONH), 162.7 (C-1), 158.4 (C-4''), 157.4 (C-4'), 151.7 (C-2'''), 148.0 (C-6'''), 138.2 (C-4'''), 135.4 (C-1'), 134.0 (C-4a), 132.1 (C-6), 131.7 (C-1''), 130.1 (C-8a), 128.2 (C-5), 127.9 (C-7), 127.6 (2 C, C-2'/6'), 127.5 (2 C, C-2''/6''), 127.4 (C-8), 119.6 (C-5'''), 113.9 (2 C, C-3'/5'), 113.7 (2 C, C-3''/5''), 113.6 (C-3'''), 64.4 (C-3), 55.1 (C-4'-OCH₃), 54.9 (C-4''-OCH₃), 51.4 (C-4).

trans-N-(3,5-Dimethylphenyl)-2,3-bis(4-methoxyphenyl)-1-oxo-1,2,3,4-tetrahydroiso-chinolin-4-carboxamid (trans-24d)

Trans-36a (500 mg, 1.2 mmol) wurde mit NEt₃ (175 μL , 1.2 mmol), 2,2,2-Trichlor-1,1-dimethylethylchlorformiat (445 mg, 1.9 mmol) und 3,5-Dimethylanilin (230 μL , 1.9 mmol) in CH₃CN (5 mL) umgesetzt. Der ausgefallene Feststoff wurde nach 60 h abfiltriert, in CHCl₃ aufgenommen und mit wässriger Ameisensäure (5%) extrahiert. Die organische Phase wurde über wasserfr. Na₂SO₄ getrocknet und anschließend eingedampft.

Farbloser Feststoff

C₃₂H₃₀N₂O₄ 506.6 g/mol
 Ausbeute: 569 mg (1.1 mmol, 91%).
 Schmp: 286–288 °C.
 Reinheit: > 99% (HPLC-Methode I, $\lambda = 254$ nm, $t_{\text{R}} = 24.7$ min).
 logD_{7.4}: 3.4 (HPLC-Methode II).
 PSA: 70.6 Å²



IR (ATM, $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹]): 3285, 1683, 1630, 1578, 1561, 1508, 1465, 1240, 1164, 1034, 826, 743.

^1H NMR (DMSO, δ [ppm], J [Hz]): 10.20 (s, 1 H, CONH), 8.02 (dd, 7.5 Hz, 1.6 Hz, 1 H, 8-H), 7.50–7.41 (m, 2 H, 6-H, 7-H), 7.35 (dd, 7.3 Hz, 1.5 Hz, 1 H, 5-H), 7.24 (s, 2 H, 2'''/6'''-H), 7.22–7.16 (m, 4 H, 2'/6'-H, 2''/6''-H), 6.90 (ddd, 9.0 Hz, 3.3 Hz, 2.2 Hz, 2 H, 3'/5'-H), 6.83 (ddd, 8.8 Hz, 2.9 Hz, 1.9 Hz, 2 H, 3''/5''-H), 6.72 (s, 1 H, 4'''-H), 5.40 (br. s, 1 H, 3-H), 4.21 (d, 1.3 Hz, 1 H, 4-H), 3.71 (s, 3 H, C-4'-OCH₃), 3.67 (s, 3 H, C-4''-OCH₃), 2.24 (s, 6 H, C-3'''/5'''-CH₃).

^{13}C NMR (DMSO, δ [ppm], J [Hz]): 169.0 (CONH), 162.6 (C-1), 158.4 (C-4''), 157.4 (C-4'), 138.6 (C-1'''), 137.7 (2 C, C-3'''/5'''), 135.5 (C-1'), 134.2 (C-4a), 132.1 (C-6), 131.9 (C-1''),

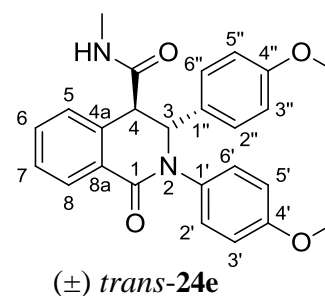
129.9 (C-8a), 128.0 (C-5), 127.8 (3 C, C-7, C-2'/6' oder C-2''/6''), 127.5 (2 C, C-2'/6' oder C-2''/6''), 127.4 (C-8), 125.0 (C-4'''), 117.1 (2 C, C-2'''/6'''), 113.8 (2 C, C-3'/5'), 113.7 (2 C, C-3''/5''), 64.4 (C-3), 55.1 (C-4'-OCH₃), 54.9 (C-4''-OCH₃), 51.9 (C-4), 20.9 (2 C, C-3'''/5'''-CH₃).

trans-2,3-Bis(4-methoxyphenyl)-1-oxo-N-(pyridin-2-yl)-1,2,3,4-tetrahydroisochinolin-4-carboxamid (*trans*-**24e**)

Trans-**36a** (500 mg, 1.2 mmol) wurde mit NaHCO₃ (105 mg, 1.2 mmol), 2,2,2-Trichlor-1,1-dimethylethylchlorformiat (445 mg, 1.9 mmol) und Methylamin (0.9 mL, 1.9 mmol, 2 M in THF) in CH₃CN (5 mL) umgesetzt. Das Lösungsmittel wurde nach 24 h entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch gereinigt (Kieselgel, *n*-Hexan/EtOAc/HCO₂H 1:5:0.1, R_f = 0.21) und aus EtOAc umkristallisiert.

Farbloser Feststoff

C₂₅H₂₄N₂O₄ 416.5 g/mol
 Ausbeute: 384 mg (0.9 mmol, 74%).
 Schmp: 202–203 °C (EtOAc).
 Reinheit: > 99% (HPLC-Methode I, λ = 254 nm, t_R = 19.9 min).
 logD_{7.4}: 1.6 (HPLC-Methode II).
 PSA: 76.3 Å²



IR (ATM, $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹]): 3367, 1670, 1621, 1574, 1537, 1508, 1461, 1435, 1246, 1181, 1033, 841, 739.

¹H NMR (DMSO, δ [ppm], *J* [Hz]): 8.03–7.95 (m, 2 H, 8-H, CONH), 7.49–7.39 (m, 2 H, 6-H, 7-H), 7.25 (dd, 7.4 Hz, 1.2 Hz, 1 H, 5-H), 7.17 (ddd, 9.0 Hz, 3.3 Hz, 2.1 Hz, 2 H, 2'/6'-H), 7.10 (ddd, 8.7 Hz, 2.8 Hz, 1.8 Hz, 2 H, 2''/6''-H), 6.91 (ddd, 9.0 Hz, 3.3 Hz, 2.1 Hz, 2 H, 3'/5'-H), 6.79 (ddd, 8.7 Hz, 2.8 Hz, 1.8 Hz, 2 H, 3''/5''-H), 5.33 (br. s, 1 H, 3-H), 3.96 (d, 1.3 Hz, 1 H, 4-H), 3.73 (s, 3 H, C-4'-OCH₃), 3.66 (s, 3 H, C-4''-OCH₃), 2.64 (d, 4.6 Hz, 3 H, N-CH₃).

¹³C NMR (DMSO, δ [ppm], *J* [Hz]): 170.5 (CONH), 162.6 (C-1), 158.3 (C-4''), 157.4 (C-4'), 135.4 (C-1'), 134.3 (C-4a), 132.1 (C-6), 131.8 (C-1''), 129.8 (C-8a), 128.4 (C-5), 127.8 (2 C,

C-2'/6'), 127.7 (C-7), 127.3 (3 C, C-8, C-2''/6''), 113.8 (2 C, C-3'/5'), 113.7 (2 C, C-3''/5''), 64.8 (C-3), 55.1 (C-4'-OCH₃), 54.9 (C-4''-OCH₃), 51.5 (C-4), 25.9 (N-CH₃).

trans-2,3-Bis(4-methoxyphenyl)-*N,N*-dimethyl-1-oxo-1,2,3,4-tetrahydroisochinolin-4-carboxamid (*trans*-**24f**)

Trans-**36a** (405 mg, 1.0 mmol) wurde mit NEt₃ (140 μL, 1.0 mmol), 2,2,2-Trichlor-1,1-dimethylethylchlorformiat (360 mg, 1.5 mmol) und Dimethylamin (1.0 mL, 2.0 mmol, 2 M in THF) in CH₃CN (5 mL) umgesetzt. Nach 24 h wurde das Lösungsmittel entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch gereinigt (1. Kieselgel, *n*-Hexan/EtOAc/HCO₂H 1:10:0.1, R_f = 0.23; 2. CHCl₃/EtOH 10:0.5, R_f = 0.21).

Farbloser amorpher Feststoff

C₂₆H₂₆N₂O₄ 430.5 g/mol

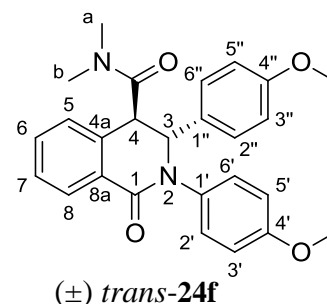
Ausbeute: 270 mg (0.63 mmol, 63%).

Schmp: 105–107 °C.

Reinheit: 99% (HPLC-Methode I, λ = 254 nm, t_R = 19.4 min).

logD_{7.4}: 1.6 (HPLC-Methode II).

PSA: 76.3 Å²



IR (ATM, $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹]): 2932, 1645, 1607, 1583, 1509, 1459, 1391, 1243, 1175, 1029, 826, 741.

¹H NMR (DMSO, δ [ppm], *J* [Hz]): 8.00–7.95 (m, 1 H, 8-H), 7.43 (dt, 7.4 Hz, 1.9 Hz, 1 H, 7-H), 7.41 (dt, 7.4 Hz, 1.7 Hz, 1 H, 6-H), 7.20–7.16 (m, 1 H, 5-H), 7.11 (ddd, 8.7 Hz, 3.0 Hz, 1.9 Hz, 2 H, 2''/6''-H), 7.05 (ddd, 9.0 Hz, 3.3 Hz, 2.2 Hz, 2 H, 2'/6'-H), 6.89 (ddd, 9.0 Hz, 3.3 Hz, 2.2 Hz, 2 H, 3'/5'-H), 6.80 (ddd, 8.7 Hz, 3.0 Hz, 1.9 Hz, 2 H, 3''/5''-H), 5.61 (d, 2.1 Hz, 1 H, 3-H), 4.59 (d, 2.1 Hz, 1 H, 4-H), 3.72 (s, 3 H, C-4'-OCH₃), 3.66 (s, 3 H, C-4''-OCH₃), 3.31 (s, 3 H, N-^bCH₃), 2.91 (s, 3 H, N-^aCH₃).

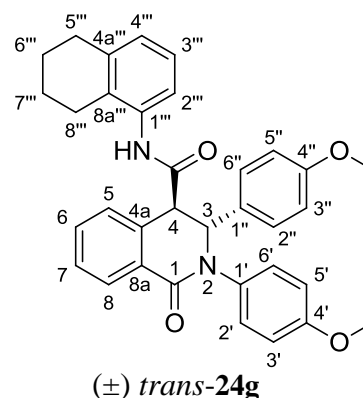
¹³C NMR (DMSO, δ [ppm], *J* [Hz]): 169.9 (CON(CH₃)₂), 163.1 (C-1), 158.4 (C-4''), 157.4 (C-4'), 134.9 (C-4a), 135.4 (C-1'), 131.8 (C-1''), 131.7 (C-6), 130.8 (C-8a), 128.0 (C-5), 127.9 (2 C, C-2'/6'), 127.53 (2 C, C-2''/6''), 127.47 (C-7), 127.1 (C-8), 113.82 (2 C, C-3'/5' oder C-3''/5''), 113.76 (2 C, C-3'/5' oder C-3''/5''), 64.6 (C-3), 55.1 (C-4'-OCH₃), 54.9 (C-4''-OCH₃), 46.7 (C-4), 37.5 (N-^bCH₃), 35.7 (N-^aCH₃).

trans-2,3-Bis(4-methoxyphenyl)-1-oxo-*N*-(5,6,7,8-tetrahydronaphthalin-1-yl)-1,2,3,4-tetrahydroisochinolin-4-carboxamid (*trans*-**24g**)

Trans-**36a** (500 mg, 1.2 mmol) wurde mit NEt₃ (175 µL, 1.2 mmol), 2,2,2-Trichlor-1,1-dimethylethylchlorformiat (445 mg, 1.9 mmol) und 5,6,7,8-Tetrahydro-1-naphthylamin (260 µL, 1.9 mmol) in CH₃CN (5 mL) umgesetzt. Nach 15 h wurde das Lösungsmittel entfernt, der Rückstand in CHCl₃ aufgenommen und mit wässriger Ameisensäure (5%) extrahiert. Die organische Phase wurde über wasserfr. Na₂SO₄ getrocknet und anschließend eingedampft. Der erhaltene Feststoff wurde aus EtOAc umkristallisiert.

Farbloser Feststoff

C₃₄H₃₂N₂O₄ 532.6 g/mol
 Ausbeute: 592 mg (1.1 mmol, 90%).
 Schmp: 131–133 °C (EtOAc).
 Reinheit: 99% (HPLC-Methode I, λ = 254 nm, t_R = 24.7 min).
 logD_{7.4}: 3.4 (HPLC-Methode II).
 PSA: 71.7 Å²



IR (ATM, $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹]): 1632, 1605, 1578, 1509, 1461, 1247, 1174, 1032, 828, 739.

