universität wien

DIPLOMARBEIT

Titel der Diplomarbeit

Funktionalisierungen an Pyrazolo[3,4-*b*]pyridinen

Verfasserin

Elisabeth Pia Metzler

angestrebter akademischer Grad

Magistra der Pharmazie (Mag.pharm.)

Wien, im April 2012

Studienkennzahl lt. Studienblatt:	A 449
Studienrichtung lt. Studienblatt:	Diplomstudium Pharmazie
Betreuerin / Betreuer:	ao. Univ.-Prof. Dr. techn. Dipl.-Ing. Wolfgang Holzer

Der experimentelle Teil der vorliegenden Diplomarbeit wurde am Department für Arznei- und Naturstoffsynthese der Universität Wien im Zeitraum von Mai 2011 bis August 2011 durchgeführt.

Ich möchte mich bei ao. Univ.-Prof. Dr. techn. Dipl.-Ing. Wolfgang Holzer bedanken für die fachliche Betreuung und für die Aufnahme und Auswertung zahlreicher NMR Spektren. Weiters bedanke ich mich herzlich dafür, dass er mir so kurzfristig die Möglichkeit gegeben hat, die Diplomarbeit in seiner Arbeitsgruppe durchzuführen. Ohne diese Unterstützung hätte sich der Abschluss meines Studiums auf Grund einer unvorhersehbaren Notsituation stark verzögert.

Ganz herzlich bedanke ich mich bei meiner Betreuerin Mag. Barbara Datterl, die sich vor, während und nach der Durchführung der Diplomarbeit stets für mich eingesetzt hat und mich immer kompetent, engagiert und freundschaftlich unterstützt hat.

Weiters bedanke ich mich bei:
Dr. Leo Jirovetz und Dr. Bodo Lachmann für die Aufnahme der Massenspektren,
Mag. Johannes Theiner für die Durchführung der Elementaranalysen und
Ing. Peter Unteregger für die Aufnahme der hochauflösenden Massenspektren.

Zudem möchte ich meinen Freundinnen und Freunden danken, die mich in jeder Lebenslage begleiten und unterstützen.
Im Besonderen danke ich meinem Freund Michael Sohm für all seine Hilfe und Geduld sowie für das zur Verfügungstellen einer wertvollen und produktiven Arbeitsumgebung für die Verfassung dieser Arbeit.

Mein besonderer Dank gilt meiner Mama und meinem Däta sowie meinen Brüdern für die liebevolle Unterstützung und für die Ermöglichung meines Studiums.

INHALTSVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG 1

1.1. ADENOSIN 1
1.2. ADENOSIN-REZEPTOREN UND DEREN SIGNALWEGE 2
1.3. PHYSIOLOGISCHE BEDEUTUNG UND THERAPEUTISCHES POTENTIAL 5
1.3.1. A_1 Adenosinrezeptoren 5
1.3.2. A_{2A} Adenosinrezeptoren 6
1.3.3. A_{2B} Adenosinrezeptoren 7
1.3.4. A_3 Adenosinrezeptoren 8
1.4. SYNTHESE VON A_3 ADENOSINREZEPTOR ANTAGONISTEN 11
1.5. PROBLEMSTELLUNG 15

2. EIGENE UNTERSUCHUNGEN 16

2.1. SYNTHESEWEG 16
2.2. SYNTHESESCHRITTE ZUR DARSTELLUNG VON 1-METHYL-6-PHENYL-5,6-DIHYDROPYRAZOLO [3,4-*B*:3',4'-*D*]PYRIDIN-4(1*H*)-ON (6) 17
2.2.1. 5-Amino-1-phenylpyrazol-4-carbonsäureethylester (1) 17
2.2.2. 4-Hydroxy-6-oxo-1-phenyl-6,7-dihydro-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridin-5-carbonsäure-ethylester (2) 18
2.2.3. 4-Chlor-6-oxo-1-phenyl-6,7-dihydro-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridin-5-carbonsäure-ethylester (3) 18
2.2.4. 4-Chloro-5-(hydroxymethyl)-1-phenyl-1,7-dihydro-6*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridin-6-on (4) 20
2.2.5. 4-Chloro-6-hydroxy-1-phenyl-6,7-dihydro-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridin-5-carbaldehyd (5) 20
2.2.6. 1-Methyl-6-phenyl-5,6-dihydropyrazolo[3,4-*b*:3',4'-*d*]pyridin-4(1*H*)-on (6) 21
2.3. SYNTHESE DER ZIELVERBINDUNGEN (7A–E) 22

3. EXPERIMENTELLER TEIL 25

3.1. GERÄTEDATEN 25
3.2. SYNTHESE VON 5-AMINO-1-PHENYLPYRAZOL-4-CARBONSÄUREETHYLESTER (1) 27
3.3. SYNTHESE VON 4-HYDROXY-6-OXO-1-PHENYL-6,7-DIHYDRO-1*H*-PYRAZOLO[3,4-*B*]PYRIDIN-5-CARBONSÄUREETHYLESTER (2) 28
3.4. SYNTHESE VON 4-CHLOR-6-OXO-1-PHENYL-6,7-DIHYDRO-1*H*-PYRAZOLO[3,4-*B*]PYRIDIN-5-CARBONSÄUREETHYLESTER (3) 29
3.5. 4-CHLORO-5-(HYDROXYMETHYL)-1-PHENYL-1,7-DIHYDRO-6*H*-PYRAZOLO[3,4-*B*]PYRIDIN-6-ON (4) 29
3.6. SYNTHESE VON 4-CHLOR-6-OXO-1-PHENYL-6,7-DIHYDRO-1*H*-PYRAZOLO[3,4-*B*]PYRIDIN-5-CARBALDEHYD (5) 30
3.7. UMSETZUNG DES ALDEHYDS MIT METHYLHYDRAZIN (6) 31
3.8. O-ALKYLIERUNG VON 1-METHYL-6-PHENYL-5,6-DIHYDROPYRAZOLO[3,4-*B*:3',4'-*D*]PYRIDIN-4(1*H*)-ON – ALLGEMEINE ARBEITSVORSCHRIFT 32
3.8.1. Synthese von *N,N*-dimethyl-2-[(1-methyl-6-phenyl-1,6-dihydrodipyrazolo[3,4-*b*:3',4'-*d*]pyridin-4-yl)oxy]ethanamin (7a) 32
3.8.2. Synthese von *N,N*-dimethyl-3-[(1-methyl-6-phenyl-1,6-dihydropyrazolo[3,4-*b*:3',4'*d*]pyridin-4-yl)oxy]-1-propanamin (7b) 33
3.8.3. Synthese von 1-Methyl-6-phenyl-4-[2-(piperidinyl)ethoxy]-1,6-dihydrodipyrazolo[3,4-*b*:3',4'-*d*]pyridin (7c) 35
3.8.4. Synthese von 1-Methyl-4-[2-(4-morpholinyl)ethoxy]-6-phenyl-1,6-dihydrodipyrazolo[3,4-*b*:3',4'-*d*]pyridin (7d) 36
3.8.5. Synthese von 1-Methyl-6-phenyl-4-[2-(1-pyrrolidinyl)ethoxy]-1,6-dihydrodipyrazolo[3,4-*b*:3',4'-*d*]pyridin (7e) 37

4. LITERATURVERZEICHNIS 39

5. ANHANG 42

5.1. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS 42
5.2. SPEKTREN 44
5.3. ZUSAMMENFASSUNG 65
5.4. LEBENSLAUF 66

1. EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG

1.1. Adenosin

Das Nukleosid Adenosin besteht aus der Purinbase Adenin sowie dem Zucker β-D-Ribose. Im Körper ist Adenosin ubiquitär vorhanden.

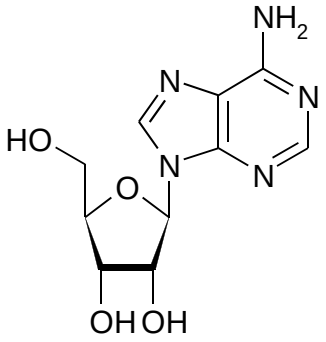


Abb.1: Adenosin

In allen Zellen und Körperflüssigkeiten ist es Baustein von Nukleotiden, welche zur Nukleinsäuresynthese sowie als Energiequelle in Form von Adenosinmono-, -di- und -triphosphat dienen. Adenosin ist eng mit dem Energiehaushalt der Zellen verbunden. Unter physiologischen Bedingungen liegt die extrazelluläre Adenosinkonzentration bei 30 bis 300 nM. [1,6] Kommt es zu einem gesteigertem Energieverbrauch der Zelle, wird vermehrt ATP via ADP und AMP zu Adenosin abgebaut. Dieses wird dem Konzentrationsgradienten folgend durch bidirektionale Transporter aus der Zelle geschleust und kann den extrazellulären Spiegel auf bis zu 10 μM und höher anheben. [1] Diese Akkumulation von Adenosin im Extrazellularraum ist Folge von metabolischem Stress und zellulärem Schaden, was zum Beispiel durch Ischämie, Hypoxie, Entzündung und Trauma verursacht werden kann. [2,5] Eine weitere Quelle von extrazellulärem Adenosin besteht neben dem intrazellulärem im extrazellulären Abbau von ATP, welches als Botenstoff von vielen Synapsen zusammen mit anderen Neurotransmittern freigesetzt wird. Die Spaltung erfolgt durch sogenannte Ekto-ATP/ADPasen (inkl. CD39) und Ekto-5'-Nukleosidasen (inkl. CD73). [5] Weiterer Ursprung von intrazellulärem Adenosin ist die Hydrolyse von S-Adenosylhomocystein. Adenosin unterliegt dem Abbau durch Phosphorylierung (Adenosinkinase, nur intrazellulär) zu AMP und Deaminierung (Adenosindeaminase) zu Inosin. AMP und Inosin sind an den Adenosinrezeptoren weniger aktiv als Adenosin. [1,3,4]

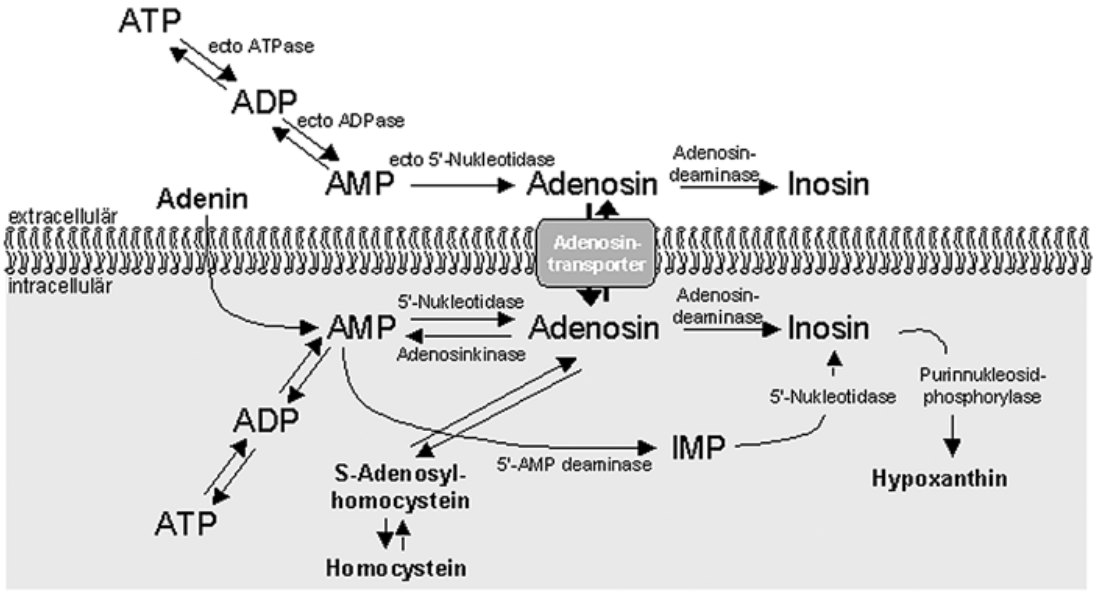


Abb. 2: Regulation des extra- und intrazellulären Adenosinspiegels [1]

1.2. Adenosin-Rezeptoren und deren Signalwege

Zellschädigende Stimuli wie Hypoxie, Ischämie und Entzündung führen zu einer Steigerung der Adenosinproduktion. [2,5] Dieses extrazelluläre Adenosin wirkt im Körper allgemein zytoprotektiv. Der Effekt kann zusammengefasst werden in: Anhebung der Sauerstoffversorgung, Schutz vor ischämischen Zellschäden durch Zellanpassung, anti-entzündliche Wirkung und Förderung der Angiogenese. [4]

Die physiologischen Effekte von Adenosin werden über vier pharmakologisch verschiedenartige Rezeptortypen vermittelt: die A_1, A_{2A}, A_{2B} und A_3 Adenosinrezeptoren.[1,2,3] Dies sind Transmembranrezeptoren und sie gehören zur Gruppe der G-Protein-gekoppelten-Rezeptoren. A_1 und A_3 Rezeptoren sind an inhibitorische G-Proteine der $G_{i/o}$ Familie gebunden, es kommt zur Hemmung der Adenylatcyclase. A_{2A} sowie A_{2B} Rezeptoren hingegen koppeln an stimulatorische G_s Proteine, welche zur Aktivierung der Adenylatcylase führen. [1,2,3]

Die ursprüngliche Einteilung erfolgte hinsichtlich der gegensätzlichen Effekte auf die intrazelluläre cAMP Produktion in A_1 (inhibierend)- und A_2 Rezeptoren (stimulierend). Erst später wurden der niedrigaffine A_{2B} Rezeptor und der koffeinunempfindliche A_3 Rezeptor [9] charakterisiert.

A_1 und A_{2A} Rezeptoren werden durch nanomolare Konzentrationen von Adenosin aktiviert, A_{2B} und A_3 Rezeptoren hingegen erst bei erhöhten Adenosinkonzentrationen im mikromolaren Bereich. [17]

Die Aktivierung von A_1 und A_3 Rezeptoren führt über Aktivierung des Pertussinsensitiven G_i Proteins zur Inhibition der Adenylatcyclase und somit zu verminderter intrazellulärer cAMP Produktion sowie zu verminderter Proteinkinase A (PKA) Aktivität. Weiters kommt es über die $G_{\beta\gamma}$-Untereinheit zur Aktivierung der Phospholipase C (PLC), welche zur Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration führt. [3,4,5,6] Durch A_1 AR Aktivierung kommt es im Myokard und in Neuronen zusätzlich zu einer direkten Öffnung von Kaliumkanälen. Dies erklärt den bradykarden Effekt von Adenosin auf das Herz. [4,5] Zusätzlich führt A_1-

AR Aktivierung zur Inhibierung von Q-, P-, und N-Typ Kalziumkanälen. [6] A_3 AR Stimulierung führt über den RhoA, Phospholipase D – Signalweg zu antiischämischen Effekten. [4]

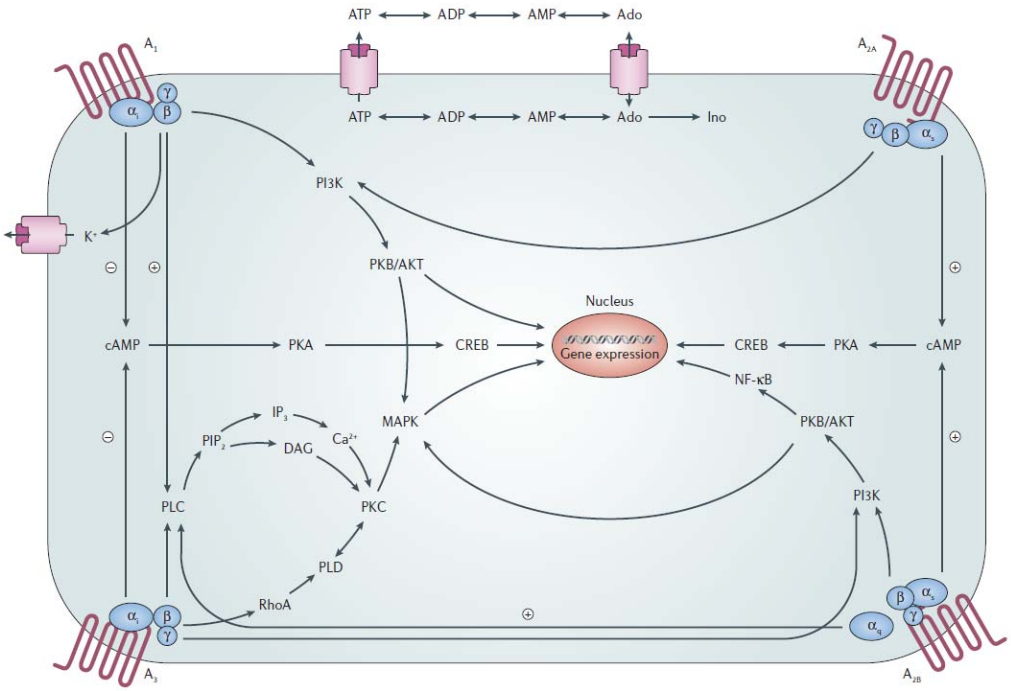


Abb.3: Signalübertragungsweg von Adenosin [4]

CREB: cAMP response element binding protein, DAG: Diacylglycerol, IP_3: Inositol-1,4,5-trisphosphat, PIP_2: Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat, PI_3K: Phosphatidylinositol-3-kinase, PK: Proteinkinase, PLD: Phospholipase D, NF-κB: Nukleärer Faktor-κB

Obwohl die vier Rezeptortypen über teilweise antagonistisch wirkende G-Proteine gekoppelt sind, können sie alle die Familie der mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAPK) aktivieren und somit mitogene Signale vermitteln. Dies erklärt den Einfluss von Adenosin auf die Regulation von Proliferation und Differenzierung und somit auf Wachstum, Überleben und Tod verschiedener Zelltypen. [1] Die Stimulierung von A_1 und A_3 Adenosin-Rezeptoren bewirkt die Aktivierung der extrazellulär regulierten Kinase (besonders ERK1/2) über die β,γ-Untereinheiten der G-Proteine. Im Vergleich dazu wirken A_{2A} und A_{2B} Rezeptoren stimulierend auf MAPK via cAMP-ras-MEK1 Signalweg. [3] Es konnte gezeigt werden, dass ein A_3 Adenosinrezeptor Agonist die Proliferation von humanen Melanomzellen via ERK1/2 hemmt. [4]

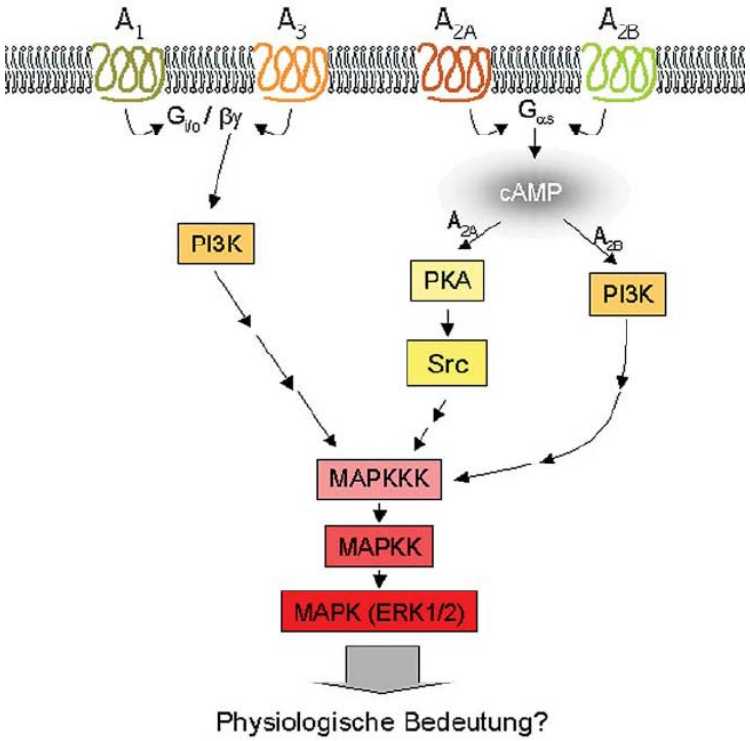


Abb. 4: Aktivierung der MAPK durch Adenosinrezeptoren [1]

Es ist anzunehmen, dass diese klassischen Signalwege eher einem Netzwerk aus Kommunikationsmöglichkeiten als linearen Wegen gleichen. Deswegen hängt der physiologische Effekt von Adenosin nicht nur von dessen Konzentration ab, sondern auch von der Dichte der einzelnen Rezeptorsubtypen im betrachteten Gewebe und deren Affinitäten zum Liganden. [1]

Über die Verteilung von A_1 und A_{2A} Adenosinrezeptoren liegt viel Information vor. A_1 AR sind in hoher Konzentration im Zentralnervensystem (Großhirnrinde, Kleinhirn, Hippocampus, dorsales Horn des Rückenmarks) sowie im Auge, in der Nebenniere und in den Vorhöfen des Herzen zu finden. Hohe Level von A_{2A} AR liegen in Milz, Schilddrüse, Leukozyten, Thrombozyten, Endothelzellen, Gefäßmuskulatur und in GABAergen Neuronen vor. [6] Über das Vorkommen der A_{2B} und A_3 Rezeptoren gibt es hingegen nur weniger eindeutige Daten. Hier ist vor allem die entsprechende mRNA Verteilung und weniger die absolute Konzentration des Rezeptorproteins herangezogen worden. A_{2B} Rezeptoren findet man im Colon und in der Blase.[3] Humane A_3 Adenosinrezeptoren werden in hohen Konzentrationen in der Lunge und Leber vermutet. Weiters sind sie in verschiedenen Geweben wie Testis, Niere, Plazenta, Herz, Gehirn, Leber, Uterus, Blase, Jejunum, Aorta, proximaler Colon und Augen verbreitet. [4] Besonders hohe Expressionsraten wurden in Mastzellen und Testis von Ratten belegt. [3]

1.3. Physiologische Bedeutung und Therapeutisches Potential

1.3.1. A_1 Adenosinrezeptoren

Agonisten

A_1 Adenosinrezeptoren sind an der Empfindung von Angst und Schmerz beteiligt. So kann postoperativer Schmerz beim Menschen durch Adenosinapplikation ins Rückenmark reduziert werden. [4] Weiters wird eine mögliche Anwendung von A_1 AR Agonisten zur Behandlung von Migräne und Cluster Kopfschmerzen sowie neuropathischen Schmerzen in Erwägung gezogen. [4] Zusätzlich werden die antikonvulsive und die sedative Eigenschaft von Adenosin auch über diesen Rezeptorsubtyp vermittelt. [6] Die Stimulierung dieses Rezeptorsubtyps schützt das Herz und andere Gewebe vor ischämischen Schäden. Aufgrund der negativ inotropen und chronotropen Wirkung wird Adenosin in der Notfallmedizin bei paroxysmal supraventrikulärer Tachykardie verabreicht um die Herzfrequenz zu normalisieren. [3] Dabei kommt es zur Hemmung der Noradrenalinfreisetzung aus sympathomimetischen Nervenendigungen. [6] Neben den negativ dromotropen, chronotropen und inotropen Effekten kommt es zu einer Vasodilatation welche zu Blutdrucksenkung führt. [3,4,6]
Im Übrigen haben A_{1A} AR auf Adipozyten eine physiologische Bedeutung in der Entstehung der Insulinresistenz. Im Tierversuch entwickelten transgene Mäuse mit A_{1A} AR Überexpression im Vergleich zur Kontrollgruppe keine Insulinresistenz. Somit stellen A_{1A} AR Agonisten eine Therapiemöglichkeit des Adipositas assoziierten, insulinresistenen Diabetes mellitus Typ 2 dar. [26]

Antagonisten

In der Niere bewirken A_1 AR Antagonisten einen diuretischen und natriuretischen Effekt, der größer ist als der der Thiaziddiuretika. Weitere Vorteile bestehen darin, dass es im Vergleich zu den Thiaziden zu keinem signifikanten Kaliumverlust kommt, zudem werden der renale Blutfluss und die glomeruläre Filtrationsrate nicht reduziert. Somit stellt diese Substanzklasse eine neue Therapiemöglichkeit bei Hypertonie und Ödemen dar. [6]
Eine weitere mögliche Indikation von A_1 AR Antagonisten ist die Behandlung der akuten Niereninsuffizienz als Folge von Herzinsuffizienz. [3,4]

1.3.2. A_{2A} Adenosinrezeptoren

Agonisten

Der am besten untersuchte Adenosinrezeptor ist der A_{2A} AR Subtyp.
Allgemein kann zusammengefasst werden, dass die Aktivierung von A_{2A} AR zu einer anti-entzündlichen, immunsupprimierenden Antwort führt. [5]

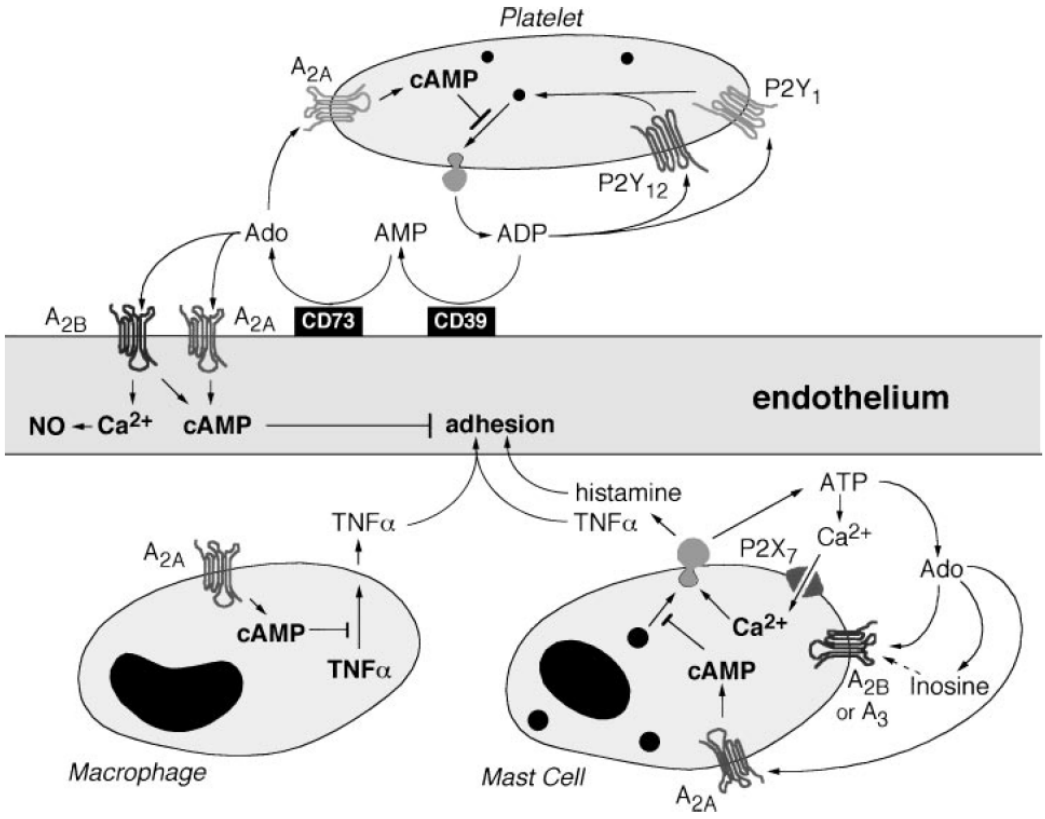


Abb.5: Regulation von Entzündung über Adenosinrezeptoren [5]

Von aktivierten Thrombozyten freigesetztes ADP hat Plättchenaggregation über P_2Y-Rezeptoren zur Folge. Der Abbau über die Ektonukleosidasen CD39 und CD73 zu Adenosin (Ado) ermöglicht die anti-aggregatorischen Effekte über die Stimulierung von A_{2A} AR. Erhöhte cAMP Spiegel hemmen die Expression von Adhäsionsmolekülen auf dem Endothel. Zudem wird über Aktivierung von A_{2A} AR die Freisetzung von Zytokinen und Histamin aus Mastzellen gehemmt.

