



universität
wien

DIPLOMARBEIT

Titel der Diplomarbeit

„Synthese potenzieller BCRP-Modulatoren“

Verfasser

Thomas Arzt

angestrebter akademischer Grad

Magister der Pharmazie (Mag.pharm.)

Wien, 2012

Studienkennzahl lt.
Studienblatt:

A 449

Studienrichtung lt.
Studienblatt:

Diplomstudium Pharmazie

Betreuerin / Betreuer:

Ao. Univ.-Prof. Mag.pharm. Dr. Thomas Erker

Inhaltsverzeichnis

1. Inhaltsangabe	<u>3</u>
2. Einleitung	<u>5</u>
2.1. Blut-Hirn-Schranke	<u>5</u>
2.1.1. Struktur der Blut-Hirn-Schranke	<u>6</u>
2.1.2. Verschiedene Transportsysteme der Blut-Hirn-Schranke.....	<u>8</u>
2.2. ABC-Transporter	<u>10</u>
2.2.1. Struktur der ABC-Transporter.....	<u>11</u>
2.2.2. Substrate und Inhibitoren von ABC-Transportern.....	<u>13</u>
2.2.3. P-Glykoprotein (P-gp, MDR1, ABCB1)	<u>17</u>
2.2.4. Breast-Cancer-Resistance-Protein (BCRP, ABCG2)	<u>20</u>
2.2.5. Multi-Drug-Resistance-Proteine	<u>21</u>
2.3. MDR-Modulatoren	<u>22</u>
2.3.1. P-gp-Modulatoren der 1. Generation	<u>22</u>
2.3.2. P-gp-Modulatoren der 2. Generation	<u>23</u>
2.3.3. P-gp-Modulatoren der 3. Generation	<u>24</u>
2.3.4. BCRP-Modulatoren	<u>25</u>
2.4. Positronen-Emissions-Tomographie (PET)	<u>29</u>
2.4.1. Prinzip der PET	<u>29</u>
2.4.2. Anwendungsgebiete der PET	<u>30</u>
2.5. Ausgangspunkt der Arbeit	<u>31</u>
2.6. Ziel der Diplomarbeit	<u>37</u>
3. Synthese.....	<u>41</u>
4. Materialien, Methoden und Ergebnisse	<u>62</u>
Abkürzungsverzeichnis.....	<u>63</u>
Verbindung 1	<u>65</u>
Verbindung 2	<u>68</u>
Verbindung 3	<u>71</u>
Verbindung 4	<u>75</u>
Verbindung 5	<u>79</u>

Verbindung 6	<u>84</u>
Verbindung 7	<u>88</u>
Verbindung 11	<u>92</u>
Verbindung 12	<u>93</u>
Verbindung 13	<u>94</u>
Verbindung 14	<u>95</u>
Verbindung 15	<u>98</u>
5. Zusammenfassung	<u>99</u>
6. Spektren	<u>106</u>
7. Literaturverzeichnis.....	<u>131</u>

1. Inhaltsangabe

Die Behandlung von Erkrankungen des Zentralnervensystems (ZNS) ist oft mit dem Problem einer Therapieresistenz konfrontiert, welche auch Multi-Drug-Resistance (MDR) genannt wird. So können z.B. refraktäre Epilepsie, Morbus Parkinson, Morbus Alzheimer, affektive Störungen oder Hirntumore davon betroffen sein.

Mit ein Hauptgrund dafür ist die Existenz von Effluxpumpen, sogenannten ATP-binding-cassette (ABC)- Transportern in den Kapillarendothelzellen der Blut-Hirn-Schranke. Sie dienen dem Schutz des ZNS vor potenziell toxischen Substanzen, indem solche aktiv aus den Zellen hinausbefördert werden.

Schlechterdings fallen auch oft Arzneistoffe in diese Kategorie und werden am Eindringen in den Wirkort ZNS gehindert.

Besondere Bedeutung für MDR aus der ABC-Transporterfamilie haben vor allem P-Glykoprotein (P-gp, MDR1), Breast-Cancer-Resistance-Protein (BCRP) und Multi-Drug-Resistance-Proteine (MRPs).

Eine Strategie zur Durchbrechung oben erwähnter Therapieresistenz besteht folglich in der Inhibierung von ABC-Transportern. Verbindungen, die dazu fähig sind, nennt man MDR-Modulatoren. Substanzen der dritten Generation jener Stoffgruppe besitzen eine hohe Selektivität zu einzelnen MDR-Transportern und haben einen starken inhibierenden Effekt auf sie. Klinische Studien der Phase III konnten bis jetzt aber leider noch keine zufriedenstellenden Ergebnisse liefern.

Man kann sich jedoch die hohe Selektivität mancher dieser Verbindungen auch für diagnostische Zwecke zu Nutze machen. Mittels Positron-Emissions-Tomographie (PET) kann man *in vivo* die ABC-Transporterdichte an der Blut-Hirn-Schranke darstellen. Für dieses nicht invasive Verfahren ist eine Überführung des MDR-Modulators in einen sogenannten PET-Tracer nötig, was einer Markierung mit radioaktiven Isotopen entspricht.

Es wurden hier schon eindrucksvolle *in vivo* Ergebnisse in Tiermodellen erreicht.

Sollte in Zukunft ein Einsatz von MDR-Modulatoren zur Unterstützung der Therapie mit konventionellen Arzneimitteln (Zytostatika, Antiepileptika, usf.) möglich sein, könnte eine Visualisierung der ABC-Transporterdichte helfen individuelle Dosierungsvorschläge zu erarbeiten und somit eine personalisierte Therapie in Angriff zu nehmen.

Das Thema dieser Arbeit stellt den Versuch der Synthese von selektiven BCRP-Modulatoren dar. Diese Substanzen könnten Vorstufen für mögliche PET-Tracer zur Visualisierung von BCRP an der Blut-Hirn-Schranke in Tiermodellen sein.

Ausgang des experimentellen Teils dieser Diplomarbeit waren kürzlich publizierte chemische Modifikationen des bekannten P-Glykoprotein-Modulators Tariquidar, die zu einer hohen Selektivität für BCRP führten. Allerdings ging dies mit einer metabolischen Instabilität einher, die durch eigene Untersuchungen zu weiteren Strukturänderungen behoben werden sollte.

Angestrebt wurden vier Tariquidar-Derivate, wovon zwei synthetisiert werden konnten.

2. Einleitung

Das menschliche Gehirn ist das Organ mit dem höchsten Grad an Komplexität. Es bedarf einer sehr hohen Nähr- und Sauerstoffzufuhr zur Erfüllung seiner Aufgaben. Genauso wichtig ist allerdings die Aufrechterhaltung eines konstanten inneren Milieus. Die Funktion der Nervenzellen ist nur unter homöostatischen Bedingungen gewährleistet. Schwankungen der Konzentration der Ionen, wie sie in peripherem Gewebe im interstitiellen Raum vorkommen, würden weitreichende Beeinträchtigungen des Membranpotentials der Nervenzellen mit sich bringen und die Hirnfunktion stören. Selbiges gilt für minimale Schwankungen des pH Wertes. Da Neuronen nicht die Fähigkeit zur Regeneration besitzen, müssen Fremdstoffe und Toxine unbedingt vom Hirngewebe ferngehalten werden (Abott, 2010).

Die große Abhängigkeit des Gehirns von Nährstoffen und die gleichzeitigen Restriktionen zur Homöostase, erfordern ein sehr selektives und effektives Filtersystem zur Abgrenzung vom systemischen Blutkreislauf: die Blut-Hirn-Schranke.

2.1. Blut-Hirn-Schranke

Die Blut-Hirn-Schranke trennt das Blut in den Hirnkapillaren vom umliegenden Hirngewebe. Es gibt sie in allen Tetrapoden. Sie besteht aus den die Kapillare bildenden Endothelzellen, welche über Tight-Junctions miteinander verbunden sind, sowie den umgebenden Perizyten und Astrozyten. Dies ergibt eine fast lückenlose Separierung des Gehirns vom Blutkreislauf.

Wie oben schon erwähnt, ist es absolut notwendig die Zusammensetzung der extrazellulären Flüssigkeit im Gehirn getrennt von der Zusammensetzung des Blutes zu halten, um die lebensnotwendigen Vorgänge der synaptischen Übertragung der Neuronen sicherzustellen. Dafür muss nebst der Konzentration an Ionen auch die Konzentration an Neurotransmittern stabil gehalten werden.

Ein weiteres Charakteristikum der Blut-Hirn-Schranke ist, dass sich ihre Filterfunktion bidirektional verhält. Durch den hohen Nährstoff-, vor allem Glukoseverbrauch, entstehen große Mengen an Metaboliten, die aus dem Gehirn hinaus transportiert werden müssen.

Das Fernhalten von Neurotoxinen ist äußerst wichtig, da es gerade bei Neuronen sehr selten zu Zellteilungen kommt. Ein Fehlen dieses Mechanismus würde zu sehr schnellem Auftreten von degenerativen Erkrankungen des ZNS führen (Löscher und Potschka, 2005). Auch stellt die Blut-Hirn-Schranke eine immunologische Barriere dar, die Krankheitserreger, Pathogene, Antikörper und Erythrozyten weitestgehend abwehrt (Ohtsuki, 2004).

2.1.1. Struktur der Blut-Hirn-Schranke

Wie schon erwähnt, besteht die Blut-Hirn-Schranke in erster Linie aus Kapillarendothelzellen, die sich von ihren peripheren Äquivalenten dadurch unterscheiden, dass sie über Tight-Junctions miteinander verbunden sind. Hiermit wird ein Passieren von hydrophilen Substanzen sowie von Makromolekülen durch Zellzwischenräume verhindert.