¹H NMR (DMSO, δ [ppm], *J* [Hz]): 9.54 (s, 1 H, CONH), 8.01 (d, 7.3 Hz, 1 H, 8-H), 7.51 (t, 7.2 Hz, 1 H, C-6), 7.45 (t, 7.2 Hz, 1 H, 7-H), 7.40 (d, 7.3 Hz, 1 H, 5-H), 7.25–7.13 (m, 5 H, 2'/6'-H, 2''/6''-H, 2'''-H), 7.06 (t, 7.7 Hz, 1 H, 3'''-H), 6.95–6.87 (m, 3 H, 3'/5'-H, 4'''-H), 6.84 (d, 8.6 Hz, 2 H, 3''/5''-H), 5.45 (s, 1 H, 3-H), 4.35 (s, 1 H, 4-H), 3.72 (s, 3 H, C-4'-OCH₃), 3.67 (s, 3 H, C-4''-OCH₃), 2.70 (t, 4.7 Hz, 2 H, 5'''-H), 2.45–2.34 (m, 2 H, 8'''-H), 1.72–1.56 (m, 4 H, 6'''-H, 7'''-H).

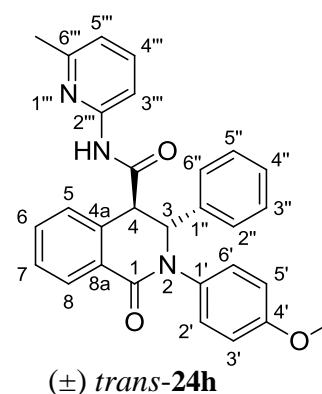
¹³C NMR (DMSO, δ [ppm], *J* [Hz]): 169.0 (CONH), 162.7 (C-1), 158.4 (C-4''), 157.4 (C-4'), 137.4 (C-4a'''), 135.4 (C-1'''), 134.5 (2 C, C-4a, C-1'), 132.1 (C-6), 131.8 (C-1''), 131.2 (C-8a'''), 129.9 (C-8a), 128.2 (C-5), 127.8 (C-7), 127.60 (2 C, C-2'/6'), 127.56 (2 C, C-2''/6''), 127.4 (C-8), 126.4 (C-4'''), 125.0 (C-3'''), 122.7 (C-2'''), 113.8 (4 C, C-3'/5', C-3''/5''), 64.7 (C-3), 55.1 (C-4'-OCH₃), 54.9 (C-4''-OCH₃), 51.5 (C-4), 29.0 (C-5'''), 23.9 (C-8'''), 22.2 (C-6''' oder C-7'''), 22.1 (C-6''' oder C-7''').

trans-2-(4-Methoxyphenyl)-N-(6-methylpyridin-2-yl)-1-oxo-3-phenyl-1,2,3,4-tetrahydroisochinolin-4-carboxamid (*trans*-**24h**)

Trans-**36b** (750 mg, 2.0 mmol) wurde mit NaHCO₃ (335 mg, 4.0 mmol), *i*-Butylchlorformiat (390 µL, 3.0 mmol) und 2-Amino-6-picolin (305 µL, 3.0 mmol) in CH₃CN (5 mL) umgesetzt. Der ausgefallene Feststoff wurde nach 20 h abfiltriert und durch kontinuierliche Soxhlet-Extraktion (CHCl₃, 24h) restliches NaHCO₃ entfernt. Die organische Phase wurde eingedampft und der erhaltene Feststoff aus EtOAc umkristallisiert.

Farbloser Feststoff

C ₂₉ H ₂₅ N ₃ O ₃	463.5 g/mol
Ausbeute:	501 mg (1.1 mmol, 54%).
Schmp:	284–286 °C (EtOAc)
Reinheit:	95% (HPLC-Methode I, λ = 280 nm, t _R = 23.4 min).
logD _{7.4} :	2.8 (HPLC-Methode II).
PSA:	76.1 Å ²



IR (ATM, $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹]): 3269, 1682, 1630, 1601, 1578, 1526, 1508, 1458, 1431, 1243, 1172, 1032, 834, 762, 737, 704.

¹H NMR (DMSO, δ [ppm], *J* [Hz]): 10.99 (s, 1 H, CONH), 8.05–8.02 (m, 1 H, 8-H), 7.88 (d, 7.9 Hz, 1 H, 3''-H), 7.67 (t, 7.9 Hz, 1 H, 4''-H), 7.49–7.40 (m, 2 H, 6-H, 7-H), 7.39–7.35 (m, 1 H, 5-H), 7.35–7.31 (m, 2 H, 2''/6''-H), 7.30–7.24 (m, 2 H, 3''/5''-H), 7.22–7.16 (m, 1 H, 4''-H), 7.19 (ddd, 9.0 Hz, 3.3 Hz, 2.2 Hz, 2 H, 2'/6'-H), 6.99 (d, 7.9 Hz, 1 H, 5'''-H), 6.89 (ddd, 9.0 Hz, 3.3 Hz, 2.2 Hz, 2 H, 3'/5'-H), 5.49 (s, 1 H, 3-H), 4.47 (s, 1 H, 4-H), 3.70 (s, 3 H, C-4''-OCH₃), 2.43 (s, 3 H, C-6'''-CH₃).

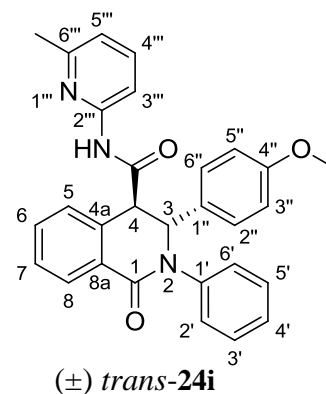
¹³C NMR (DMSO, δ [ppm], *J* [Hz]): 169.8 (CONH), 162.8 (C-1), 157.5 (C-4'), 156.5 (C-6'''), 151.1 (C-2'''), 139.9 (C-1'), 138.5 (C-4'''), 135.4 (C-1'), 134.0 (C-4a), 132.1 (C-6), 130.1 (C-8a), 128.3 (2 C, C-3''/5''), 128.1 (C-5), 127.9 (C-7), 127.6 (2 C, C-2''/6''), 127.4 (C-8 oder C-4''), 127.3 (C-8 oder C-4''), 126.4 (2 C, C-2''/6''), 118.9 (C-5'''), 113.9 (2 C, C-3'/5'), 110.5 (C-3'''), 64.9 (C-3), 55.1 (C-4'-OCH₃), 51.2 (C-4), 23.4 (C-6'''-CH₃).

trans-3-(4-Methoxyphenyl)-*N*-(6-methylpyridin-2-yl)-1-oxo-2-phenyl-1,2,3,4-tetrahydroisochinolin-4-carboxamid (*trans*-**24i**)

Trans-**36c** (1.37 g, 3.7 mmol) wurde mit NEt₃ (510 μL, 3.7 mmol), 2,2,2-Trichlor-1,1-dimethylethylchlorformiat (1.32 g, 5.5 mmol) und 2-Amino-6-picolin (740 μL, 7.4 mmol) in CH₃CN (25 mL) umgesetzt. Der ausgefallene Feststoff wurde nach 24 h abfiltriert und anschließend aus Toluol umkristallisiert.

Farbloser Feststoff

C ₂₉ H ₂₅ N ₃ O ₃	463.5 g/mol
Ausbeute:	1.48 g (3.2 mmol, 87%).
Schmp:	265–268 °C (Toluol).
Reinheit:	99% (HPLC-Methode I, λ = 254 nm, t _R = 23.4 min).
logD _{7.4} :	2.8 (HPLC-Methode II).
pK _a :	2.7, 3.7, 9.1.
PSA:	76.1 Å ²



IR (ATM, $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹]): 3252, 1694, 1631, 1607, 1577, 1532, 1492, 1452, 1415, 1233, 1172, 1032, 791, 743, 700.

¹H NMR (DMSO, δ [ppm], *J* [Hz]): 11.00 (s, 1 H, CONH), 8.02 (dd, 7.4 Hz, 1.6 Hz, 1 H, 8-H), 7.87 (d, 7.9 Hz, 1 H, 3''-H), 7.66 (t, 7.9 Hz, 1 H, 4''-H), 7.48 (dt, 7.4 Hz, 1.6 Hz, 1 H, 6-H), 7.43 (dt, 7.4 Hz, 1.6 Hz, 1 H, 7-H), 7.40–7.31 (m, 3 H, 5-H, 3'/5'-H), 7.29–7.18 (m, 5 H, 2'/6'-H, 4'-H, 2''/6''-H), 6.99 (d, 7.9 Hz, 1 H, 5'''-H), 6.83 (d, 8.8 Hz, 2 H, 3''/5''-H), 5.50 (s, 1 H, 3-H), 4.46 (s, 1 H, 4-H), 3.67 (s, 3 H, C-4''-OCH₃), 2.43 (s, 3 H, C-6'''-CH₃).

¹³C NMR (DMSO, δ [ppm], *J* [Hz]): 169.7 (CONH), 162.7 (C-1), 158.4 (C-4''), 156.5 (C-6'''), 151.1 (C-2'''), 142.7 (C-1'), 138.5 (C-4'''), 134.1 (C-4a), 132.1 (C-6), 131.7 (C-1''), 130.1 (C-8a), 128.6 (2 C, C-3'/5'), 128.2 (C-5), 127.9 (C-7), 127.5 (2 C, C-2''/6''), 127.4 (C-8), 126.30 (2 C, C-2'/6'), 126.27 (C-4'), 118.8 (C-5'''), 113.7 (2 C, C-3''/5''), 110.5 (C-3'''), 64.2 (C-3), 54.9 (C-4''-OCH₃), 51.4 (C-4), 23.4 (C-6'''-CH₃).

trans-3-(4-Methoxyphenyl)-1-oxo-2-phenyl-*N*-(pyrimidin-2-yl)-1,2,3,4-tetrahydroisochinolin-4-carboxamid (*trans*-**24j**)

Trans-**36c** (250 mg, 0.7 mmol) wurde mit *N,N*-Diisopropylethylamin (115 μ L, 0.7 mmol), 2,2,2,-Trichlor-1,1-dimethylethylchlorformiat (240 mg, 1.0 mmol) und 2-Aminopyrimidin (130 mg, 1.3 mmol) in CH₃CN (10 mL) umgesetzt. Nach 24 h wurde das Lösungsmittel entfernt, der Rückstand säulenchromatographisch gereinigt (CHCl₃/EtOH 10:1, R_f = 0.53) und aus Toluol umkristallisiert.

Farbloser Feststoff

C₂₇H₂₂N₄O₃ 450.5 g/mol

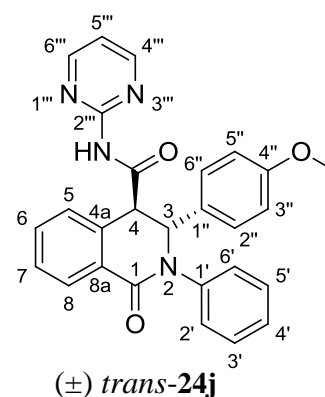
Ausbeute: 146 mg (0.32 mmol, 48%).

Schmp: 273–275 °C (Toluol).

Reinheit: > 99 % (HPLC-Methode I, λ = 254 nm, t_R = 20.0 min).

logD_{7.4}: 1.8 (HPLC-Methode II).

PSA: 87.6 Å²



IR (ATM, $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹]): 3257, 1714, 1629, 1604, 1577, 1513, 1434, 1411, 1249, 1149, 1034, 829, 791, 737, 723, 698.

¹H NMR (DMSO, δ [ppm], *J* [Hz]): 11.12 (s, 1 H, CONH), 8.69 (d, 4.8 Hz, 2 H, 4''/6''-H), 8.03 (dd, 7.3 Hz, 1.6 Hz, 1 H, 8-H), 7.48 (dt, 7.3 Hz, 1.6 Hz, 1 H, 6-H), 7.44 (dt, 7.3 Hz, 1.5 Hz, 1 H, 7-H), 7.39 (dd, 7.3 Hz, 1.5 Hz, 1 H, 5-H), 7.34 (t, 7.9 Hz, 2 H, 3'/5'-H), 7.29 (dd, 7.9 Hz, 1.5 Hz, 2 H, 2'/6'-H), 7.26–7.19 (m, 4 H, 4'-H, 2''/6''-H, 5'''-H), 6.83 (d, 8.8 Hz, 2 H, 3''/5''-H), 5.52 (s, 1 H, 3-H), 4.55 (s, 1 H, 4-H), 3.67 (s, 3 H, C-4''-OCH₃).

¹³C NMR (DMSO, δ [ppm], *J* [Hz]): 169.0 (CONH), 162.7 (C-1), 158.42 (C-4''), 158.37 (2 C, C-4'''/6'''), 157.5 (C-2'''), 142.7 (C-1'), 134.0 (C-4a), 132.3 (C-6), 131.7 (C-1''), 130.1 (C-8a), 128.6 (2 C, C-3'/5'), 128.3 (C-5), 127.9 (C-7), 127.5 (2 C, C-2''/6''), 127.4 (C-8), 126.5 (2 C, C-2'/6'), 126.4 (C-4'), 117.1 (C-5'''), 113.8 (2 C, C-3''/5''), 64.0 (C-3), 54.9 (C-4''-OCH₃), 51.6 (C-4).

trans-3-(4-Methoxyphenyl)-1-oxo-2-phenyl-N-(pyridin-3-yl)-1,2,3,4-tetrahydroisochinolin-4-carboxamid (*trans*-**24k**)

Trans-**36c** (500 mg, 1.3 mmol) wurde mit NEt₃ (180 µL, 1.3 mmol), 2,2,2-Trichlor-1,1-dimethylethylchlorformiat (480 mg, 2.0 mmol) und 3-Aminopyridin (250 mg, 2.7 mmol) in CH₃CN (10 mL) umgesetzt. Nach 24 h wurde das Lösungsmittel entfernt, der Rückstand säulenchromatographisch gereinigt (CHCl₃/EtOH 10:1, R_f = 0.37) und aus EtOAc umkristallisiert.