Dieser Rezeptorsubtyp spielt eine bedeutende Rolle in der Thrombozytenaggregation, Blutdruckregulation und Schmerzweiterleitung. [3] Der Blutdruck senkende Effekt kommt durch Stimulierung der A_{2A} AR der glatten Gefäßmuskulatur zustande und führt zu Vasodilatation. [5]
A_{2A} AR Agonisten hemmen die Thrombozytenaggregation, wodurch ein neuer Ansatz der antithrombotischen Therpie denkbar ist. [4]

Antagonisten

Adenosin scheint ein wichtiger endogener Promoter der Schlafinduktion zu sein. Koffein, das weltweit meist konsumierte Psychostimulans wirkt als Antagonist an A_1 und an A_{2A} Rezeptoren. Ursprünglich wurde angenommen, dass der zentral stimulierende Effekt auf die Hemmung der Adenosinwirkung auf den A_1 AR zurückzuführen ist. Neue Studien mit knock-out Mäusen zeigte jedoch, dass nicht die A_1 AR sondern die A_{2A} AR für den anregenden Effekt von Koffein verantwortlich sind. Somit spielt der A_{2A} AR eine wichtige Rolle im Schlaf-Wachrhythmus. [3,4,23]

A_{2A} AR Antagonisten zeigen in Tierversuchen eine synergistische Wirkung mit Dopaminrezeptor Agonisten, weswegen sie möglicherweise als Adjuvantien in der Therapie von Morbus Parkinson eingesetzt werden können. Dieser Wirkmechanismus ermöglicht vermutlich eine nicht dopaminerge Therapie, welche zum einen Symptomverbesserung und möglicherweise auch eine Verbesserung der Prognose der Erkrankung bewirkt. [3,4,6,24] Zudem konnte ein inverser Zusammenhang zwischen Koffeinkonsum und dem Risiko an Morbus Parkinson zu erkranken nachgewiesen werden. [25]

1.3.3. A_{2B} Adenosinrezeptoren

Agonisten

Die Aktivierung von A_{2B} AR des Endothels führt zu der calciumabhängigen Aktiverung der NO-Synthetase und ist somit beteiligt an der Stickstoffmonoxid- vermittelten Vasodilatation der Gefäßmuskulatur. [5] Zusätzlich kommt es durch A_{2B} AR Aktivierung zu verstärkter Angiogenese durch gesteigerte Freisetzung von angiogenesefördernden Faktoren. [4]

Antagonisten

A_{2B} und A_3 AR spielen eine Rolle bei der Mastzelldegranulation und Freisetzung von allergischen Mediatoren. [3,5] In der Pharmakotherapie von Asthma wird Theophyllin als Reservemedikament schon lange Zeit verwendet. Theophyllin ist ein unselektiver Adenosinrezeptorantagonist, mit einer geringen Affinität zu A_1 und A_{2A} AR. Somit sind die A_{2B} und A_3 AR Antagonisten ins Zentrum der entzündungshemmenden, antiasthmatischen und bronchodilatierenden Arzneimittelforschung gerückt.[3,5,6] Momentan sind die Ergebnisse bezüglich der Wirkungen A_3/A_{2B} Adenosinrezeptoren auf inflammatorische Prozesse teilweise noch kontrovers und ungeklärt, was eventuell mit Rezeptorunterschieden zwischen den Spezies zusammen hängt. [5]

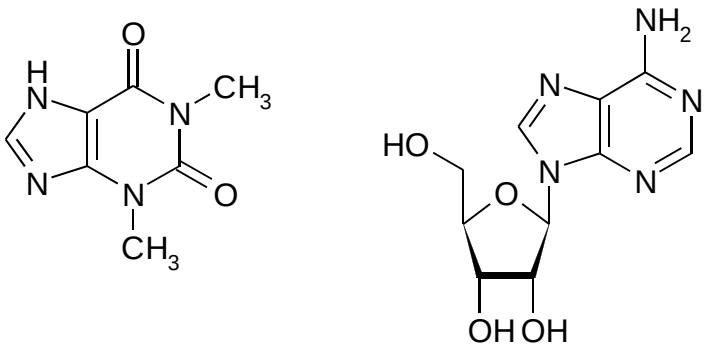


Abb. 6: Vergleich Theophyllin - Adenosin

1.3.4. A_3 Adenosinrezeptoren

Agonisten

Die Aktivierung dieses Rezeptorsubtyps führt zu kardioprotektiven Effekten. Da in den Kardiomyozyten aber nur relativ wenige A_3 AR zu finden sind, kann diese Wirkung eventuell indirekt durch Modulation der Funktion von Mastzellen und Neutrophilen Granulozyten erklärt werden, welche eine hohe A_3 AR Dichte vorweisen. Der durch diese Zelltypen vermittlete proinflammatorische Effekt schädigt die Herzmuskelzellen. [4,5] Im Vergleich zu den A_1 AR Agonisten kommt es bei der Stimulierung der A_3 AR zu keinem Blutdruckabfall, was den therapeutischen Einsatz zur Kardioprotektion deutlich verbessern würde.[4]
Auf Grund der Wirkung auf den Zellzyklus via MAPK, zeigt die Aktivierung von A_3 AR eine Hemmung des Wachstums von Krebszellen, was die Anwendung von selektiven A_3 AR Agonisten in der Antitumortherapie denkbar macht. [4]
Die Tatsache, dass in quergestreifter Muskulatur Tumore nur sehr selten vorkommen, führte zu Untersuchungen, welche Adenosin als einen der wirksamen Bestandteile identifizierte, welcher von den Muskelzellen bei körperlicher Aktivität produziert werden. Es wurde gezeigt, dass Tumorzellinien von Melanomen, Leukämie und Lymphomen in der G_0/G_1-Phase des Zellzyklus angehalten werden konnten. Die Ergebnisse unterstützen die Vermutung, dass physische Aktivität mit einem vermidertem Krebsrisiko zusammenhängt. [12]
Aktivierung von A_3 AR durch den selektiven Agonist IB-MECA reduziert die durch UV-Strahlung induzierte Apoptose von Mastzellen der Ratte um über 50 Prozent. Der anti- apoptotischer Effekt kann durch selektive A_3 AR Antagonisten gehemmt werden. Dieser Mechanismus erleichtert Mastzellen und möglicherweise anderen Zelltypen, welche A_3 AR exprimieren das Überleben und die Akkumulation in entzündlichen Geweben. [27]

Antagonisten

Bei der Aktivierung von T-Lymphozyten kommt es zur Up-Regulation der A_3 AR auf deren Oberfläche, was die Adenosin- vermittelten inflammatorische Effekte verstärkt. [11]
Die Hemmung der A_3 AR bewirkt eine verminderte Freisetzung von entzündlichen Mediatoren aus Mastzellen. Das macht den Einsatz von selektiven Antagonisten in der Therapie von entzündlichen und allergischen Erkrankungen wie zum Beispiel Asthma bronchiale wahrscheinlich. [5,6] Zudem gibt es Hinweise, welche den Einsatz dieser Substanzklasse in der Antitumor Therapie vorschlagen. [6] Denn es wurde festgestellt, dass im krankhaft veränderten Gewebe von Kolonkarzinomen die A_3 AR überexprimiert vorliegen. Im Vergleich zu gesundem Darmmukosagewebe der jeweils selben Patienten konnte eine über doppelt erhöhte A_3 AR Dichte nachgewiesen werden. Diese Überexpression kann auch in peripheren Blutzellen wie Lymphozyten wiedergefunden werden. Hier liegen die A_3 AR mehr als dreifach überexprimiert vor im Vergleich zu gesunden Personen. Dies legt den Einsatz A_3 AR Dichte als potentiellen Tumormarker zur Detektion von Kolonkarzinomen nah. Die Studie an 73 Probanden zeigte zudem, dass sich nach Tumorresektion die A_3 AR Dichte der Lymphozyten wieder normalisierte. [6,7]

Adenosin fördert über A_3 AR die Expression von HIF-1α und die Akkumulation von VEGF in Tumorzellen, was diesem Rezeptorsubtyp eine wichtige Rolle in der Regulation der Angiogenese gibt. [6,14] A_3 Antagonisten hemmen die HIF-1α sowie die VEGF Akkumulation in hypoxen Zellen, es kommt somit zur Hemmung der Angiogenese. Neue Untersuchungen weisen darauf hin, dass A_3 AR Antagonisten potenziell zur Therapie von Glioblastoma multiforme, einer tumorösen Gehirnerkrankung mit extrem schlechter Prognose eingesetzt werden können.
Die durch Überexpression von HIF-1α resultierende Vaskularisation des Tumors ist oft abnormal und führt wieder zu hypoxen Zuständen im Gewebe, was wiederum zur gesteigerten Expression von HIF-1α führt. Dieser Teufelskreis kann durch Hemmung der HIF-1α Bildung mittels A_3 Antagonisten durchbrochen werden. [14]

Studien zeigen außerdem eine generell nierenschützende Wirkung von A_3 AR Antagonisten. [4]

In Tierversuchen wiesen A_3 AR knocked-out Mäuse einen signifikant niedrigeren intraokularen Druck als normale Mäuse auf. Es wurde gezeigt, dass A_3 AR Antagonisten die Aktivität eines Chlorid-Ionenkanals des nicht pigmentierten Ziliarepithels hemmen und somit den Augeninnendruck erniedrigen. Dies könnte bedeuten, dass die Hemmung dieses Rezeptorsubtyps in der Behandlung von Glaukomen eine zukünftige Rolle spielen kann. [6,8]

Allgemein muss bei diesem Rezeptortyp beachtet werden, dass die meisten Daten aus murinen Untersuchungen stammen. Da beim A_3 AR jedoch erhebliche strukturelle und funktionelle Abweichungen zwischen den Spezies vorliegen, ist es ratsam die gewonnenen Informationen vorsichtig zu interpretieren. So besitzt der A_3 AR des Menschen und der der Ratte nur eine 72% ige Übereinstimmung der Primärstruktur. [4,8]

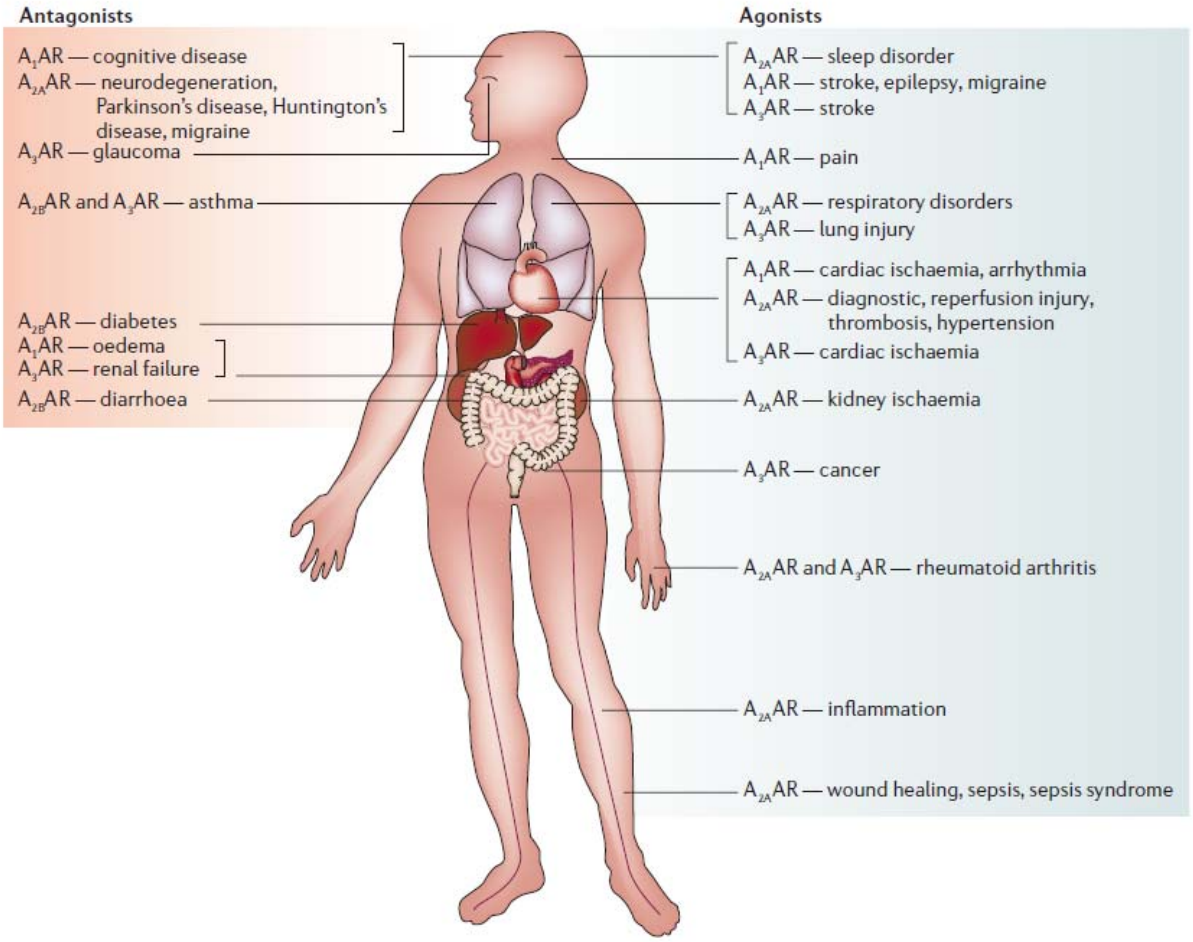


Abb. 7: Therapeutische Ansatzpunkte für selektive Adenosinrezeptor Liganden [4]

1.4. Synthese von A_3 Adenosinrezeptor Antagonisten

Als Ausgangspunkt für die Synthese von weiteren Adenosinrezeptor Agonisten wurde der endogene Ligand Adenosin chemisch verändert. Dabei stellte sich die Modifizierung der N^6- und 2-Position des Adenins sowie die Modifizierung 3'-, 4'- und 5'-Position der Ribose als am effektivsten heraus. [4]

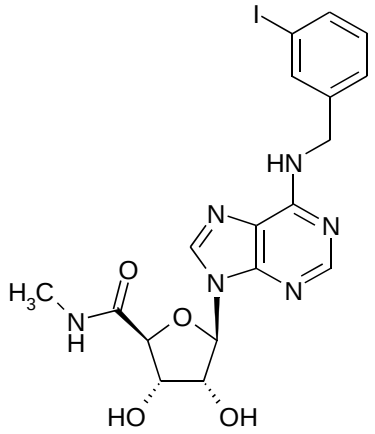


Abb. 8: IB-MECA: ein selektiver A_3 AR Agonist

Für die Entwicklung von Adenosinrezeptor Antagonisten wurde zuerst von den natürlich vorkommenden Antagonisten, den Xanthinen wie Koffein und Theophyllin für Strukturveränderungen ausgegangen. Im Falle des A_3 Adenosinrezeptors, welcher relativ xanthinunempfinlich ist, wurde zu anderen heterozyklichen Grundstrukturen gewechselt. Dabei stellten sich folgende fünf Systeme als besonders affin heraus:

a) Flavonoide,

b) 1,4-Dihydropyridine und Pyridin Derivate,

c) Triazoloquinazoline Derivate,

d) Isochinoline und Chinazolin Derivate und

e) Diverse heterozyklische Strukturen wie Triazolonaphthyridin-. Thiazolopyrimidin- und Pyrazolotriazolo-pyrimidin Derivate. [4,10]

Colotta et al. untersuchten 2-Arylpyrazolo[3,4-*c*]chinolin Derivate als potentielle Adenosinrezeptor Antagonisten. Dabei wurde gezeigt, dass für die A_3 Rezeptor Affinität eine Carbonylfunktion in Position 4 wichtig ist. Weiters steigt die A_3 Rezeptor Affinität durch 2-Substitution mit einem Phenylring, welcher in *para*-Stellung mit einer sterisch kleinen Gruppe substituiert ist. Es stellte sich heraus, dass hierbei sowohl Elektronen-liefernde Gruppen (Methyl- und Methoxy-) als auch Elektronen-ziehende Substituenten (Chlor-) die A_3-Affinität erhöhen. [13]

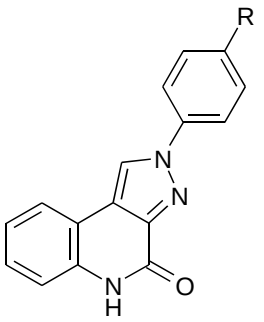


Abb.9: 2-Arylpyrazolo[3,4-*c*]chinoline [13]

Die Synthese und Untersuchung der Strukturisomere dieser Verbindung erfolgte durch Baraldi et al. Auch hier war eine *para*-Substitution des 2-Phenylrings (mit Methyl-, Methoxy-, Chlor- oder Fluor-) optimal für die Steigerung der A_3 Affinität. Im Vergleich dazu führt eine Substitution mit Chlor in *meta*-Stellung zu vollständigem Affinitätsverlust. Eine Vergrößerung des Restes am Phenylring führt zudem zu Affinitätsabnahme. Auch in diesen Untersuchungen zeigte die Amidfunktion eine wichtige Rolle für A_3 Rezeptor Affinität.[16]

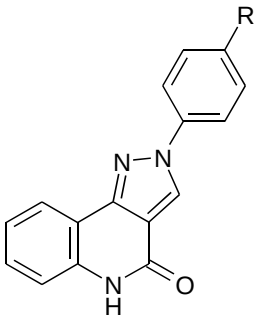


Abb.10: 2-Arylpyrazolo[3,4-*c*]chinoline [16]

Weitere Grundstrukturen für die Synthese von selektiven und potenten A_3 Antagnoisten sind Pyrido[2,3-*e*]-1,2,4-triazolo[4,3-*a*]pyrazin-1-one welche in Position 4 entweder eine Oxo-Gruppe oder eine Amino-Gruppe vorweisen. Auch hier zeigte ein *para*-Methoxy-substituierter Phenylring in 2 einen A_3 Affinität erhöhenden Effekt. [15]

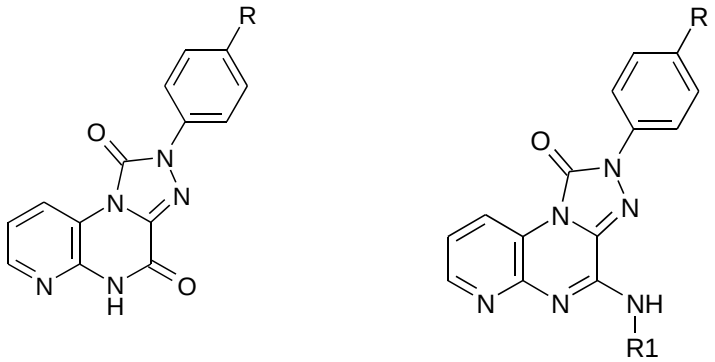


Abb.11: 4-Oxo- und 4-Amino-substituierte 2-Arylpyrido[2,3-*e*]-1,2,4-triazolo[4,3-*a*] pyrazin-1-one [15]

Ebenfalls potente und selektive A_3 Antagonisten liefert die Grundstruktur der 2-Arylpyrazolo-tiazolo-pyrimidine. [18]

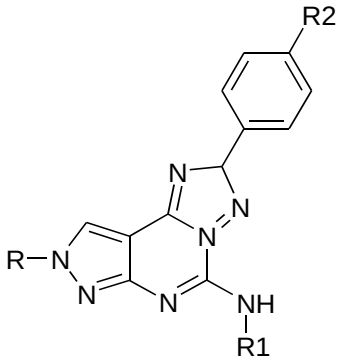


Abb.12: 2-Arylpyrazolo-tiazolo-pyrimidine [18]

Diese Beispiele zeigen deutlich Gemeinsamkeiten der neuen Strukturen. Bei allen Verbindungen handelt es sich um trizyklische Ringsysteme mit einer planaren Gestalt und pseudoaromatischem Charakter auf Grund der delokalisierten Elektronen. [18]

Weitere planare Ringsysteme mit A_3 antagonistischer Wirkung sind Isochinoline und Chinazoline, welche über eine Ureabrücke mit einem Aromaten verbunden sind. Substitution der 3- Position des Isochinolins bzw. der 2- Position des Chinazolin mit einer Arylfunktion steigert die A_3 Affinität signifikant. *Para*- und *meta*-Substitution der Phenylfunktion am Harnstoff vermindert die A_3 Rezeptoraffinität, *ortho*- Substitution mit einem Elektronen-liefernden Rest (Methyl-, Methoxy-) steigert sie hingegen. [19]

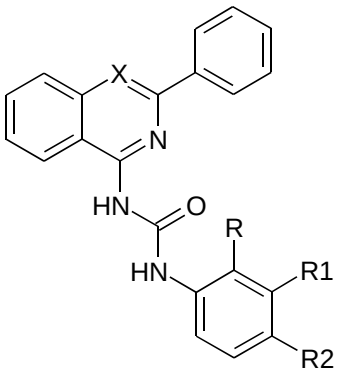


Abb.13: Substituierte Chinazolin-4-yl- und Isochinolin-1-yl-urea Derivate [19]

1.5. Problemstellung

Im Rahmen dieser Diplomarbeit wurden anhand der Literatur [16] neue Strukturen mit potentieller A_3 Rezeptoraffinität synthetisiert. Abbildung 14 zeigt die hergestellten Zielstrukturen mit 1-Methyl-6-phenyl-1,6-dihydrodipyrazolo[3,4-*b*:3',4'-*d*]pyridin-4-on Grundstruktur. Der Vergleich mit Abbildung 10 zeigt eine große Strukturverwandtschaft. Anstatt des am Pyridin annelierten Benzolrings, weisen die neuen Verbindungen eine 1-Phenyl-1H-pyrazolo-[3,4-*b*] Teilstruktur vor.

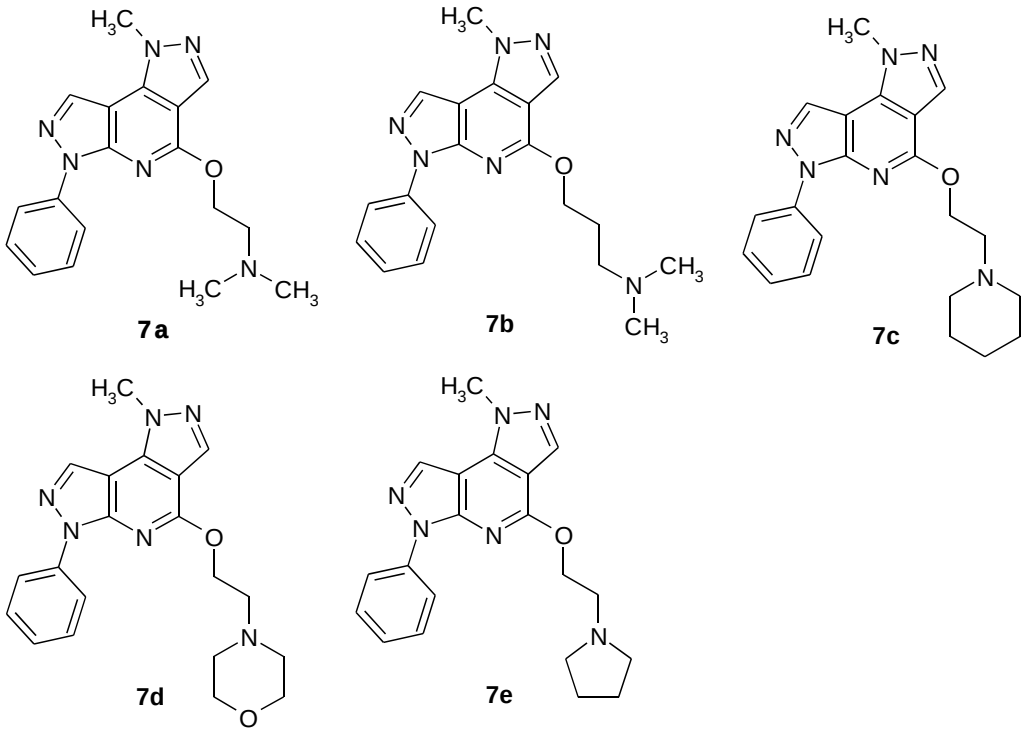
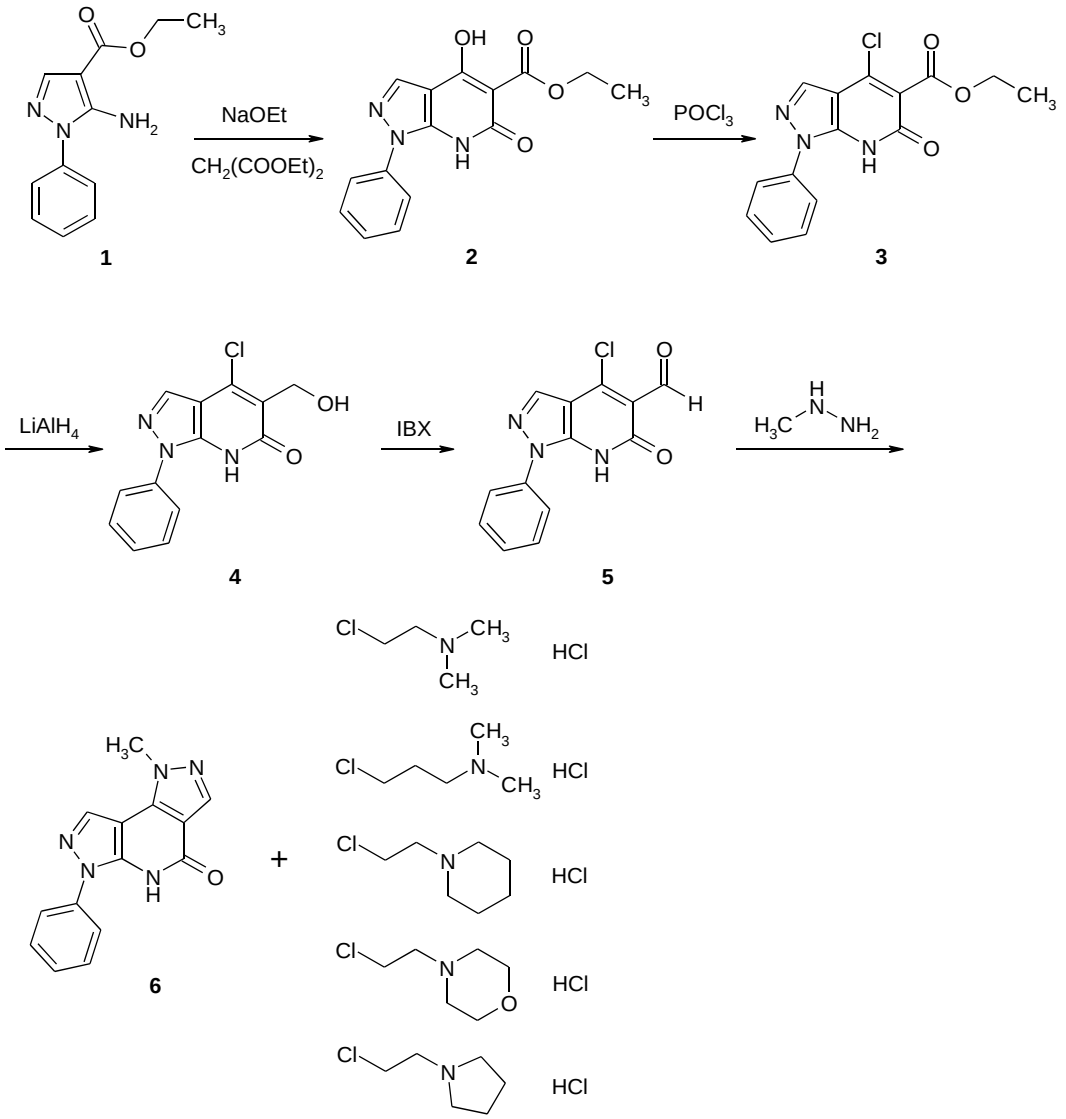


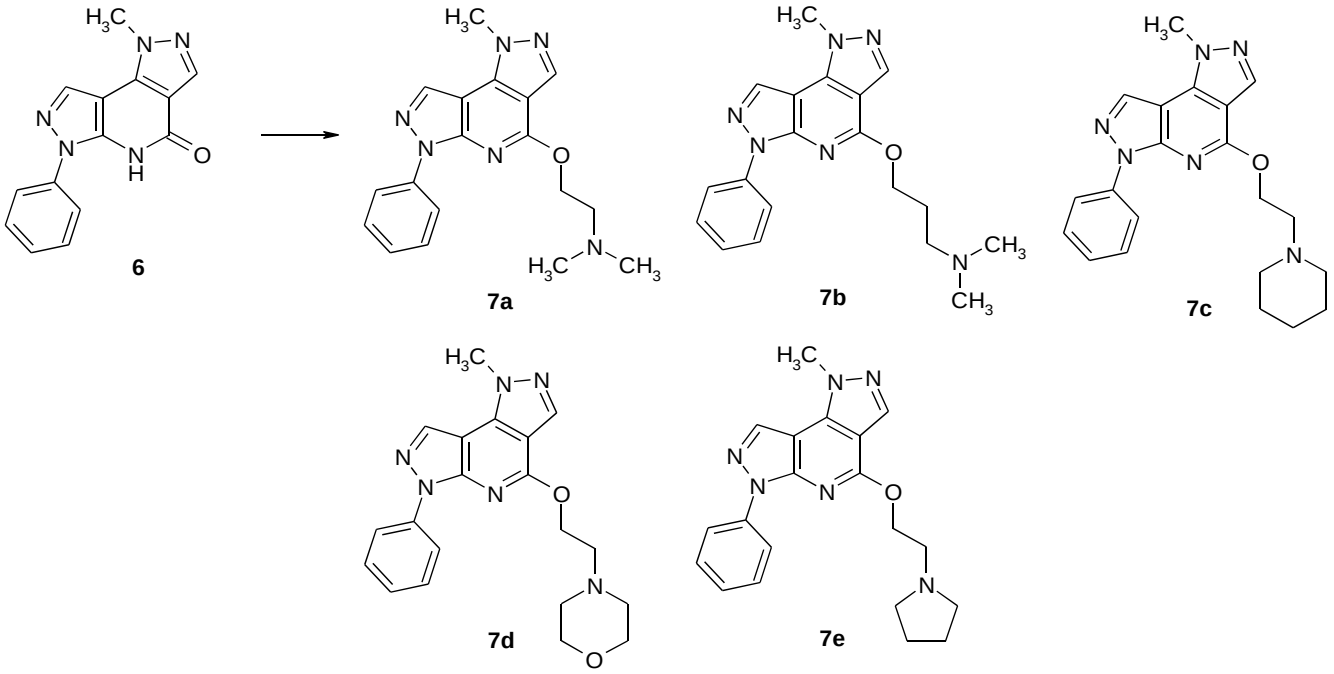
Abb. 14: Zielstrukturen

2. EIGENE UNTERSUCHUNGEN

2.1. Syntheseweg

Schema 1 zeigt den Syntheseweg zur Herstellung der trizyklischen Zielverbindungen **7a**−**e**. Die Schlüsselverbindung dafür ist 1-Methyl-6-phenyl-5,6-dihydropyrazolo[3,4-*b*:3',4'-*d*]pyridin-4(1*H*)-on (**6**) und die kommerziell erhältlichen Hydrochloride der Aminkomponenten.