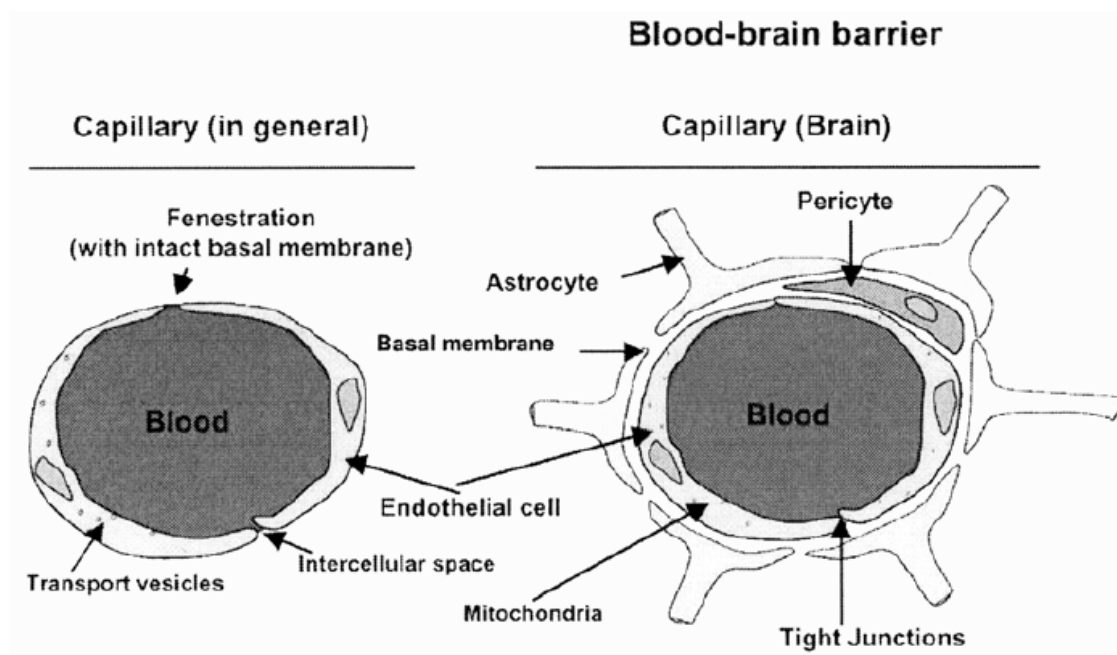


Abb.1: Vergleich von peripheren Kapillaren und Kapillargefäßen im Gehirn; letztere haben keine Fenestrierungen und keine intrazellulären Zwischenräume, sind dafür aber von Perizyten und Astrozyten ummantelt (Löscher und Potschka, 2005)

Diese Tight-Junctions der Kapillarendothelzellen werden durch transmembranären Proteine wie Occludin und Claudin gebildet (Brenner, 2006). Es gibt im Vergleich zum peripheren Gefäßendothel keine Fenestrierungen und keine Intrazellulärspalten. Dies stellt die physikalische Schranke dar.

Abb.1 veranschaulicht nochmals den Unterschied zwischen Hirnkapillaren und herkömmlichen Kapillaren (Löscher und Potschka, 2005).

Die Endothelzellen selbst weisen eine überdurchschnittliche Dichte an Mitochondrien auf, was auf den hohen Energieverbrauch durch vermehrte aktive Transportprozesse, von denen später noch die Rede sein wird, zurückzuführen ist. Diese bilden eine Schranke auf molekularer Ebene (Deeken und Löscher, 2007).

Umkleidet sind die Endothelzellen von der Basallamina, die eine rein stabilisierende Funktion inne hat. Etwa 20 % der Endothelzellen grenzen an Perizyten. Ihnen wird eine gefäßdurchmesser- und somit blutdruckregulierende, sowie eine makrophagenartige Eigenschaft zugeschrieben. Außerdem beeinflussen sie Zellteilung und Differenzierung der Endothelzellen (Abott, 2010).

Beinahe das gesamte Endothel ist von den Endfüßchen der Astrozyten ummantelt. Dieser Zelltypus, der zur Familie der Makroglia zählt, induziert allererst die Herausbildung einer Blut-Hirn-Schranke in den zerebralen Blutgefäßen. Die Astrozyten stehen in unmittelbarem Austausch mit den Endothelzellen, der über Ausschüttung von Botenstoffen (z.B. Interleukin-6) läuft. Eine weitere Funktion besteht in der Versorgung der Neuronen mit Nährstoffen (Cholesterin-Synthese) und der Kontrolle der extrazellulären Ionenkonzentration (Abbott, 2006).

2.1.2. Verschiedene Transportsysteme der Blut-Hirn-Schranke

Folgende Abbildung soll die Gesamtheit der Möglichkeiten des Passierens der Endothelzellmembran von Substanzen an der Blut-Hirn-Schranke darstellen (Begley *et al.*, 2003):

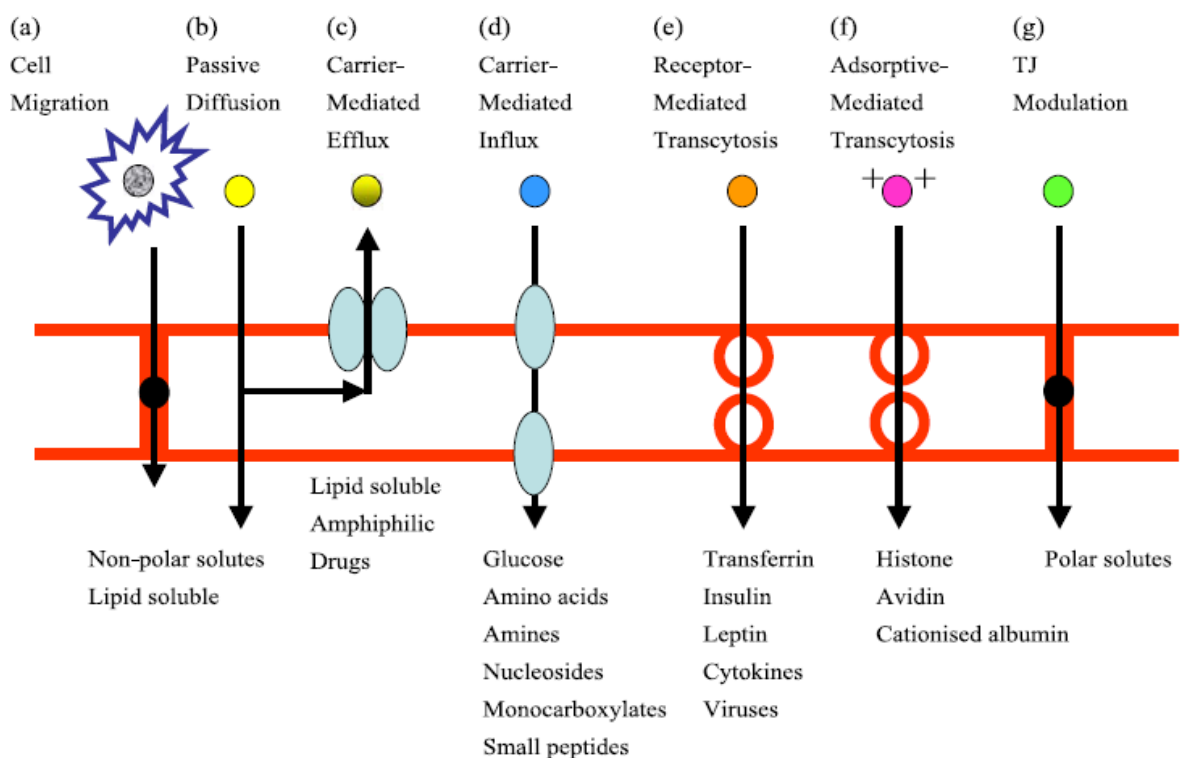


Abb. 2: Transportmechanismen an der Blut-Hirn-Schranke und deren Substrate (Begley *et al.*, 2003)

a) Zellmigration:

Leukozyten können die Blut-Hirn-Schranke durch Zellmigration durchqueren.

b) Passive Diffusion:

Sie ist möglich für O_2 und CO_2 , sowie für niedermolekulare lipophile Verbindungen. Das Ausmaß der Diffusion letzterer ist abhängig von Größe, Ladung und Lipophilie.

c) Carrier-vermittelter Efflux:

Verantwortlich sind verschiedene Familien von Effluxtransportern (z.B. ABC-Transporter) die verhindern, dass unerwünschte lipophile Substanzen mittels passiver Diffusion in das zentrale Nervensystem eindringen können.

d) Carrier-vermittelter Influx:

Der wichtigste Energieträger D-Glukose und essentielle Stoffe wie z.B. Vitamine, Amino- und Nukleinsäuren müssen aufgrund ihrer Hydrophilie mittels spezifischer Carrier aktiv in die Endothelzellen transportiert werden. Eine Diffusion dazwischen hindurch ist wegen der Tight-Junctions nicht möglich.

e) Rezeptor-vermittelte Transcytose:

Peptide und Proteine binden an Rezeptoren, werden in Vesikel eingeschlossen, so durch die Zelle transportiert und an der basolateralen Membran sezerniert.

f) Adsorptions-vermittelte Transcytose:

Durch die wegen peripherer Membranproteine negativ geladene Zelloberfläche werden positiv geladene Makromoleküle adsorbiert und mittels Transzytose durch die Zelle geschleust. Studien hierzu liegen vor allem für Insulin und Transferrin vor.

g) Tight-Junction Modulation:

Durch Modulation kann eine Öffnung der Tight-Junctions geschaffen werden und somit ein parazellulärer Diffusionsweg.

Besprochen werden soll von den aufgezeigten Transportsystemen nur das des Carrier-vermittelten Effluxes. Hier im genaueren interessieren uns vor allem BCRP, P-Glykoprotein (P-gp) und die Gruppe der MRPs, welche alle der Familie der ABC-Transporter angehören. Das gehäufte Auftreten solcher Transporter wird bei bestimmten Krankheiten beobachtet, so z.B. bei therapieresistenten (Hirn)-Tumoren, refraktärer Epilepsie, Morbus Parkinson und Morbus Alzheimer und führt dort zu einer Multi-Drug-Resistance (MDR) (Lazarowski *et al.*, 2007; Miller *et al.*, 2008; Wolf *et al.*, 2012).