Farbloser Feststoff

C₂₈H₂₃N₃O₃ 449.5 g/mol

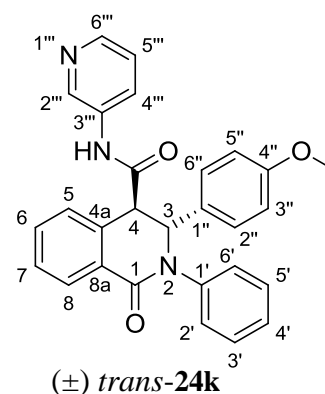
Ausbeute: 520 mg (1.2 mmol, 86%).

Schmp: 219–221 °C (EtOAc).

Reinheit: > 99 % (HPLC-Methode I, λ = 254 nm, t_R = 20.6 min).

logD_{7.4}: 2.0 (HPLC-Methode II).

PSA: 76.7 Å²



IR (ATM, $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹]): 3250, 1685, 1627, 1600, 1584, 1536, 1514, 1469, 1417, 1277, 1180, 1036, 828, 802, 750, 737, 699.

¹H NMR (DMSO, δ [ppm], J [Hz]): 10.63 (s, 1 H, CONH), 8.76 (d, 2.4 Hz, 1 H, 2''-H), 8.29 (dd, 4.7 Hz, 1.4 Hz, 1 H, 4''-H), 8.07 (ddd, 8.3 Hz, 2.4 Hz, 1.4 Hz, 1 H, 6''-H), 8.04 (dd, 7.5 Hz, 1.5 Hz, 1 H, 8-H), 7.50 (dt, 7.5 Hz, 1.5 Hz, 1 H, 6-H), 7.45 (dt, 7.5 Hz, 1.0 Hz, 1 H, 7-H), 7.39–7.32 (m, 4 H, 5-H, 3'/5'-H, 5''-H), 7.28 (d, 7.2 Hz, 2 H, 2'/6'-H), 7.25–7.19 (m, 1 H, 4'-H), 7.23 (d, 8.7 Hz, 2 H, 2''/6''-H), 6.85 (d, 8.7 Hz, 2 H, 3''/5''-H), 5.53 (br. s, 1 H, 3-H), 4.29 (d, 1.2 Hz, 1 H, 4-H), 3.68 (s, 3 H, C-4''-OCH₃).

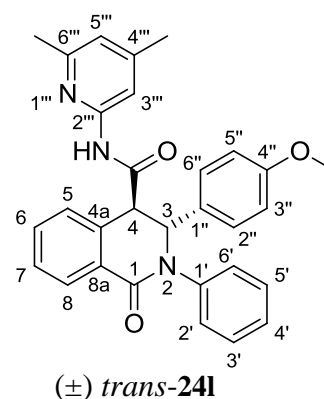
¹³C NMR (DMSO, δ [ppm], J [Hz]): 169.6 (CONH), 162.6 (C-1), 158.5 (C-4''), 144.5 (C-4'''), 142.7 (C-1'), 140.9 (C-2'''), 135.2 (C-3'''), 133.9 (C-4a), 132.3 (C-6), 131.7 (C-1''), 130.0 (C-8a), 128.6 (2 C, C-3'/5'), 128.1 (C-5), 128.0 (C-7), 127.5 (C-8), 127.4 (2 C, C-2''/6''), 126.5 (2 C, C-2'/6'), 126.44 (C-4' oder C-6'''), 126.37 (C-4' oder C-6'''), 123.7 (C-5'''), 113.8 (2 C, C-3''/5''), 64.1 (C-3), 54.9 (C-4''-OCH₃), 51.9 (C-4).

trans-N-(4,6-Dimethylpyridin-2-yl)-3-(4-methoxyphenyl)-1-oxo-2-phenyl-1,2,3,4-tetrahydroisochinolin-4-carboxamid (trans-241)

Trans-36c (300 mg, 0.8 mmol) wurde mit NEt₃ (110 µL, 0.8 mmol), 2,2,2,-Trichlor-1,1-dimethylethylchlorformiat (290 mg, 1.2 mmol) und 2-Amino-4,6-dimethylpyridin (195 mg, 1.6 mmol) in CH₃CN (10 mL) umgesetzt. Der ausgefallene Feststoff wurde nach 24 h abfiltriert und aus EtOAc umkristallisiert.

Farbloser Feststoff

C ₃₀ H ₂₇ N ₃ O ₃	477.6 g/mol
Ausbeute:	171 mg (0.36 mmol, 45%).
Schmp:	265–267 °C (EtOAc).
Reinheit:	86 % (HPLC-Methode I, λ = 254 nm, t _R = 23.8 min).
logD _{7.4} :	3.1 (HPLC-Methode II).
PSA:	74.7 Å ²



IR (ATM, $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹]): 3256, 1685, 1637, 1612, 1579, 1542, 1509, 1251, 1215, 1173, 1030, 841, 805, 755, 725, 699.

¹H NMR (DMSO, δ [ppm], *J* [Hz]): 10.91 (s, 1 H, CONH), 8.02 (d, 7.0 Hz, 1 H, 8-H), 7.72 (s, 1 H, 3''-H), 7.47 (t, 7.0 Hz, 1 H, 6-H), 7.43 (t, 7.0 Hz, 1 H, 7-H), 7.37 (d, 7.0 Hz, 1 H, 5-H), 7.35 (t, 7.6 Hz, 2 H, 3'/5'-H), 7.28 (d, 7.6 Hz, 2 H, 2'/6'-H), 7.26–7.18 (m, 3 H, 4'-H, 2''/6''-H), 6.87–6.77 (m, 3 H, 3''/5''-H, 5'''-H), 5.50 (s, 1 H, 3-H), 4.43 (s, 1 H, 4-H), 3.67 (s, 3 H, C-4''-OCH₃), 2.38 (s, 3 H, C-6'''-CH₃), 2.24 (s, 3 H, C-4'''-CH₃).

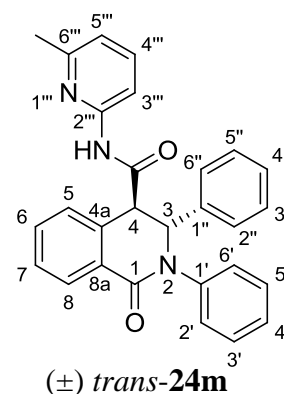
¹³C NMR (DMSO, δ [ppm], *J* [Hz]): 169.7 (CONH), 162.7 (C-1), 158.4 (C-4''), 156.1 (C-6'''), 151.1 (C-2'''), 149.2 (C-4'''), 142.7 (C-1'), 134.2 (C-4a), 132.2 (C-6), 131.7 (C-1''), 130.0 (C-8a), 128.6 (2 C, C-3'/5'), 128.1 (C-5), 127.9 (C-7), 127.5 (2 C, C-2''/6''), 127.4 (C-8), 126.34 (2 C, C-2'/6'), 126.25 (C-4'), 119.8 (C-5'''), 113.8 (2 C, C-3''/5''), 111.0 (C-3'''), 64.1 (C-3), 54.9 (C-4''-OCH₃), 51.4 (C-4), 23.2 (C-6'''-CH₃), 20.7 (C-4'''-CH₃).

trans-*N*-(6-Methylpyridin-2-yl)-1-oxo-2,3-diphenyl-1,2,3,4-tetrahydroisochinolin-4-carboxamid (*trans*-**24m**)

Trans-**36d** (300 mg, 0.9 mmol) wurde mit NaHCO₃ (75 mg, 0.9 mmol), *i*-Butylchlorformiat (195 μL, 1.5 mmol) und 2-Amino-6-picolin (150 μL, 1.5 mmol) in CH₃CN (5 mL) umgesetzt. Der ausgefallene Feststoff wurde nach 24 h abfiltriert, in Wasser suspendiert und anschließend getrocknet.

Farbloser Feststoff

C ₂₈ H ₂₃ N ₃ O ₂	433.5 g/mol
Ausbeute:	311 mg (0.7 mmol, 82%).
Schmp:	265–266 °C.
Reinheit:	95% (HPLC-Methode I, λ = 254 nm, t _R = 23.3 min).
logD _{7.4} :	2.8 (HPLC-Methode II).
PSA:	66.4 Å ²



IR (ATM, $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹]): 3279, 1693, 1633, 1603, 1578, 1537, 1492, 1453, 760, 693.

¹H NMR (DMSO, δ [ppm], *J* [Hz]): 11.03 (br. s, 1 H, CONH), 8.03 (d, 6.9 Hz, 1 H, 8-H), 7.86 (d, 7.7 Hz, 1 H, 3'''-H), 7.66 (t, 7.7 Hz, 1 H, 4'''-H), 7.50–7.40 (m, 2 H, 6-H, 7-H), 7.40–7.31 (m, 5 H, 5-H, 3'/5'-H, 2''/6''-H), 7.31–7.16 (m, 6 H, 2'/6'-H, 4'-H, 3''/5''-H, 4''-H), 6.99 (d, 7.7 Hz, 1 H, 5'''-H), 5.57 (s, 1 H, 3-H), 4.52 (s, 1 H, 4-H), 2.43 (s, 3 H, C-6'''-CH₃).

¹³C NMR (DMSO, δ [ppm], *J* [Hz]): 169.7 (CONH), 162.8 (C-1), 156.5 (C-6'''), 151.1 (C-2'''), 142.7 (C-1'), 139.9 (C-1''), 138.5 (C-4'''), 134.0 (C-4a), 132.3 (C-6), 130.0 (C-8a), 128.6 (2 C, C-2'/6'), 128.4 (2 C, C-3''/5''), 128.1 (C-5), 127.9 (C-7), 127.4 (C-8 oder C-4''), 127.3 (C-8 oder C-4'''), 126.3 (5 C, C-3'/5', C-4', C-2''/6''), 118.9 (C-5'''), 110.5 (C-3'''), 64.6 (C-3), 51.2 (C-4), 23.4 (C-6'''-CH₃).

trans-2,3-Bis(4-fluorphenyl)-*N*-(6-methylpyridin-2-yl)-1-oxo-1,2,3,4-tetrahydroisochinolin-4-carboxamid (*trans*-**24n**)

Trans-**36e** (500 mg, 1.3 mmol) wurde mit NEt₃ (185 μL, 1.3 mmol), 2,2,2-Trichlor-1,1-dimethylethylchlorformiat (475 mg, 2.0 mmol) und 2-Amino-6-picolin (200 μL, 2.0 mmol) in

CH₃CN (5 mL) umgesetzt. Der ausgefallene Feststoff wurde nach 24 h abfiltriert und anschließend aus CHCl₃ umkristallisiert.

Farblose Kristalle

C₂₈H₂₁F₂N₃O₂ 469.5 g/mol

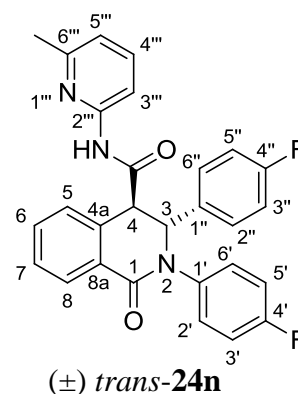
Ausbeute: 556 mg (1.2 mmol, 90%).

Schmp: 275–277 °C (CHCl₃).

Reinheit: > 99% (HPLC-Methode I, λ = 254 nm, t_R = 24.7 min).

logD_{7.4}: 2.9 (HPLC-Methode II).

PSA: 68.4 Å²



IR (ATM, $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹]): 3284, 1695, 1633, 1601, 1578, 1538, 1507, 1452, 1439, 1212, 1156, 823, 791, 742.

¹H NMR (DMSO, δ [ppm], *J* [Hz]): 10.98 (s, 1 H, CONH), 8.02 (dd, 7.4 Hz, 1.6 Hz, 1 H, 8-H), 7.87 (d, 7.9 Hz, 1 H, 3''-H), 7.66 (dt, 7.9 Hz, 1 H, 4''-H), 7.50 (dt, 7.4 Hz, 1.6 Hz, 1 H, 6-H), 7.45 (dt, 7.4 Hz, 1.5 Hz, 1 H, 7-H), 7.41 (dd, 7.4 Hz, 1.5 Hz, 1 H, 5-H), 7.39–7.33 (m, 2 H, 2''/6''-H), 7.33–7.27 (m, 2 H, 2'/6'-H), 7.24–7.16 (m, 2 H, 3'/5'-H), 7.15–7.07 (m, 2 H, 3''/5''-H), 6.99 (d, 7.9 Hz, 1 H, 5'''-H), 5.58 (s, 1 H, 3-H), 4.46 (s, 1 H, 4-H), 2.43 (s, 3 H, C-6'''-CH₃).