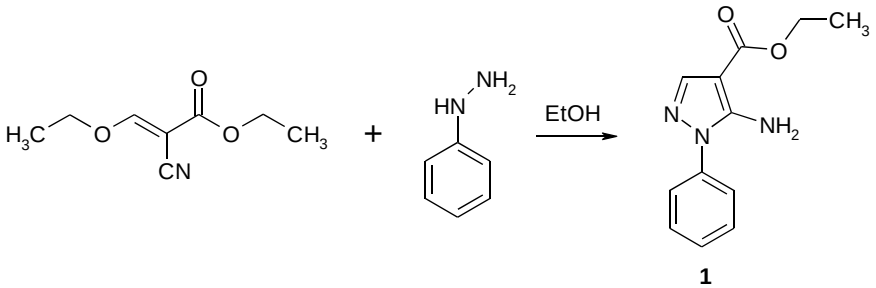


Schema 1

2.2. Syntheseschritte zur Darstellung von 1-Methyl-6-phenyl-5,6-dihydropyrazolo [3,4-*b*:3',4'-*d*]pyridin-4(1*H*)-on (6)

2.2.1. 5-Amino-1-phenylpyrazol-4-carbonsäureethylester (1)

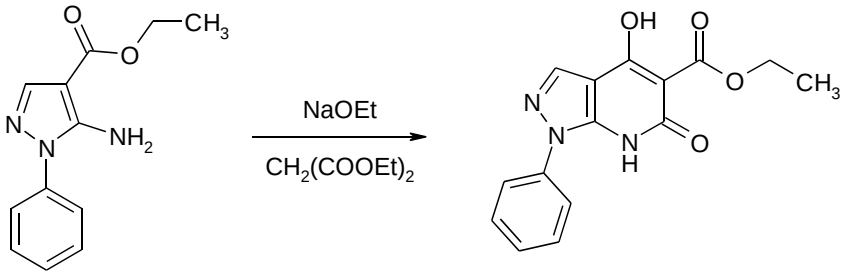
Ethoxymethylencyanessigsäureethylester wird mit Phenylhydrazin laut Literatur umgesetzt [20]. Dabei kommt es zum Aufbau des Pyrazolrings unter Bildung von Verbindung **1** (Schema 2). Letztere ist ein ortho-difunktionales Pyrazol-Derivat, welches als Precursor für die Anellierung eines weiteren N-hältigen Ringes an das Pyrazolsystem fungieren kann.



Schema 2

2.2.2. 4-Hydroxy-6-oxo-1-phenyl-6,7-dihydro-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridin-5-carbonsäure-ethylester (2)

Im stark basischen Milieu (in situ Herstellung von Natriumethanolat durch Lösen von metallischem Natrium in absolutem Alkohol) wird durch Reaktion des 5-Aminopyrazolcarbonsäureethylester **1** mit Malonsäurediethylester der Pyridinring von Verbindung **2** aufgebaut (Schema 3). Der Hydroxyester **2** kann prinzipiell in verschiedenen tautomeren Formen vorliegen. NMR spektroskopische Untersuchungen weisen jedoch eindeutig auf das Vorliegen einer Hydroxyfunktion am C-Atom 4 hin.

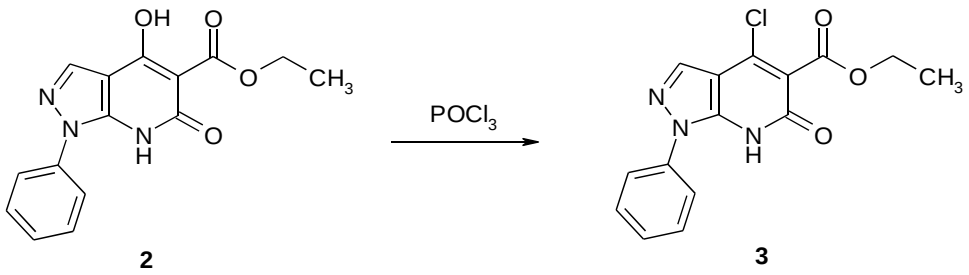


1 **2**

Schema 3

2.2.3. 4-Chlor-6-oxo-1-phenyl-6,7-dihydro-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridin-5-carbonsäure-ethylester(3)

Der 4-Hydroxyester **2** wird durch Reaktion mit vier Äquivalenten $POCl_3$ in siedendem Acetonitril zum entsprechenden 4-Chlor-Derivat **3** umgesetzt (Schema 4). Bei der Reaktion dient Benzyltriethylammoniumchlorid als Lösungsvermittler und Phasentransferkatalysator. Unter diesen Reaktionsbedingungen wurde keine Chlorierung an der Laktam C=O Funktion beobachtet. Das gewonnene Reaktionsprodukt kann ohne Aufreinigung für weitere Syntheseschritte verwendet werden.



2 **3**

Schema 4

Als nächster Schritt soll die Ethylester Funktionalität von Verbindung **3** in eine Aldehyd Funktion umgewandelt werden.
Zur Transformation von Estern in die korrespondierenden Aldehyde sind prinzipiell zwei Möglichkeiten in Betracht zu ziehen:

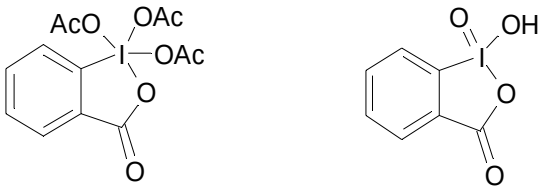
a. Die direkte Reduktion des Esters zum Aldehyd:

Diese Reaktion erfordert Reagentien mit genau dosierter Reduktionskraft um die Weiterreduktion des gebildeten Aldehyds zum entsprechenden Alkohol zu verhindern. Dazu werden zumeist komplexe Aluminiumhydride verwendet. Beispiele dafür sind Diisobutylaluminiumhydrid (DIBAL-H), Lithium-tri-*tert*-butoxyaluminiumhydride (LTBA), Lithium-diisobutyl-*tert*-butoxyaluminiumhydrid (LDBBA) und Lithium-diisobutylpiperidinohydroaluminate (LDBPA). [30, 31, 32] Die sterisch anspruchsvollen Seitenketten dieser Reagentien führen zu einer gewissen Abschirmung und somit zu einer Abschwächung der Reduktionskraft im Vergleich zum ‚Standardreagens' $LiAlH_4$. Der Nachteil dieser Reagentien liegt darin, dass in manchen Fällen partielle Weiterreduktion zum Alkohol erfolgen kann. Weiters sind nicht alle kommerziell erhältlich und müssen selbst in situ hergestellt werden. Aus diesen Gründen wurde das unten angeführte, alternative Syntheseverfahren verwendet.

b. Reduktion zum Alkohol und anschließende Oxidation zum Aldehyd:

In einer ersten Reaktion wird der Ester zur Alkoholfunktion reduziert. Das Standard-Reagens hierfür ist $LiAlH_4$, welches für die meisten Ester und auch Laktone zur Reduktion geeignet ist. Eine weitere Möglichkeit zur Reduktion der Esterfunktion sind Kupferchromit Katalysatoren, welche jedoch Reaktionsbedingungen wie hohe Drücke und hohe Temperaturen verlangen. $NaBH_4$ ist zur Reduktion von Estern nicht geeignet, da die Reaktion zu langsam abläuft.
Als zweiter Schritt erfolgt die gezielte Re-Oxidation des Alkohols zum Aldehyd. Zur Oxidation von Alkoholfunktionalitäten zu Aldehyden gibt es die Möglichkeit, Reagentien wie $KMnO_4$, Rutheniumtetroxid oder das Jones Reagens (Chromsäure in Schwefelsäure) zu verwenden. Dabei handelt es sich jedoch um starke Oxidationsmittel, welche zu einer Überoxidation bis hin zur Carbonsäure führen können. Um dies zu verhindern, kann der gebildete Aldehyd laufend aus dem Reaktionsgemisch abdestilliert werden. Dies ist wiederum mit einem Mehraufwand verbunden. Zur selektiven Oxidation zu Aldehyden werden daher oft Chrom(VI)-Reagentien angewandt, wie das Collins' Reagens (Dipyridine-chrom(VI)-oxid), Pyridiniumchlorochromat (PCC) oder Pyridiniumdichromat (PDC). Chromreagentien haben den Nachteil, dass sie toxisch sind und die Umwelt belasten. Eine Alternative stellt die Oppenauer Oxidation dar. Hierbei wird der Alkohol durch ein Keton (in der Praxis meist Aceton, Butanon oder Cyclohexanon) in Gegenwart eines Aluminiumkatalysators zur Aldehydfunktion oxidiert. Eine weitere, praktische Möglichkeit zur gezielten Oxidation zum Aldehyd besteht in der Swern Oxidation (Oxalylchlroid in DMSO). Auch hier findet keine Oxidation zur Carbonsäure statt. Desweiteren führen

hypervalente Iodreagentien zur gezielten Oxidation zum Aldehyd. Ein Beispiel dafür ist das Dess-Martin Reagens, welches jedoch die Gefahr der Explosion bei zu langer Lagerung mit sich bringt. Im Rahmen dieser Arbeit wurde daher 2-Iodoxybenzoesäure als Oxidationsmittel verwendet, da dieses einfach und kostengünstig selbst hergestellt werden konnte. [33]

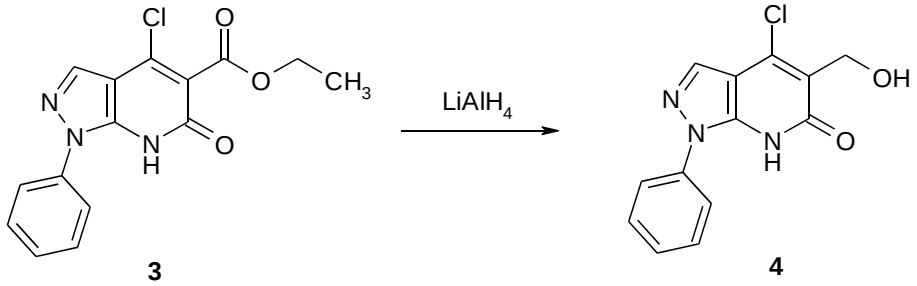


Dess Martin Reagens IBX

Schema 4a: hypervalente Iodreagentien zur Oxidation von Estern zu Aldehyden

2.2.4. 4-Chloro-5-(hydroxymethyl)-1-phenyl-1,7-dihydro-6*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridin-6-on (4)

Der 4-Chlorethylester **3** wird mit Hilfe von $LiAlH_4$ zur Hydroxymethylverbindung **4** reduziert (Schema 5). Die Reaktion erfolgt unter inerten Bedingungen bei −10 bis −5 °C und wird durch Wasserzugabe beendet. Dabei fällt ein feiner Niederschlag aus, welcher vollständig durch mehrmaliges Filtrieren abgetrennt werden muss. Durch schwaches Ansäuern der klaren Lösung wird das gewünschte Reaktionsprodukt ausgefällt. Eine Reduktion der Laktamfunktion wurde hierbei nicht beobachtet.



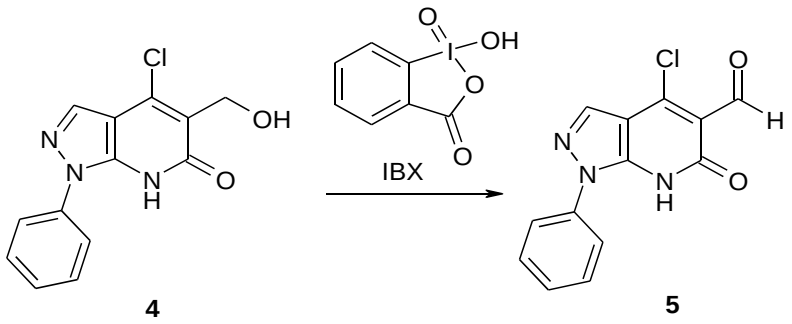
3 **4**

Schema 5

2.2.5. 4-Chloro-6-hydroxy-1-phenyl-6,7-dihydro-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridin-5-carbaldehyd (5)

Zur Herstellung der Verbindung **5** wird die primäre Alkoholfunktion von Verbindung **4** gezielt zum Aldehyd oxidiert. Dies geschieht mit dem milden Oxidationsmittel 2-Iodoxybenzoesäure (IBX) in DMSO (Schema 6). IBX ist ein chemoselektives Oxidationsmittel, welches einen primären Alkohol zum entsprechenden Aldehyd und nicht weiter zur Carbonsäure oxidiert. IBX ist einfach und günstig herzustellen. [28] Zudem ist IBX in DMSO ausreichend löslich und stabil. [21] Der Carbaldehyd **5** ist im Vergleich zum Alkohol **4** gut in CH_2Cl_2 löslich und kann dadurch leicht aus dem Reaktionsgemisch extrahiert werden. Zum Entfernen von DMSO

Resten in der organischen Phase wird diese wiederholt mit Wasser und gesättigter NaCl- Lösung ausgeschüttelt. Das Produkt kann ohne weitere Aufreinigung für den folgenden Reaktionsschritt verwendet werden.

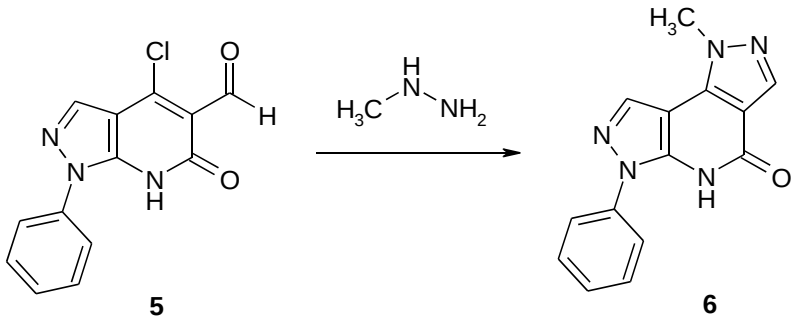


4 **5**

Schema 6

2.2.6. 1-Methyl-6-phenyl-5,6-dihydropyrazolo[3,4-*b*:3',4'-*d*]pyridin-4(1*H*)-on (6)

Verbindung **5** wird in Dimethylglykolether (Dimethoxyethan) gelöst und mit einem dreifachen Überschuss an Methylhydrazin versetzt. Dabei kommt es zum Pyrazolringschluss und der Tricyclus **6** – die Schlüsselverbindung für die Synthese der Zielverbindungen vom Typ **7** - fällt als feiner Niederschlag aus (Schema 7).

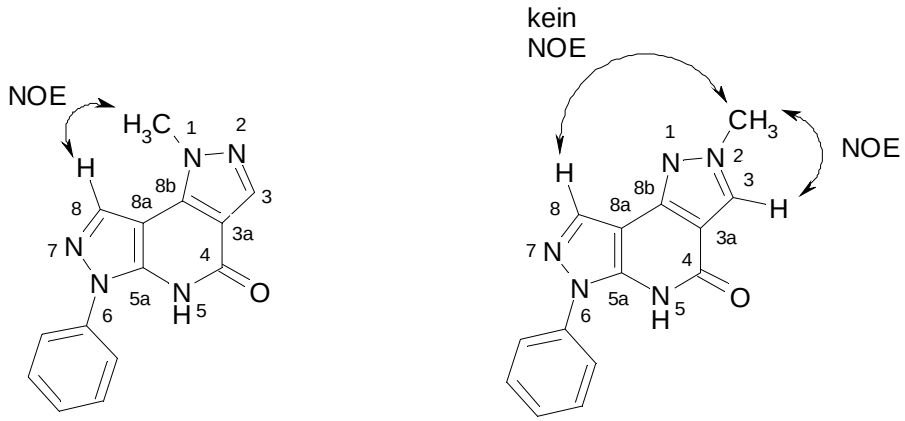


5 **6**

Schema 7

Bei dieser Reaktion wird ausschließlich die Verbindung **6** erhalten. Die Bildung des Strukturisomers **X** (Schema 7a), dessen Entstehung im Verlauf dieser Reaktion prinzipiell ebenfalls möglich ist, wurde nicht beobachtet. Die Struktur des entstandenen Tricyclus (und damit die Position der N-Methylgruppe) folgt eindeutig aus dem Auftreten eines kräftigen NOE zwischen Methylgruppe und dem Pyrazol H-Atom des N-Phenylpyrazol-Systems (Schema 7a links) in einem NOESY Experiment. Beim Strukturisomer **X** kann ein solcher NOE wegen der zu großen räumlichen Entfernung der involvierten Protonen nicht auftreten (Schema 7a, rechts), dafür sollte ein NOE zum Pyrazol-H des N-Methylpyrazol-Systems erfolgen. Außerdem zeigt sich im ^{1}H-gekoppelten ^{13}C NMR Spektrum (gated decoupling) für das C3-Signal ein Dublett und nicht ein

quartettisch aufgespaltenes Dublett, wie es für das Isomer **X** zu erwarten wäre.

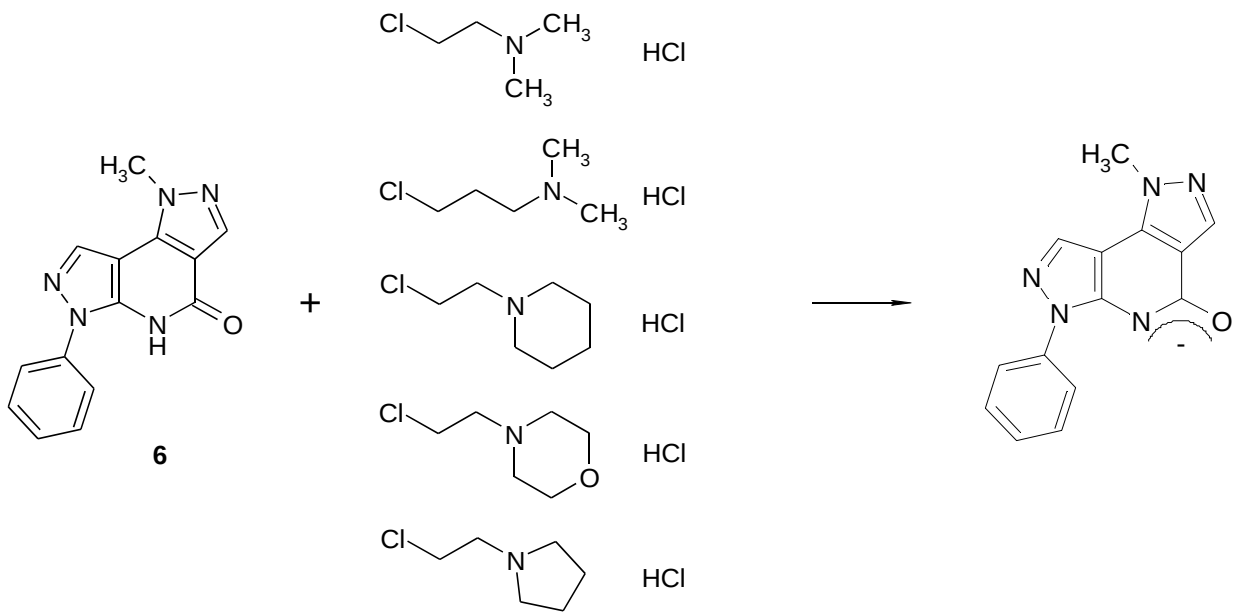


6 **X**

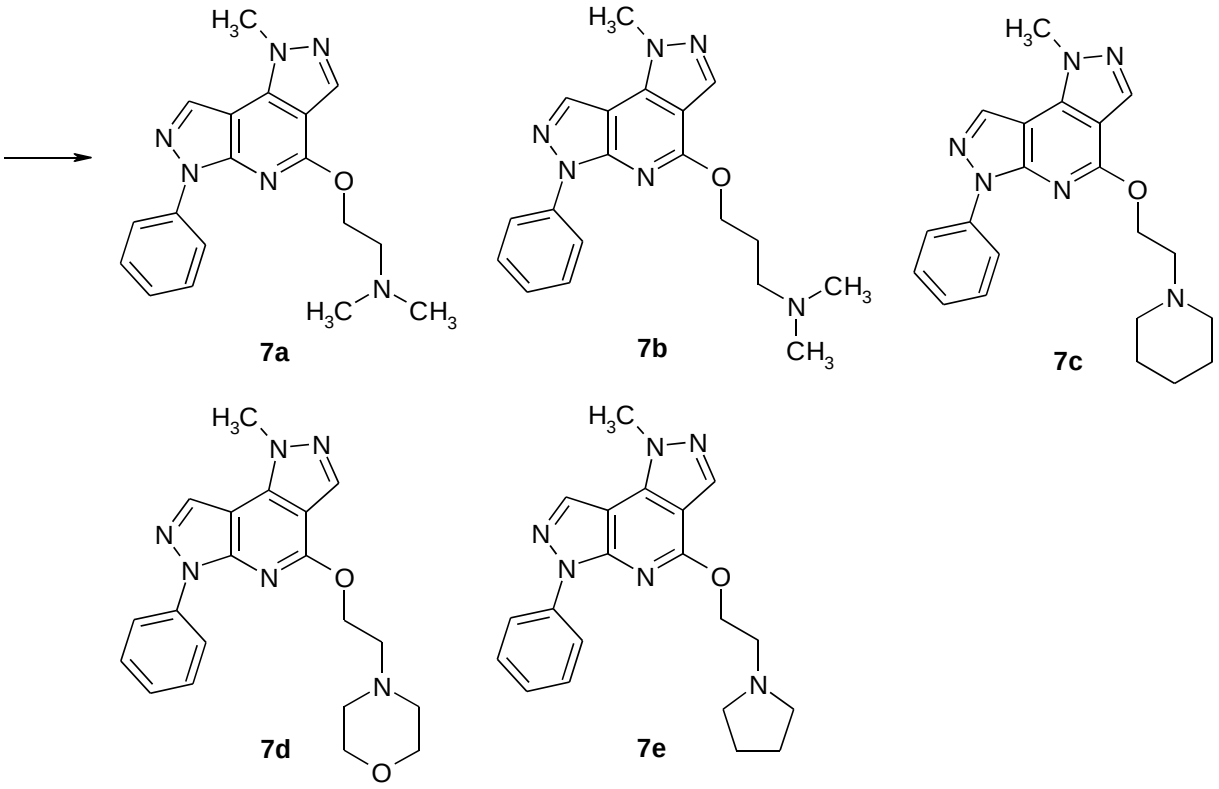
Schema 7a

2.3. Synthese der Zielverbindungen (7a−e)

Die Herstellung der Verbindungen **7a−e** erfolgt durch Umsetzung der Verbindung **6** mit den Hydrochloriden der entsprechenden Alkylamine in DMF. Unter inerten und trockenen Bedingungen (bei −10 bis −5 °C) wird mittels NaH ein mesomeriestabilisiertes Anion gebildet welches alkyliert werden kann. Die Reaktion wird durch Wasserzugabe beendet, das Reaktionsprodukt mit EA extrahiert, über Na_2SO_4 getrocknet und eingedampft. Die Aufreinigung der Produkte erfolgt säulenchromatographisch.

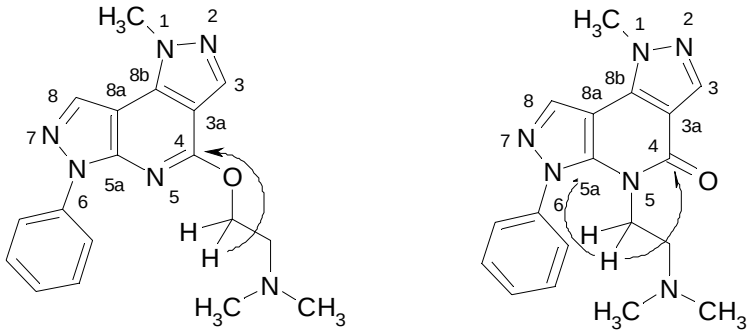


6



Schema 8

Die Alkylierung erfolgt unter diesen Reaktionsbedingungen ausschließlich am Sauerstoff, der die "härtere" Stelle des mesomeriestabilisierten Anions darstellt. Das Vorliegen einer O-Substitution ist erkenntlich an den Resultaten des HMBC Experimentes (Schema 8a), welches eine Kopplung über drei Bindungen der Methylen-Wasserstoffe der Seitenkette mit nur einem Kohlenstoff (Position 4) und nicht zusätzlich mit dem Kohlenstoff an Position 5a zeigt, wie es bei N-Alkylierung zu erwarten wäre. Zudem würde der sp^3 hybridisierte Dihydropyridin-Stickstoff in einem möglichen N-Alkyl Produkt im ^{15}N NMR Spektrum eine andere chemische Verschiebung liefern als der korrespondierende sp^2 hybridisierte Pyridinstickstoff im O-Alkyl Produkt.