2.2. ABC-Transporter

ABC-Transporter sind ubiquitär im menschlichen Körper zu finden: in Leber, Niere, im Gastrointestinaltrakt (GIT) und am stärksten exprimiert in speziellen Geweben, die Schutzbarrieren darstellen, *i.e.* die Blut-Hirn-Schranke, die Blut-Testes-Schranke und die Blut-Plazenta-Schranke (Demeule *et al.*, 2002). Sie befinden sich alle in der Zellplasmamembran.

Bisweilen wurden 48 ABC-Transporter codierende Gene im Menschen gefunden. Sie sind in sieben Familien (A-G) unterteilt und vier davon werden in direkten Zusammenhang mit MDR gebracht (A,B,C und G) (Ambudkar *et al.*, 2003).

Für viele gibt es homologe ABC-Transporter in anderen Säugetieren, was einen leichten Zugang zu Tiermodellen, vornehmlich Nagetieren, mit sich bringt.

Ihre Funktion besteht in einem aktiven Transport ihrer Substrate gegen ein Konzentrationsgefälle aus der Zelle. Der dafür nötige Energieaufwand wird durch ATP-Hydrolyse bereitgestellt.

ABC-Transporter an der Blut-Hirn-Schranke lassen sich mit Hilfe von Positron-Emissions-Tomographie sehr gut *in vivo* veranschaulichen. Dazu benötigt man

sogenannte PET-Tracer. Diese müssen mit dem zu visualisierenden ABC-Transporter interferieren, also Substrat oder Inhibitor sein. Um die Verbindung detektieren und die Interaktion mit dem Transporter mittels Schnittbilder zeigen zu können, ist es nötig der Verbindung ein Positronen emittierendes Radionuklid anzufügen.

2.2.1. Struktur der ABC-Transporter

ABC-Transporter sind Membranproteine, bestehend aus hydrophoben transmembranären Domänen (α -Helices) und zumeist zwei hydrophilen intrazellulären Domänen. Letztere besitzen je eine ATP-Bindungsstelle.

Die hier stattfindende Hydrolyse des ATPs bringt die nötige Energie für den aktiven Transport eines Substrates durch die Zellmembran, welcher über eine Konformationsänderung der α -Helices verläuft (Schinkel und Jonker 2003).

Es gibt extrazelluläre N-Glykosilierungsstellen, die für den Transport allerdings keine entscheidende Rolle spielen. Ihnen wird eher eine stabilisierende Funktion eingeräumt.

BCRP besitzt als einziger ABC-Transporter nur eine transmembranäre Domäne und nur eine intrazelluläre ATP-Bindungsstelle und muss daher ein funktionales Dimer mit einem zweiten Molekül bilden (Özvegy, 2001).

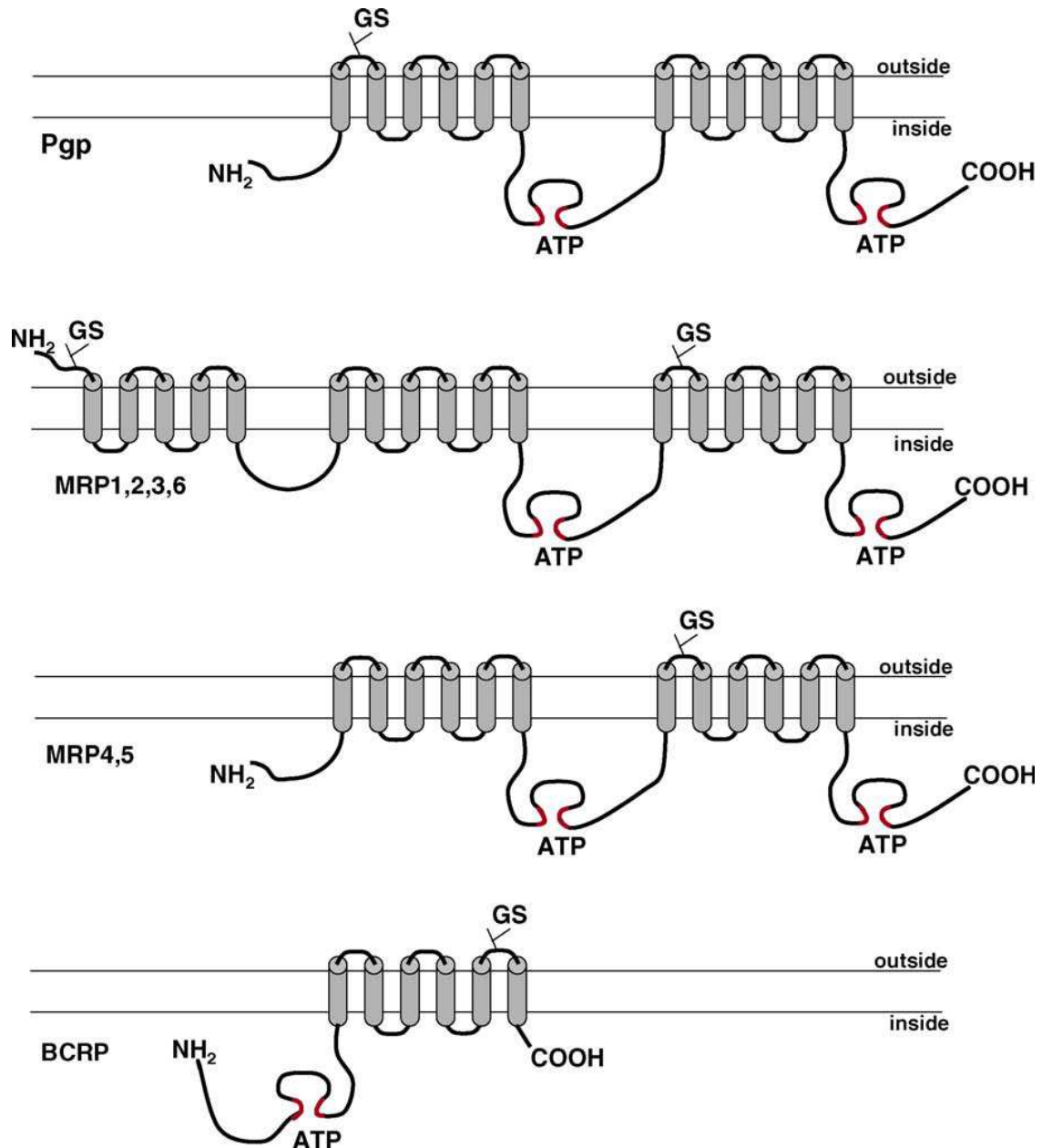


Abb. 3: Zweidimensionale schematische Darstellung von wichtigen ABC-Transportern. Es werden transmembranäre α -Helices, ATP-Bindungsstellen und N-Glykosilierungsstellen angezeigt (Löscher und Potschka, 2005).

2.2.2. Substrate und Inhibitoren von ABC-Transportern

Einen systematischen Überblick über die wichtigsten ABC-Transporter, deren Vorkommen und Substrate/Inhibitoren soll folgende Tabelle geben (Ambudkar 2003; Mairinger 2008):

Gebräuchlicher Name	Systematischer Name	Vorkommen im Gewebe	Substrate	Modulatoren
P-gp/MDR 1	ABCB1	GIT Leber Niere Plazenta Blut-Hirn-Schranke	neutrale und kationische organische Verbindungen Zytostatika: Doxorubicin, Daunorubicin, Epirubicin, Vinblastin, Vincristin, Mitoxantron, Paclitaxel Antiepileptika: Phenytoin, Phenobarbital, Gabapentin Immunsuppressiva: Cyclosporin A, Tacrolimus Zytokine: IL-2, IL-4, IFN-γ Calcium-Antagonisten: Verapamil, Nifedipin, Diltiazem Antibiotika: Erythromycin, Tetracycline, Fluorochinolone	1.Generation: Verapamil, Cyclosporin A, Chinidin, Nifedipin, Cephalosporine 2.Generation Valspodar (PSC833), Biricodar (VX-710), R-Verapamil 3.Generation Elacridar (GF120918) Tariquidar (XR9576) Zosuquidar (LY335979) Laniquidar (R101933)
MRP 1	ABCC1	in allen Geweben	Glutathione und andere Konjugate organische Anionen Leukotriene: LTC₄, LTD₄, LTE₄ Zytostatika: Doxorubicin, Daunorubicin, Vincristin, Etoposid	Sulfinpyrazon, Probenecid, Benzbromarone, LTC₄, Cyclosporin A, Verapamil, Valspodar, Biricodar

MRP 2	ABCC2	Leber Niere GIT	entspricht MRP 1	entspricht MRP 1
MRP 3	ABCC3	Pankreas Niere GIT Leber Nebenniere	Glucuronate, Glukothione, Gallensäuren Leukotriene Zytostatika: Etoposid, Teniposid, Methotrexat	Probenecid, MK-571, LTC ₄
MRP 4	ABCC4	Prostata Testes Ovarien GIT Pankreas Lunge	Nucleosid-Analoga, organische Anionen Zytostatika: Methotrexat, 6-Mercaptopurin, Thioguanin Prostaglandine konjugierte Steroide Gallensäuren	Probenecid

MRP 5	ABCC5	in den meisten Geweben	Nucleosid-Analoga, cyclische Nucleotide, organische Anionen Fluorescein	Probenecid PDE-Inhibitoren: Sildenafil, Trequisin
MRP 6	ABCC6	Leber Niere	anionische, cyclische Pentapeptide, Zytostatika: Daunorubicin, Doxorubicin, Etoposid, Cisplatin, Actinomycin D	BQ-123 (cyclisches Pentapeptid)
BCRP	ABCG2	Plazenta GIT Prostata Leber Blut-Hirn-Schranke	starke Überlappung mit Substraten von P-gp, MRP 1 und MRP 2 Prazosin	Elacridar (GF120918) Fumitremorgin C und Analoge: Ko132, Ko134 Pantoprazol

Tabelle 1: Wichtige ABC-Transporter, deren Expressionsgewebe, Substrate und Inhibitoren (Ambudkar 2003; Mairinger 2008)

2.2.3. P-Glykoprotein (P-gp, MDR1, ABCB1)

Es ist das am besten untersuchte Mitglied der ABC-Transporterfamilie. Es wurde erstmals in mutierten Chinese Hamster Ovary (CHO)-Zellen von Juliano und Ling beschrieben (Juliano und Ling 1976). P-gp war der erste Transporter, der in den Kapillarendothelzellen der Blut-Hirn-Schranke gefunden wurde und auch der erste, der mit MDR in Krebszellen in Zusammenhang gebracht wurde.