¹³C NMR (DMSO, δ [ppm], *J* [Hz]): 169.7 (CONH), 162.8 (C-1), 161.3 (d, ¹J_{CF} = 244.0 Hz, C-4''), 160.2 (d, ¹J_{CF} = 243.6 Hz, C-4'), 156.5 (C-6'''), 151.9 (C-2'''), 138.7 (d, ⁴J_{CF} = 2.9 Hz, C-1'), 138.5 (C-4'''), 135.9 (d, ⁴J_{CF} = 2.8 Hz, C-1''), 133.9 (C-4a), 132.5 (C-6), 129.6 (C-8a), 128.6 (d, ³J_{CF} = 8.6 Hz, 2 C, C-2'/6'), 128.4 (d, ³J_{CF} = 8.3 Hz, 2 C, C-2''/6''), 128.1 (C-7), 128.0 (C-5), 127.5 (C-8), 118.9 (C-5'''), 115.5 (d, ²J_{CF} = 25.0 Hz, 2 C, C-3'/5'), 115.3 (d, ²J_{CF} = 24.0 Hz, 2 C, C-3''/5''), 110.5 (C-3'''), 63.8 (C-3), 51.1 (C-4), 23.4 (C-6'''-CH₃).

trans-2,3-Bis(4-chlorophenyl)-*N*-(6-methylpyridin-2-yl)-1-oxo-1,2,3,4-tetrahydroisochinolin-4-carboxamid (*trans*-**24o**)

Trans-**36f** (410 mg, 1.0 mmol) wurde mit NEt₃ (140 μL, 1.0 mmol), 2,2,2-Trichlor-1,1-dimethylethylchlorformiat (360 mg, 1.5 mmol) und 2-Amino-6-picolin (150 μL, 1.5 mmol) in CH₃CN (5 mL) umgesetzt. Der ausgefallene Feststoff wurde nach 24 h abfiltriert, in CHCl₃

aufgenommen und mit wässriger Ameisensäure (5%) extrahiert. Die organische Phase wurde über wasserfr. Na₂SO₄ getrocknet und anschließend eingedampft. Der Rückstand wurde aus EtOAc umkristallisiert.

Farbloser Feststoff

C₂₈H₂₁Cl₂N₃O₂ 502,4 g/mol

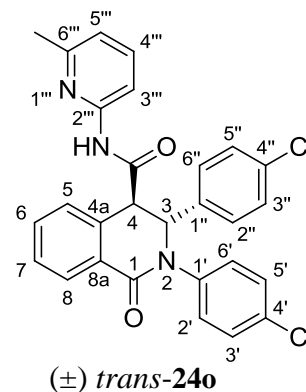
Ausbeute: 387 mg (0.8 mmol, 77%).

Schmp: 241–242 °C (EtOAc).

Reinheit: > 99% (HPLC-Methode I, λ = 254 nm,
t_R = 25.0 min).

logD_{7.4}: 3.9 (HPLC-Methode II).

PSA: 66.5 Å²



IR (ATM, $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹]): 3238, 1684, 1632, 1604, 1578, 1542, 1508, 1452, 1434, 1035, 825, 789, 743.

¹H NMR (DMSO, δ [ppm], *J* [Hz]): 10.99 (s, 1 H, CONH), 8.02 (dd, 7.5 Hz, 1.5 Hz, 1 H, 8-H), 7.85 (d, 7.8 Hz, 1 H, 3'''-H), 7.66 (t, 7.8 Hz, 1 H, 4'''-H), 7.50 (dt, 7.3 Hz, 1.5 Hz, 1 H, 6-H), 7.47–7.39 (m, 4 H, 5-H, 7-H, 2'/6'-H), 7.35 (br. s, 4 H, 2''/6''-H, 3''/5''-H), 7.30 (ddd, 8.8 Hz, 3.0 Hz, 2.1 Hz, 2 H, 3'/5'-H), 6.99 (d, 7.8 Hz, 1 H, 5'''-H), 5.62 (d, 1.6 Hz, 1 H, 3-H), 4.48 (br. s, 1 H, 4-H), 2.43 (s, 3 H, C-6'''-CH₃).

¹³C NMR (DMSO, δ [ppm], *J* [Hz]): 169.5 (CONH), 162.7 (C-1), 156.5 (C-6'''), 151.0 (C-2'''), 141.3 (C-1'), 138.7 (C-1''), 138.5 (C-4'''), 133.9 (C-4a), 132.6 (C-6), 132.2 (C-4''), 130.7 (C-4'), 129.4 (C-8a), 128.7 (2 C, C-3''/5'''), 128.5 (2 C, C-2'/6'), 128.2 (4 C, C-3'/5', C-2''/6''), 128.13 (C-5 oder C-7), 128.10 (C-5 oder C-7), 127.5 (C-8), 118.9 (C-5'''), 110.5 (C-3'''), 63.6 (C-3), 50.8 (C-4), 23.4 (C-6'''-CH₃).

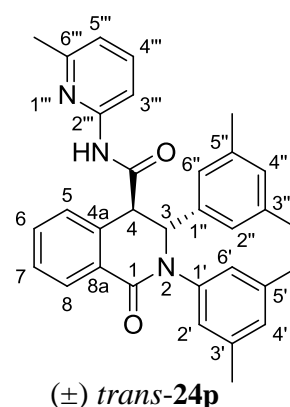
trans-2,3-Bis(3,5-dimethylphenyl)-*N*-(6-methylpyridin-2-yl)-1-oxo-1,2,3,4-tetrahydroisoquinolin-4-carboxamid (*trans*-**24p**)

Trans-**36g** (400 mg, 1.0 mmol) wurde mit NEt₃ (140 μL, 1.0 mmol), 2,2,2-Trichlor-1,1-dimethylethylchlorformiat (360 mg, 1.5 mmol) und 2-Amino-6-picolin (150 μL, 1.5 mmol) in CH₃CN (5 mL) umgesetzt. Der ausgefallene Feststoff wurde nach 14 h abfiltriert, in CHCl₃ aufgenommen und mit wässriger Ameisensäure (5%) extrahiert. Die organische Phase wurde

über wasserfr. Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel anschließend eingedampft. Der zurückgebliebene Feststoff wurde aus EtOAc umkristallisiert.

Farbloser Feststoff

C ₃₂ H ₃₁ N ₃ O ₂	489.6 g/mol
Ausbeute:	462 mg (0.9 mmol, 94%).
Schmp:	281–283 °C (EtOAc).
Reinheit:	98% (HPLC-Methode I, λ = 254 nm, t _R = 25.8 min).
logD _{7.4} :	4.2 (HPLC-Methode II).
PSA:	65.2 Å ²



IR (ATM, $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹]): 3261, 2920, 1692, 1632, 1600, 1578, 1508, 1452, 1153, 852, 781, 731.

¹H NMR (DMSO, δ [ppm], *J* [Hz]): 11.06 (s, 1 H, CONH), 8.02–7.98 (m, 1 H, 8-H), 7.86 (d, 7.8 Hz, 1 H, 3'''-H), 7.67 (t, 7.8 Hz, 1 H, 4'''-H), 7.48–7.39 (m, 2 H, 6-H, 7-H), 7.34–7.30 (m, 1 H, 5-H), 6.99 (d, 7.8 Hz, 1 H, 5'''-H), 6.96 (s, 2 H, 2''/6''-H), 6.87 (s, 2 H, 2'/6'-H), 6.85 (s, 1 H, 4'-H), 6.81 (s, 1 H, 4''-H), 5.43 (s, 1 H, 3-H), 4.45 (s, 1 H, 4-H), 2.44 (s, 3 H, C-6'''-CH₃), 2.16 (s, 12 H, C-3'/5'-CH₃, C-3''/5''-CH₃).

¹³C NMR (DMSO, δ [ppm], *J* [Hz]): 169.7 (CONH), 162.8 (C-1), 156.5 (C-6'''), 151.1 (C-2'''), 142.6 (C-1'), 139.8 (C-1''), 138.5 (C-4'''), 137.6 (2 C, C-3'/5' oder C-3''/5''), 137.2 (2 C, C-3'/5' oder C-3''/5''), 134.0 (C-4a), 132.1 (C-6), 130.4 (C-8a), 128.8 (C-4''), 128.1 (C-5), 127.84 (C-7 oder C-4'), 127.81 (C-7 oder C-4'), 127.2 (C-8), 124.03 (2 C, C-2''/6''), 124.00 (2 C, C-2'/6'), 118.8 (C-5'''), 110.5 (C-3'''), 64.8 (C-3), 51.5 (C-4), 23.4 (C-6'''-CH₃), 20.9 (2 C, C-3''/5''-CH₃), 20.7 (2 C, C-3'/5'-CH₃).

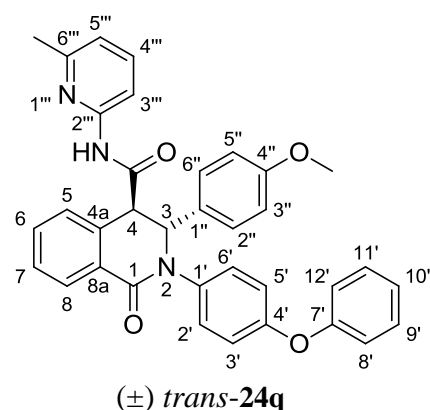
trans-3-(4-Methoxyphenyl)-*N*-(6-methylpyridin-2-yl)-1-oxo-2-(4-phenoxyphenyl)-1,2,3,4-tetrahydroisochinolin-4-carboxamid (*trans*-**24q**)

Trans-**36h** (465 mg, 1.0 mmol) wurde mit NEt₃ (140 μL, 1.0 mmol), 2,2,2-Trichlor-1,1-dimethylethylchlorformiat (360 mg, 1.5 mmol) und 2-Amino-6-picolin (150 μL, 1.5 mmol) in CH₃CN (5 mL) umgesetzt. Der ausgefallene Feststoff wurde nach 14 h abfiltriert, in CHCl₃ aufgenommen und mit wässriger Ameisensäure (5%) extrahiert. Die organische Phase wurde

über wasserfr. Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel anschließend eingedampft. Der Rückstand wurde aus CHCl₃ umkristallisiert.

Farbloser Feststoff

C ₃₅ H ₂₉ N ₃ O ₄	555.6 g/mol
Ausbeute:	461 mg (0.8 mmol, 83%).
Schmp:	240–242 °C (CHCl ₃).
Reinheit:	> 99% (HPLC-Methode I, λ = 254 nm, t _R = 25.3 min).
logD _{7.4} :	4.0 (HPLC-Methode II).
PSA:	78.0 Å ²



IR (ATM, $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹]): 3276, 1682, 1631, 1601, 1578, 1524, 1503, 1454, 1226, 1158, 1032, 839, 790, 745, 691.

¹H NMR (DMSO, δ [ppm], *J* [Hz]): 10.98 (s, 1 H, CONH), 8.02 (dd, 7.5 Hz, 1.5 Hz, 1 H, 8-H), 7.86 (d, 8.0 Hz, 1 H, 3''-H), 7.65 (t, 8.0 Hz, 1 H, 4''-H), 7.51–7.41 (m, 2 H, 6-H, 7-H), 7.41–7.34 (m, 3 H, 5-H, 9'/11'-H), 7.27 (ddd, 9.0 Hz, 3.3 Hz, 2.2 Hz, 2 H, 2'/6'-H), 7.24 (ddd, 8.8 Hz, 2.9 Hz, 1.8 Hz, 2 H, 2''/6''-H), 7.13 (tt, 7.4 Hz, 1.0 Hz, 1 H, 10'-H), 7.01–6.96 (m, 5 H, 3'/5'-H, 8'/12'-H, 5'''-H), 6.83 (ddd, 8.8 Hz, 2.9 Hz, 1.8 Hz, 2 H, 3''/5''-H), 5.49 (s, 1 H, 3-H), 4.45 (s, 1 H, 4-H), 3.67 (s, 3 H, C-4''-OCH₃), 2.43 (s, 3 H, C-6'''-CH₃).

¹³C NMR (DMSO, δ [ppm], *J* [Hz]):): 169.8 (CONH), 162.8 (C-1), 158.4 (C-4''), 156.5 (C-6'''), 156.4 (C-7'), 154.6 (C-4'), 151.0 (C-2'''), 138.5 (C-4'''), 137.9 (C-1'), 134.2 (C-4a), 132.2 (C-6), 131.6 (C-1''), 129.9 (3 C, C-8a, C-9'/11'), 128.2 (C-5), 128.0 (2 C, C-2'/6'), 127.9 (C-7), 127.5 (2 C, C-2''/6''), 127.4 (C-8), 123.4 (C-10'), 118.9 (C-5'''), 118.6 (2 C, C-3'/5' oder C-8'/12'), 118.5 (2 C, C-3'/5' oder C-8'/12'), 113.8 (2 C, C-3''/5''), 110.5 (C-3'''), 64.1 (C-3), 54.9 (C-4''-OCH₃), 51.4 (C-4), 23.4 (C-6'''-CH₃).

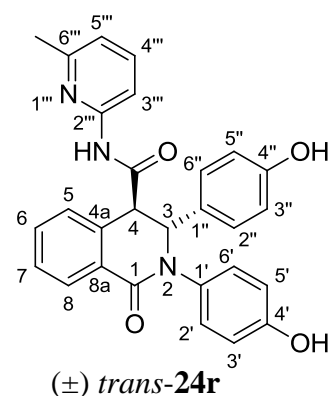
trans-2,3-Bis(4-hydroxyphenyl)-N-(6-methylpyridin-2-yl)-1-oxo-1,2,3,4-tetrahydroiso-
chinolin-4-carboxamid (*trans*-**24r**)

Zu einer Lösung von 1.05 g (2.0 mmol) *trans*-**24a** in abs. CH₂Cl₂ (50 mL) wurden unter Argon-Atmosphäre bei 0 °C langsam 2.3 mL (24 mmol) Bortribromid zugegeben. Die Reaktionsmischung wurde 24 h bei RT gerührt, anschließend durch Zugabe von MeOH (20

mL) gequenched und weitere 72 h gerührt. Das organische Lösungsmittel wurde entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch gereinigt (Kieselgel, CHCl₃/EtOH 10:1, R_f = 0.33).

Farbloser Feststoff

C₂₈H₂₃N₃O₄ 465.5 g/mol
 Ausbeute: 575 mg (1.2 mmol, 61%).
 Schmp: 298–301 °C (Zersetzung).
 Reinheit: 98% (HPLC-Methode I, λ = 254 nm, t_R = 18.7 min).
 logD_{7.4}: 0.9 (HPLC-Methode II).
 PSA: 112.9 Å²



IR (ATM, $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹]): 3361, 3074, 1697, 1646, 1609, 1579, 1544, 1513, 1460, 1227, 1165, 827, 742.