Schema 8a

Zusammenfassend ist zu bemerken, dass nach der in Schema 1 angeführten Synthesesequenz die Zielverbindungen **7a-e** in akzeptablen bis guten Ausbeuten erhalten werden konnten. Ihre Struktur (und jene der Zwischenverbindungen) wurde mittels spektroskopischer Daten (^{1}H-NMR, ^{13}C-NMR, ^{15}N-NMR, MS, HRMS) sowie durch Mikroelementaranalyse bestätigt.

3. EXPERIMENTELLER TEIL

3.1. Gerätedaten

Aufnahme der Spektren:

Massenspektren:
Shimadzu QP 5000 (EI, 70eV), Direkteinlass
Finnigan LCQ Deca mit HPLC-Pumpe Shimadzu LC-10AT (Flussrate 0.05 ml/min)

Hochaufgelöste Massenspektren:
Finningan MAT 8230 (EI, 70eV)

^{1}H-NMR und ^{13}C-NMR Spektren:
Varian Unity*Plus* 300 (299.95 MHz für ^{1}H, 75.43 MHz für ^{13}C), bei 28 °C. Bruker Avance 500 (500.13 MHz für ^{1}H, 125.77 MHz für ^{13}C), bei 28 °C. Die Lösungsmittelsignale wurden als interner Standard verwendet, welcher mit δ 7.26 ppm (^{1}H, $CDCl_3$) bzw. δ 2.49 ppm (^{1}H, DMSO-*d6*) und δ 77.0 ppm (^{13}C, $CDCl_3$) bzw. δ 39.5 ppm (^{13}C, DMSO-*d6*) auf TMS bezogen wurde. Die chemische Verschiebung wird durch die δ-Werte angegeben.

^{15}N-NMR Spektren:
Bruker Avance 500 (50.69 MHz für ^{15}N), Referenz: externes Nitromethan.

Chromatographische Trennungen:

Dünnschichtchromatographie:
Merck DC-Metallfolien, Kieselgel 60 F_{254}, Schichtdicke 0.2 mm

Säulenchromatographie:
Merck Kieselgel 60 F_{254}

Sonstiges:

Schmelzpunkte:

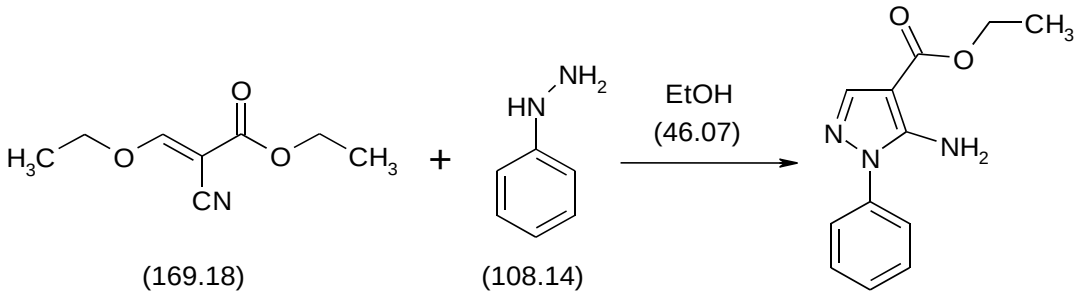
Reichert-Kofler Heiztischmikroskop (unkorrigiert)

CHN-Analysen:

Mikroanalytisches Laboratorium Universität Wien

Es fand keine Optimierung der Ausbeuten der durchgeführten Synthesen statt.

3.2. Synthese von 5-Amino-1-phenylpyrazol-4-carbonsäureethylester (1)



(169.18) (108.14)

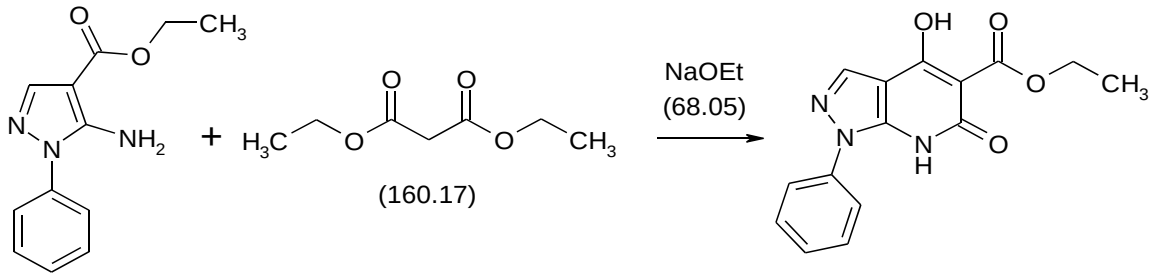
1
(231.26)

In einem 2l Rundkolben werden 100.00 g (710 mmol) Ethoxymethylencyanessigsäureethylester in 500 ml EtOH gelöst und anschließend 70.5 ml bzw. 76.80 g (710 mmol) Phenylhydrazin zugegeben. Das Reaktionsgemisch wird für 12 h zum Rückfluss erhitzt. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur wird das Reaktionsgemisch unter vermindertem Druck zur Trockene eingedampft. Der Rückstand wird aus zirka 300 ml Et_2O umkristallisiert. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur werden die Kristalle abgesaugt und getrocknet.

Ausbeute: 124.55 g (76 %) farblose Kristalle (75 % der Literatur)

Schmelzpunkt: 99 °C (Lit. [22] Schmelzpunkt: 98−100 °C)

3.3. Synthese von 4-Hydroxy-6-oxo-1-phenyl-6,7-dihydro-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridin-5-carbonsäureethylester (2)



1
(231.25)

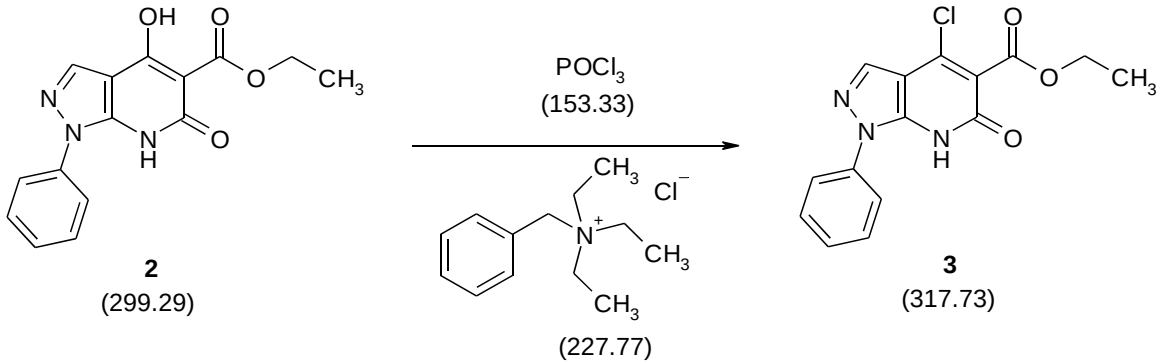
2
(299.29)

400 ml absoluter EtOH werden unter Feuchtigkeitsausschluss (Trockenrohr), Abzug (Woulf'sche Flasche) und Rühren portionsweise zu 25.40g (1.10 mmol) metallischem Natrium gegeben. Zur Lösung des Natriumethanolats wird 68.45 g (296 mmol) Aminopyrazol **1** hinzugefügt. Das Reaktionsgemisch wird erwärmt. Währenddessen wird eine Lösung von 160 ml (1.04 mmol) Malonsäurediethylester in 150 ml absolutem EtOH über 30 min hinzu getropft. Danach wird für weitere 72 h zum Rückfluss erhitzt. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur wird das Reaktionsgemisch durch Zugabe von 500 ml H_2O verdünnt. Die Reaktionslösung wird in einem Becherglas gerührt und durch Zutropfen von halbkonzentrierter HCl auf einen pH-Wert von 2−3 eingestellt, wobei das gewünschte Produkt **2** ausfällt. Der Niederschlag wird abgesaugt, mit H_2O gewaschen und über Nacht im Hochvakuum (Vakuumline) getrocknet. Umkristallisiert wird aus EA.

Ausbeute: 35.23 g (51 %) hellbeige Kristalle

Schmelzpunkt: 137.5 °C (Lit. [29] Schmelzpunkt: 137–138 °C)

3.4. Synthese von 4-Chlor-6-oxo-1-phenyl-6,7-dihydro-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridin-5-carbonsäureethylester (3)

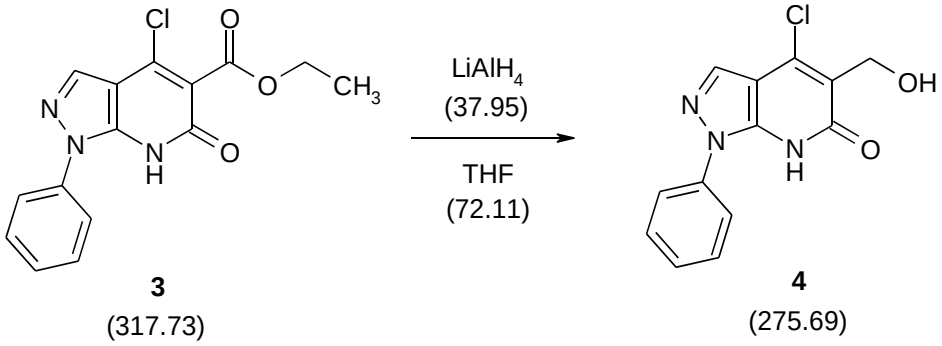


50.50 g (168.8 mmol) der Ausgangsverbindung **2** und 161.60 g (676 mmol) BTEAM werden in einem Rundkolben unter Rühren mit 660 ml ACN versetzt. Daraufhin werden 140.8 ml $POCl_3$ hinzugefügt und 3 h zum Rückfluss erhitzt. Die gesamte Reaktion findet unter Feuchtigkeitsausschluss statt (Trockenrohr). Die abgekühlte Lösung wird unter dem Abzug (Gasentwicklung) vorsichtig auf 1.4 l Eiswasser gegossen und über Nacht im Kühlschrank gelagert. Dabei ausgefallener Niederschlag wird abgesaugt und im Trockenschrank bis zur Gewichtskonstanz getrocknet.

Ausbeute: 52.04 g (99%) farblose Kristalle

Schmelzpunkt: 147 °C (Lit. [29] Schmelzpunkt: 148 °C)

3.5. 4-Chloro-5-(hydroxymethyl)-1-phenyl-1,7-dihydro-6*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridin-6-on (4)



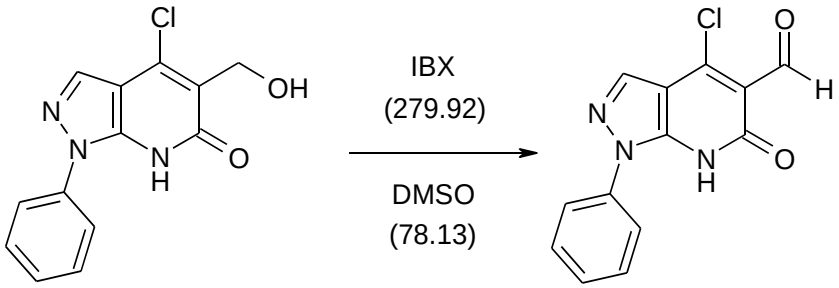
Unter Inertgasbedingungen wird 15.88 g (50 mmol) der Ausgangsverbindung **3** unter Rühren in 150 ml THF

gelöst. Das Reaktionsgemisch wird mit Hilfe eines Eisbades auf −10 °C gekühlt. 55 ml (50 mmol) $LiAlH_4$ werden über eine Spritze portionsweise vorsichtig zugetropft, wobei die Temperatur der Lösung maximal 0 °C erreichen soll. Daraufhin wird das Reaktionsgemisch 1 h weiter im Eisbad gerührt. Die Reaktion wird durch behutsames Zutropfen von H_2O über eine Spritze beendet. Die Lösung wird in ein Becherglas überführt und mit weiteren 500 ml H_2O versetzt, dabei fallen Verunreinigungen aus. Diese werden durch Filtrieren abgetrennt. Das klare Filtrat wird mit 2N HCl auf pH 4 eingestellt. Dabei ausgefallener Niederschlag wird abgesaugt und bei 100 °C im Trockenschrank getrocknet.

Ausbeute: 7.66 g (48%) farblose Kristalle

Schmelzpunk: 203 °C (Lit. [29] Schmelzpunkt: 204−205 °C)

3.6. Synthese von 4-Chlor-6-oxo-1-phenyl-6,7-dihydro-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridin-5-carbaldehyd (5)



4
(275.69)

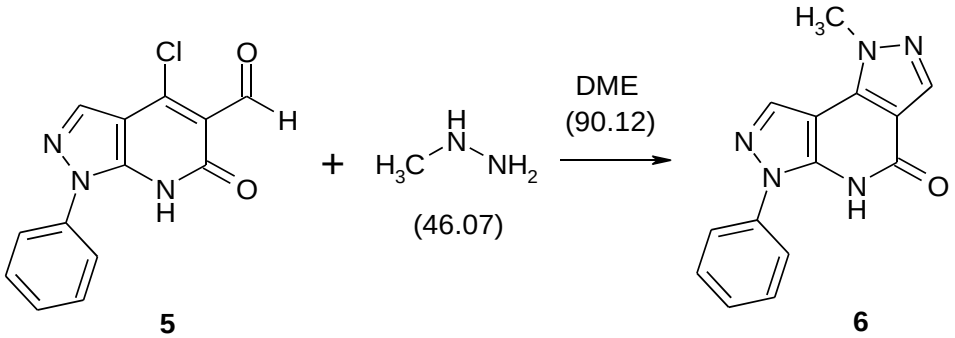
5
(273.68)

Man löst unter Rühren 6.90 g (25 mmol) des Alkohols **4** in 125 ml DMSO und gibt anschließend 10.28 g (37.5 mmol) IBX hinzu. Das Reaktionsgemisch wird 3.5 h gerührt. Eine DC-Kontrolle (FM: DCM) zeigte, dass sich die Ausgangsverbindung schon beinahe vollständig umgesetzt hat. Die Lösung wird in einem großen Becherglas mit 500 ml H_2O verdünnt. Der dabei ausgefallene Niederschlag wird abgesaugt und mehrmals gründlich mit DCM gewaschen. Nach der Trennung der Phasen im Scheidetrichter extrahiert man die organische Phase 3 × mit je 150 ml DCM. Zur Abtrennung von DMSO werden die gesammelten organischen Phasen erst 3 × mit je 150 ml Wasser, daraufhin 3 × mit je 150 ml gesättigter NaCl-Lösung und dann wieder 3 × mit je 150 ml Wasser gewaschen. Man trocknet die organische Phase mit Na_2SO_4, filtriert und dampft die Lösung unter vermindertem Druck ein.

Ausbeute: 5.16 g (75%)

Schmelzpunkt: 146 °C (Lit. [29] Schmelzpunkt 144−145 °C)

3.7. Umsetzung des Aldehyds mit Methylhydrazin (6)



5
(273.68)

6
(265.27)

1.37 g (5 mmol) Aldehyd **5** werden unter Rühren in 50 ml DME gelöst. Die hellgelbe Lösung verfärbt sich nach Zugabe von 0.8 ml (15 mmol) Methylhydrazin milchig-weiß. Das Reaktionsgemisch wird über Nacht unter Rückfluss gekocht. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur kann das dabei ausgefallene Produkt **6** abgesaugt werden. Die Trocknung erfolgt im Exsiccator.

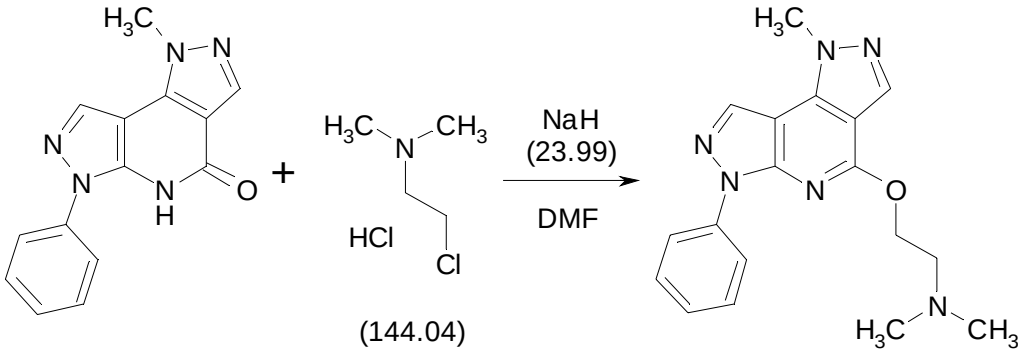
Ausbeute: 1.38 g (99 %)

Schmelzpunkt: 305 °C (Lit. [29] Schmelzpunkt 307°C)

3.8. O-Alkylierung von 1-Methyl-6-phenyl-5,6-dihydropyrazolo[3,4-*b*:3',4'-*d*]pyridin-4(1*H*)-on − Allgemeine Arbeitsvorschrift

434 mg (1.64 mmol) der Ausgangsverbindung **6** werden in 20 ml trockenem DMF aufgenommen und bei einer Temperatur von −5 °C bis −10 °C zu einer Lösung von 240 mg (5.7 mmol) NaH in 12 ml trockenem DMF hinzugefügt. Diese Lösung wird 30 min gerührt. Daraufhin gibt man eine Lösung von 3.4 mmol des Alkylierungsreagenzes in 10 ml trockenem DMF hinzu. Das Reaktionsgemisch wird über Nacht auf 69 °C erwärmt. Alle Lösungsschritte und die Reaktion erfolgen unter Inertgasbedingungen. Durch Zugabe von 100 ml H_2O wird die Reaktion beendet. Die wässrige Phase wird dreimal mit je 60 ml EA im Scheidetrichter extrahiert. Die gesammelten organischen Phasen werden über Na_2SO_4 getrocknet, filtriert und unter vermindertem Druck eingedampft. Die Aufreinigung des Rückstandes erfolgt säulenchromatographisch.

3.8.1. Synthese von *N,N*-dimethyl-2-[(1-methyl-6-phenyl-1,6-dihydrodipyrazolo[3,4-*b*:3',4'-*d*]pyridin-4-yl)oxy]ethanamin (7a)



6
(265.27)

7a
(336.39)

Die Verbindung wird wie oben beschrieben aus 434 mg (1.64 mmol) der Ausgangsverbindung **6** und 490 mg (3.4 mmol) 2-Chlor-N,N-dimethylethylamin·HCl hergestellt. Das Produkt wird säulenchromatographisch (Kieselgel) aufgereinigt. Dabei wird zuerst die nicht umgesetzte Ausgangsverbindung mit EA eluiert, dann das gewünschte Produkt mit einem Gemisch von EA/MeOH (10:1). Das Produkt löst man in DCM und filtriert es durch einen doppelten Faltenfilter. Zu analytischen Zwecken wurden 50 mg aus PE umkristallisiert.

Ausbeute: 124 mg (29 %) farblose Kristalle

Schmelzpunkt: 118 °C

^{1}H-NMR: (300 MHz, DMSO-d_6) (Tafel 7a.1): δ (ppm) 8.60 (s, 1H, H-8), 8.22 (m, 2H, Ph H-2,6), 8.12 (s, 1H, H-3), 7.55 (m, 2H, Ph H-3,5), 7.35 (m, 1H, Ph H-4), 4.59 (t, 6.0 Hz, 2H, OCH_2), 4.21 (s, 3H, N1-CH_3), 2.72 (t, 6.0 Hz, 2H, NCH_2), 2.23 (s, 6H, NCH_3).

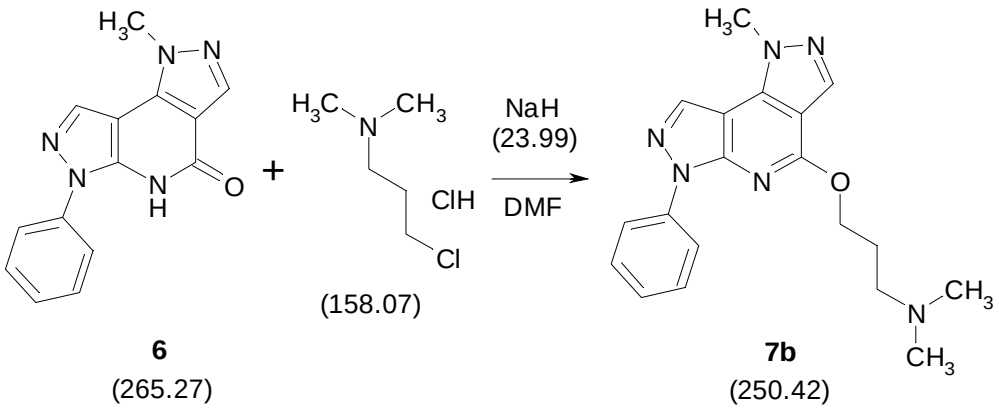
^{13}C-NMR: (75 MHz, DMSO-d_6) (Tafel 7a.2): δ (ppm) 157.4 (C-4, ^{3}J(C-4,OCH_2) = 3.2 Hz), 147.0 (C-5a, ^{3}J(C-5a,H-8) = 4.4 Hz), 139.3 (Ph C-1), 138.7 (C-8b), 133.3 (C-3, ^{1}J(C-3,H-3) = 192.3 Hz), 131.8 (C-8, ^{1}J(C-8,H-8) = 192.9 Hz), 129.1 (Ph C-3,5), 126.1 (Ph C-4), 121.0 (Ph C-2,6), 105.8 (C-3a, ^{2}J(C-3a,H-3) = 10.2 Hz), 98.4 (C-8a, ^{2}J(C-8a,H-8) = 10.8 Hz), 64.4 (OCH_2), 57.2 (NCH_2), 45.6 (NCH_3), 37.5 (N1-CH_3, ^{1}J(N1-CH_3) = 140.7 Hz).

^{15}N-NMR: (50 MHz, DMSO-d_6) (Tafel 7a.3): δ (ppm) −360.2 (N-CH_3), −195.7 (N-1), −181.9 (N-6), −80.0 (N-7), −64.2 (N-2), N-5 nicht gefunden.

MS m/z (%) (Tafel 7a.4): 337 (M^++1, 100), 315 (9), 292 (6), 257 (8).

CHN-Analyse: berechnet für $C_{18}H_{20}N_6O$ (336.391): C,64.27; H, 5.99; N, 24.98. Gefunden: C, 64.24; H, 5.83; N, 24.78.

3.8.2. Synthese von *N,N*-dimethyl-3-[(1-methyl-6-phenyl-1,6-dihydropyrazolo[3,4-*b*:3',4'*d*]pyridin-4-yl)oxy]-1-propanamin (7b)



Die Verbindung wird wie oben beschrieben aus 434 mg (1.64 mmol) der Ausgangsverbindung und 538 mg (3.4 mmol) 3-Dimethylamino-1-propylchlorid·HCl hergestellt. Das Produkt wird säulenchromatographisch (Kieselgel) aufgereinigt. Dabei wird zuerst die nicht umgesetzte Ausgangsverbindung mit EA eluiert, dann das gewünschte Produkt mit einem Gemisch von EA/MeOH (5:1) +1 % TEA. Das Produkt löst man in DCM

und filtriert es durch einen doppelten Faltenfilter. Zu analytischen Zwecken wurde aus DPE umkristallisiert.

Ausbeute: 140 mg (32 %) farblose Kristalle

Schmelzpunkt: 95 °C

^{1}H-NMR: (300 MHz, DMSO-d_6) (Tafel 7b.1): δ (ppm) 8.62 (s, 1H, H-8), 8.23 (m, 2H, Ph H-2,6), 8.16 (s, 1H, H-3), 7.55 (m, 2H, Ph H-3,5), 7.35 (m, 1H, Ph H-4), 4.55 (t, 6.6 Hz, 2H, OCH_2), 4.23 (s, 3H, N_1-CH_3), 2.39 (t, 7.0 Hz, 2H, NCH_2), 2.13 (s, 6H, N-CH_3), 1.96 (m, 2H, CH_2).

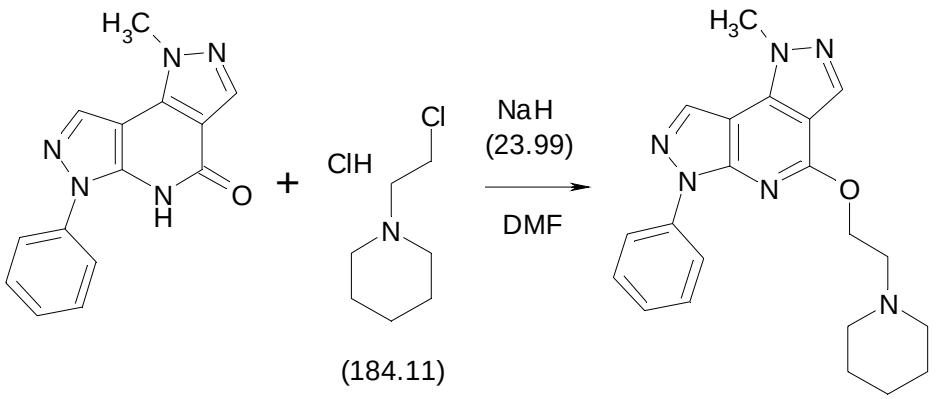
^{13}C-NMR: (125 MHz, DMSO-d_6) (Tafel 7b.2): δ (ppm) 157.6 (C-4, ^{3}J(C-4,OCH_2) = 3.0 Hz), 147.1 (C-5a, ^{3}J(C-5aH-8) = 4.2 Hz), 139.3 (Ph C-1), 138.7 (C-8b), 133.3 (C-3, ^{1}J(C-3,H-3) = 192.3 Hz), 131.8 (C-8, ^{1}J(C-8,H-8) = 192.9 Hz), 129.1 (Ph C-3,5), 126.1 (Ph C-4), 121.0 (Ph C-2,6), 105.9 (C-3a, ^{2}J(C-3a,H-3) = 10.2 Hz), 98.4 (C-8a, ^{2}J(C-8a,H-8) = 10.8 Hz), 64.9 (OCH_2), 55.7 (NCH_2), 45.2 (N-CH_3), 37.5 (N1-CH_3, ^{1}J(N1-CH_3) = 140.8 Hz), 26.5 (CH_2).

^{15}N-NMR: (50 MHz, DMSO-d_6) (Tafel 7b.3): δ (ppm) −357.7 (N-CH_3), −195.8 (N-1), −181.9 (N-6), −80.0 (N-7), −64.2 (N-2), N-5 nicht gefunden.

MS m/z (%) (Tafel 7b.4): 351.20 (M^++1, 100), 312.53 (7), 257.33 (4).

HRMS: berechnet für $C_{19}H_{23}N_6O$ (M^++H): 351.1928. Gefunden: 351.1940 (M^++H).

3.8.3. Synthese von 1-Methyl-6-phenyl-4-[2-(piperidinyl)ethoxy]-1,6-dihydrodipyrazolo[3,4-*b*:3',4'-*d*]pyridin (7c)



6
(265.27)

7c
(376.45)

Die Verbindung wird wie oben beschrieben aus 434 mg (1.64 mmol) der Ausgangsverbindung und 626 mg (3.4 mmol) N-(2-Chlorethyl)-piperidin·HCl hergestellt. Zur säulenchromatographischen Aufreinigung wurde EA als Fließmittel verwendet. Das erhaltene Produkt löst man in DCM, filtriert es durch einen doppelten Faltenfilter und kristallisiert es zu analytischen Zwecken aus EtOH um.