P-gp kommt in vielen menschlichen Geweben vor und wird stark in Epithelzellen der Leber, der Niere und des GIT exprimiert. Dort spielt es auch eine Rolle für die Bioverfügbarkeit von Arzneistoffen. Diese können an der Resorption gehindert werden und daher niedriger konzentriert im Blutplasma vorliegen (Schinkel, 1999).

In den Kapillarendothelzellen der Blut-Hirn-, Blut-Testes- und Blut-Plazenta-Schranke findet man besonders hohe Expressionsraten von P-gp, was aufgrund der Sensibilität der zu schützenden Organe von großer Notwendigkeit ist.

Als Substrate wurden schon sehr viele Arzneistoffe identifiziert, darunter wichtige Chemotherapeutika, Antiepileptika, Calcium-Antagonisten und Antibiotika (siehe Tab.1). Generell aber kann man von neutralen oder kationischen hydrophoben Verbindungen sprechen, die oft aromatische Teilstrukturen und quartäre Stickstoffatome enthalten (Ambudkar *et al.*, 2003).

Strukturell betrachtet ist P-gp ein Plasmamembranprotein mit 1280 Aminosäuren und einem Molekulargewicht von 170 kDa. Es besteht aus zwei lipophilen transmembranären Domänen, die sich wiederum je aus 6 α -Helices zusammensetzen, und aus zwei hydrophilen Nukleotidbindungsstellen (NBS; siehe Abb.3).

Für den aktiven Transport von Verbindungen durch die Plasmamembran müssen die transmembranären Segmente einem Konformationswechsel unterlaufen, allerdings ist noch nicht bis ins letzte Detail geklärt, wie dieser Prozess tatsächlich abläuft. Es existieren zurzeit vier verschiedene Modelle (Sharom, 2006; Ambudkar *et al.*, 2003):

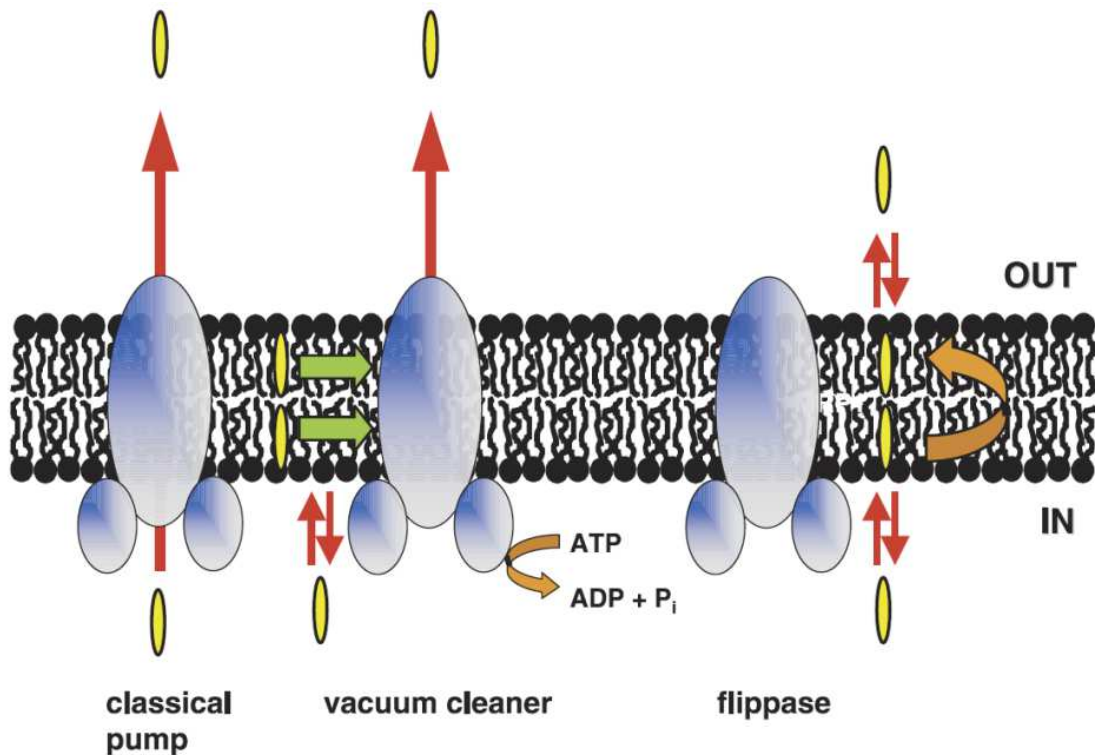


Abb. 4: Verschiedene Modelle zur Erklärung des Transportmechanismus von P-gp (Sharom, 2006)

- a) Das Modell einer Pumpe, die Substrate vom Zytoplasma in den Extrazellarraum (EZR) durch einen hydrophilen Tunnel bringt, der durch die α -Helices geformt wird.
- b) Das Modell eines sogenannten Vacuum-Cleaners, bei dem angenommen wird, dass das Substrat in die Plasmamembran diffundiert, wo es mit der Bindungsstelle des transmembranären Segments von P-gp interferiert und schließlich in den EZR gepumpt wird, bevor es wieder ins Zytoplasma zurückdiffundieren kann.
- c) Das Modell einer Flippase, in dem das Substrat ebenfalls in die Plasmamembran diffundiert, mit der transmembranären Domäne von P-gp interagiert und von dieser ans andere Ende der Phospholipidmembran in einer Drehbewegung gebracht wird, um von dort schließlich in den EZR zu gelangen.

Als vierte Variante existiert noch ein abgewandeltes Modell vom Funktionsmechanismus P-gps als einer klassischen Pumpe. Es wurde von Ambudkar *et al.* beschrieben (Ambudkar *et al.*, 2003).

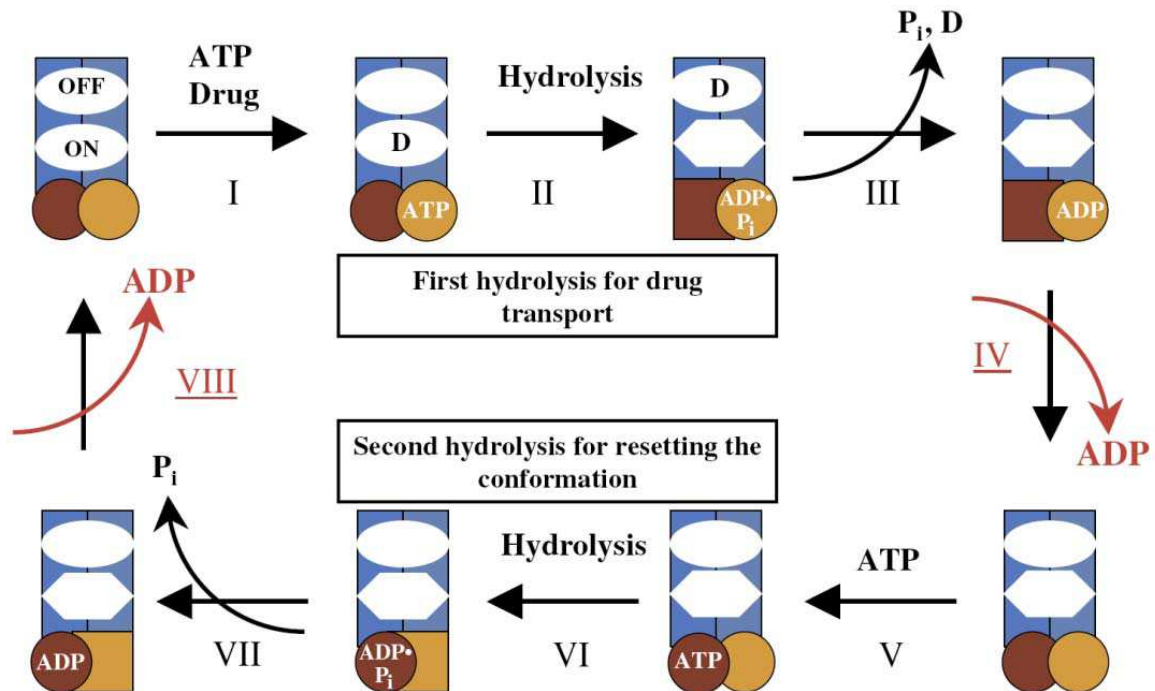


Abb. 5: Schematische Darstellung des Modells von P-gp als einer ATP-betriebenen Pumpe (Ambudkar *et al* 2003)

In dieser Darstellung werden für ein Molekül Substrat zwei Moleküle ATP verbraucht und dem P-gp zwei Substratbindungsstellen zugeschrieben, eine mit höherer, die andere mit niedrigerer Substrataffinität.

Als erstes muss das Substrat an der hochaffinen Bindungsstelle am P-gp binden (I). An einer der beiden Nukleotidbindungsstellen (NBS) bindet ATP (I). Es wird hydrolysiert, um einen Konformationswechsel der transmembranären Domäne zu veranlassen. Dies führt zu einer Senkung der Affinität der hochaffinen Bindungsstelle und zum Wechsel des Substrates in die ursprünglich weniger affine Bindungsstelle (II). Im nächsten Schritt werden Substrat und Phosphat freigesetzt (III). ADP dissoziiert spontan von der NBS (IV). In den Schritten (V,VI,VII) und (VIII) bindet noch einmal ATP an eine der NBS, wird hydrolysiert und der Energiegewinn

zur Rückgewinnung der hochaffinen Konformation der ersten Substratbindungsstelle genutzt (Ambudkar *et al.*, 2003).