¹H NMR (DMSO, δ [ppm], *J* [Hz]): 10.93 (s, 1 H, CONH), 9.45 (s, 1 H, C-4'-OH), 9.34 (s, 1 H, C-4''-OH), 8.80 (ddd, 8.8 Hz, 3.3 Hz, 2.1 Hz, 2 H, 2'/6'-H), 7.99 (dd, 7.3 Hz, 1.6 Hz, 1 H, 8-H), 7.87 (d, 8.1 Hz, 1 H, 3'''-H), 7.66 (dd, 8.1 Hz, 7.6 Hz, 1 H, 4'''-H), 7.46 (dt, 7.3 Hz, 1.6 Hz, 1 H, 6-H), 7.42 (dt, 7.3 Hz, 1.4 Hz, 1 H, 7-H), 7.36 (dd, 7.2 Hz, 1.4 Hz, 1 H, 5-H), 7.08 (ddd, 8.6 Hz, 3.0 Hz, 1.9 Hz, 2 H, 2''/6''-H), 6.98 (d, 7.6 Hz, 1 H, 5'''-H), 6.69 (ddd, 8.8 Hz, 3.3 Hz, 2.1 Hz, 2 H, 3'/5'-H), 6.62 (ddd, 8.6 Hz, 3.0 Hz, 1.9 Hz, 2 H, 3''/5''-H), 5.30 (s, 1 H, 3-H), 4.38 (s, 1 H, 4-H), 2.43 (s, 3 H, C-6'''-CH₃).

¹³C NMR (DMSO, δ [ppm], *J* [Hz]): 169.9 (CONH), 162.7 (C-1), 156.50 (C-4'' oder C-6'''), 156.48 (C-4'' oder C-6'''), 155.7 (C-4'), 151.1 (C-2'''), 138.5 (C-4'''), 134.17 (C-4a oder C-1'), 134.08 (C-4a oder C-1'), 132.0 (C-6), 130.3 (C-1''), 130.1 (C-8a), 128.1 (C-5), 127.8 (C-7), 127.7 (2 C, C-2'/6'), 127.5 (2 C, C-2''/6''), 127.3 (C-8), 118.8 (C-5'''), 115.04 (2 C, C-3'/5' oder C-3''/5''), 114.98 (2 C, C-3'/5' oder C-3''/5''), 110.5 (C-3'''), 64.7 (C-3), 51.5 (C-4), 23.4 (C-6'''-CH₃).

10 Lipophiliebestimmung

Probenvorbereitung: Etwa 4 mg der zu testenden Substanz (Referenzverbindung oder Carboxamid **24a, c-s**) wurden in 1 mL DMSO gelöst. 10 µL dieser Probelösung wurden mit 990 µL der mobilen Phase verdünnt, sodass eine Endkonzentration von 40 µg/mL vorlag. Vor Applikation wurde die Probe zentrifugiert.

HPLC-Methode: siehe Kapitel 8.2 (Methode II)

Probengabe: Es wurde ein Volumen von 40 µL pro HPLC-Lauf injiziert.

Der Kapazitätsfaktor k' der untersuchten Substanzen wurde nach folgender Formel aus den jeweiligen Retentionszeiten (t_R) und der Totzeit (t_0) errechnet.

$$k' = \frac{t_R - t_0}{t_0}$$

Auf Basis der literaturbekannten LogP-Werte^[153] der Referenzsubstanzen wurden *via* linearer Regression die Parameter a und b der Geradengleichung bestimmt, die den Zusammenhang zwischen Verteilungskoeffizient und Kapazitätsfaktor herstellt.

$$\log P/D = a \cdot \log k' + b$$

Der Verteilungskoeffizient der Carboxamide **24 a, c-s** wurde anschließend unter Verwendung der entsprechenden k' -Werte mit Hilfe dieser Gleichung errechnet. Die $\log D_{7.4}$ -Werte der Verbindungen **24 a, c-s** wurden in vier Chargen ermittelt (Tabelle 28–31) und dabei stets die die Retentionszeiten der Referenzsubstanzen neu bestimmt. Die Berechnung der $\log D_{7.4}$ -Werte wurde mit Hilfe der entsprechenden Geradengleichungen durchgeführt um Schwankungen auszugleichen, die trotz gleicher Bedingungen entstanden sind.

#	Verbindung	t _R [min]	log k'	logP / logD _{7,4}	Geradengleichung
1	2-Phenylethanol	1.90	-0.38	1.36	y = 2.2544x + 2.0409 R ² = 0.98
2	Benzol	3.13	0.12	2.13	
3	Chlorbenzol	4.32	0.35	2.89	
4	Toluol	4.49	0.37	2.73	
5	Ethylbenzol	6.25	0.56	3.15	
6	Biphenyl	9.35	0.78	4.01	
7	Anthracen	16.48	1.05	4.45	
8	24a	4.36	0.35	2.83	
9	24b	4.72	0.40	2.94	
10	24c	3.27	0.16	2.40	
11	24d	6.52	0.59	3.36	
12	24e	2.23	-0.18	1.64	
13	24g	6.63	0.59	3.38	
14	24h	4.37	0.34	2.81	
15	24i	4.31	0.35	2.82	
16	24m	4.29	0.33	2.78	
17	24r	1.77	-0.49	0.93	

Tabelle 28: Retentionszeiten, log k', logP- und logD_{7,4}-Werte der Referenzsubstanzen und Carboxamide **24** (Teil I).

#	Verbindung	t _R [min]	log k'	logP / logD _{7,4}	Geradengleichung
1	2-Phenylethanol	1.73	-0.51	1.36	y = 2.1901x + 2.2845 R ² = 0.97
2	Benzol	2.74	0.03	2.13	
3	Chlorbenzol	3.69	0.25	2.89	
4	Toluol	3.82	0.28	2.73	
5	Ethylbenzol	5.22	0.47	3.15	
6	Biphenyl	7.55	0.67	4.01	
7	Anthracen	13.42	0.96	4.45	
8	24f	1.96	-0.30	1.63	

Tabelle 29: Retentionszeiten, log k', logP- und logD_{7,4}-Werte der Referenzsubstanzen und Carboxamide **24** (Teil II).

#	Verbindung	t_R [min]	log k'	logP / logD _{7,4}	Geradengleichung
1	2-Phenylethanol	1.80	-0.52	1.36	$y = 2.0966x + 2.2643$ $R^2 = 0.97$
2	Benzol	2.89	0.04	2.13	
3	Chlorbenzol	3.94	0.27	2.89	
4	Toluol	4.09	0.29	2.73	
5	Ethylbenzol	5.60	0.49	3.15	
6	Biphenyl	8.45	0.71	4.01	
7	Anthracen	16.16	1.03	4.45	
8	24j	2.20	-0.22	1.81	
9	24k	2.37	-0.14	1.98	
10	24l	4.87	0.41	3.12	

Tabelle 30: Retentionszeiten, log k' -, logP- und logD_{7,4}-Werte der Referenzsubstanzen und Carboxamide **24** (Teil III).

#	Verbindung	t_R [min]	log k'	logP / logD _{7,4}	Geradengleichung
1	2-Phenylethanol	1.71	-0.56	1.36	$y = 2.1702x + 2.3584$ $R^2 = 0.97$
2	Benzol	2.68	0.01	2.13	
3	Chlorbenzol	3.52	0.22	2.89	
4	Toluol	3.67	0.25	2.73	
5	Ethylbenzol	4.97	0.44	3.15	
6	Biphenyl	7.19	0.64	4.01	
7	Anthracen	12.71	0.93	4.45	
8	24n	3.78	0.26	2.91	
9	24o	7.91	0.70	3.87	
10	24p	11.03	0.86	4.23	
11	24q	8.71	0.75	3.98	

Tabelle 31: Retentionszeiten, log k' -, logP- und logD_{7,4}-Werte der Referenzsubstanzen und Carboxamide **24** (Teil IV).

11 Röntgenstrukturanalyse

Struktur- und Ortsparameter der Röntgenbeugungsanalyse des Ugi-Produkts **26h**.

Summenformel	$C_{23}H_{26}BrClN_2O_2$
CCDC-Nummer	nicht veröffentlicht
Molekulargewicht [$g \cdot mol^{-1}$]	477.82
Messtemperatur [K]	100(2)
Kristallabmessungen [mm^3]	0.16 x 0.12 x 0.09
Strahlung, λ [Å]	$Mo_{K\alpha}$ 0.71073
Kristallsystem	triklin
Raumgruppe	<i>P</i> -1
<i>a</i> [Å]	10.2480(12)
<i>b</i> [Å]	10.7009(13)
<i>c</i> [Å]	11.5476(13)
α (°), β (°), γ (°)	102.054(5), 105.462(5), 102.401(5)
<i>V</i> [Å ³]	1143.4(2)
<i>Z</i>	2
Berechnete Kristalldichte [$Mg \cdot m^{-3}$]	1.388
Absorptionskoeffizient [mm^{-1}]	1.935
<i>F</i> (000)	492
Beugungsbereich θ [°]	1.91–26.73
Gesammelte Reflexe	53810
Unabhängige Reflexe	4818
Minimale / Maximale Transmission	0.6340 / 0.7454
Daten / Parameter / restraints	4818 / 266 / 0
Gütefaktor (GoF)	1.051
R-Werte [$I > 2\sigma(I)$]	$R_1 = 0.0265$, $wR_2 = 0.0749$
R-Werte (alle Daten)	$R_1 = 0.0292$, $wR_2 = 0.0765$
Maximale / Minimale Restelektronendichte [$e \cdot \text{Å}^{-3}$]	0.453 / -0.337

Struktur- und Ortsparameter der Röntgenbeugungsanalyse des Tetrahydroisochinolinons 25e.

Summenformel	$C_{27}H_{32}N_2O_3$
CCDC-Nummer	nicht veröffentlicht
Molekulargewicht [$g \cdot mol^{-1}$]	432.55
Messtemperatur [K]	100(2)
Kristallabmessungen [mm^3]	0.22 x 0.15 x 0.15
Strahlung, λ [Å]	$Mo_{K\alpha}$ 0.71073
Kristallsystem	orthorhombisch
Raumgruppe	$Pna2_1$
a [Å]	13.985(6)
b [Å]	9.813(5)
c [Å]	16.954(8)
α (°), β (°), γ (°)	90.0, 90.0, 90.0
V [Å ³]	2326.6(18)
Z	4
Berechnete Kristalldichte [$Mg \cdot m^{-3}$]	1.235
Absorptionskoeffizient [mm^{-1}]	0.080
$F(000)$	928
Beugungsbereich θ [°]	2.40–26.94
Gesammelte Reflexe	15033
Unabhängige Reflexe	4600
Minimale / Maximale Transmission	0.6372 / 0.7454
Daten / Parameter / restraints	4600 / 300 / 45
Gütefaktor (GoF)	1.049
R-Werte [$I > 2\sigma(I)$]	$R_1 = 0.0602$, $wR_2 = 0.1644$
R-Werte (alle Daten)	$R_1 = 0.0763$, $wR_2 = 0.1759$
Maximale / Minimale Restelektronendichte [$e \cdot \text{Å}^{-3}$]	0.865 / -0.335

Struktur- und Ortsparameter der Röntgenbeugungsanalyse des 2,5-Diketopiperazins trans-35b.

Summenformel	C₃₂H₂₉N₃O₅S
CCDC-Nummer	CCDC-910534
Molekulargewicht [g·mol ⁻¹]	567.64
Messtemperatur [K]	173(2)
Kristallabmessungen [mm ³]	0.24 x 0.06 x 0.05
Strahlung, λ [Å]	Mo _{Kα} 0.71073
Kristallsystem	monoklin
Raumgruppe	P2 ₁ /n (14)
a [Å]	5.7974(8)
b [Å]	23.460(3)
c [Å]	20.101(3)
α (°),β (°),γ (°)	90.0, 96.219(3), 90.0
V [Å ³]	2717.8(6)
Z	4
Berechnete Kristalldichte [Mg·m ⁻³]	1.387
Absorptionskoeffizient [mm ⁻¹]	0.168
F(000)	1192
Beugungsbereich θ [°]	1.74–25.00
Gesammelte Reflexe	20749
Unabhängige Reflexe	4764 [R(int) = 0.0961]
Minimale / Maximale Transmission	0.9609 / 0.9917
Daten / Parameter / restraints	0961 / 371 / 0
Gütefaktor (GoF)	1.096
R-Werte [I>2σ(I)]	R ₁ = 0.0919, wR ₂ = 0.2218
R-Werte (alle Daten)	R ₁ = 0.1359, wR ₂ = 0.2499
Maximale / Minimale Restelektronendichte [e·Å ⁻³]	0.566 / -0.427

Struktur- und Ortsparameter der Röntgenbeugungsanalyse des Tetrahydroisochinolinon-carboxamids trans-24n.