Ausbeute: 343 mg (79 %) farblose Kristalle

Schmelzpunkt: 297 °C

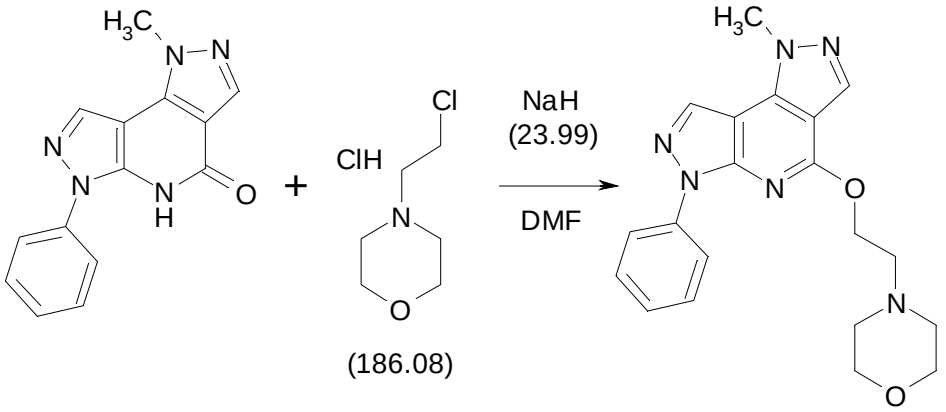
^{1}H-NMR: (300 MHz, DMSO-d_6) (Tafel 7c.1): δ (ppm) 8.61 (s, 1H, H-8), 8.22 (m, 2H, Ph H-2,6), 8.13 (s, 1H, H-3), 7.54 (m, 2H, Ph H-3,5), 7.35 (m, 1H, Ph H-4), 4.61 (t, 6.3 Hz, 2H, OCH_2), 4.22 (s, 3H, N1-CH_3), 2.74 (t, 6.3 Hz, 2H, NCH_2), 2.44 (m, 4H, Pip H-2,6), 1.45 (m, 4H, Pip H-3,5), 1.34 (m, 2H, Pip H-4).

^{13}C-NMR: (125 MHz, DMSO-d_6) (Tafel 7c.2): δ (ppm) 157.4 (C-4, ^{3}J(C-4,OCH_2) = 3.5 Hz), 147.0 (C-5a, ^{3}J(C-5a,H-8) = 4.4 Hz), 139.3 (Ph C-1), 138.7 (C-8b), 133.3 (C-3, ^{1}J(C-3,H-3) = 192.3 Hz), 131.8 (C-8, ^{1}J(C-8,H-8) = 192.9 Hz), 129.0 (Ph C-3,5), 126.2 (Ph C-4), 121.0 (Ph C-2,6), 105.8 (C-3a, ^{3}J(C-3a,H-3) = 10.2 Hz), 98.4 (C-8a, ^{2}J(C-8a,H-8) = 10.8 Hz), 64.1 (OCH_2), 56.8 (NCH_2), 54.4 (Pip C-2,6), 37.5 (N1-CH_3, ^{1}J(N1-CH_3) = 140.7 Hz), 25.6 (Pip C-3,5), 23.9 (Pip C-4).

^{15}N-NMR: (50 MHz, DMSO-d_6) (Tafel 7c.3): δ (ppm) −336.2 (Pip N), −195.6 (N-1), −181.9 (N-6), −79.9 (N-7), −64.2 (N-2), N-5 nicht gefunden.

HRMS: berechnet für $C_{21}H_{25}N_6O$ (M^++H): 377.2084. Gefunden: 377.2093 (M^++H).

3.8.4. Synthese von 1-Methyl-4-[2-(4-morpholinyl)ethoxy]-6-phenyl-1,6-dihydrodipyrazolo[3,4-*b*:3',4'-*d*]pyridin (7d)



6
(265.27)

7d
(378.43)

Die Verbindung wird wie oben beschrieben aus 434 mg (1.68 mmol) der Ausgangsverbindung und 624 mg (3.4 mmol) N-(2-Chlorethyl)morpholin·HCl hergestellt. Um das gewünschte Produkt von der nicht umgesetzten Ausgangsverbindung auf der Säule zu trennen, wird mit EA eluiert. Das Produkt wird in DCM gelöst und durch einen doppelten Faltenfilter filtriert.

Ausbeute: 229 mg (53 %) farblose Kristalle

Schmelzpunkt: 139 °C

^{1}H-NMR: (500 MHz, DMSO-d_6) (Tafel 7d.1): δ (ppm) 8.59 (s, 1H, H-8), 8.20 (m, 2H, Ph H-2,6), 8.13 (s, 1H, H-3), 7.54 (m, 2H, Ph H-3,5), 7.35 (m, 1H, Ph H-4), 4.62 (t, 6.0 Hz, 2H, OCH_2), 4.21 (s, 3H, N1-CH_3), 3.53 (m, 4H, Morph H-2,6), 2.77 (t, 6.0 Hz, 2H, NCH_2), 2.49 (m, 4H, Morph H-3,5).

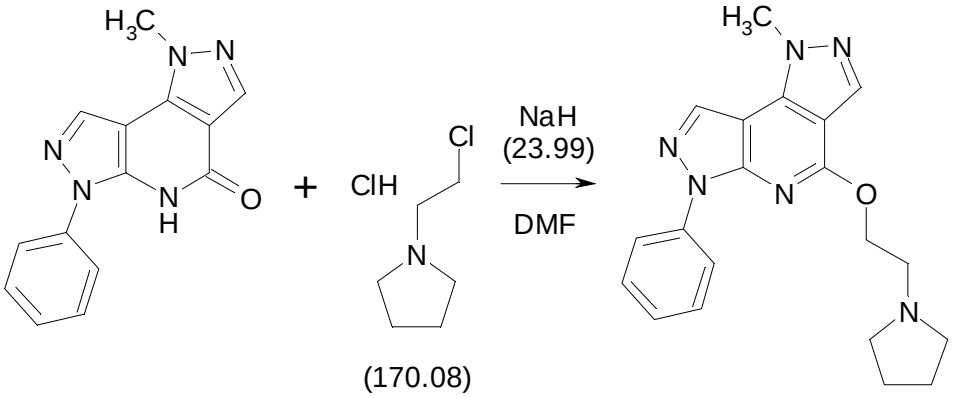
^{13}C-NMR: (125 MHz, DMSO-d_6) (Tafel 7d.2): δ (ppm) 157.4 (C-4, ^3J(C-4,OCH_2) = 3.3 Hz), 147.0 (C-5a, ^3J(C-5a,H-8) = 4.3 Hz), 139.2 (Ph C-1), 138.7 (C-8b), 133.3 (C-3, ^1J(C-3,H-3) = 192.0 Hz), 131.8 (C-8, ^1J(C-8,H-8) = 192.9 Hz), 129.1 (Ph C-3,5), 126.2 (Ph C-4), 121.1 (Ph C-2,6), 105.8 (C-3a, ^2J(C-3a,H-3) = 10.2 Hz), 98.4 (C-8a, ^2J(C-8a,H-8) = 10.8 Hz), 66.2 (Morph C-3,5), 63.9 (OCH_2), 56.5 (NCH_2), 53.6 (Morph C-2,6), 37.5 (N1-CH_3, ^1J(N1-CH_3) = 140.7 Hz).

^{15}N-NMR: (50 MHz, DMSO-d_6) (Tafel 7d.3): δ (ppm) −195.8 (N-1), −181, 9 (N-6), −79.9 (N-7), −64.3 (N-2), 41.3 (Morph N-1), N-5 nicht gefunden.

MS m/z (%) (Tafel 7d.4): 379.20 (M^++1, 100), 355.20 (5), 351.27 (9), 337.20 (10), 315.13 (31), 312.53 (35), 287.33 (8), 284.53 (14), 257.20 (18).

HRMS: berechnet für $C_{20}H_{23}N_6O_2$ (M^++H): 379.1877. Gefunden: 379.1887 (M^++H).

3.8.5. Synthese von 1-Methyl-6-phenyl-4-[2-(1-pyrrolidinyl)ethoxy]-1,6-dihydrodipyrazolo[3,4-*b*:3',4'-*d*]pyridin (7e)



(170.08)

6 (265.27) **7e** (362.43)

Die Verbindung wird wie oben beschrieben aus 434 mg (1.64 mmol) der Ausgangsverbindung und 578 mg (3.4 mmol) N-(2-Chlorethyl)pyrrolidin·HCl hergestellt. Zur säulenchromatographischen Reinigung wurde eine Mischung von EA/MeOH (10:2) als Fließmittel verwendet. Das Produkt wird in DCM aufgenommen, durch einen doppelten Faltenfilter filtriert und zu analytischen Zwecken in DPE umkristallisiert.

Ausbeute: 225 mg (52 %) farblose Kristalle

Schmelzpunkt: 101 °C

^{1}H-NMR: (300 MHz, DMSO-d_6) (Tafel 7d.1): δ (ppm) 8.60 (s, 1H, H-8), 8.22 (m, 2H, Ph H-2,6), 8.13 (s, 1H, H-3), 7.54 (m, 2H, Ph H-3,5), 7.35 (m, 1H, Ph H-4), 4.61 (t, 6.1 Hz, 2H, OCH_2), 4.21 (s, 3H, N1-CH_3), 2.89 (t, 6.1 Hz, 2H, NCH_2), 2.54 (m, 4H, Pyrr H-2,5), 1.66 (m, 4H, Pyrr H-3,4).

^{13}C-NMR: (75 MHz, DMSO-d_6) (Tafel 7d.2): δ (ppm) 157.4 (C-4, ^3J(C-4,OCH_2) = 3.2 Hz), 147.0 (C-5a, ^3J(C-5a,H-8) = 4.3 Hz), 139.3 (Ph C-1), 138.7 (C-8b), 133.3 (C-3, ^1J(C-3,H-3) = 192.2 Hz), 131.8 (C-8,

^{1}J(C-8,H-8) = 192.9 Hz), 129.1 (Ph C-3,5), 126.1 (Ph C-4), 121.0 (Ph C-2,6), 105.8 (C-3a, ^{2}J(C-3a,H-3) = 10.2 Hz), 98.4 (C-8a, ^{2}J(C-8a,H-8) = 10.8 Hz), 65.4 (OCH_2), 54.1 (Pyrr C-2,5), 53.8 (NCH_2), 37.5 (N1-CH_3, ^{1}J(N1-CH_3) = 140.7 Hz), 23.2 (Pyrr C-3,4).

^{15}N-NMR: (50 MHz, DMSO-d_6) (Tafel 7d.3): δ (ppm) −331.1 (Pyrr N-1), −195.7 (N-1), −181.9 (N-6), −79.9 (N-7), −64.1 (N-2), N-5 nicht gefunden.

MS m/z (%) (Tafel 7e.4): 363.20 (M^++1, 100), 312.47 (4), 292.33 (10).

HRMS: berechnet für $C_{20}H_{23}N_6O$ (M^++H): 363.1928. Gefunden: 363.1935 (M^++H).

4. LITERATURVERZEICHNIS

[1] G. Schulte, Adenosin, Adenosinrezeptoren und adenosinrezeptoraktivierte Signalwege, *BIOspektrum* **2004**, 2 (10. Jahrgang), 159−161.

[2] G. Haskó, J. Linden, B. Cronstein, P. Pacher, Adenosine receptors: therapeutic aspects for inflammatory and immune diseases, *Nat. Rev. Drug Discovery* **2008**, 7, 759−770.

[3] B. Fredholm, A. Ijzerman, K. Jacobson, K. N. Klotz, J. Linden, International Union of Pharmacology. XXV. Nomenclature and Classification of Adenosine Receptors, *Pharmacol. Rev.* **2001**, 53, 527−552.

[4] K. A. Jacobson, Z.-G. Gao, Adenosine receptors as therapeutic targets, *Nat. Rev. Drug Discovery* **2006**, 5, 247−264.

[5] J. Linden, Molecular Approach To Adensoine Receptors: Receptor-Mediated Mechanisms of Tissue Protection, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **2001**, 41, 775−787.

[6] P. G. Baraldi, M. A. Tabrizi, S. Gessi, P. A. Borea, Adenosine Receptor Antagonists: Translating Medicinal Chemistry and Pharmacology into Clinical Utility, *Chem. Rev.* **2008**, 108, 238−263.

[7] S. Gessi, E. Cattabriga, A. Avitabile, Elevated Expression of A_3 Adenosine Receptors in Human Colorectal Cancer Is Reflected in Peripheral Blood Cells, *Clin. Cancer Res.* **2004**, 10, 5895−5901.

[8] T. Okamura, Y. Kurogi, K. Hashimoto, S. Sato, H. Nishikawa, K. Kiryu, Y. Nagao, Structure-activity relationships of adenosine A_3 receptor ligands: new potential therapy for the treatment of glaucoma, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, 14, 3775−3779.

[9] Q.-Y. Zhou, C. Li, M. Olah, R. A. Johnson, G. L. Stilese, O. Civelli, Molecular cloning and characterization of an adenosine receptor: The A3 adenosine receptor, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1992**, 89, 7432−7436.

[10] P. G. Baraldi, B. Cacciari, R. Romagnoli, S. Merighi, K. Varani, P. A. Borea, G. Spalluto, A_3 Adenosine Receptor Ligands: History and Perspectives, *Med. Res. Rev.* **2000**, 20, 103−128.

[11] S. Gessi, K. Varani, S. Merighi, E. Cattabriga, A. Avitabile, R. Gavioli, C. Fortini, E. Leung, S. Mac Lennan, P. A. Borea, Expression of A_3 Adenosine Receptors in Human Lymphocytes: Up-Regualtion in T Cell Activation, *Mol. Pharmacol.* **2004**, 65, 711−719.

[12] P. Fishman, S. Bar-Yehuda, L. Vagman, Adenosine and Other Low Molecular Weight Factors Relased by Muscle Cells Inhibit Tumor Cell Growth, *Cancer Res.* **1998**, 58, 3181−3187.

[13] V. Colotta, D. Catarzi, F. Varano, L. Cecchi, G. Filacchioni, C. Martini, L. Trincavelli, A. Lucacchini, Synthesis and Structure−Activity Relationships of a New Set of 2-Arylpyrazolo[3,4-*c*]quinoline Derivatives as Adenosine Receptor Antagonists, *J. Med. Chem.* **2000**, 43, 3118−3124.

[14] S. Merighi, A. Benini, P. Mirandola, S. Gessi, K. Varani, E. Leung, S. Maclennan, P. A. Borea, Adenosine modulates vascular endotelial growth factor exression via hypoxia-inducible factor-1 in human glioblastoma cells, *Biochem. Pharmacol.* **2006**, 72, 19−31.

[15] V. Colotta, O. Lenzi, D. Catarzi, F. Varano, G. Filacchioni, C. Martini, L. Trincavelli, O. Ciampi, A. M. Pugliese, C. Traini, F. Pedata, E. Morizzo, S. Moro, Pyrido[2,3-*e*]pyrazin-1-one as a New Scaffold To Develop Potent and Selective Human A_3 Adenosine Receptor Antagonists. Synthesis, Pharmacological Evaluation, and Ligand−Receptor Modeling Studies, *J. Med. Chem.* **2009**, 52, 2407−2419.

[16] P. G. Baraldi, M. A. Tabrizi, D. Preti, A. Bovero, F. Fruttarolo, R. Romagnoli, N. A. Zaid, A. R. Moorman, K. Varani, P. A. Borea, New 2-Arylpyrazolo[4,5-*c*]quinoline Derivatives as Potent and Selective Human A_3 Adenosine Receptor Antagnoists, *J. Med. Chem.* **2005**, 48, 5001−5008.

[17] P. G. Baraldi, P. A. Borea, New potent and selective human adenosine A3 receptor antagonists, *TiPS* **2000**, 21, 456−459.

[18] S. L. Cheong, S. Federico, G. Venkatesan, P. Paira, Y.-M. Shao, G. Spalluto, C. W. Yap, G. Pastorin, Pharmacophore elucidation for a new series of 2-aryl-pyrazolo-triazolo-pyrimidines as potent human A_3 adenosine receptor antagnoists, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2011**, 21, 2898−2905.

[19] J. E. Van Muijlijk-Koezen, H. Timmerman, H. Van der Goot, W. M. P. B. Menge, J. Frijtag Von Drabbe Künzel, M. De Groote, A. P. Ijzerman, Isoquinoline an Quinazline Urea Analogues as Antagonists for the Human Adenosine A_3 Receptor, *J. Med. Chem.* **2000**, 43, 2227−2238.

[20] M. Kopp, J.-C. Lancelot, P. Dallemagne, S. Rault, Synthesis of Novel Pyrazolopyrrolopyrazines, Potential Analogs of Sildenafil, *J. Heterocycl. Chem.* **2001**, 38, 1045−1050.

[21] M. Frigerio, M. Santagostino, S. Sputore und G. Palmisano, Oxidation of Alcohols with o-Iodoxybenzoic Acid (IBX) in DMSO: A New Insight into an Old Hypervalent Iodine Reagent, *J. Org.*

Chem. **1995**, 60, 7272−7276.

[22] M. Kopp, J. C. Lancelot, P. Dallemagne, S. Rault, Synthesis of Novel Pyrazolopyrrolopyrazines, Potential Analogs of Sildenafil, *J. Heterocycl. Chem.* **2001**, 38, 1045−1050.

[23] Z. L. Huang, W. M. Qu, N. Eguchi, J. F. Chen, M. A. Schwarzschild, B. B. Fredholm, Y. Urade, O. Hayaishi, Adenosine A_{2A}, but not A_1, receptors mediate the arousal effect of caffeine, *Nature Neurosci.* **2005**, 8, 858−859.

[24] K. Xu, E. Bastia, M. Schwarzschild, Therapeutic potential of adenosine A_{2A} receptor antagonists in Parkinson's disease, *Pharmacol. Ther.* **2005**, 105, 267−310.

[25] A. Kalda, L. Yu, E. Oztas, J. F. Chen, Novel neuroprotection by caffeine and adenosine A2A receptor antagonists in animal models of Parkinson's disease, *J. Neurol. Sci.* **2006**, 248, 9−15.

[26] Q. Dong, H. N. Ginsberg, B. F. Erlanger, Overexpression of the A1 adenosine receptor in adipose tissue protects mice from obesity-related insulin resistance, *Diabetes Obes. Metab.* **2001**, 5, 360−366.

[27] Z. Gao, B. S. Li, Y. J. Day, J. Linden, A3 Adenosine Receptor Activation Triggers Phosphorylation of Protein Kinase B and Protects Rat Basophilic Leukemia 2H3 Mast Cells from Apoptosis, *Mol. Pharmacol.* **2001**, 59, 76−82.

[28] M. Frigerio, M. Santagostino und S. Sputore, A User-Friendly Entry to 2-Iodoxybenzoic Acid (IBX), *J. Org. Chem,* **1999**, 64, 4537–4538.

[29] B. Datterl, Dissertation, Universität Wien, in Vorbereitung.

[30] J. de M. Muñoz, J. Alcázar, A. de la Hoz, A. Díaz-Ortiz, Application of Flow Chemistry to the Selective Reduction of Esters to Aldehydes, *Eur. J. Org. Chem.* **2012**, 260–263.

[31] Ahn, Jin Hee, Song, Jeong In, Ahn, Jeong Eun, An, Duk Keun, Lithium diisobutylpiperidinohydroaluminate (LDBPA) as a mild and efficient reducing agent for the conversion of ester to aldehyde, *Bull. Korean Chem. Soc.* **2005**, 26, 377–378.

[32] J. Malek, *Org. React*. **1988**, 36, 249–590.

[33] M. B. Smith, J. March, March's Advanced Organic Chemistry: Reactions, Mechanisms, and Structure, Sixth Edition, *John Wiley & Sons, Inc*. **2007**, 1806–1807.

5. ANHANG

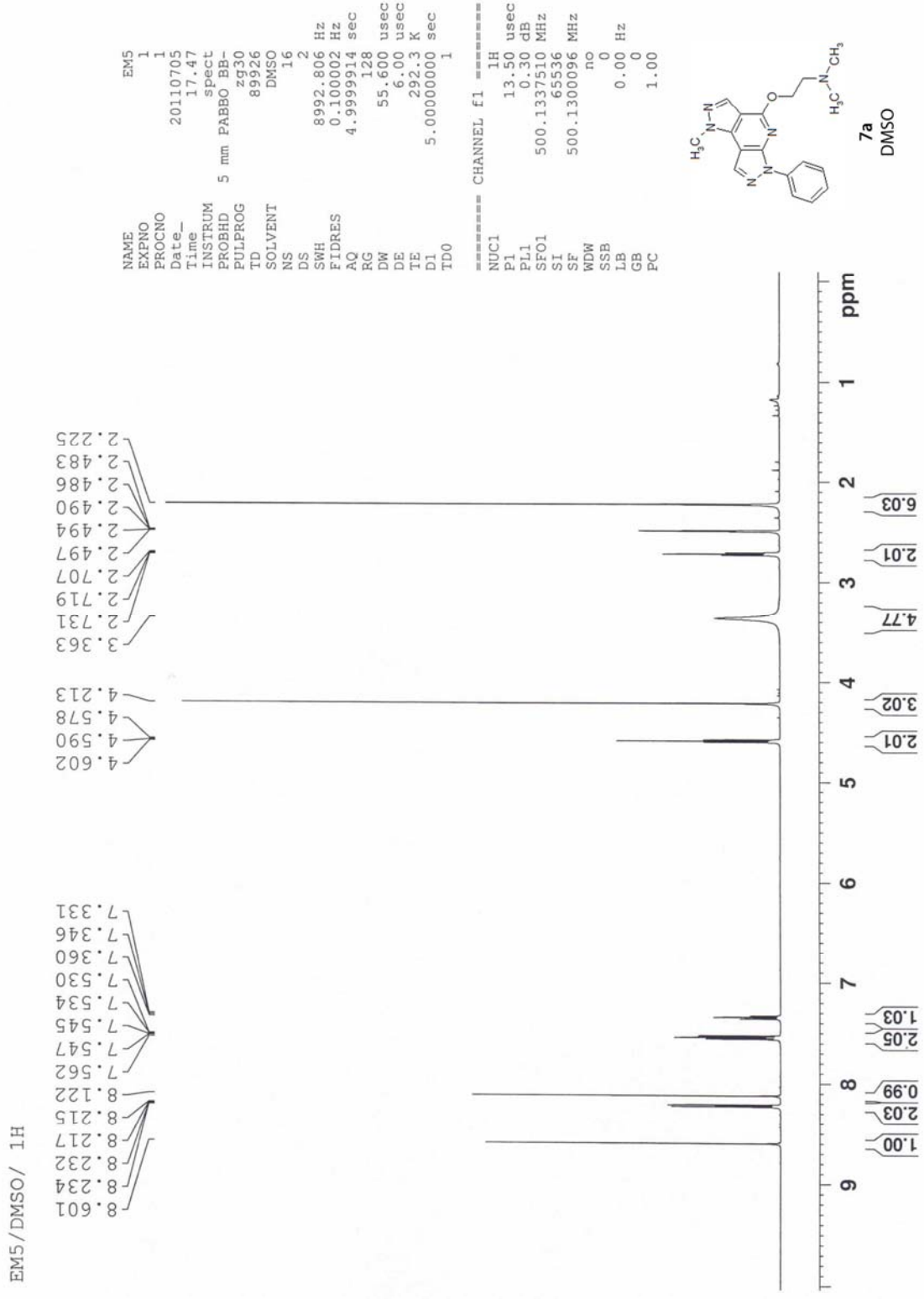
5.1. Abkürzungsverzeichnis

Ac	Acetyl
ACN	Acetonitril
AMP	Adenosinmonophosphat
ADP	Adenosindiphosphat
ATP	Adenosintriphosphat
AR	Adenosinrezeptor
BTEAM	Benzyltriethylammoniumchlorid
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CH_2Cl_2	Dichlormethan
$CH_2(COOEt)_2$	Malonsäurediethylester
DC	Dünnschichtchromatographie
DCM	Dichlormethan
DME	Ethylenglykoldimethylether
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DMSO-*d6*	Deuterodimethylsulfoxid
DPE	Diisopropylether
EA	Ethylacetat
EI	Elektronenstoßionisation
EtOH	Ethanol
Et_2O	Diethylether
ERK	extrazellulär signalreguierte Kinase
FM	Fließmittel
FP	Schmelzpunkt
GABA	Gammaaminobuttersäure
HCl	Salzsäure
·HCl	Hydrochlorid
HIF	Hypoxie induzierter Faktor
HRMS	Hochaufgelöstes Massenspektrum
H_2O	Wasser
IBX	2-Iodoxybenzoesäure
$LiAlH_4$	Lithiumaluminiumhydrid
MAPK	mitogen-aktivierte Proteinkinasen

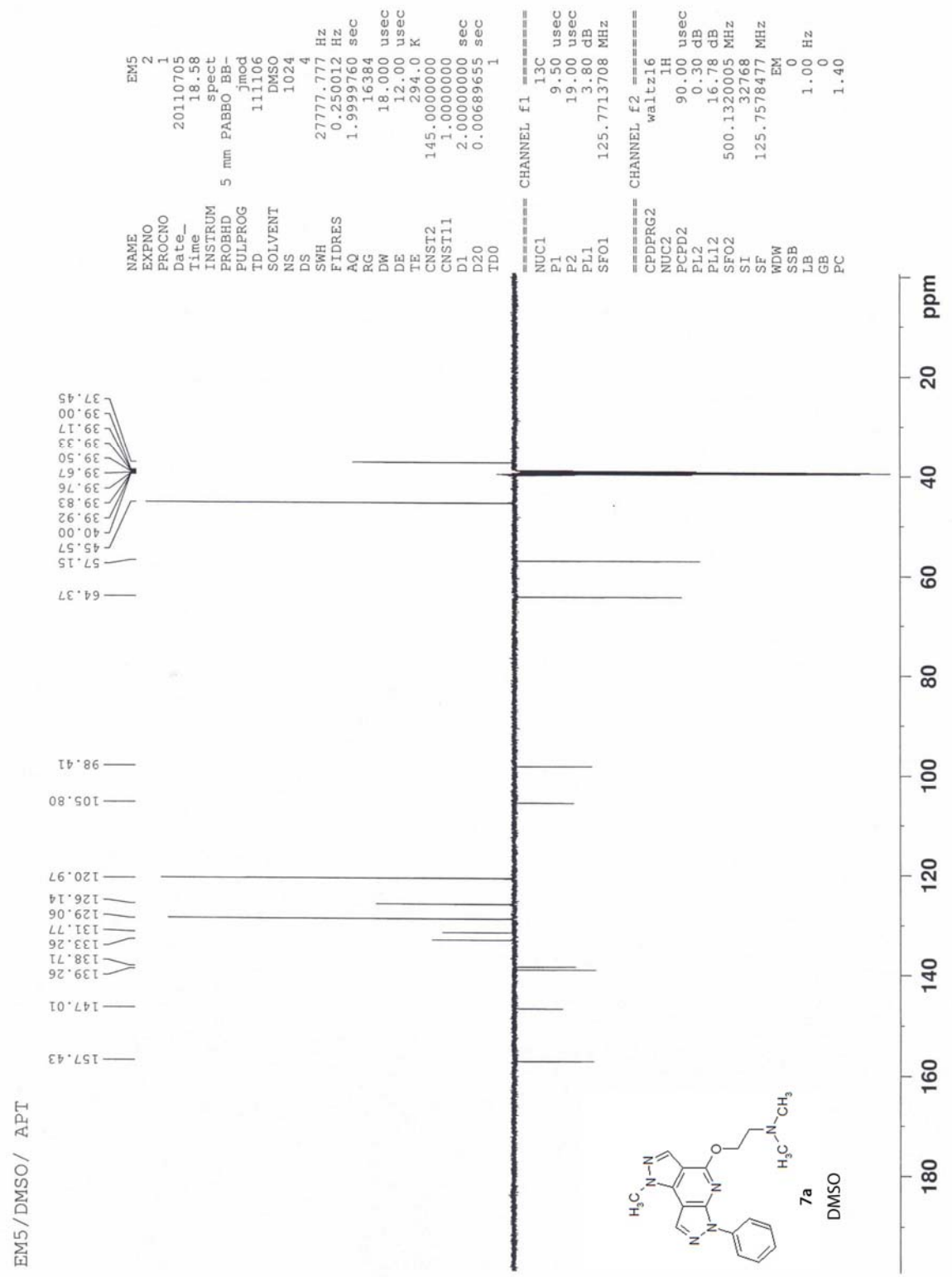
Me	Methyl
MeOH	Methanol
Morph	Morpholin
mRNA	Boten-RNA
MS	Massenspektrum
m/z	Masse-Ladungs-Verhältnis
NaCl	Natriumchlorid
NaH	Natriumhydrid
NMR	nuclear magnetic resonance (Kernspinresonanz)
NaOEt	Natriumethanolat
Na_2SO_4	Natriumsulfat
NO	Stickstoffmonoxid
PE	Petrolether
Ph	Phenyl
Pip	Piperidin
$POCl_3$	Phosphoroxychlorid
Pyrr	Pyrrolidin
TEA	Triethylamin
THF	Tetrahydrofuran
VEGF	vascular endothelial growth factor