2.2.4. Breast-Cancer-Resistance-Protein (BCRP, ABCG2)

BCRP ist das jüngstens entdeckte Mitglied der ABC-Transporter-Familie und kann seiner Funktion nach betrachtet in mehrfacher Weise mit dem P-gp verglichen werden.

Es kommt in vielen Geweben wie der Blut-Hirn-Schranke, der Plazenta, der Prostata, der Leber und dem GIT vor und wird beispielsweise in der menschlichen Blut-Hirn-Schranke acht Mal stärker exprimiert, als das länger bekannte und besser untersuchte P-gp (Dauchy, 2008).

Entdeckt wurde es durch Doyle *et al.* in der letztlich auch namensgebenden MCF-7 (Michigan Cancer Foundation) Brustkrebs-Zelllinie (Doyle *et al.*, 1998).

Ein endogenes Substrat ist nicht bekannt, allerdings wird eine Vielzahl von Substraten (siehe Tab. 1) durch BCRP aktiv aus den exprimierenden Zellen transportiert, wobei hier eine starke Überschneidung mit P-gp vorliegt (Matsson 2009).

BCRP liegt, dem P-gp gleich, an der luminalen Seite der Doppellipidmembran der Kapillarendothelzellen der Blut-Hirn-Schranke.

Strukturell betrachtet besteht es aus 655 Aminosäuren, hat aber, wie in Abb. 3 ersichtlich, nur eine transmembranäre Domäne und nur eine ATP-Bindungsstelle. Es wird daher als „Halb-Transporter“ bezeichnet und funktioniert analog zu den bakteriellen Transportern LmrA und MsbA durch Bildung eines Homodimers. Özvegy *et al.* bestätigte in Untersuchungen zur Expressierung von humanem ABCG2 in einer Insektenzelllinie (Özvegy *et al.*, 2001), dass kein zusätzliches Protein zur Funktion von BCRP nötig ist.

2.2.5. Multi-Drug-Resistance-Proteine

Eine weitere sehr bedeutende Gruppe der ABC-Transporterfamilie stellen die Multi-Drug-Resistance-Proteine (MRP) dar. Sie werden ebenfalls stark an der Blut-Hirn-Schranke exprimiert.

Im Gegensatz zu P-gp und BCRP sind sie nicht nur an der apikalen Seite der Membran von Endothelzellen vorhanden, sondern auch an der basolateralen, der dem Lumen abgewandten Seite, siehe Abb.6 (Schinkel und Jonker, 2003).

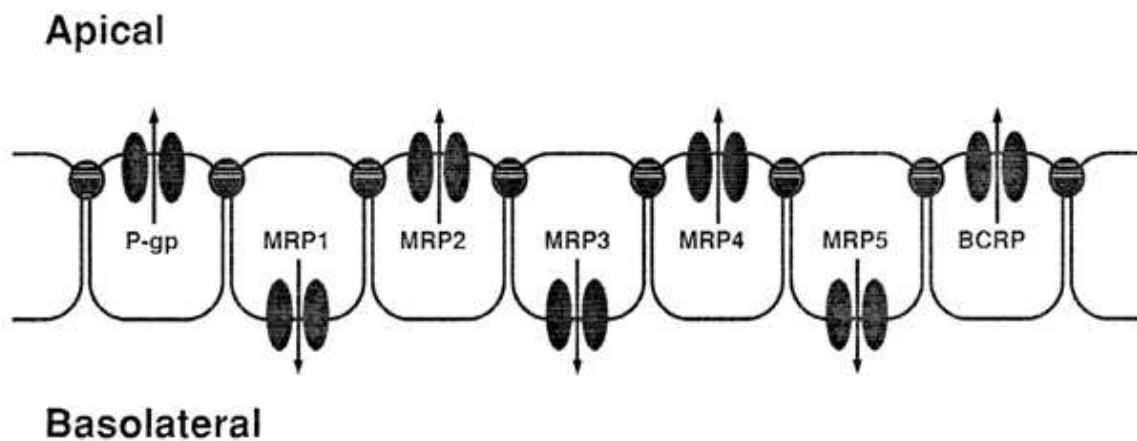


Abb. 6: Schematische Darstellung der an der apikalen oder basolateralen Membranseite befindlichen ABC-Transporter an der Blut-Hirn-Schranke (Schinkel und Jonker 2003)

MRP wurden zuerst in einer multiresistenten Lungenkrebszelllinie gefunden, in der kein P-gp nachgewiesen werden konnte (Cole *et al* 1992).

Strukturelle Unterschiede zwischen einzelnen MRPs und im Vergleich zu P-gp und BCRP werden schematisch in Abb.3 aufgezeigt.

MRPs transportieren anionische Substrate und Säurekonjugate, wie Glutathionate oder Glucuronate (Borst *et al.*, 2000), was in gewisser Weise eine Ergänzung zur Substratspezifität von P-gp und BCRP darstellt.

2.3. MDR- Modulatoren

Ganz allgemein formuliert sind MDR-Modulatoren Verbindungen, die an ABC-Transporter binden und einen Effekt auf sie ausüben. Dieser kann inhibitorischer oder stimulierender Natur sein, wobei hier, bezogen auf einen therapeutischen Nutzen, sinnvoller Weise nur von Inhibitoren die Rede sein kann. Allerdings impliziert der Begriff MDR-Modulatoren auch hochaffine Substrate, die an ABC-Transporter binden, aber keinen antagonistischen Effekt auf sie haben. Hier gibt es noch Klassifizierungsschwierigkeiten, weshalb der neutrale Terminus „Modulator“ verwendet wird.

2.3.1. P-gp-Modulatoren der 1. Generation

Die ersten P-gp-Modulatoren wurden in den 1980er Jahren entdeckt. Es handelte sich dabei um bekannte Arzneistoffe wie:

- Verapamil, einen Ca-Antagonisten
- Cyclosporin A, ein Immunsuppressivum
- Cepholasporine, eine wichtige Gruppe von β -Lactam-Antibiotika

Die Erwartungen mit der adjuvanten Gabe dieser Verbindungen zu einer schon bestehenden Zytostatikatherapie eine MDR bei Krebspatienten zu umgehen, gingen leider nicht in Erfüllung. Die Modulatoren der 1. Generation waren zu wenig P-gp-affin und mussten deshalb sehr hoch dosiert werden, was zu ernsten Nebenwirkungen führte.

2.3.2. P-gp-Modulatoren der 2. Generation

Ausgehend von den Erfahrungen mit der ersten Generation an P-gp-Modulatoren sollten Verbindungen mit höherer P-gp-Affinität entwickelt werden, um niedriger dosieren und dadurch weniger Nebenwirkungen in Kauf nehmen zu müssen. Beispiele sind:

- Dexverapamil, das R-Enantiomer von Verapamil
- Valspodar (PSC833)
- Biricodar (VX-710)

Der am besten untersuchte Vertreter der 2. Generation ist Valspodar, ein nicht immunsuppressives Derivat von Cyclosporin D, das P-gp zehn bis zwanzig Mal stärker inhibiert als Cyclosporin A (Thomas und Coley 2003). Allerdings konnte durch die Inhibierung die Aufnahme von Zytostatika nur geringfügig erhöht werden (Greenberg *et al.*, 2004).

Vertreter der 2. Generation von P-gp Modulatoren sind meist Substrate von Cytochrom P (CYP)-450 Enzymen. Leider sind das einige wichtige Zytostatika wie Paclitaxel oder Vinblastin auch. Diese Überschneidung in der Metabolisierung führte zu erhöhten Plasmaspiegeln der Zytostatika und somit zu einer unerwünscht hohen Toxizität (Wandel *et al.*, 1999).

Ein weiteres Problem war die geringe Selektivität der Modulatoren für einzelne ABC-Transporter, was durch die breite Inhibierung zu einer Schädigung von gesundem Gewebe im ganzen Körper führte. Dies verwundert kaum, wenn man bedenkt, welche physiologische Rolle den ABC-Transportern zukommt.

Es mussten daher alle weiteren klinischen Studien abgebrochen werden (Thomas und Coley, 2003).

2.3.3. P-gp-Modulatoren der 3. Generation

Die Anforderungen an die 3. Generation von P-gp-Modulatoren waren eine erhöhte Selektivität für P-gp, eine in der Klinik minimierte Toxizität und möglichst keine Interaktionen als CYP-450-Substrate, um Einflüsse auf den CYP-450 abhängigen Metabolismus gleichzeitig applizierter Zytostatika zu verhindern. Wichtige Vertreter dieser 3. Generation sind:

– Elacridar (GF120918):

Elacridar ist ein hochaffiner P-gp- und BCRP-Inhibitor. Er wurde in klinischen Studien zur Unterstützung der Therapie von multiresistenten Tumoren eingesetzt (Kruijtzter *et al.*, 2002). Es wurden mit Elacridar und Derivaten als radioaktiv markiertem PET-Tracer schon Studien zur Visualisierung von P-gp an der Blut-Hirn-Schranke von Mäusen und Ratten durchgeführt (Kawamura *et al.*, 2011; Dörner *et al.*, 2011; Dörner *et al.*, 2009).