Summenformel	C ₂₉ H ₂₂ Cl ₃ F ₂ N ₃ O ₂
CCDC-Nummer	CCDC-885355
Molekulargewicht [g·mol ⁻¹]	588.85
Messtemperatur [K]	100(2)
Kristallabmessungen [mm ³]	0.27 x 0.15 x 0.12
Strahlung, λ [Å]	MoK _α 0.71073
Kristallsystem	monoklin
Raumgruppe	P2 ₁ /n
a [Å]	13.2570(17)
b [Å]	14.2765(18)
c [Å]	14.2363(16)
α (°),β (°),γ (°)	90.0, 95.143(4), 90.0
V [Å ³]	2683.6(6)
Z	4
Berechnete Kristalldichte [Mg·m ⁻³]	1.457
Absorptionskoeffizient [mm ⁻¹]	0.389
F(000)	1208
Beugungsbereich θ [°]	2.01–26.37
Gesammelte Reflexe	14108
Unabhängige Reflexe	5420
Minimale / Maximale Transmission	0.6273 / 0.7454
Daten / Parameter / restraints	5420 / 353 / 0
Gütefaktor (GoF)	1.031
R-Werte [I>2σ(I)]	R ₁ = 0.0484, wR ₂ = 0.1116
R-Werte (alle Daten)	R ₁ = 0.0791, wR ₂ = 0.1252
Maximale / Minimale Restelektronendichte [e·Å ⁻³]	0.422 / -0.439

LITERATUR UND ANMERKUNGEN

- [1] Richard Nixon: "Annual Message to the Congress on the State of the Union.," January 22, 1971. Online by Gerhard Peters and John T. Woolley, The American Presidency Project. <http://www.presidency.ucsb.edu/ws/?pid=3110>; Seite aufgerufen 01/2013.
- [2] T. DeVita Vincent, Jr., The 'War on Cancer' and its impact. *Nat. Clin. Pract. Oncol.* **2004**, *1*, 55.
- [3] P. Kaatsch; C. Spix; A. Katalinic; S. Hentschel, *Krebs in Deutschland 2007/2008*. Robert Koch-Institut (Hrsg) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg): Berlin, **2012**.
- [4] J. Bertz; S. Dahm; J. Haberland; K. Kraywinkel; B.-M. Kurth; U. Wolf, *Verbreitung von Krebserkrankungen in Deutschland - Entwicklung der Prävalenzen zwischen 1990 und 2010*. Robert Koch-Institut (Hrsg): Berlin, **2010**.
- [5] M. Center; R. Siegel; A. Jemal, *Global Cancer Facts & Figures 2nd Edition*. American Cancer Society: Atlanta, **2011**.
- [6] H. Varmus, The New Era in Cancer Research. *Science* **2006**, *312*, 1162-1165.
- [7] P. Workman, Genomics and the second golden era of cancer drug development. *Mol. BioSyst.* **2005**, *1*, 17-26.
- [8] E. C. Friedberg, Harold Varmus. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2008**, *9*, 502-503.
- [9] Bild "Harold Varmus" von http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Nci-vol-8619-300_Harold_Vamus_cropped.jpg; Seite aufgerufen 01/2013; Lizenzfrei veröffentlicht unter "Public Domain".
- [10] B. A. Chabner; T. G. Roberts, Chemotherapy and the war on cancer. *Nat. Rev. Cancer* **2005**, *5*, 65-72.
- [11] L. S. Goodman; M. M. Wintrobe; W. Dameshek; M. J. Goodman; A. Gilman; M. T. McLennan, Nitrogen mustard therapy. Use of methylbis(2-chloroethyl)amine hydrochloride and tris(2-chloroethyl)amine hydrochloride for Hodgkin's disease, lymphosarcoma, leukemia and certain allied and miscellaneous disorders. *J. Am. Med. Assoc.* **1946**, *132*, 126-132.
- [12] C. G. Moertel; T. R. Fleming; J. S. Macdonald; D. G. Haller; J. A. Laurie; P. J. Goodman; J. S. Ungerleider; W. A. Emerson; D. C. Tormey; J. H. Glick; et al., Levamisole and fluorouracil for adjuvant therapy of resected colon carcinoma. *N. Engl. J. Med.* **1990**, *322*, 352-358.
- [13] B. Rosenberg; L. Van Camp; T. Krigas, Inhibition of Cell Division in Escherichia coli by Electrolysis Products from a Platinum Electrode. *Nature* **1965**, *205*, 698-699.
- [14] B. D. Evans; K. S. Raju; A. H. Calvert; S. J. Harland; E. Wiltshaw, Phase II study of JM8, a new platinum analog, in advanced ovarian carcinoma. *Canc. Treat. Rep.* **1983**, *67*, 997-1000.
- [15] I. Collins; P. Workman, New approaches to molecular cancer therapeutics. *Nat. Chem. Biol.* **2006**, *2*, 689-700.
- [16] P. Workman, Scoring a bull's-eye against cancer genome targets. *Curr. Opin. Pharmacol.* **2001**, *1*, 342-352.
- [17] B. J. Druker; M. Talpaz; D. J. Resta; B. Peng; E. Buchdunger; J. M. Ford; N. B. Lydon; H. Kantarjian; R. Capdeville; S. Ohno-Jones; C. L. Sawyers, Efficacy and Safety of a Specific Inhibitor of the BCR-ABL Tyrosine Kinase in Chronic Myeloid Leukemia. *N. Engl. J. Med.* **2001**, *344*, 1031-1037.
- [18] A. Balmain; J. Gray; B. Ponder, The genetics and genomics of cancer. *Nat. Genet.* **2003**, *33*, 238-244.
- [19] A. Paramore; S. Frantz, Bortezomib. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2003**, *2*, 611-612.
- [20] R. Siegel; D. Naishadham; A. Jemal, Cancer statistics, 2012. *CA-Cancer J. Clin.* **2012**, *62*, 10-29.
- [21] R. Kupperts, Mechanisms of B-cell lymphoma pathogenesis. *Nat. Rev. Cancer* **2005**, *5*, 251-262.

- [22] R. A. Kyle; S. V. Rajkumar, Criteria for diagnosis, staging, risk stratification and response assessment of multiple myeloma. *Leukemia* **2008**, *23*, 3-9.
- [23] Alexanian R; Haut A.; Khan A. U., Treatment for multiple myeloma: Combination chemotherapy with different melphalan dose regimens. *J. Am. Med. Assoc.* **1969**, *208*, 1680-1685.
- [24] A. Osterborg; M. Bjorkholm; M. Bjoreman; G. Brenning; K. Carlson; F. Celsing; G. Gahrton; G. Grimfors; H. Gyllenhammar; R. Hast, Natural interferon-alpha in combination with melphalan/prednisone versus melphalan/prednisone in the treatment of multiple myeloma stages II and III: a randomized study from the Myeloma Group of Central Sweden. *Blood* **1993**, *81*, 1428-1434.
- [25] A. Mahindra; J. Laubach; N. Raje; N. Munshi; P. G. Richardson; K. Anderson, Latest advances and current challenges in the treatment of multiple myeloma. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **2012**, *9*, 135-143.
- [26] S. Lonial, Multiple Myeloma: Novel Approaches for Relapsed Disease. *Clin. Lymphoma Myeloma Leuk.* **2007**, *8*, S18-S23.
- [27] R. Popovic; J. D. Licht, MEK and MAF in myeloma therapy. *Blood* **2011**, *117*, 2300-2302.
- [28] K. Podar; D. Chauhan; K. C. Anderson, Bone marrow microenvironment and the identification of new targets for myeloma therapy. *Leukemia* **2008**, *23*, 10-24.
- [29] M. Landriscina; M. R. Amoroso; A. Piscazzi; F. Esposito, Heat shock proteins, cell survival and drug resistance: The mitochondrial chaperone TRAP1, a potential novel target for ovarian cancer therapy. *Gynecol. Oncol.* **2010**, *117*, 177-182.
- [30] M. Chatterjee; S. Jain; T. Stuehmer; M. Andrulis; U. Ungethuen; R.-J. Kuban; H. Lorentz; K. Bommert; M. Topp; D. Kraemer; H. K. Mueller-Hermelink; H. Einsele; A. Greiner; R. C. Bargou, STAT3 and MAPK signaling maintain overexpression of heat shock proteins 90 α and β in multiple myeloma cells, which critically contribute to tumor-cell survival. *Blood* **2007**, *109*, 720-728.
- [31] Y. Tu; A. Gardner; A. Lichtenstein, The Phosphatidylinositol 3-Kinase/AKT Kinase Pathway in Multiple Myeloma Plasma Cells: Roles in Cytokine-dependent Survival and Proliferative Responses. *Cancer Res.* **2000**, *60*, 6763-6770.
- [32] F. U. Hartl; A. Bracher; M. Hayer-Hartl, Molecular chaperones in protein folding and proteostasis. *Nature* **2011**, *475*, 324-332.
- [33] F. U. Hartl; M. Hayer-Hartl, Molecular Chaperones in the Cytosol: from Nascent Chain to Folded Protein. *Science* **2002**, *295*, 1852-1858.
- [34] D. D. Mosser; R. I. Morimoto, Molecular chaperones and the stress of oncogenesis. *Oncogene* **2004**, *23*, 2907-2918.
- [35] D. R. Ciocca; A. P. Arrigo; S. K. Calderwood, Heat shock proteins and heat shock factor 1 in carcinogenesis and tumor development: an update. *Arch. Toxicol.* **2013**, *87*, 19-48.
- [36] L. Neckers; P. Workman, Hsp90 Molecular Chaperone Inhibitors: Are We There Yet? *Clin. Cancer Res.* **2012**, *18*, 64-76.
- [37] P. Workman, Combinatorial attack on multistep oncogenesis by inhibiting the Hsp90 molecular chaperone. *Cancer Lett.* **2004**, *206*, 149-157.
- [38] C. S. Mitsiades; N. S. Mitsiades; C. J. McMullan; V. Poulaki; A. L. Kung; F. E. Davies; G. Morgan; M. Akiyama; R. Shringarpure; N. C. Munshi; P. G. Richardson; T. Hideshima; D. Chauhan; X. Gu; C. Bailey; M. Joseph; T. A. Libermann; N. S. Rosen; K. C. Anderson, Antimyeloma activity of heat shock protein-90 inhibition. *Blood* **2006**, *107*, 1092-1100.
- [39] T. Stuehmer; A. Zollinger; D. Siegmund; M. Chatterjee; E. Grella; S. Knop; M. Kortum; C. Unzicker; M. R. Jensen; C. Quadt; P. Chene; J. Schoepfer; C. Garcia-Echeverria; H. Einsele; H. Wajant; R. C. Bargou, Signalling profile and antitumour activity of the novel Hsp90 inhibitor NVP-AUY922 in multiple myeloma. *Leukemia* **2008**, *22*, 1604-1612.
- [40] T. Stuehmer; M. Chatterjee; E. Grella; R. Seggewiss; C. Langer; S. Muller; J. Schoepfer; C. Garcia-Echeverria; C. Quadt; M. R. Jensen; H. Einsele; R. C. Bargou, Anti-myeloma activity of the novel 2-aminothienopyrimidine Hsp90 inhibitor NVP-BEP800. *Br. J. Haematol.* **2009**, *147*, 319-327.

- [41] T. Stühmer; K. Iskandarov; Z. Gao; T. Bumm; E. Grella; M. R. Jensen; H. Einsele; M. Chatterjee; R. C. Bargou, Preclinical Activity of the Novel Orally Bioavailable HSP90 Inhibitor NVP-HSP990 against Multiple Myeloma Cells. *Anticancer Res.* **2012**, *32*, 453-462.
- [42] P. G. Richardson; A. A. Chanan-Khan; M. Alsina; M. Albitar; D. Berman; M. Messina; C. S. Mitsiades; K. C. Anderson, Tanespimycin monotherapy in relapsed multiple myeloma: results of a phase 1 dose-escalation study. *Br. J. Haematol.* **2010**, *150*, 438-445.
- [43] M. V. Powers; P. A. Clarke; P. Workman, Dual targeting of HSC70 and HSP72 inhibits HSP90 function and induces tumor-specific apoptosis. *Cancer Cell* **2008**, *14*, 250-262.
- [44] T. Heimberger; M. Andrulis; S. Riedel; T. Stühmer; H. Schraud; A. Beilhack; T. Bumm; B. Bogen; H. Einsele; R. C. Bargou; M. Chatterjee, The heat shock transcription factor 1 as a potential new therapeutic target in multiple myeloma. *Br. J. Haematol.* **2013**, *160*, 465-476.
- [45] M. Chatterjee; M. Andrulis; T. Stuhmer; E. Muller; C. Hofmann; T. Steinbrunn; T. Heimberger; H. Schraud; S. Kressmann; H. Einsele; R. C. Bargou, The PI3K/Akt signalling pathway regulates the expression of Hsp70, which critically contributes to Hsp90-chaperone function and tumor cell survival in multiple myeloma. *Haematologica* **2012**, *in Druck*, doi: 10.3324/haematol.2012.066175.
- [46] L. Whitesell; S. Lindquist, Inhibiting the transcription factor HSF1 as an anticancer strategy. *Expert Opin. Ther. Targets* **2009**, *13*, 469-478.
- [47] E. de Billy; M. V. Powers; J. R. Smith; P. Workman, Drugging the heat shock factor I pathway: Exploitation of the critical cancer cell dependence on the guardian of the proteome. *Cell Cycle* **2009**, *8*, 3806-3808.
- [48] HSF-1/HSP Schema: <http://qian.human.cornell.edu/research-hsr.htm>; Seite aufgerufen 01/2013.
- [49] N. Zaarur; L. Gabai Vladimir; A. Porco John, Jr.; S. Calderwood; Y. Sherman Michael, Targeting heat shock response to sensitize cancer cells to proteasome and Hsp90 inhibitors. *Cancer Res.* **2006**, *66*, 1783-1791.
- [50] S. Vispé; L. DeVries; L. Créancier; J. Besse; S. Bréand; D. J. Hobson; J. Q. Svejstrup; J.-P. Annereau; D. Cussac; C. Dumontet; N. Guilbaud; J.-M. Barret; C. Bailly, Triptolide is an inhibitor of RNA polymerase I and II-dependent transcription leading predominantly to down-regulation of short-lived mRNA. *Mol. Cancer Ther.* **2009**, *8*, 2780-2790.
- [51] A. De Thonel; V. Mezger; C. Garrido, Implication of Heat Shock Factors in Tumorigenesis: Therapeutical Potential. *Cancers* **2011**, *3*, 1158-1181.
- [52] Y. J. Yoon; J. A. Kim; K. D. Shin; D.-S. Shin; Y. M. Han; Y. J. Lee; J. S. Lee; B.-M. Kwon; D. C. Han, KRIBB11 Inhibits HSP70 Synthesis through Inhibition of Heat Shock Factor 1 Function by Impairing the Recruitment of Positive Transcription Elongation Factor b to the hsp70 Promoter. *J. Biol. Chem.* **2011**, *286*, 1737-1747.
- [53] L. R. Ferguson; W. A. Denny, Genotoxicity of non-covalent interactions: DNA intercalators. *Mutat. Res.-Fund. Mol. M.* **2007**, *623*, 14-23.
- [54] R. E. Wang; R. K. Pandita; J. Cai; C. R. Hunt; J.-S. Taylor, Inhibition of Heat Shock Transcription Factor Binding by a Linear Polyamide Binding in an Unusual 1:1 Mode. *ChemBioChem* **2012**, *13*, 97-104.
- [55] M. V. Powers; K. Jones; C. Barillari; I. Westwood; R. L. M. van Montfort; P. Workman, Targeting HSP70: the second potentially druggable heat shock protein and molecular chaperone? *Cell Cycle* **2010**, *9*, 1542-1550.
- [56] E. B. Bertelsen; L. Chang; J. E. Gestwicki; E. R. P. Zuiderweg, Solution conformation of wild-type E. coli Hsp70 (DnaK) chaperone complexed with ADP and substrate. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2009**, *106*, 8471-8476.
- [57] J. Jiang; K. Prasad; E. M. Lafer; R. Sousa, Structural basis of interdomain communication in the Hsc70 chaperone. *Molecular Cell* **2005**, *20*, 513-524.
- [58] A. R. Goloudina; O. N. Demidov; C. Garrido, Inhibition of HSP70: A challenging anti-cancer strategy. *Cancer Lett.* **2012**, *325*, 117-124.
- [59] C. G. Evans; L. Chang; J. E. Gestwicki, Heat Shock Protein 70 (Hsp70) as an Emerging Drug Target. *J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 4585-4602.