5.2. Spektren

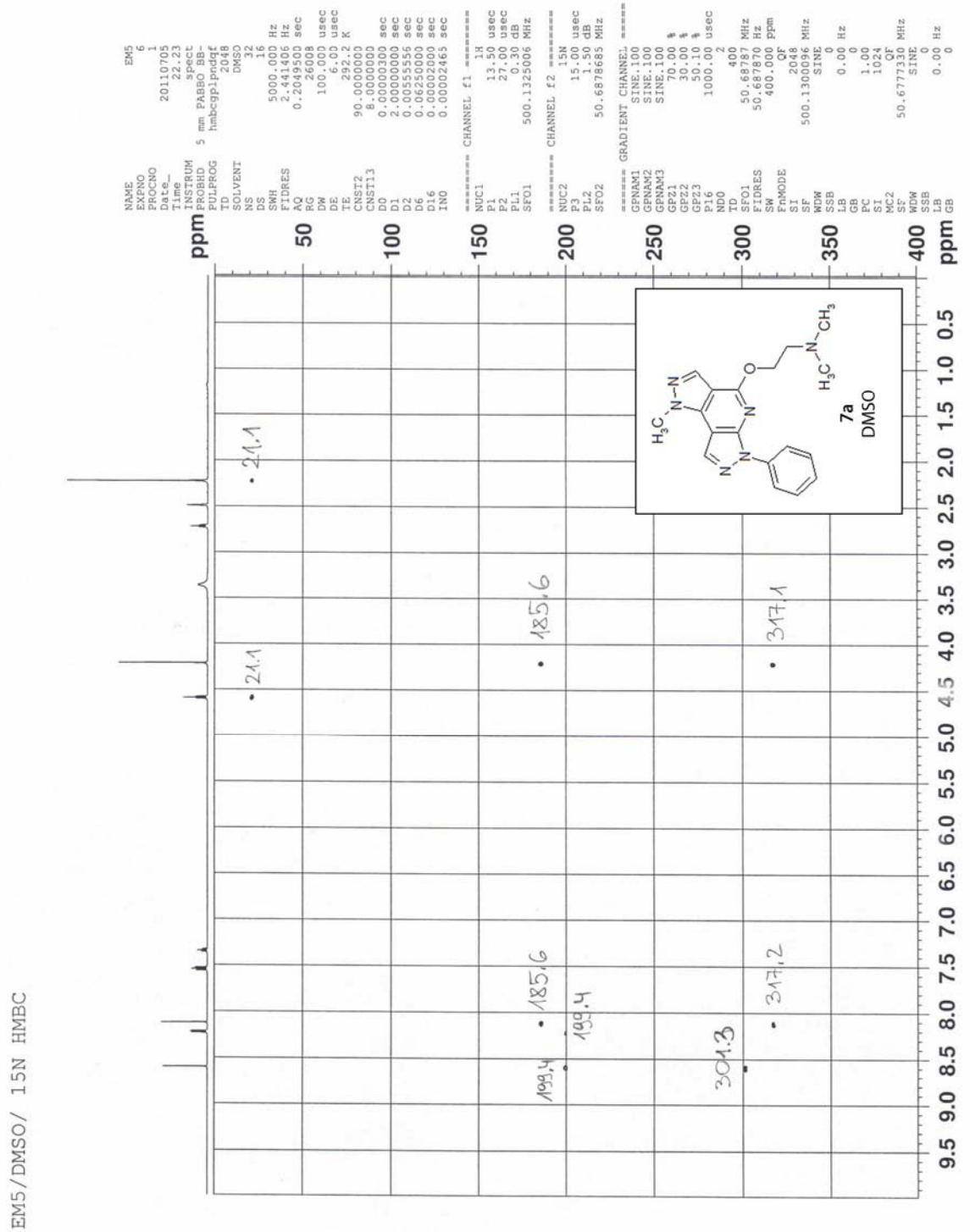
Tafel 7a.1


EM5/DMSO/ 1H
NAME EM5
EXPNO 1
PROCNO 1
Date_ 20110705
Time 17.47
INSTRUM spect
PROBHD 5 mm PABBO BB-
PULPROG zg30
TD 89926
SOLVENT DMSO
NS 16
DS 2
SWH 8992.806 Hz
FIDRES 0.100002 Hz
AQ 4.9999914 sec
RG 128
DW 55.600 usec
DE 6.00 usec
TE 292.3 K
D1 5.00000000 sec
TDO 1
======== CHANNEL f1 ========
NUC1 1H
P1 13.50 usec
PL1 0.30 dB
SFO1 500.1337510 MHz
SI 65536
SF 500.1300096 MHz
WDW no
SSB 0
LB 0.00 Hz
GB 0
PC 1.00
7a
DMSO
ppm
8.601
8.234
8.232
8.217
8.215
8.122
7.562
7.547
7.545
7.534
7.530
7.360
7.346
7.331
4.602
4.590
4.578
4.213
3.363
2.731
2.719
2.707
2.497
2.494
2.490
2.486
2.483
2.225
1.00
2.03
0.99
2.05
1.03
2.01
3.02
4.77
2.01
6.03

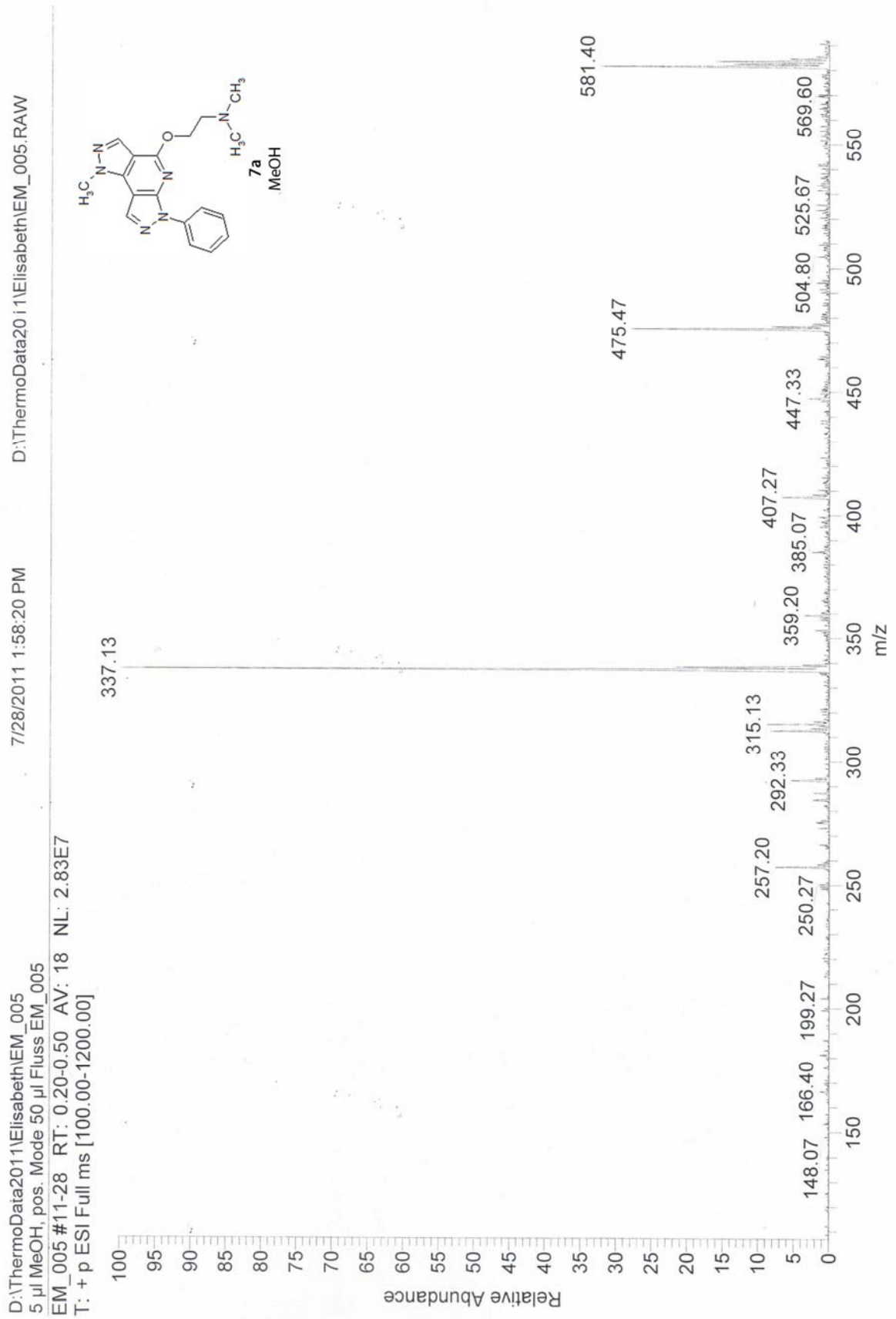
Tafel 7a.2


EM5/DMSO/ APT
NAME EM5
EXPNO 2
PROCNO 1
Date_ 20110705
Time 18.58
INSTRUM spect
PROBHD 5 mm PABBO BB-
PULPROG jmod
TD 111106
SOLVENT DMSO
NS 1024
DS 4
SWH 27777.777 Hz
FIDRES 0.250012 Hz
AQ 1.9999760 sec
RG 16384
DW 18.000 usec
DE 12.00 usec
TE 294.0 K
CNST2 145.0000000
CNST11 1.0000000
D1 2.00000000 sec
D20 0.00689655 sec
TD0 1
CHANNEL f1
NUC1 13C
P1 9.50 usec
P2 19.00 usec
PL1 3.80 dB
SFO1 125.7713708 MHz
CHANNEL f2
CPDPRG2 waltz16
NUC2 1H
PCPD2 90.00 usec
PL2 0.30 dB
PL12 16.78 dB
SFO2 500.1320005 MHz
SI 32768
SF 125.7578477 MHz
WDW EM
SSB 0
LB 1.00 Hz
GB 0
PC 1.40
37.45
39.00
39.17
39.33
39.50
39.67
39.76
39.83
39.92
40.00
45.57
57.15
64.37
98.41
105.80
120.97
126.14
129.06
131.77
133.26
138.71
139.26
147.01
157.43
ppm
20
40
60
80
100
120
140
160
180
7a
DMSO

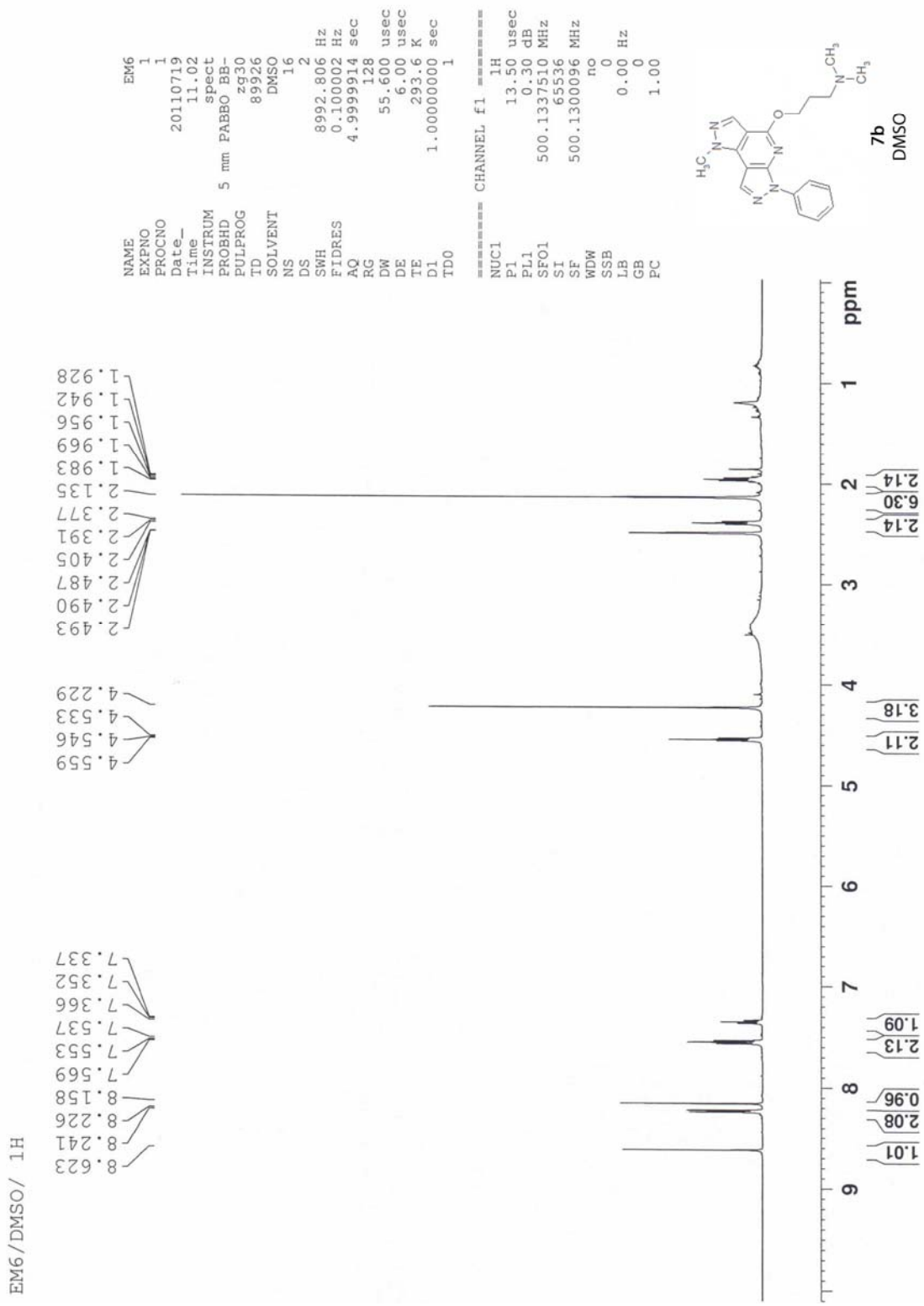
Tafel 7a.3


EM5/DMSO/ 15N HMBC
ppm
21.1
21.1
185.6
199.4
185.6
199.4
304.3
317.2
317.1
7a
DMSO

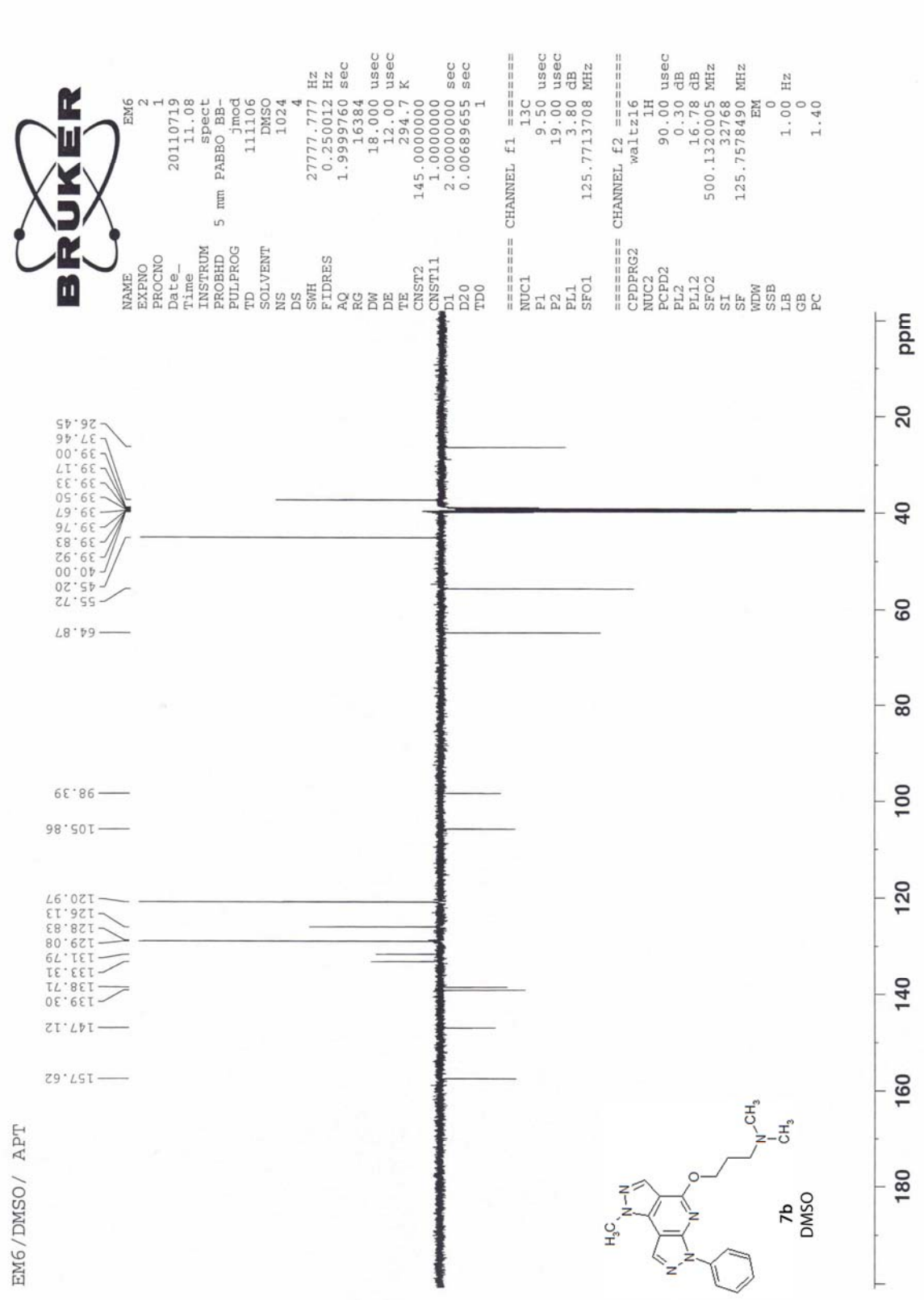
Tafel 7a.4


D:\ThermoData2011\Elisabeth\EM_005
5 µl MeOH, pos. Mode 50 µl Fluss EM_005
EM_005 #11-28 RT: 0.20-0.50 AV: 18 NL: 2.83E7
T: + p ESI Full ms [100.00-1200.00]
7/28/2011 1:58:20 PM
D:\ThermoData20 i 1\Elisabeth\EM_005.RAW
7a
MeOH
Relative Abundance
m/z
337.13
581.40
475.47
148.07
166.40
199.27
250.27
257.20
292.33
315.13
359.20
385.07
407.27
447.33
504.80
525.67
569.60

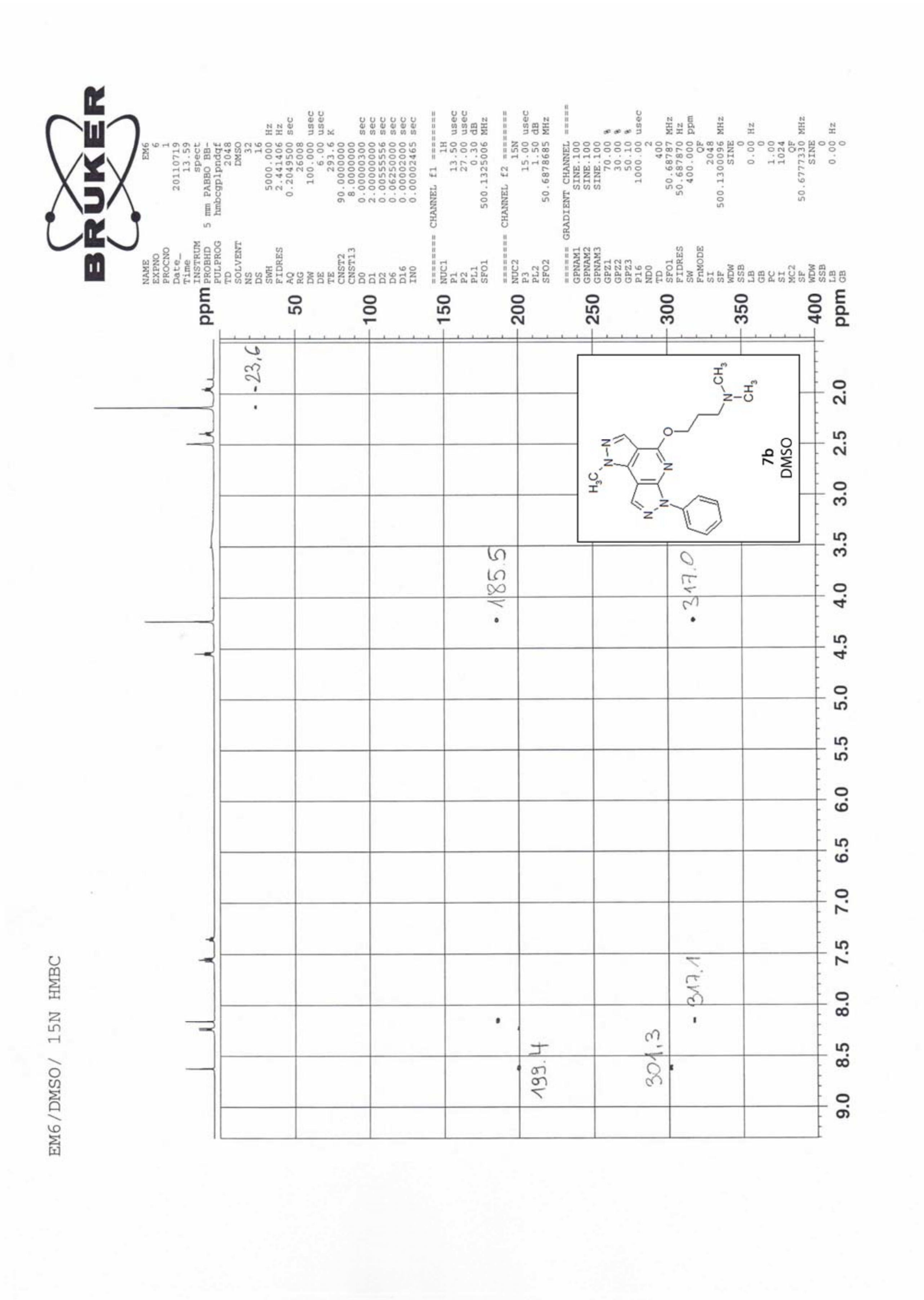
Tafel 7b.1


EM6/DMSO/ 1H
NAME EM6
EXPNO 1
PROCNO 1
Date_ 20110719
Time 11.02
INSTRUM spect
PROBHD 5 mm PABBO BB-
PULPROG zg30
TD 89926
SOLVENT DMSO
NS 16
DS 2
SWH 8992.806 Hz
FIDRES 0.100002 Hz
AQ 4.9999914 sec
RG 128
DW 55.600 usec
DE 6.00 usec
TE 293.6 K
D1 1.00000000 sec
TD0 1
======== CHANNEL f1 ========
NUC1 1H
P1 13.50 usec
PL1 0.30 dB
SFO1 500.1337510 MHz
SI 65536
SF 500.1300096 MHz
WDW no
SSB 0
LB 0.00 Hz
GB 0
PC 1.00
7b
DMSO
ppm
8.623
8.241
8.226
8.158
7.569
7.553
7.537
7.366
7.352
7.337
4.559
4.546
4.533
4.229
2.493
2.490
2.487
2.405
2.391
2.377
2.135
1.983
1.969
1.956
1.942
1.928
1.01
2.08
0.96
1.09
2.13
2.11
3.18
2.14
6.30
2.14

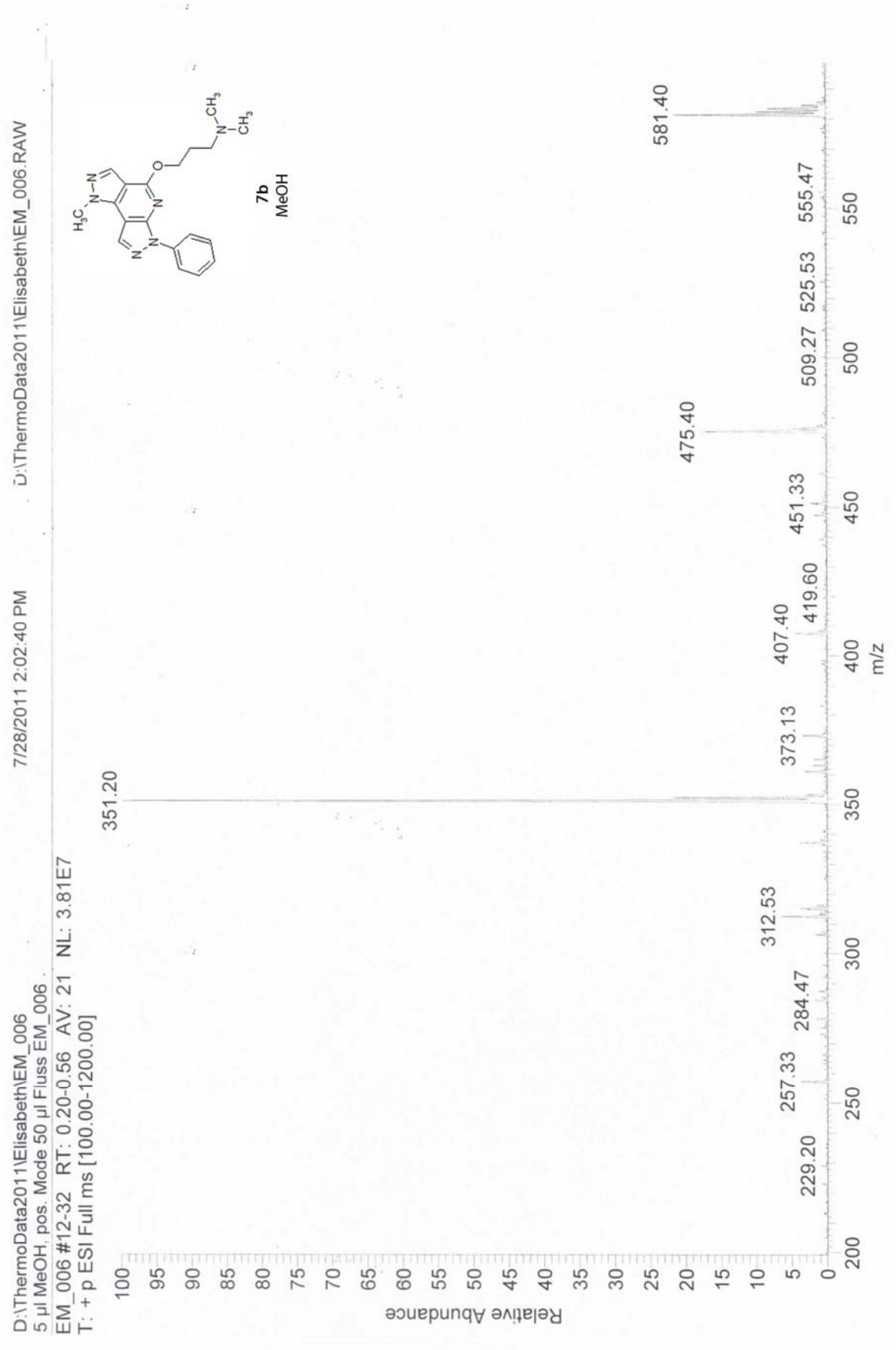
Tafel 7b.2


EM6/DMSO/ APT
BRUKER
NAME EM6
EXPNO 2
PROCNO 1
Date_ 20110719
Time 11.08
INSTRUM spect
PROBHD 5 mm PABBO BB-
PULPROG jmod
TD 111106
SOLVENT DMSO
NS 1024
DS 4
SWH 27777.777 Hz
FIDRES 0.250012 Hz
AQ 1.9999760 sec
RG 16384
DW 18.000 usec
DE 12.00 usec
TE 294.7 K
CNST2 145.0000000
CNST11 1.0000000
D1 2.00000000 sec
D20 0.00689655 sec
TD0 1
======== CHANNEL f1 ========
NUC1 13C
P1 9.50 usec
P2 19.00 usec
PL1 3.80 dB
SFO1 125.7713708 MHz
======== CHANNEL f2 ========
CPDPRG2 waltz16
NUC2 1H
PCPD2 90.00 usec
PL2 0.30 dB
PL12 16.78 dB
SFO2 500.1320005 MHz
SI 32768
SF 125.7578490 MHz
WDW EM
SSB 0
LB 1.00 Hz
GB 0
PC 1.40
26.45
37.46
39.00
39.17
39.33
39.50
39.67
39.76
39.83
39.92
40.00
45.20
55.72
64.87
98.39
105.86
120.97
126.13
128.83
129.08
131.79
133.31
138.71
139.30
147.12
157.62
20
40
60
80
100
120
140
160
180
ppm
7b
DMSO