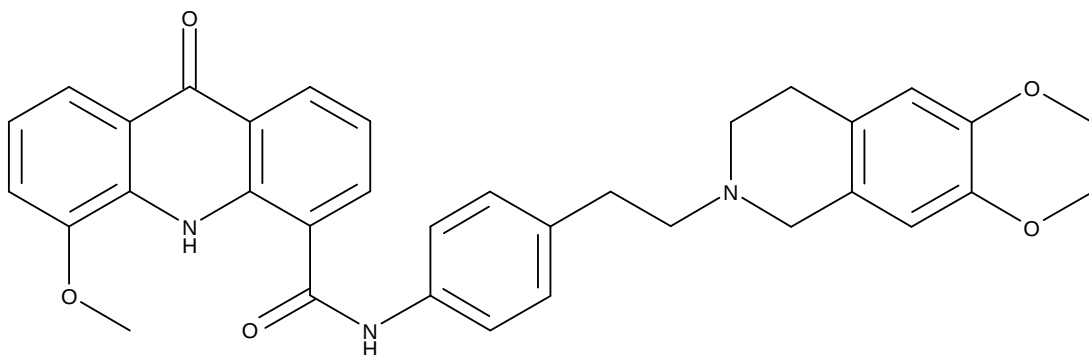


Abb. 7: Elacridar, ein P-gp- und BCRP-Modulator

– Tariquidar (XR9576)

Tariquidar ist ein hochspezifischer Inhibitor von P-gp, der eine vergleichsweise geringe Wirkung auf BCRP hat. Es ist ob seiner hohen Affinität der prominenteste Vertreter der P-gp-Modulatoren.

Auch hier wurden schon Studien zur Visualisierung der P-gp-Transporterdichte an der Blut-Hirn-Schranke durchgeführt (Bauer *et al.*, 2010; Kawamura *et al.*, 2010).

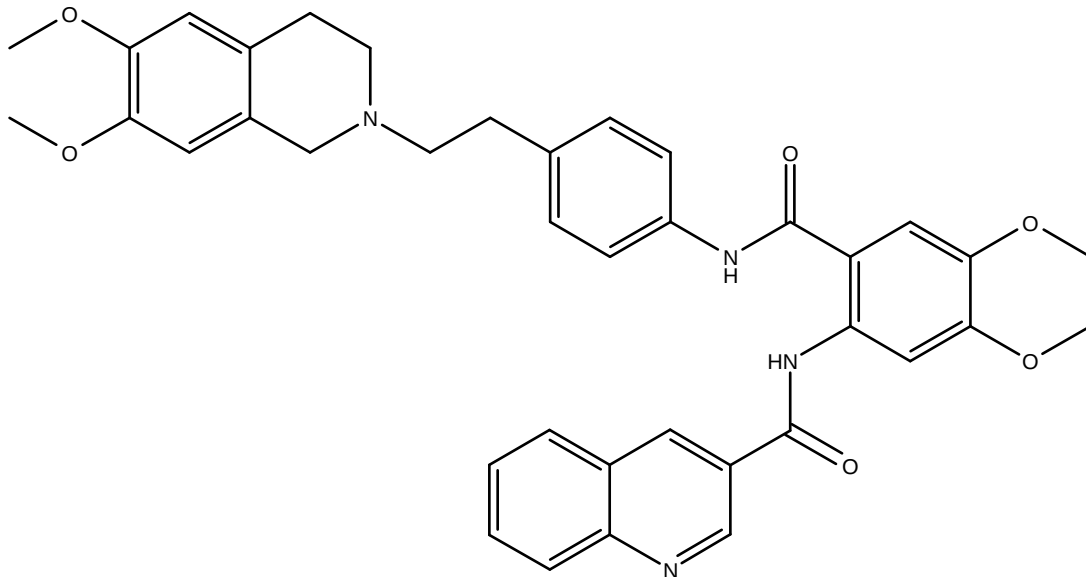


Abb. 8: Tariquidar, ein sehr selektiver P-gp-Inhibitor

- Laniquidar
- Zosuquidar

2.3.4. BCRP-Modulatoren

Da BCRP im Vergleich zu P-gp erst wesentlich später entdeckt wurde (Doyle *et al.*, 1998), beginnt auch die Suche nach möglichen Modulatoren sehr viel später.

- Elacridar

Wie schon erwähnt hat Elacridar beinahe dieselbe inhibierende Wirkung auf BCRP wie auf P-gp. Kühnle *et al.* al beschrieben für BCRP eine IC₅₀ (halbmaximale inhibitorische Konzentration) von 250 (± 45) nM und für P-gp

eine IC₅₀ von 193 (± 18) nM in einem Mitoxantron-Efflux-Essay in einer MCF-7 Brustkrebszelllinie.

– Fumitremorgin C

Fumitremorgin C wurde als erster selektiver BCRP-Modulator beschrieben (Rabindran *et al.*, 2000). Es führte zu einer vermehrten Aufnahme von Mitoxantron, Doxorubicin und Topotecan in MCF-7 Brustkrebszellen und somit zur Erhöhung deren zytotoxischer Wirkung.

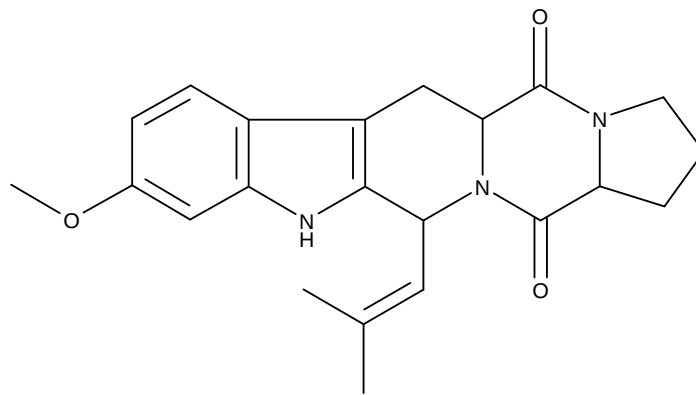


Abb. 9: Fumitremorgin C, ein selektiver BCRP-Modulator

Allerdings ist Fumitremorgin C aufgrund seiner Neurotoxizität nicht für *in vivo* Experimente geeignet (Kühnle *et al.*, 2009).

Aus diesem Grund führten van Loevezijn *et al.* kombinatorische Festphasensynthesen durch, mit dem Ziel die Selektivität und die Wirksamkeit zu erhöhen (van Loevezijn *et al.* 2001).

Dies führte zu zwei interessanten Derivaten:

- Ko132 und Ko134

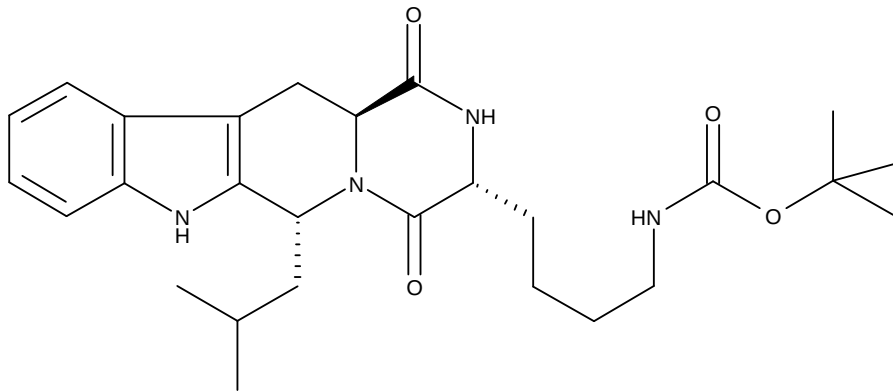


Abb. 10: Ko132, ein Derivat von Fumitremorgin C, mit erhöhter Potenz

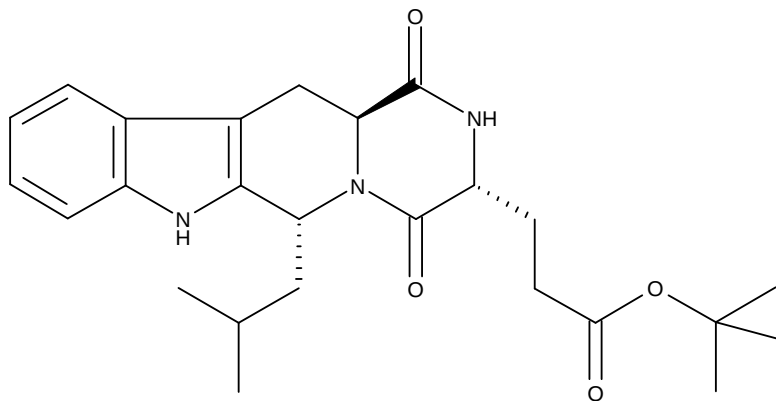


Abb. 11: Ko134, ein weiteres Derivat von Fumitremorgin C, mit erhöhter Potenz

- Methyl 2-(chinolin-2-carboxamido)-4-((4-(2-(6,7-dimethoxy-1,2,3,4-tetrahydroisochinolin-2-yl)ethyl)phenyl)carbamoyl)benzoat:

Ist ein kürzlich beschriebenes Tariquidar-Derivat, das durch leichte strukturelle Veränderungen eine sehr hohe Selektivität zu BCRP und eine stark inhibierende Wirkung auf BCRP aufweist (Kühnle *et al.*, 2009).

Es konnten die hohen Erwartungen jedoch leider in PET-Untersuchungen *in vivo* nicht erfüllt werden. Grund ist wahrscheinlich eine metabolische Instabilität der Verbindung (Mairinger *et al.*, 2010).