- [60] S. W. Fewell; B. W. Day; J. L. Brodsky, Identification of an Inhibitor of hsc70-mediated Protein Translocation and ATP Hydrolysis. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 910-914.
- [61] D. R. Williams; S.-K. Ko; S. Park; M.-R. Lee; I. Shin, An Apoptosis-Inducing Small Molecule That Binds to Heat Shock Protein 70. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2008**, *47*, 7466-7469.
- [62] D. S. Williamson; J. Borgognoni; A. Clay; Z. Daniels; P. Dokurno; M. J. Drysdale; N. Foloppe; G. L. Francis; C. J. Graham; R. Howes; A. T. Macias; J. B. Murray; R. Parsons; T. Shaw; A. E. Surgenor; L. Terry; Y. Wang; M. Wood; A. J. Massey, Novel Adenosine-Derived Inhibitors of 70 kDa Heat Shock Protein, Discovered Through Structure-Based Design. *J. Med. Chem.* **2009**, *52*, 1510-1513.
- [63] A. J. Massey; D. S. Williamson; H. Browne; J. B. Murray; P. Dokurno; T. Shaw; A. T. Macias; Z. Daniels; S. Geoffroy; M. Dopson; P. Lavan; N. Matassova; G. L. Francis; C. J. Graham; R. Parsons; Y. Wang; A. Padfield; M. Comer; M. J. Drysdale; M. Wood, A novel, small molecule inhibitor of Hsc70/Hsp70 potentiates Hsp90 inhibitor induced apoptosis in HCT116 colon carcinoma cells. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **2010**, *66*, 535-545.
- [64] A. J. Massey, ATPases as Drug Targets: Insights from Heat Shock Proteins 70 and 90. *J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 7280-7286.
- [65] E. Schmitt; A. Parcellier; S. Gurbuxani; C. Cande; A. Hammann; M. C. Morales; C. R. Hunt; D. J. Dix; R. T. Kroemer; F. Giordanetto; M. Jäättelä; J. M. Penninger; A. Pance; G. Kroemer; C. Garrido, Chemosensitization by a Non-apoptogenic Heat Shock Protein 70-Binding Apoptosis-Inducing Factor Mutant. *Cancer Res.* **2003**, *63*, 8233-8240.
- [66] A.-L. Rerole; J. Gobbo; A. De Thonel; E. Schmitt; J. P. Pais de Barros; A. Hammann; D. Lanneau; E. Fourmaux; O. Deminov; O. Micheau; L. Lagrost; P. Colas; G. Kroemer; C. Garrido, Peptides and Aptamers Targeting HSP70: A Novel Approach for Anticancer Chemotherapy. *Cancer Res.* **2011**, *71*, 484-495.
- [67] M. Chatterjee; T. Heimberger; M. Andrusis; T. Stühmer; T. Steinbrunn; H. Einsele; R. C. Bargou, Heat shock proteins Hsp72 and Hsp73 as novel therapeutic targets in multiple myeloma. *Onkologie* **2008**, *31 Suppl. 4*, 181.
- [68] R. Nimmanapalli; E. Gerbino; W. S. Dalton; V. Gandhi; M. Alsina, HSP70 inhibition reverses cell adhesion mediated and acquired drug resistance in multiple myeloma. *Br. J. Haematol.* **2008**, *142*, 551-561.
- [69] M. Chatterjee; R. C. Bargou; U. Holzgrabe, unveröffentlichte Ergebnisse.
- [70] U. Holzgrabe; E. Inkmann, Cerium(IV) oxidations of beta -aminoketones. VIII. Synthesis of 1,2,3,4-tetrahydroisoquinolines with differently substituted piperidine parts. *Arch. Pharm.* **1993**, *326*, 209-215.
- [71] W. M. Whaley; T. R. Govindachari, The Pictet-Spengler Synthesis of Tetrahydroisoquinolines and Related Compounds. In *Organic Reactions*, John Wiley & Sons: **2004**.
- [72] T. Ngouansavanh; J. Zhu, IBX-mediated oxidative Ugi-type multicomponent reactions: application to the N and C1 functionalization of tetrahydroisoquinoline. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2007**, *46*, 5775-5778.
- [73] V. Gracias; J. D. Moore; S. W. Djuric, Sequential Ugi/Heck cyclization strategies for the facile construction of highly functionalized N-heterocyclic scaffolds. *Tetrahedron Lett.* **2004**, *45*, 417-420.
- [74] I. Ugi; C. Steinbrückner, Über ein neues Kondensations-Prinzip. *Angew. Chem.* **1960**, *72*, 267-268.
- [75] A. Domling; I. Ugi, Multicomponent reactions with isocyanides. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2000**, *39*, 3168-3210.
- [76] Herrn Dr. Krzysztof Radacki (AG Braunschweig, Universität Würzburg) danke ich herzlich für die Durchführung der Röntgenstrukturanalyse.
- [77] C. Amatore; A. Jutand; A. Thuilliez, Formation of Palladium(0) Complexes from Pd(OAc)₂ and a Bidentate Phosphine Ligand (dppp) and Their Reactivity in Oxidative Addition. *Organometallics* **2001**, *20*, 3241-3249.
- [78] A. de Meijere; F. E. Meyer, Fine Feathers Make Fine Birds: The Heck Reaction in Modern Garb. *Angew. Chem., Int. Ed.* **1995**, *33*, 2379-2411.
- [79] A. B. Dounay; L. E. Overman, The Asymmetric Intramolecular Heck Reaction in Natural Product Total Synthesis. *Chem. Rev.* **2003**, *103*, 2945-2964.

- [80] M. Hesse; H. Meier; B. Zeeh, *Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie (7. Auflage)*. Georg Thieme Verlag Stuttgart, **2005**.
- [81] M. A. Tanja Heimberger, Stephanie Fischbach, Thorsten Stühmer, Hermann Einsele, Ralf C. Bargou, Manik Chatterjee, Inhibition of the Heat Shock Transcription Factor 1 as a Potential New Therapeutic Strategy to Target Multiple Oncogenic Heat Shock Proteins in Multiple Myeloma. *Blood (ASH Annual Meeting Abstracts)* **2009**, Abstract 2829.
- [82] A. Hartung; F. Seufert; C. Berges; V. Gessner; U. Holzgrabe, One-Pot Ugi/Aza-Michael Synthesis of Highly Substituted 2,5-Diketopiperazines with Anti-Proliferative Properties. *Molecules* **2012**, *17*, 14685-14699.
- [83] A. D. Borthwick; D. E. Davies; A. M. Exall; R. J. D. Hatley; J. A. Hughes; W. R. Irving; D. G. Livermore; S. L. Sollis; F. Nerozzi; K. L. Valko; M. J. Allen; M. Perren; S. S. Shabbir; P. M. Woollard; M. A. Price, 2,5-Diketopiperazines as Potent, Selective, and Orally Bioavailable Oxytocin Antagonists. 3. Synthesis, Pharmacokinetics, and in Vivo Potency. *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 4159-4170.
- [84] D. H. Scharf; P. Chankhamjon; K. Scherlach; T. Heinekamp; M. Roth; A. A. Brakhage; C. Hertweck, Epithiol Formation by an Unprecedented Twin Carbon-Sulfur Lyase in the Gliotoxin Pathway. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2012**, *51*, 9943.
- [85] A. D. Borthwick, 2,5-Diketopiperazines: Synthesis, Reactions, Medicinal Chemistry, and Bioactive Natural Products. *Chem. Rev.* **2012**, *112*, 3641-3716.
- [86] Y. Sugie; H. Hirai; T. Inagaki; M. Ishiguro; Y.-J. Kim; Y. Kojima; T. Sakakibara; S. Sakemi; A. Sugiura; Y. Suzuki; L. Brennan; J. Duignan; L. H. Huang; J. Sutcliffe; N. Kojima, A new antibiotic CJ-17,665 from *Aspergillus ochraceus*. *J. Antibiot.* **2001**, *54*, 911-916.
- [87] R. Nishizawa; T. Nishiyama; K. Hisaichi; C. Minamoto; N. Matsunaga; Y. Takaoka; H. Nakai; S. Jenkinson; W. M. Kazmierski; H. Tada; K. Sagawa; S. Shibayama; D. Fukushima; K. Maeda; H. Mitsuya, Spirodiketopiperazine-based CCR5 antagonist: Discovery of an antiretroviral drug candidate. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2011**, *21*, 1141-1145.
- [88] Y. Zeng; Q. Li; R. P. Hanzlik; J. Aube, Synthesis of a small library of diketopiperazines as potential inhibitors of calpain. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, *15*, 3034-3038.
- [89] D.-X. Wang; M.-T. Liang; G.-J. Tian; H. Lin; H.-Q. Liu, A facile pathway to synthesize diketopiperazine derivatives. *Tetrahedron Lett.* **2002**, *43*, 865-867.
- [90] A. Endo; A. Yanagisawa; M. Abe; S. Tohma; T. Kan; T. Fukuyama, Total Synthesis of Ecteinasidin 743. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 6552-6554.
- [91] S. Santra; P. R. Andreana, A One-Pot, Microwave-Influenced Synthesis of Diverse Small Molecules by Multicomponent Reaction Cascades. *Org. Lett.* **2007**, *9*, 5035-5038.
- [92] S. Santra; P. R. Andreana, A Rapid, One-Pot, Microwave-Influenced Synthesis of Spiro-2,5-diketopiperazines via a Cascade Ugi/6-Exo-Trig Aza-Michael Reaction. *J. Org. Chem.* **2011**, *76*, 2261-2264.
- [93] C. Portal; D. Launay; A. Merritt; M. Bradley, High Throughput Physical Organic Chemistry: Analytical Constructs for Monomer Reactivity Profiling. *J. Comb. Chem.* **2005**, *7*, 554-560.
- [94] V. P. Mehta; S. G. Modha; E. Ruijter; K. Van Hecke; L. Van Meervelt; C. Pannecouque; J. Balzarini; R. V. A. Orru; E. Van der Eycken, A Microwave-Assisted Diastereoselective Multicomponent Reaction To Access Dibenzo[c,e]azepinones: Synthesis and Biological Evaluation. *J. Org. Chem.* **2011**, *76*, 2828-2839.
- [95] P. D. Leeson; T. I. Oprea, Drug-like physicochemical properties. In *Drug Design Strategies: Quantitative Approaches*, RSC: **2012**; 35-59.
- [96] H. Mofakham; Z. Hezarkhani; A. Shaabani, Cellulose-SO₃H as a biodegradable solid acid catalyzed one-pot three-component Ugi reaction: Synthesis of α -amino amide, 3,4-dihydroquinoxalin-2-amine, 4H-benzo[b][1,4]thiazin-2-amine and 1,6-dihydropyrazine-2,3-dicarbonitrile derivatives. *J. Mol. Catal. A Chem.* **2012**, *360*, 26-34.