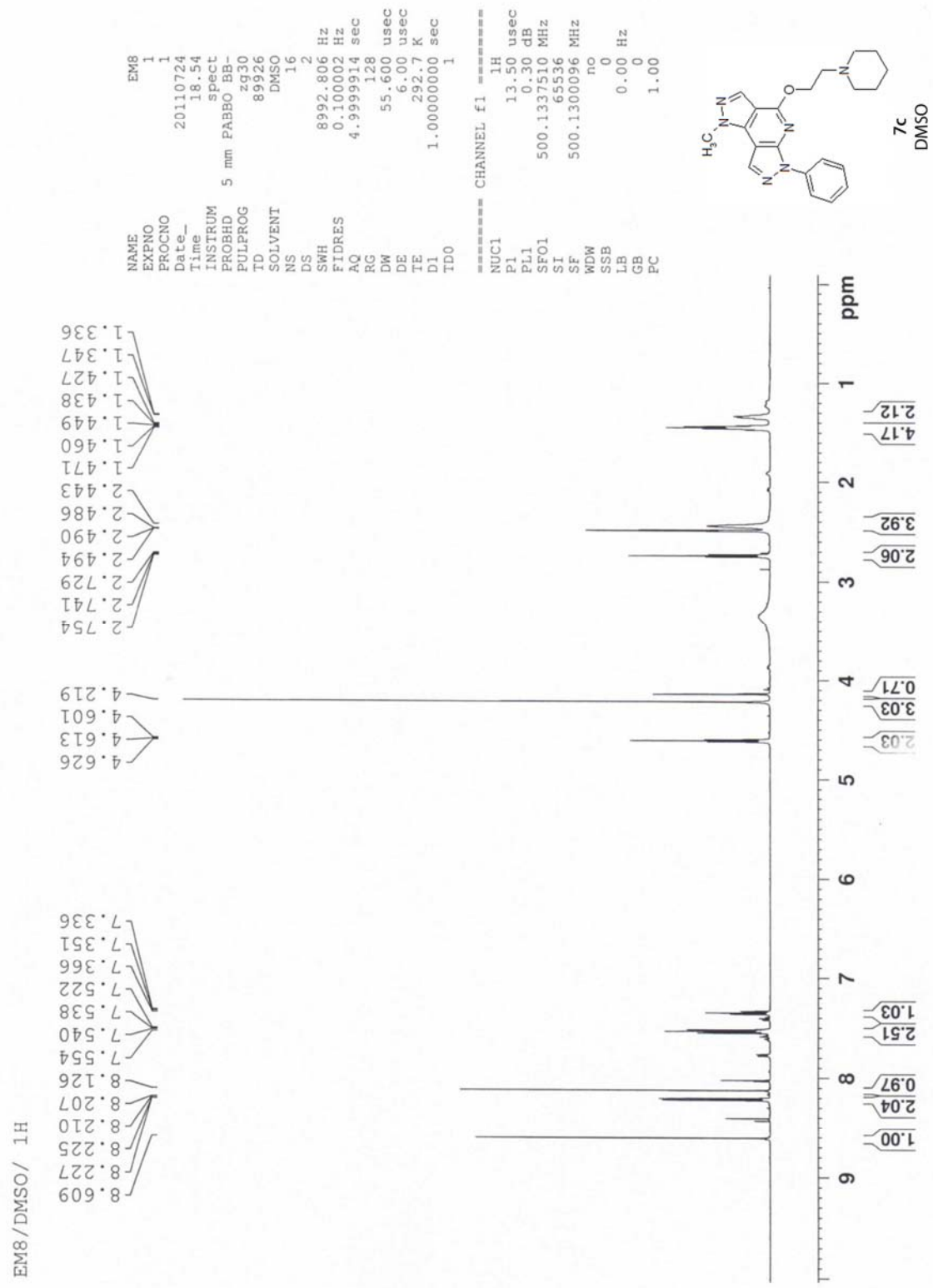
Tafel 7b.3



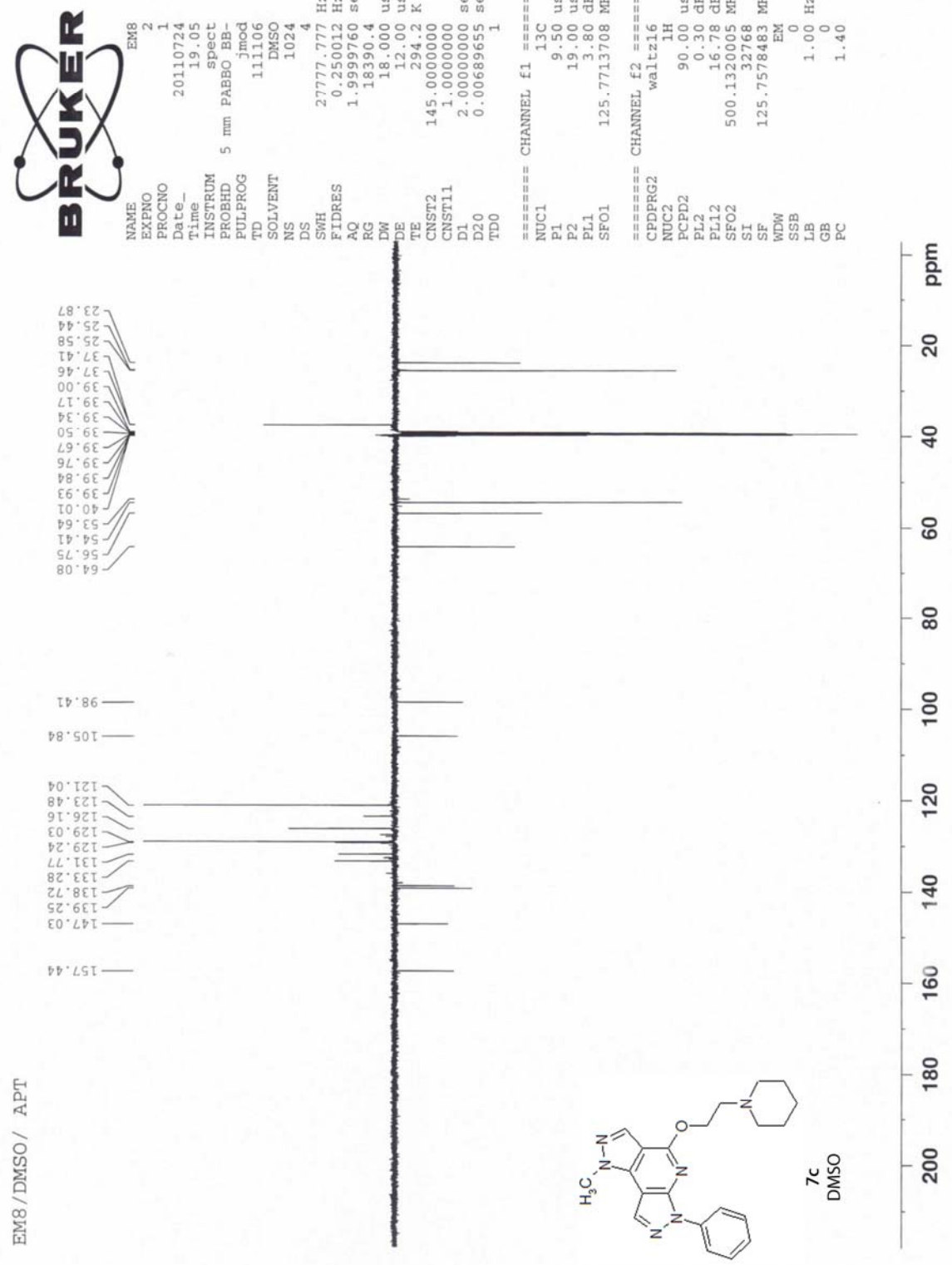
Tafel 7b.4


D:\ThermoData2011\Elisabeth\EM_006
5 µl MeOH, pos. Mode 50 µl Fluss EM_006
EM_006 #12-32 RT: 0.20-0.56 AV: 21 NL: 3.81E7
T: + p ESI Full ms [100.00-1200.00]
D:\ThermoData2011\Elisabeth\EM_006.RAW
7/28/2011 2:02:40 PM
7b
MeOH
Relative Abundance
m/z
351.20
475.40
581.40
312.53
373.13
407.40
419.60
451.33
509.27
525.53
555.47
229.20
257.33
284.47

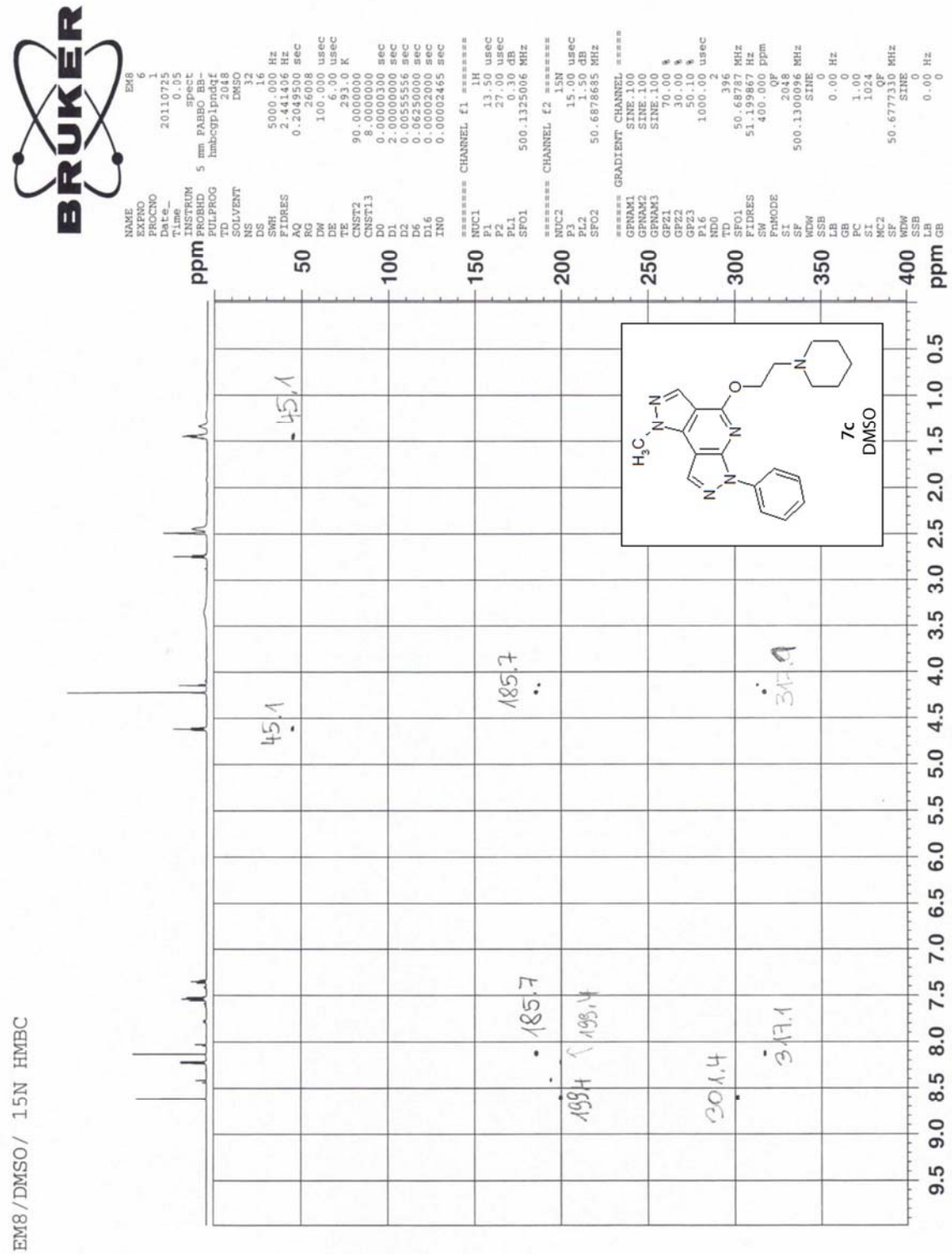
Tafel 7c.1


EM8/DMSO/ 1H
NAME EM8
EXPNO 1
PROCNO 1
Date_ 20110724
Time 18.54
INSTRUM spect
PROBHD 5 mm PABBO BB-
PULPROG zg30
TD 89926
SOLVENT DMSO
NS 16
DS 2
SWH 8992.806 Hz
FIDRES 0.100002 Hz
AQ 4.9999914 sec
RG 128
DW 55.600 usec
DE 6.00 usec
TE 292.7 K
D1 1.00000000 sec
TD0 1
======== CHANNEL f1 ========
NUC1 1H
P1 13.50 usec
PL1 0.30 dB
SFO1 500.1337510 MHz
SI 65536
SF 500.1300096 MHz
WDW no
SSB 0
LB 0.00 Hz
GB 0
PC 1.00
7c
DMSO
ppm
1.00
2.04
0.97
2.51
1.03
2.03
3.03
0.71
2.06
3.92
4.17
2.12

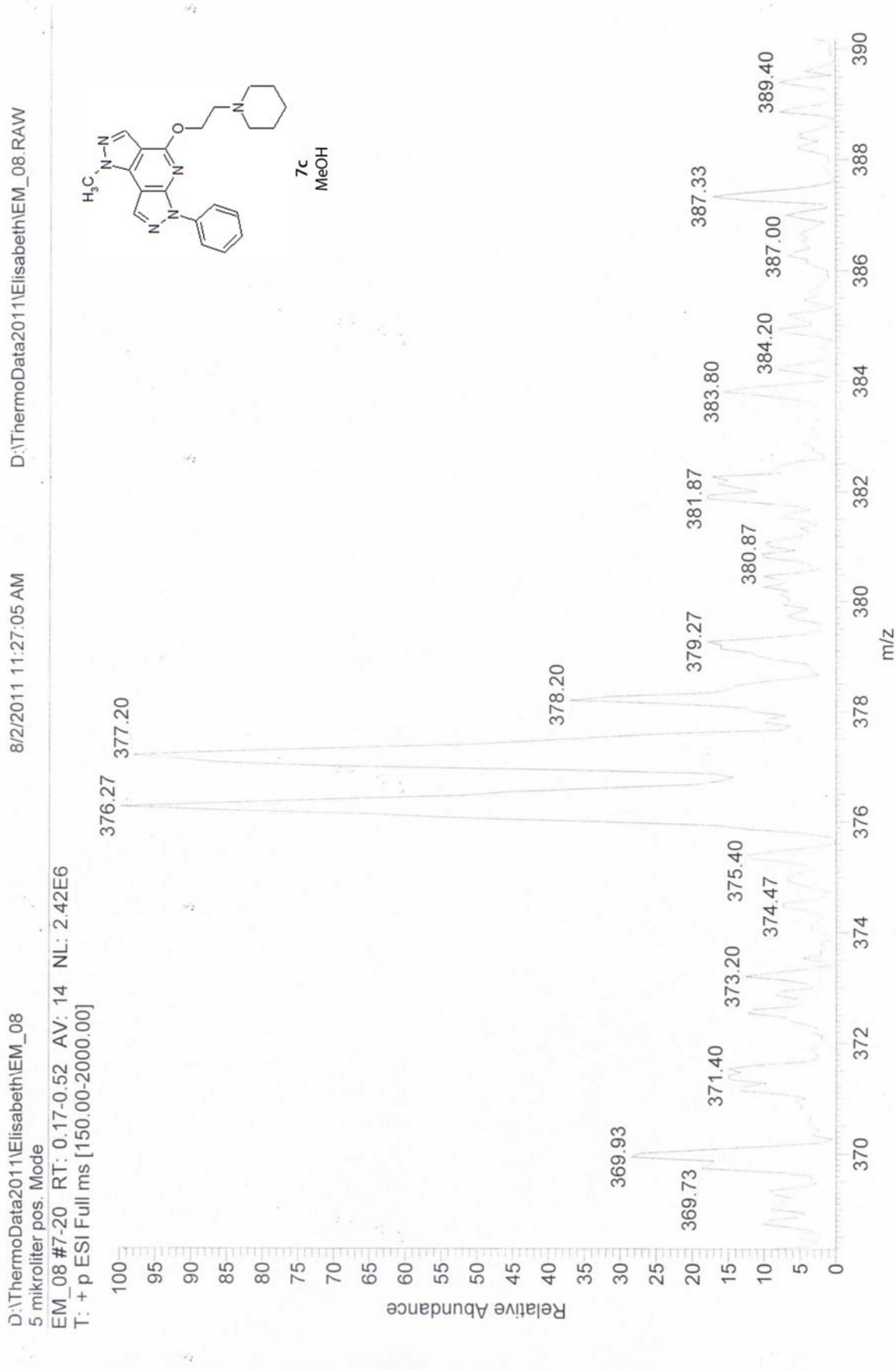
Tafel 7c.2



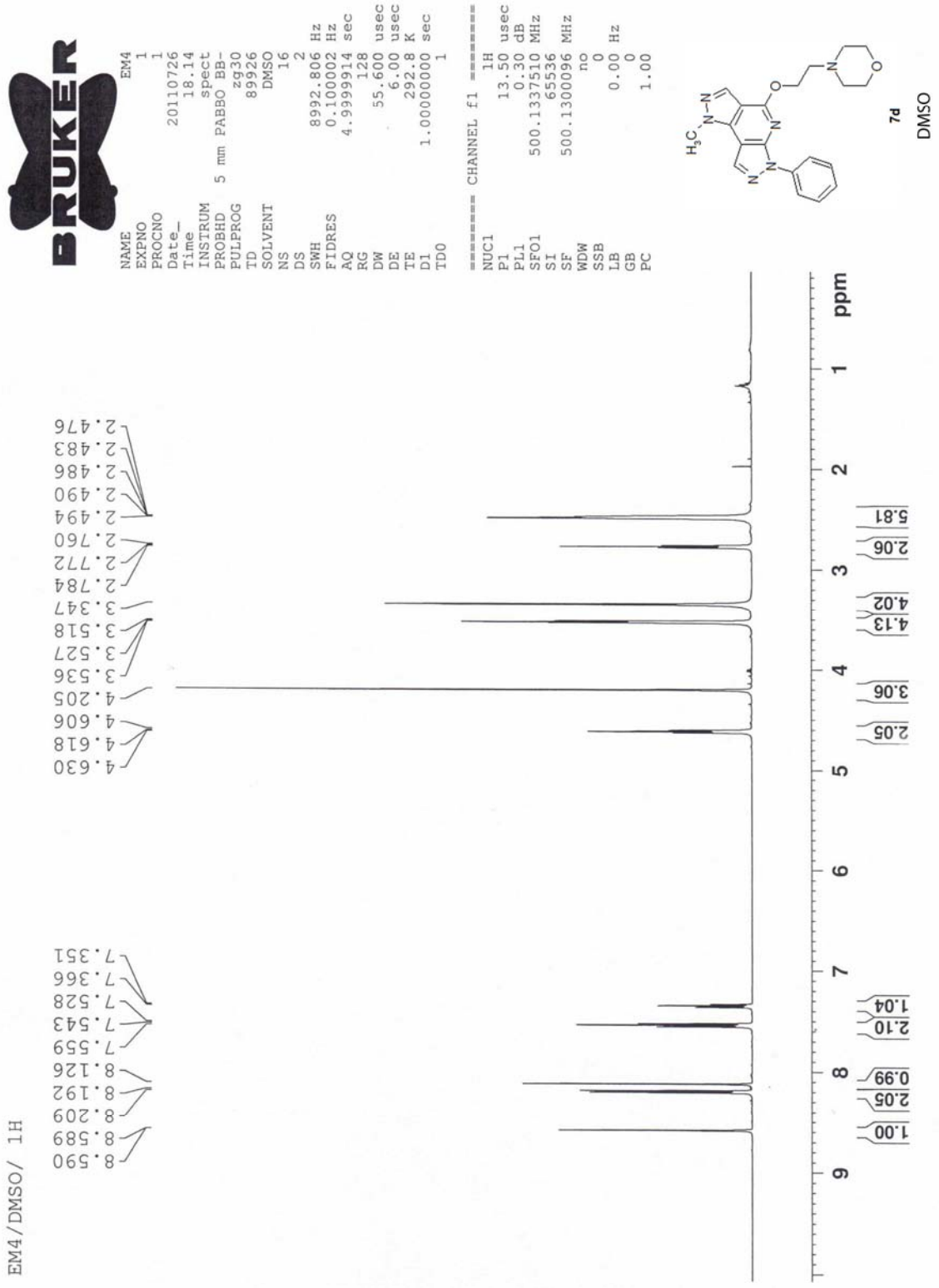
Tafel 7c.3



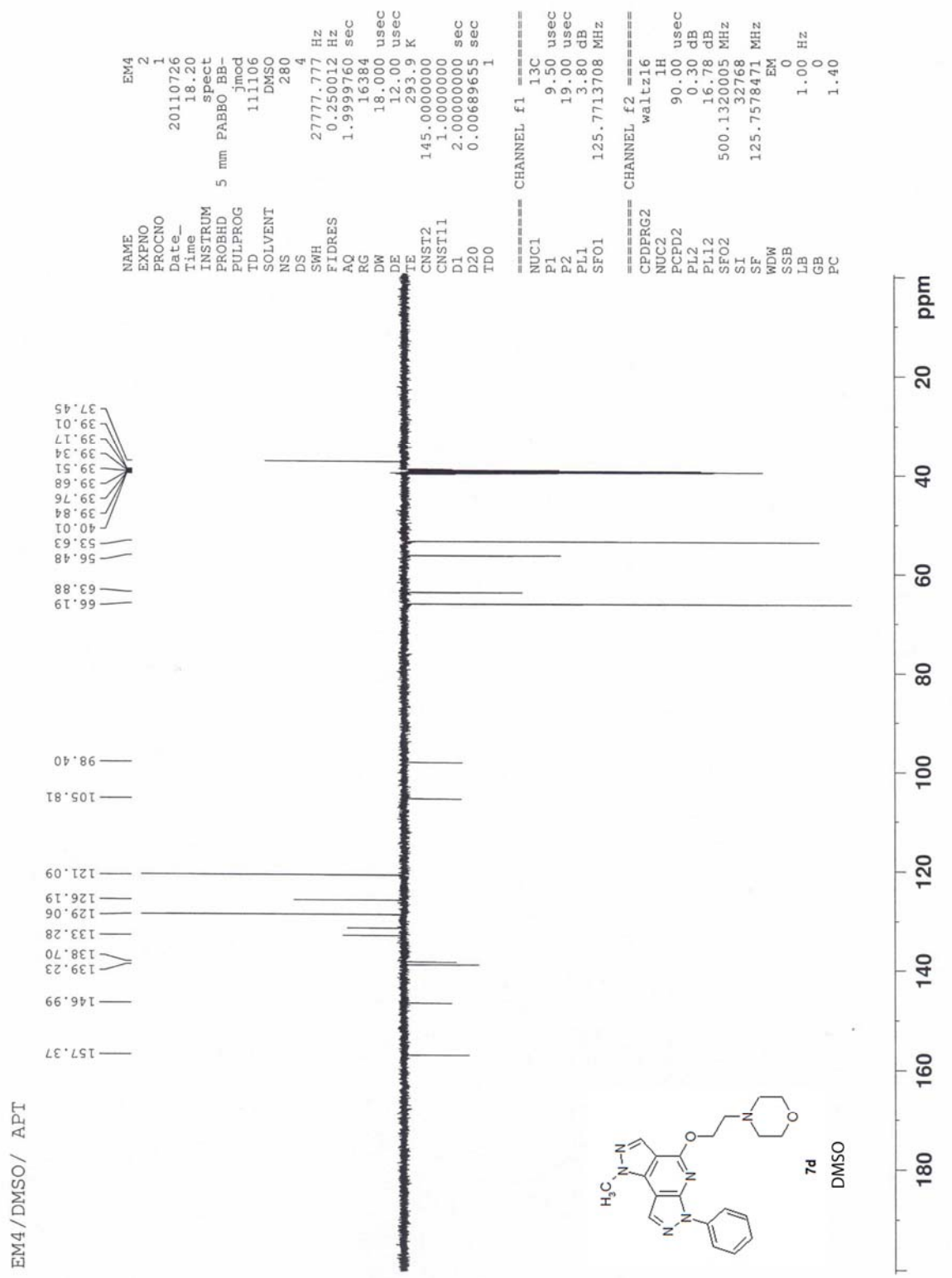
Tafel 7c.4


D:\ThermoData2011\Elisabeth\EM_08
5 mikroliter pos. Mode
EM_08 #7-20 RT: 0.17-0.52 AV: 14 NL: 2.42E6
T: + p ESI Full ms [150.00-2000.00]
8/2/2011 11:27:05 AM
D:\ThermoData2011\Elisabeth\EM_08.RAW
7c
MeOH
Relative Abundance
m/z
369.73
369.93
371.40
373.20
374.47
375.40
376.27
377.20
378.20
379.27
380.87
381.87
383.80
384.20
387.00
387.33
389.40