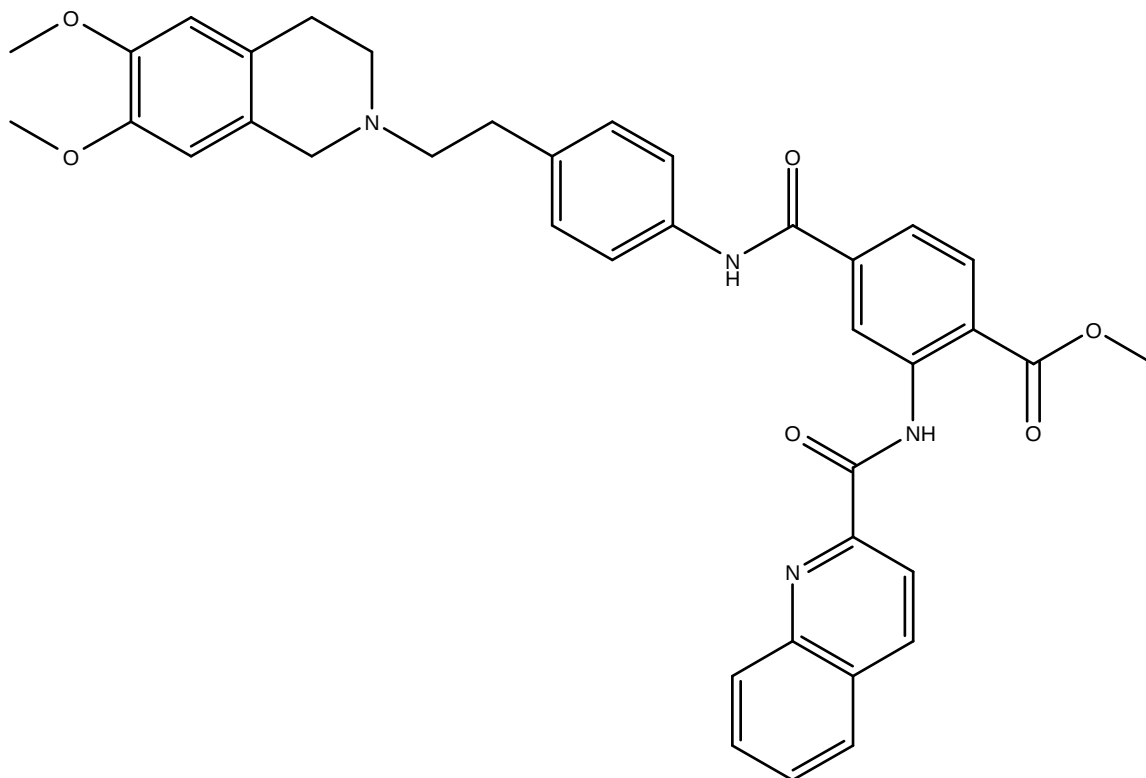


Abb. 12: Methyl 2-(chinolin-2-carboxamido)-4-((4-(2-(6,7-dimethoxy-1,2,3,4-tetrahydroisochinolin-2-yl)ethyl)phenyl)carbamoyl)benzoat, ein Tariquidar-Derivat mit starker BCRP- *in vitro* Selektivität (Kühnle *et al.*, 2009; Mairinger *et al.*, 2010)

In weiteren Modifikationen dieser Verbindung zur Erhöhung der metabolischen Stabilität liegt der Ansatzpunkt dieser Arbeit. Er soll genauer in einem späteren Kapitel behandelt werden.

2.4. Positronen-Emissions-Tomographie (PET)

Positronen-Emissions-Tomographie spielt u.a. bei der Untersuchung der Funktion von ABC-Transportern an der Blut-Hirn-Schranke eine wichtige Rolle.

Das Prinzip dieser bildgebenden nuklearmedizinischen Methode liegt in der radioaktiven Markierung einer Verbindung, die dadurch mittels PET im lebenden Organismus auffindbar und verfolgbar gemacht wird. So können physiologische Prozesse abgebildet und nachvollzogen werden.

2.4.1. Prinzip der PET

Die zur Markierung verwendeten Radionuklide sind β^+ -Strahler, d.h. sie emittieren Positronen. Diese treffen im Gewebe auf Elektronen und bilden mit ihnen ein Positronium. Dieses hat eine sehr kurze Lebensspanne von wenigen Nanosekunden und zerfällt unter Emission von zwei hochenergetischen γ -Photonen in einem Winkel von etwa 180° . Diese Photonen können leicht Gewebe durchdringen und werden mittels rund um den Körper angeordneten Detektoren erfasst. Somit kann ein Zerfallsereignis zeitlich und räumlich rekonstruiert werden und die Verteilung des PET-Tracers durch die Errechnung von Schnittbildern dargestellt werden.

Es können mit PET funktionale Prozesse (z.B. Stoffwechselprozesse oder Pharmakon-Rezeptor-Interaktionen) im Organismus untersucht und veranschaulicht werden und nicht wie bei anderen bildgebenden Verfahren nur morphologische Strukturen.

Die am häufigsten verwendeten Radionuklide sind ^{18}F , ^{11}C , ^{13}N , ^{15}O oder ^{68}Ga und werden mit Hilfe eines Zyklotrons hergestellt.

2.4.2. Anwendungsgebiete der PET

PET wird oft in Kombination mit CT (Computertomographie) in der Diagnose von verschiedenen Tumorerkrankungen (z.B. Mammakarzinom, Schilddrüsenkarzinom, Bronchialkarzinom und weitere), aber auch in der Diagnose von Morbus Parkinson, Epilepsie oder Demenz angewandt.

Jedoch können auch Aussagen zur Pharmakokinetik eines bestimmten PET-Tracers getroffen werden. Früh miteinbezogen, könnte PET schon bei der Entwicklung von Arzneistoffen äußerst dienlich sein. Man denke nur an solche, deren Ziel es ist die Blut-Hirn-Schranke zu durchdringen, wie z.B. neue Antiepileptika für refraktäre Formen, Zytostatika zur Anwendung bei Hirntumoren oder Metastasen, oder Virostatika, die bei einer HIV-Infektion des Gehirns unbedingt diese Barriere umgehen können müssen.

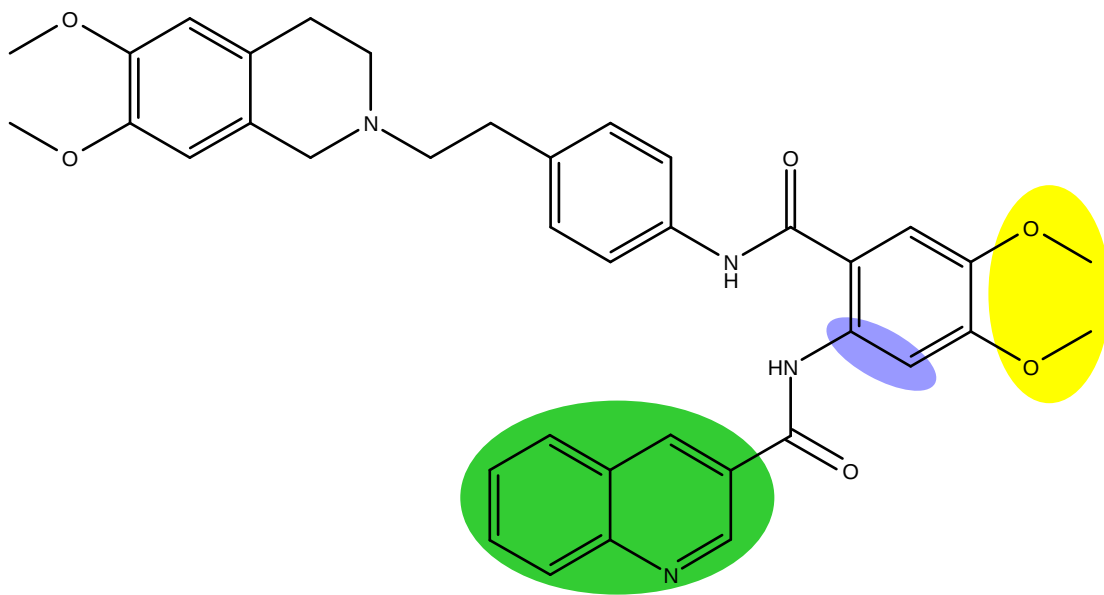
Diesem therapeutischen Interesse ist auch ein diagnostisches anzureihen. Schließlich könnte man in unserem speziellen Beispiel die ABC-Transporterdichte an der Blut-Hirn-Schranke mit dem SUV-Wert (Standardized-Uptake-Value), der die regionale Radioaktivitätskonzentration beschreibt, quantifizieren.

Es wurde schon weiter oben ausgeführt, dass bei manchen Erkrankungen, wie Epilepsie oder Tumorerkrankungen eine Überexprimierung von ABC-Transportern stattfindet und das zur MDR führt.

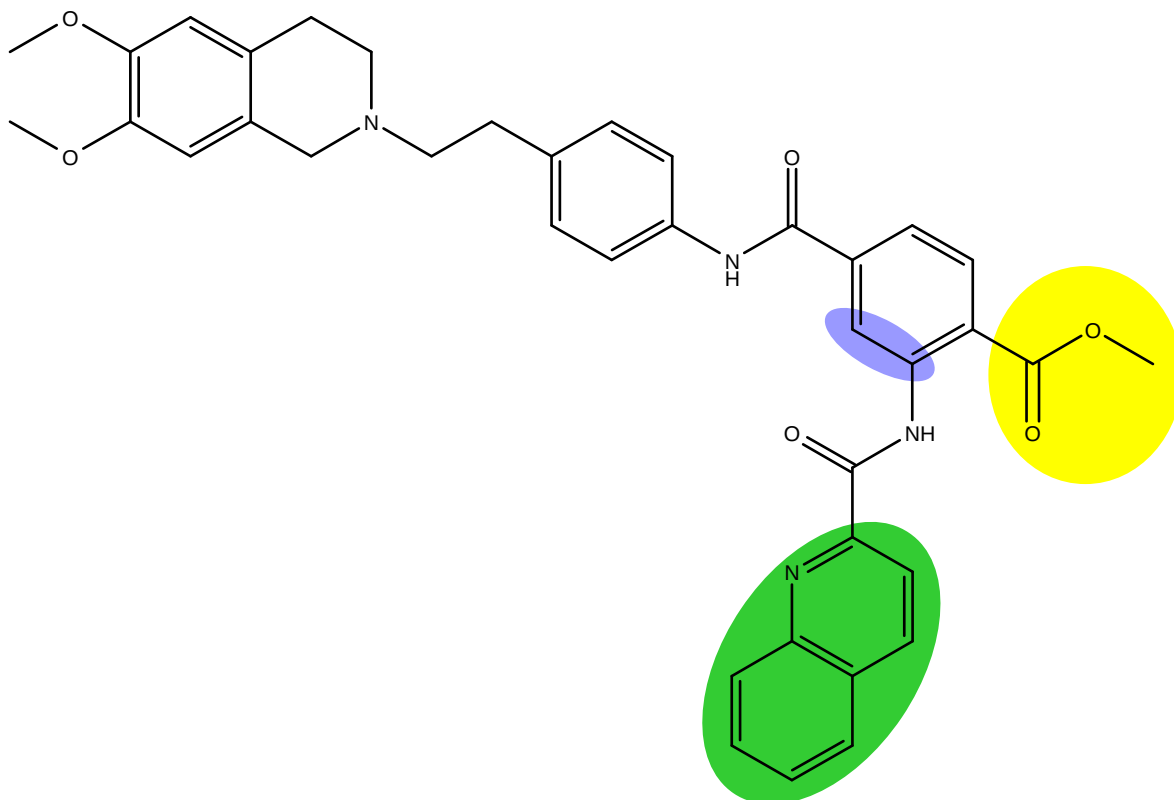
Hier wäre mit PET die Möglichkeit eines Ansatzes für eine personalisierte Therapie gegeben, indem vor Arzneimittelgabe eruiert wird, wie es sich mit der ABC-Transporterdichte verhält, um Vorschläge für eine individuelle Dosierung zu erhalten.