- [97] S. G. Davies; A. Christopher Garner; J. V. A. Ouzman; P. M. Roberts; A. D. Smith; E. J. Snow; J. E. Thomson; J. A. Tamayo; R. J. Vickers, Diastereoselective synthesis of quaternary α -amino acids from diketopiperazine templates. *Org. Biomol. Chem.* **2007**, *5*, 2138-2147.
- [98] Frau Dr. Viktoria Gessner (Universität Würzburg) danke ich herzlich für die Durchführung der Röntgenstrukturanalyse.
- [99] I. Gomez-Monterrey; P. Campiglia; A. Carotenuto; D. Califano; C. Pisano; L. Vesce; T. Lama; A. Bertamino; M. Sala; A. M. Di Bosco; P. Grieco; E. Novellino, Design, Synthesis, and Cytotoxic Evaluation of a New Series of 3-Substituted Spiro[(dihydropyrazine-2,5-dione)-6,3'-(2',3'-dihydrothieno[2,3-b]naphthalene-4',9'-dione)] Derivatives. *J. Med. Chem.* **2007**, *50*, 1787-1798.
- [100] I. Gomez-Monterrey; P. Campiglia; A. Carotenuto; P. Stiuso; A. Bertamino; M. Sala; C. Aquino; P. Grieco; S. Morello; A. Pinto; P. Ianelli; E. Novellino, Spiro[(dihydropyrazin-2,5-dione)-6,3'-(2',3'-dihydrothieno[2,3-b]naphtho-4',9'-dione)]-Based Cytotoxic Agents: Structure-Activity Relationship Studies on the Substituent at N4-Position of the Diketopiperazine Domain. *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 2924-2932.
- [101] M. H. Sayegh; L. A. Turka, The role of T-cell costimulatory activation pathways in transplant rejection. *N. Engl. J. Med.* **1998**, *338*, 1813-1821.
- [102] A. Skapenko; J. Leipe; E. Lipsky Peter; H. Schulze-Koops, The role of the T cell in autoimmune inflammation. *Arthrit. Res. Ther.* **2005**, *7 Suppl 2*, 4-14.
- [103] C. Stuehler; S. Mielke; M. Chatterjee; J. Duell; S. Lurati; F. Rueckert; H. Einsele; R. C. Bargou; M. S. Topp, Selective depletion of alloreactive T cells by targeted therapy of heat shock protein 90: a novel strategy for control of graft-versus-host disease. *Blood* **2009**, *114*, 2829-2836.
- [104] J. J. Irwin; T. Sterling; M. M. Mysinger; E. S. Bolstad; R. G. Coleman, ZINC: A Free Tool to Discover Chemistry for Biology. *J. Chem. Inf. Model.* **2012**, *52*, 1757-1768.
- [105] M. S. Manhas; M. Ghosh; A. K. Bose, Studies on lactams. Part 84. beta-Lactams via alpha,beta-unsaturated acid chlorides: intermediates for carbapenem antibiotics. *J. Org. Chem.* **1990**, *55*, 575-580.
- [106] H. Naka; D. Koseki; Y. Kondo, Catalytic deprotonation and functionalization of propargyl silyl ethers with imines. *Adv. Synth. Catal.* **2008**, *350*, 1901-1906.
- [107] J. S. Bennett; K. L. Charles; M. R. Miner; C. F. Heuberger; E. J. Spina; M. F. Bartels; T. Foreman, Ethyl lactate as a tunable solvent for the synthesis of aryl aldimines. *Green Chem.* **2009**, *11*, 166-168.
- [108] M. Cushman; J. Gentry; F. W. Dekow, Condensation of imines with homophthalic anhydrides. A convergent synthesis of cis- and trans-13-methyltetrahydroprotoberberines. *J. Org. Chem.* **1977**, *42*, 1111-1116.
- [109] M. Cushman; E. J. Madaj, A study and mechanistic interpretation of the electronic and steric effects that determine the stereochemical outcome of the reaction of Schiff bases with homophthalic anhydride and 3-phenylsuccinic anhydride. *J. Org. Chem.* **1987**, *52*, 907-915.
- [110] A. R. Karimi; R. Pashazadeh, Sulfonic acid functionalized silica: a mild, reusable and efficient heterogeneous catalyst for the highly diastereoselective synthesis of cis-isoquinolonic acids. *Synthesis* **2010**, 437-442.
- [111] Y. Vara; T. Bello; E. Aldaba; A. Arrieta; J. L. Pizarro; M. I. Arriortua; X. Lopez; F. P. Cossio, Trans-Stereoselectivity in the Reaction between Homophthalic Anhydride and Imines. *Org. Lett.* **2008**, *10*, 4759-4762.
- [112] L. Wang; J. Liu; H. Tian; C. Qian; J. Sun, One-pot synthesis of cis-isoquinolonic acid derivatives via three-component reaction of homophthalic anhydride with aldehydes and amines using ytterbium(III) triflate as catalyst. *Adv. Synth. Catal.* **2005**, *347*, 689-694.
- [113] J. Azizian; A. A. Mohammadi; E. Soleimani; A. R. Karimi; M. R. Mohammadzadeh, A stereoselective three-component reaction: One-pot synthesis of cis-isoquinolonic acids catalyzed by silica sulfuric acid under mild and heterogeneous conditions. *J. Heterocycl. Chem.* **2006**, *43*, 187-190.
- [114] N. Yu; L. Bourel; B. Deprez; J.-C. Gesquiere, Lewis acid-induced reaction of homophthalic anhydride with imines: a convenient synthesis of trans-isoquinolonic acids. *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 829-832.
- [115] R. Brückner, *Reaktionsmechanismen: Organische Reaktionen, Stereochemie, Moderne Synthesemethoden (3. Auflage)*. Spektrum, Akad. Verlag: München, **2004**.

- [116] T. Gareth, *Medicinal Chemistry (2nd Edition)*. John Wiley & Sons: Chichester, **2007**.
- [117] H. Offermanns, The azology principle: forward and reverse. *Nachr. Chem.* **2011**, *59*, 1152-1153.
- [118] U. Huber; R. E. Majors, *Principles in preparative HPLC*. Agilent Technologies Inc.: Publication Number 5989-6639EN, **2007**.
- [119] G. Rücker; M. Neugebauer; G. Willems, *Instrumentelle pharmazeutische Analytik (4. Auflage)*. Wissenschaftlicher Verlagsgesellschaft mbH: Stuttgart, **2008**.
- [120] N. Berova; B. L. Di; G. Pescitelli, Application of electronic circular dichroism in configurational and conformational analysis of organic compounds. *Chem. Soc. Rev.* **2007**, *36*, 914-931.
- [121] M. J. Waring, Lipophilicity in drug discovery. *Expert Opin. Drug Discovery* **2010**, *5*, 235-248.
- [122] R. A. Scherrer; S. M. Howard, Use of distribution coefficients in quantitative structure-activity relations. *J. Med. Chem.* **1977**, *20*, 53-58.
- [123] S. H. Unger; T. F. Feuerman, Octanol-aqueous partition, distribution and ionization coefficients of lipophilic acids and their anions by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A* **1979**, *176*, 426-429.
- [124] S. H. Unger; G. H. Chiang, Octanol-physiological buffer distribution coefficients of lipophilic amines by reversed-phase high-performance liquid chromatography and their correlation with biological activity. *J. Med. Chem.* **1981**, *24*, 262-270.
- [125] S. H. Unger; J. R. Cook; J. S. Hollenberg, Simple procedure for determining octanol-aqueous partition, distribution, and ionization coefficients by reversed-phase high-pressure liquid chromatography. *J. Pharm. Sci.* **1978**, *67*, 1364-1367.
- [126] W. E. Hammers; G. J. Meurs; C. L. de Ligny, Correlations between liquid chromatographic capacity ratio data on LiChrosorb RP-18 and partition coefficients in the octanol—water system. *J. Chromatogr. A* **1982**, *247*, 1-13.
- [127] B. Slater; A. McCormack; A. Avdeef; J. E. A. Comer, pH-metric log P. 4. Comparison of partition coefficients determined by HPLC and potentiometric methods to literature values. *J. Pharm. Sci.* **1994**, *83*, 1280-1283.
- [128] C. A. Lipinski; F. Lombardo; B. W. Dominy; P. J. Feeney, Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv. Drug Deliv.* **1997**, *23*, 3-25.
- [129] H. v. d. Waterbeemd; B. Testa, *Drug Bioavailability*. Wiley-VCH: Weinheim, **2009**.
- [130] L. Di; E. H. Kerns, Profiling drug-like properties in discovery research. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2003**, *7*, 402-408.
- [131] D. F. Veber; S. R. Johnson; H.-Y. Cheng; B. R. Smith; K. W. Ward; K. D. Kopple, Molecular Properties That Influence the Oral Bioavailability of Drug Candidates. *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 2615-2623.
- [132] K. Palm; P. Stenberg; K. Luthman; P. Artursson, Polar molecular surface properties predict the intestinal absorption of drugs in humans. *Pharm. Res.* **1997**, *14*, 568-571.
- [133] P. Ertl; B. Rohde; P. Selzer, Fast Calculation of Molecular Polar Surface Area as a Sum of Fragment-Based Contributions and Its Application to the Prediction of Drug Transport Properties. *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 3714-3717.
- [134] D. E. Clark; S. D. Pickett, Computational methods for the prediction of 'drug-likeness'. *Drug Discov. Today* **2000**, *5*, 49-58.
- [135] P. D. Leeson; B. Springthorpe, The influence of drug-like concepts on decision-making in medicinal chemistry. *Nat. Rev. Drug Discovery* **2007**, *6*, 881-890.
- [136] A. L. Hopkins; C. R. Groom; A. Alex, Ligand efficiency: a useful metric for lead selection. *Drug Discov. Today* **2004**, *9*, 430-431.
- [137] P. Habenberger; A. Choidas; B. Klebl; J. Eickhoff, Unterstützung der Identifizierung von Leitstrukturen mit PBMCs. *Laborwelt* **2009**, *4*, 4-6.

- [138] L. Ravagnan; S. Gurbuxani; S. A. Susin; C. Maise; E. Daugas; N. Zamzami; T. Mak; M. Jaattela; J. M. Penninger; C. Garrido; G. Kroemer, Heat-shock protein 70 antagonizes apoptosis-inducing factor. *Nat. Cell Biol.* **2001**, *3*, 839-843.
- [139] H. M. Beere; B. B. Wolf; K. Cain; D. D. Mosser; A. Mahboubi; T. Kuwana; P. Taylor; R. I. Morimoto; G. M. Cohen; D. R. Green, Heat-shock protein 70 inhibits apoptosis by preventing recruitment of procaspase-9 to the Apaf-1 apoptosome. *Nat. Cell Biol.* **2000**, *2*, 469-475.
- [140] H. M. Beere, "The stress of dying": The role of heat shock proteins in the regulation of apoptosis. *J. Cell Sci.* **2004**, *117*, 2641-2651.
- [141] E. Schmitt; M. Gehrmann; M. Brunet; G. Multhoff; C. Garrido, Intracellular and extracellular functions of heat shock proteins: repercussions in cancer therapy. *J. Leukoc. Biol.* **2007**, *81*, 15-27.
- [142] S. S. Riedel; A. Mottok; C. Brede; C. A. Baeuerlein; A.-L. Jordan Garrote; M. Ritz; K. Mattenheimer; A. Rosenwald; H. Einsele; B. Bogen; A. Beilhack, Non-invasive imaging provides spatiotemporal information on disease progression and response to therapy in a murine model of multiple myeloma. *PLoS One* **2012**, *7*, e52398.
- [143] Sirius Analytical Ltd, *SiriusT3 Instruction Manual (Revision 1.1)*, **2011**.
- [144] F. Fischer; S. Bauer, Polyvinylpyrrolidon. Ein Tausendsassa in der Chemie. *Chem. unserer Zeit* **2009**, *43*, 376-383.
- [145] D. Hörter; J. B. Dressman, Influence of physicochemical properties on dissolution of drugs in the gastrointestinal tract. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **1997**, *25*, 3-14.
- [146] G. Völgyi; E. Baka; K. J. Box; J. E. A. Comer; K. Takács-Novák, Study of pH-dependent solubility of organic bases. Revisit of Henderson-Hasselbalch relationship. *Anal. Chim. Acta* **2010**, *673*, 40-46.
- [147] H. Afrasiabi Garekani; F. Sadeghi; A. Ghazi, Increasing the Aqueous Solubility of Acetaminophen in the Presence of Polyvinylpyrrolidone and Investigation of the Mechanisms Involved. *Drug Dev. Ind. Pharm.* **2003**, *29*, 173-179.
- [148] R. F. Schmidt; F. Lang; M. Heckmann, *Physiologie des Menschen (31. Auflage)*. Springer-Verlag Heidelberg: **2011**.
- [149] H. Fraga, Firefly luminescence: A historical perspective and recent developments. *Photochem. Photobiol. Sci.* **2008**, *7*, 146-158.
- [150] Autorenkollektiv, *Organikum*. WILEY-VCH Verlag GmbH: Weinheim, **2004**.
- [151] J. S. Bennett Green synthesis of aryl aldimines using ethyl lactate. US 2011/0196174 A1, 13 January 2011.
- [152] R. Torregrosa; I. M. Pastor; M. Yus, Isoprene-catalyzed lithiation of imidazole: synthesis of 2-(hydroxyalkyl)- and 2-(aminoalkyl)imidazoles. *Tetrahedron* **2005**, *61*, 11148-11155.
- [153] C. Hansch; A. Leo; D. H. Hoekman, *Exploring QSAR: Hydrophobic, Electronic, and Steric Constants*. American Chemical Society: Washington DC, **1995**.

Im Rahmen der Zusammenarbeit mit meinen Kooperationspartnern wurden mir für die Anfertigung dieser Arbeit freundlicher Weise verschiedene Abbildungen zur Verfügung gestellt:

Beilhack *et al.* Darstellungen zur *In-vivo*-Studie (Abb. 62, 63).

Bringmann *et al.* CD-Spektren (Abb. 39, 41).

Chatterjee *et al.* Westernblot- & ELISA-Analysen (Abb. 23, 24, 26–28, 45, 47), Viabilitätsanalysen (Abb. 46, 59).

Meinel *et al.* Darstellungen zur physikochemischen Charakterisierung (Abb. 49–51, 54–57), Simulation der Plasmakonzentrationen (Abb. 60).

Sotriffer *et al.* Proteinillustrationen (Abb. 9, 32, 33), Darstellung der PSA (Abb. 42).