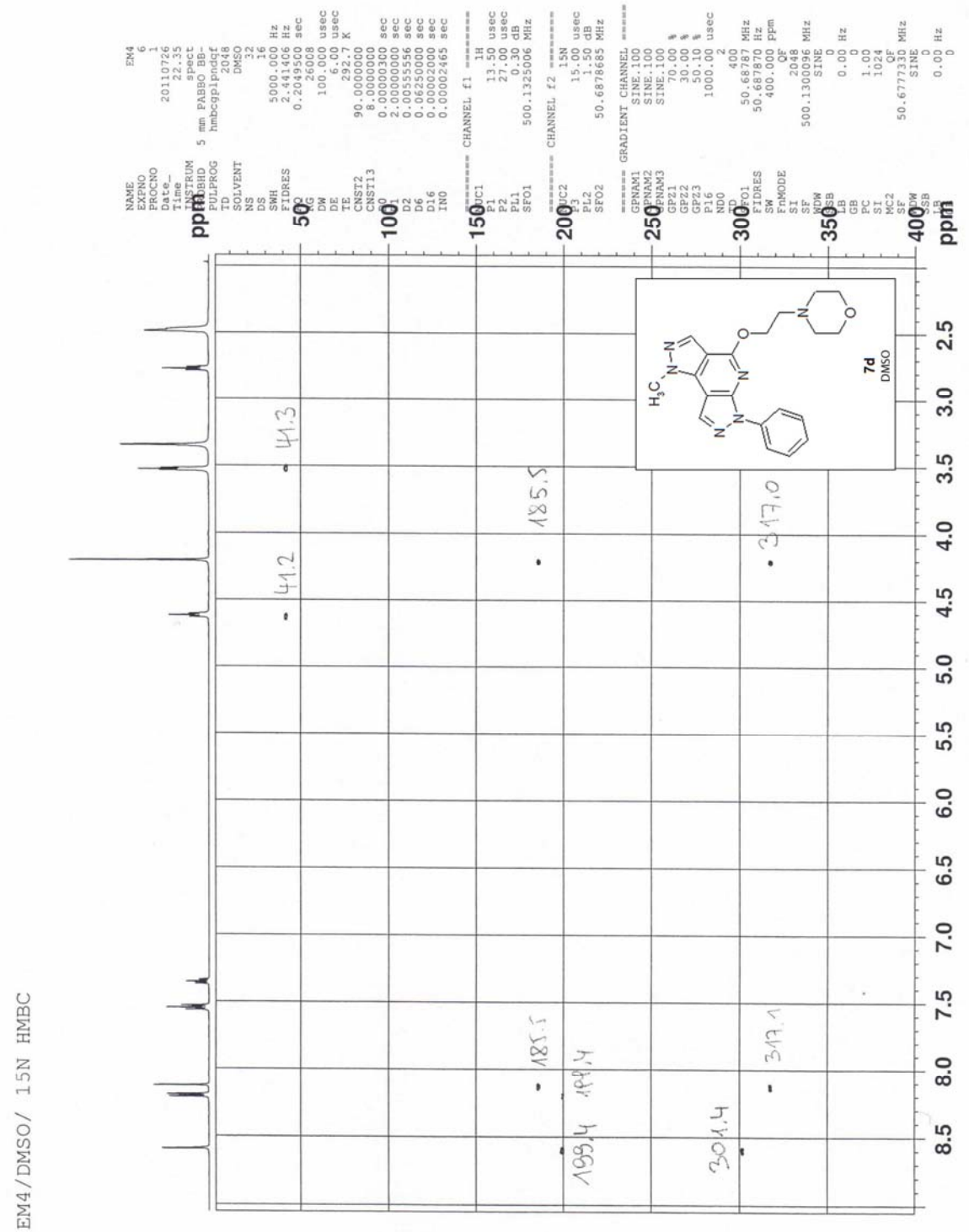
Tafel 7d.1


BRUKER
NAME EM4
EXPNO 1
PROCNO 1
Date_ 20110726
Time 18.14
INSTRUM spect
PROBHD 5 mm PABBO BB-
PULPROG zg30
TD 89926
SOLVENT DMSO
NS 16
DS 2
SWH 8992.806 Hz
FIDRES 0.100002 Hz
AQ 4.9999914 sec
RG 128
DW 55.600 usec
DE 6.00 usec
TE 292.8 K
D1 1.00000000 sec
TD0 1
======== CHANNEL f1 ========
NUC1 1H
P1 13.50 usec
PL1 0.30 dB
SFO1 500.1337510 MHz
SI 65536
SF 500.1300096 MHz
WDW no
SSB 0
LB 0.00 Hz
GB 0
PC 1.00
7d
DMSO
EM4/DMSO/ 1H
8.590
8.589
8.209
8.192
8.126
7.559
7.543
7.528
7.366
7.351
4.630
4.618
4.606
4.205
3.536
3.527
3.518
3.347
2.784
2.772
2.760
2.494
2.490
2.486
2.483
2.476
1.00
2.05
0.99
2.10
1.04
2.05
3.06
4.13
4.02
2.06
5.81
ppm

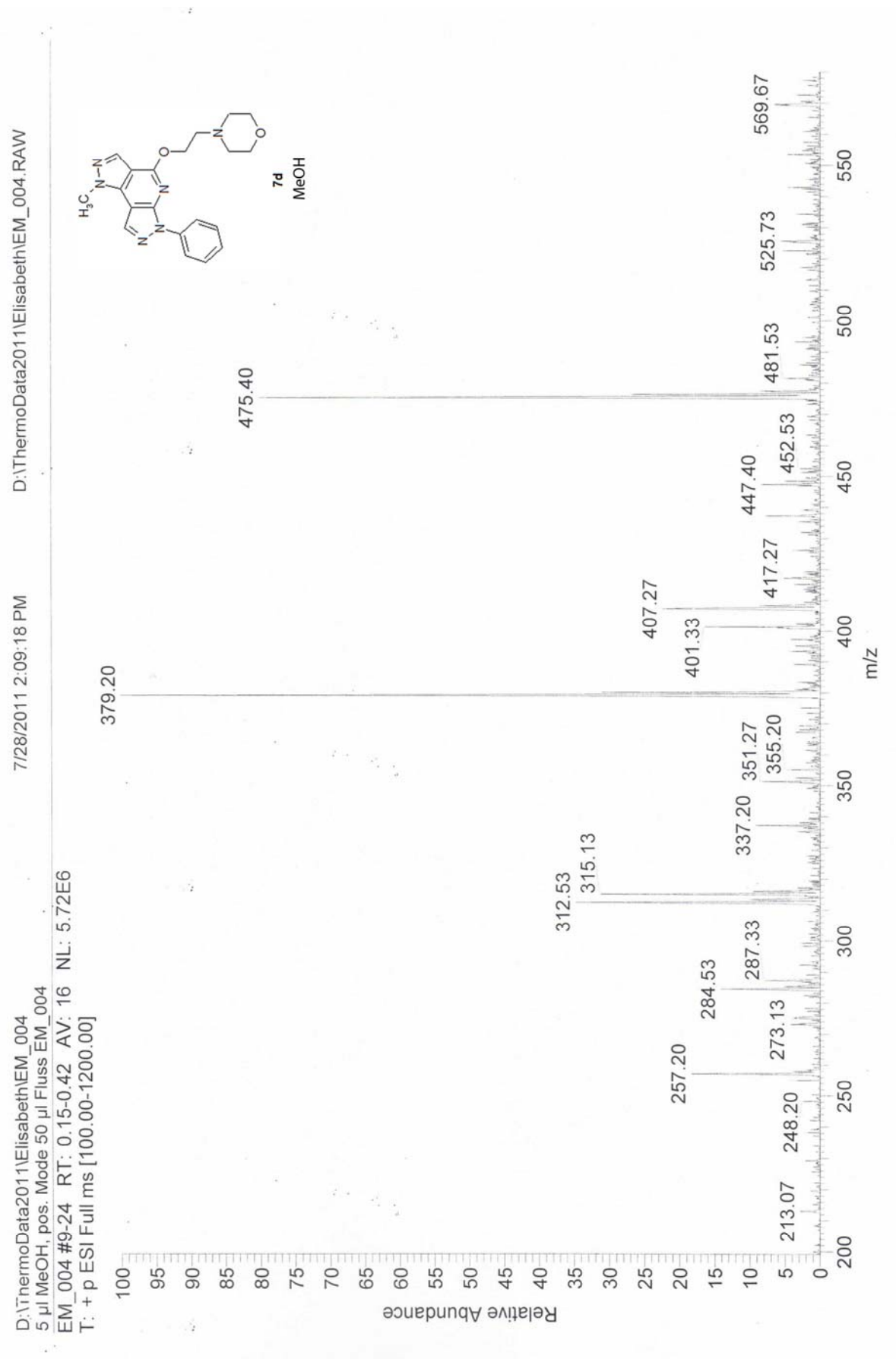
Tafel 7d.2


EM4/DMSO/ APT
37.45
39.01
39.17
39.34
39.51
39.68
39.76
39.84
40.01
53.63
56.48
63.88
66.19
98.40
105.81
121.09
126.19
129.06
133.28
138.70
139.23
146.99
157.37
ppm
20
40
60
80
100
120
140
160
180
7d
DMSO

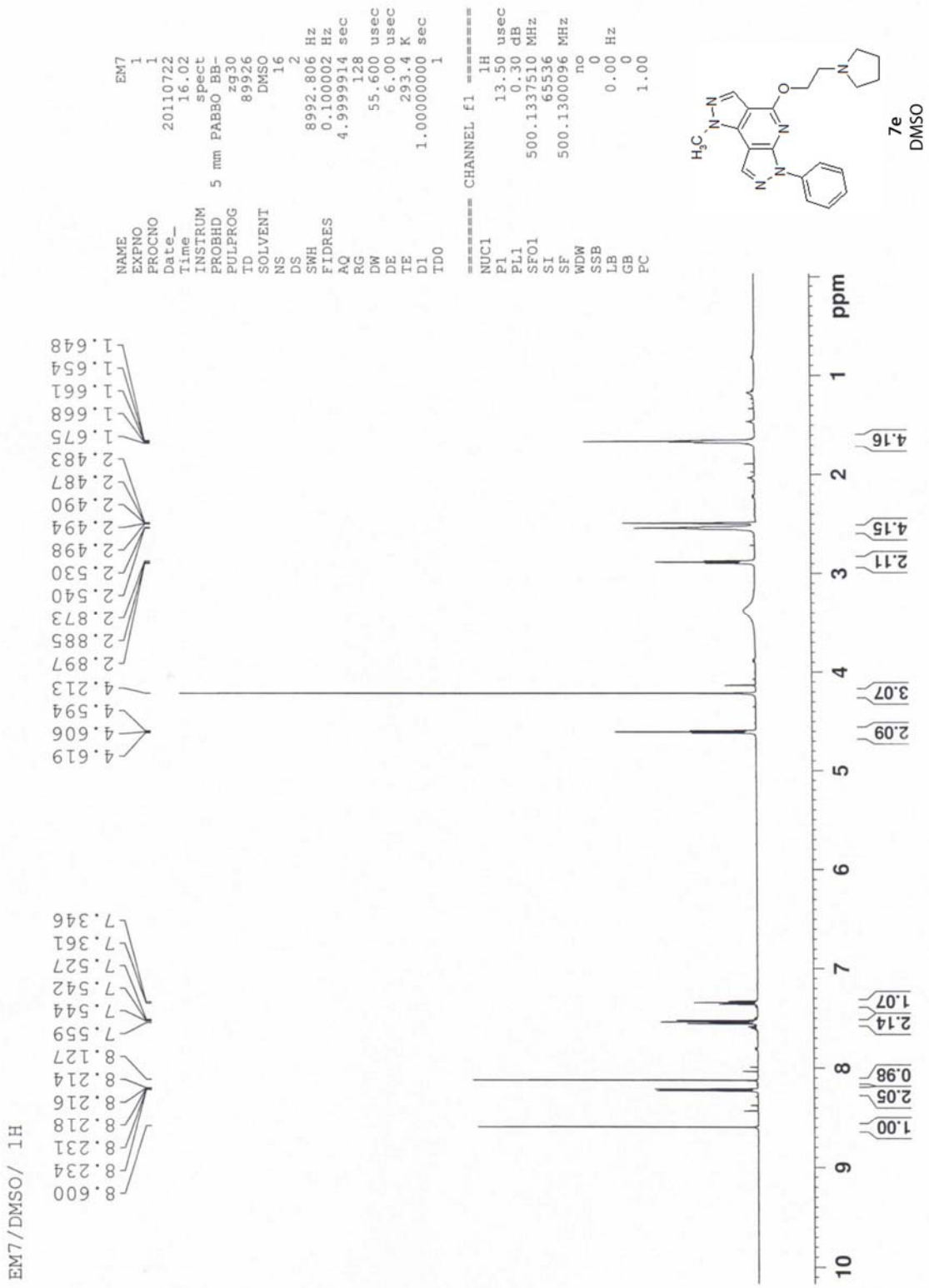
Tafel 7d.3


EM4/DMSO/ 15N HMBC
ppm
7d
DMSO
41.3
41.2
185.5
317.0
185.5
199.4
199.4
301.4
317.1

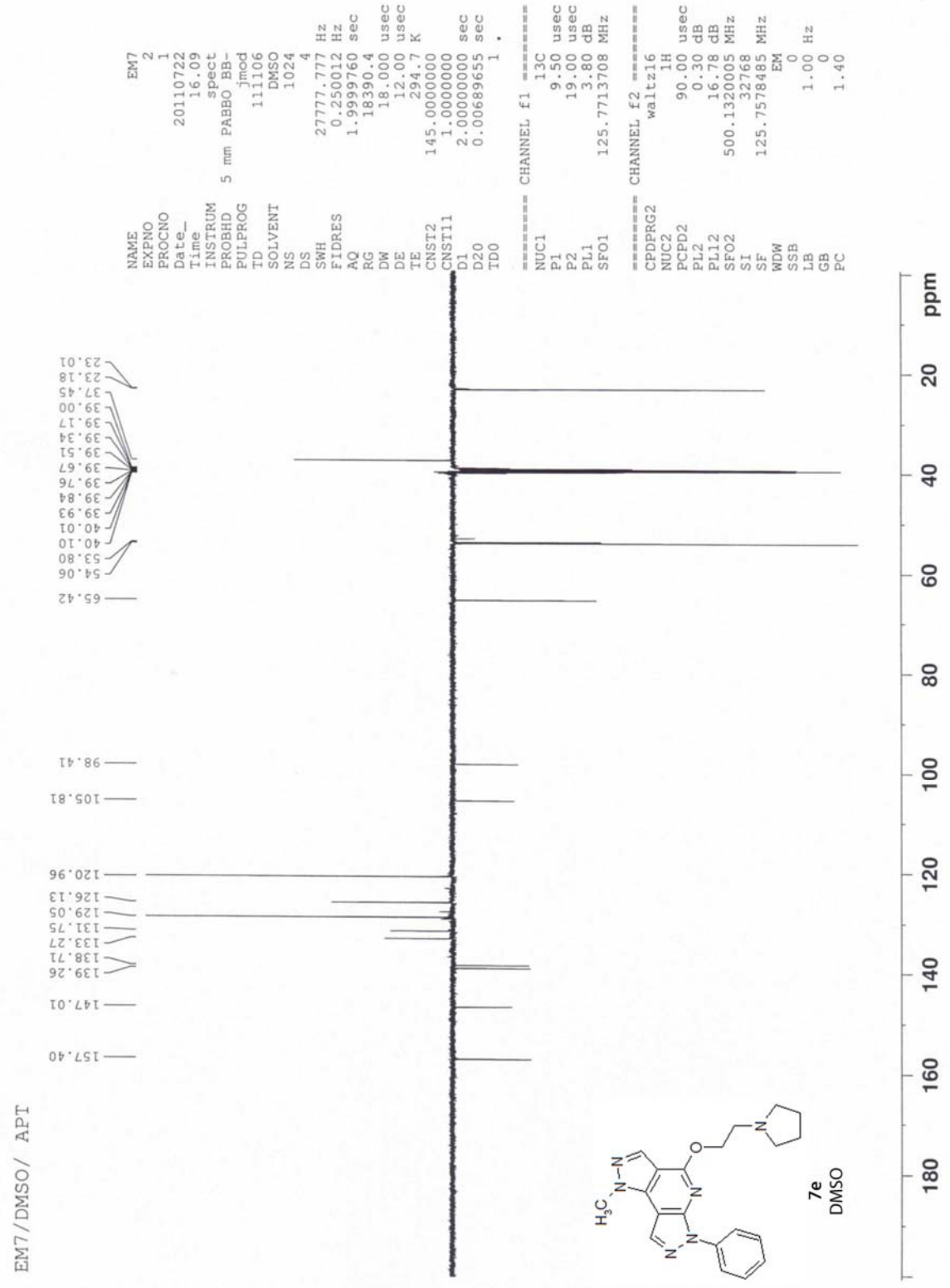
Tafel 7d.4


D:\ThermoData2011\Elisabeth\EM_004
5 µl MeOH, pos. Mode 50 µl Fluss EM_004
EM_004 #9-24 RT: 0.15-0.42 AV: 16 NL: 5.72E6
T: + p ESI Full ms [100.00-1200.00]
7/28/2011 2:09:18 PM
D:\ThermoData2011\Elisabeth\EM_004.RAW
7d
MeOH
Relative Abundance
m/z
379.20
475.40
213.07
248.20
257.20
273.13
284.53
287.33
312.53
315.13
337.20
351.27
355.20
401.33
407.27
417.27
447.40
452.53
481.53
525.73
569.67

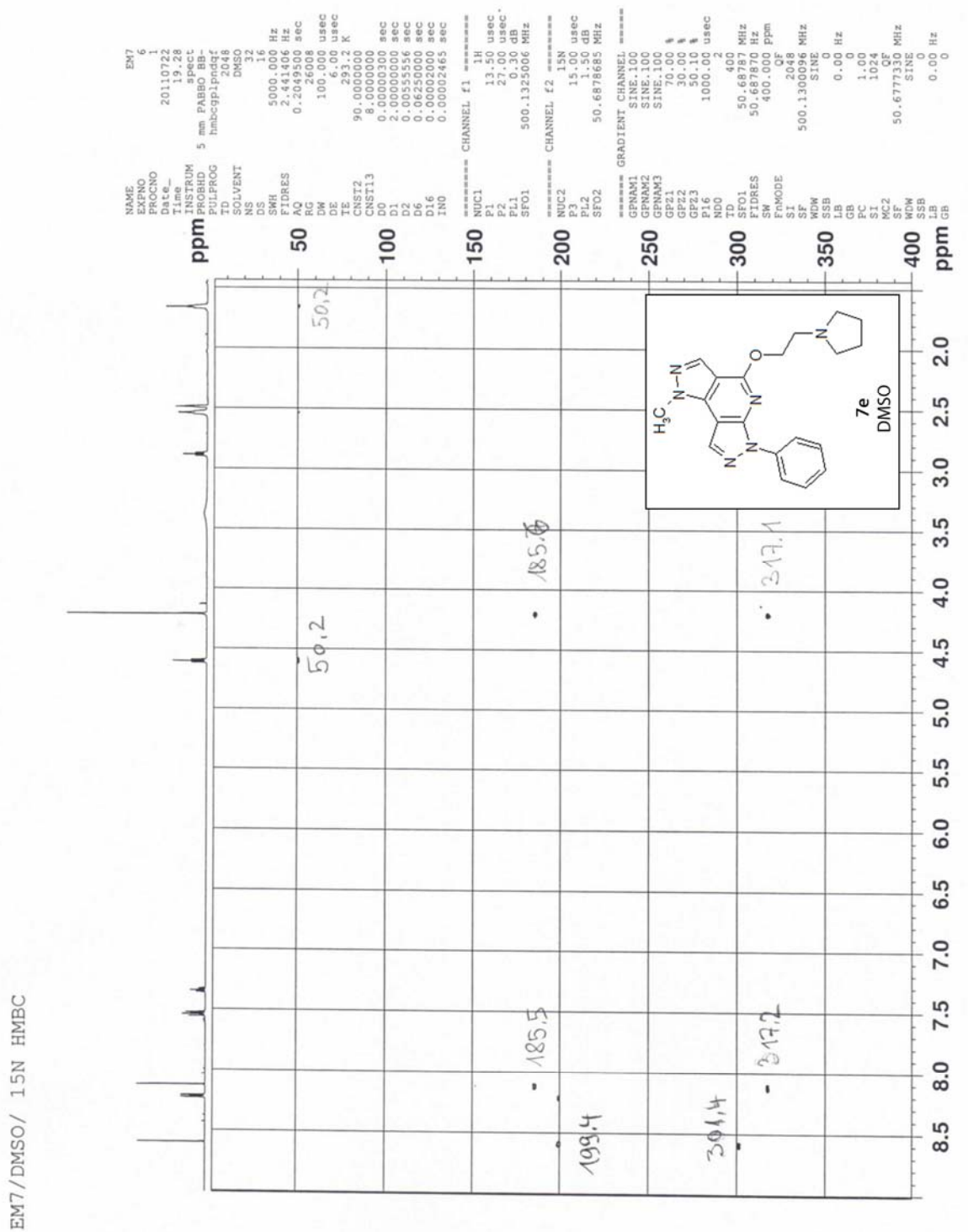
Tafel 7e.1


EM7/DMSO/ 1H
NAME EM7
EXPNO 1
PROCNO 1
Date_ 20110722
Time 16.02
INSTRUM spect
PROBHD 5 mm PABBO BB-
PULPROG zg30
TD 89926
SOLVENT DMSO
NS 16
DS 2
SWH 8992.806 Hz
FIDRES 0.100002 Hz
AQ 4.9999914 sec
RG 128
DW 55.600 usec
DE 6.00 usec
TE 293.4 K
D1 1.00000000 sec
TD0 1
======== CHANNEL f1 ========
NUC1 1H
P1 13.50 usec
PL1 0.30 dB
SFO1 500.1337510 MHz
SI 65536
SF 500.1300096 MHz
WDW no
SSB 0
LB 0.00 Hz
GB 0
PC 1.00
7e
DMSO
ppm
1.00
2.05
0.98
2.14
1.07
2.09
3.07
2.11
4.15
4.16

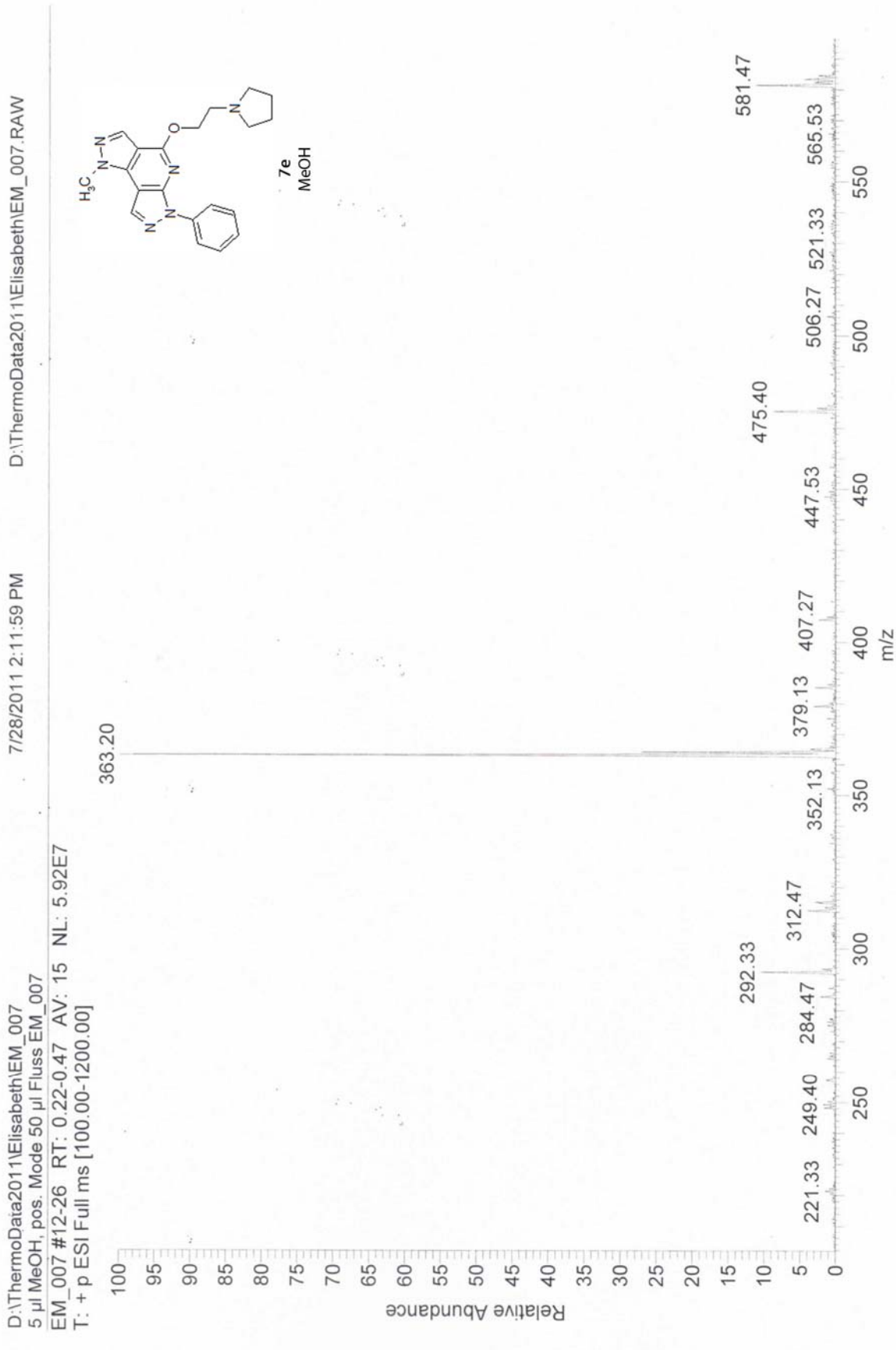
Tafel 7e.2


EM7/DMSO/ APT
NAME EM7
EXPNO 2
PROCNO 1
Date_ 20110722
Time 16.09
INSTRUM spect
PROBHD 5 mm PABBO BB-
PULPROG jmod
TD 111106
SOLVENT DMSO
NS 1024
DS 4
SWH 27777.777 Hz
FIDRES 0.250012 Hz
AQ 1.99999760 sec
RG 18390.4
DW 18.000 usec
DE 12.00 usec
TE 294.7 K
CNST2 145.00000000
CNST11 1.00000000
D1 2.00000000 sec
D20 0.00689655 sec
TD0 1
======== CHANNEL f1 ========
NUC1 13C
P1 9.50 usec
P2 19.00 usec
PL1 3.80 dB
SFO1 125.7713708 MHz
======== CHANNEL f2 ========
CPDPRG2 waltz16
NUC2 1H
PCPD2 90.00 usec
PL2 0.30 dB
PL12 16.78 dB
SFO2 500.1320005 MHz
SI 32768
SF 125.7578485 MHz
WDW EM
SSB 0
LB 1.00 Hz
GB 0
PC 1.40
23.01
23.18
37.45
39.00
39.17
39.34
39.51
39.67
39.76
39.84
39.93
40.01
40.10
53.80
54.06
65.42
98.41
105.81
120.96
126.13
129.05
131.75
133.27
138.71
139.26
147.01
157.40
ppm
20
40
60
80
100
120
140
160
180
7e
DMSO

Tafel 7e.3



Tafel 7e.4


D:\ThermoData2011\Elisabeth\EM_007
5 µl MeOH, pos. Mode 50 µl Fluss EM_007
7/28/2011 2:11:59 PM
D:\ThermoData2011\Elisabeth\EM_007.RAW
EM_007 #12-26 RT: 0.22-0.47 AV: 15 NL: 5.92E7
T: + p ESI Full ms [100.00-1200.00]
7e
MeOH
Relative Abundance
m/z
363.20
292.33
475.40
581.47

5.3. Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Diplomarbeit wurden potentielle A_3 Adenosinrezeptorantagonisten synthetisiert. Allen Verbindungen liegt die 5,6-Dihydro-dipyrazolo[3,4-*b*:3',4'-*d*]pyridin-4(1*H*)-on Partialstruktur zu Grunde.
Als Ausgangsverbindung wurde zuerst 1-Methyl-6-phenyl-5,6-dihydropyrazolo[3,4-*b*:3',4'-*d*]pyridin-4(1*H*)-one (**6**) synthetisiert, welches durch Umsetzung mit

a) 2-Chlor-N,N-dimethylethylamin·HCl,
b) 3-Dimethylamino-1-propylchlorid·HCl,
c) N-(2-Chlorethyl)-piperidin·HCl,
d) N-(2-Chlorethyl)morpholin·HCl und
e) N-(2-Chlorethyl)pyrrolidine·HCl

zu den alkylierten trizyklischen Zielverbindungen (**7a−e**) umgesetzt wurde.

Die neuen Verbindungen wurden alle mittels spektroskopischen bzw. mikroanalytischen Methoden (^{1}H-NMR, ^{13}C-NMR, ^{15}N-NMR, MS, HRMS, CHN-Analyse) charakterisiert.

5.4. Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name:	Elisabeth Pia Metzler
Geburtsdatum:	30. August 1986
Geburtsort:	Bregenz
Staatsbürgerschaft:	Österreich

Schulische Ausbildung:

1993-1997	Volksschule Hörbranz, Vorarlberg
1997-2005	Bundesgymnasium Blumenstrasse in Bregenz
24. Juni 2005	Matura mit gutem Erfolg bestanden
seit Oktober 2005	Studium der Pharmazie, Universität Wien

Berufliche Erfahrungen:

2004-2008	Sommer-Ferialpraktikum in der Leiblachtal-Apotheke in Hörbranz, Vorarlberg
Mai 2008 - April 2011	geringfügig beschäftigt in der Hans-Sachs-Apotheke, Wien