2.5. Ausgangspunkt der Arbeit

Die Grundlage für diese Arbeit bildete eine Veröffentlichung von Kühnle *et al.* im Jahr 2009, in der von der Synthese und *in vitro* Evaluation eines Tariquidar-Derivates mit erhöhter Selektivität für BCRP berichtet wurde (Kühnle *et al.*, 2009). Die folgenden Abbildungen sollen die geringen strukturellen Unterschiede zwischen Tariquidar und seinem *in vitro* BCRP-selektiven Derivat veranschaulichen:



Tariquidar, P-gp-Inhibitor



Methyl 2-(chinolin-2-Carboxamido)-4-((4-(2-(6,7-dimethoxy-1,2,3,4-tetrahydroisochinolin-2-yl)ethyl)phenyl)carbamoyl)benzoat , BCRP-Inhibitor

Abb.12: Leichte Strukturmodifikationen des bekannten P-gp-Inhibitors Tariquidar führten bei **16** zu einer Umkehrung der Selektivität zu BCRP (Kühnle *et al.*, 2009)

In der oben erwähnten Studie wird berichtet, dass per Zufall entdeckt wurde, dass eine Versetzung des Chinolinamidrestes am Anthranilsäurering zu einer Umkehrung der Selektivität von P-gp zu BCRP führte.

Es wurden daraufhin verschiedene Derivate hergestellt, wobei die Variationen alle den Anthranilsäurering betrafen und folgende waren:

Die Methoxy-Gruppen wurden weggelassen oder gegen Methyl-Gruppen oder einen Methylester getauscht. Letzteres stellte sich als bestes für eine BCRP selektive Wirkung heraus.

Auch wurden verschiedene Heterocyclen an der besagten Position 2 des Anthranilsäurerings getestet. Hier erwies sich der Substituent 2-Chinolinamid als die BCRP-Selektivität und Wirksamkeit am positivsten beeinflussend. So stand am Ende der Untersuchungen Methyl 2-(chinolin-2-carboxamido)-4-((4-(2-(6,7-

dimethoxy-1,2,3,4-tetrahydroisochinolin-2-yl)ethyl)phenyl)carbamoyl)benzoat als Verbindung mit der höchsten Affinität und Selektivität zu BCRP fest.

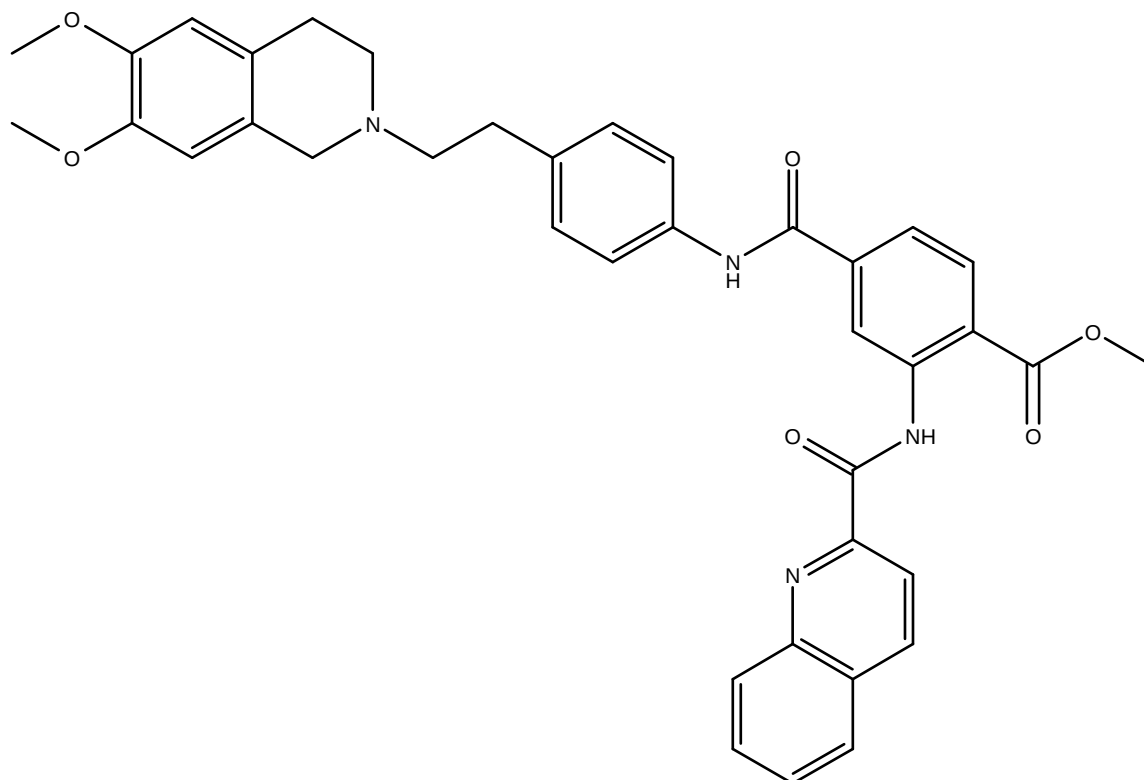


Abb. 13: In einem Mitoxantron-Efflux-Assay erwies sich Methyl 2-(chinolin-2-Carboxamido)-4-((4-(2-(6,7-dimethoxy-1,2,3,4-tetrahydroisochinolin-2-yl)ethyl)phenyl)carbamoyl)benzoat als BCRP am stärksten inhibierend (Kühnle *et al.*, 2009).

Der Nachweis der BCRP selektiven Inhibierung wurde mit Durchflusszytometrie in einem Mitoxantron-Efflux-Assay im Vergleich zu einem Calcein-AM-Efflux-Assay erbracht.

Rot fluoreszierendes Mitoxantron kumuliert in MCF-7/Topo Zellen nicht, sondern wird durch BCRP aus den Zellen transportiert (Doyle *et al.* 1998). Durch Zugabe von BCRP-Inhibitoren steigt die Konzentration von Mitoxantron in den Zellen an, was mit der Durchflusszytometrie gemessen wird. Veränderungen im Efflux des Mitoxantrons durch verschieden hohe Konzentrationen von BCRP-Inhibitoren können durch die relative Intensität der Fluoreszenz, des in der Zelle befindlichen Mitoxantrons gemessen werden. So kann über den Zusammenhang zwischen Inhibitor-Konzentration und intrazellulärer Mitoxantron-Konzentration, sprich

gemessener Fluoreszenz, eine Aussage über die inhibierende Wirksamkeit einer Verbindung getroffen werden.

In analoger Weise wurde beim Calcein-AM-Efflux-Assay verfahren. KBv1 Zellen überexprimieren P-gp, das fluoreszierendes Calcein aktiv aus den Zellen transportiert. Bei Inhibierung von P-gp steigt die Konzentration an Calcein in den Zellen und so kann in gleicher Weise über die Intensität der Fluoreszenz eine Aussage über die Wirksamkeit des Inhibitors getroffen werden.

Zu einem Schluss über die Selektivität der jeweiligen Verbindung zu einem der beiden ABC-Transporter kommt man durch Vergleich der Wirksamkeit im Mitoxantron-Efflux-Assay zur Wirksamkeit im Calcein-AM-Efflux-Assay.

So wurde bei Kühnle et al. der Nachweis einer *in vitro* Selektivität zu BCRP (IC_{50} = 60 nM) gegenüber P-gp (IC_{50} = >29000 nM) und damit auch einer starken Bindungsaffinität zu BCRP für Methyl 2-(chinolin-2-carboxamido)-4-((4-(2-(6,7-dimethoxy-1,2,3,4-tetrahydroisochinolin-2-yl)ethyl)phenyl)carbamoyl)benzoat erbracht.

Allerdings konnten Mairinger *et al.*, in einer darauffolgenden Studie zeigen, wie wichtig es ist, sobald als möglich *in vivo* Untersuchungen durchzuführen, wenn es um die Findung neuer Wirkstoffe oder PET-Tracer geht (Mairinger *et al.*, 2010).

In dieser Studie wurde die Überführung von Methyl 2-(chinolin-2-carboxamido)-4-((4-(2-(6,7-dimethoxy-1,2,3,4-tetrahydroisochinolin-2-yl)ethyl)phenyl)carbamoyl)benzoat in den PET-Tracer [^{11}C]Methyl 2-(chinolin-2-carboxamido)-4-((4-(2-(6,7-dimethoxy-1,2,3,4-tetrahydroisochinolin-2-yl)ethyl)phenyl)carbamoyl)benzoat zur Visualisierung der BCRP Modulation mittels PET durchgeführt.

Der PET-Tracer wurde in vier verschiedenen Mäusetypen getestet, nämlich in Wild-Typ-Mäusen, P-gp-, BCRP- und P-gp-/BCRP- Knock-out-Mäusen.

Abb. 13 zeigt jedoch, dass die höchsten Konzentrationen des PET-Tracers konnten in der BCRP/P-gp-Knock-out- Mausgruppe gefunden wurden, gefolgt von der P-gp-Knock-out-Gruppe.

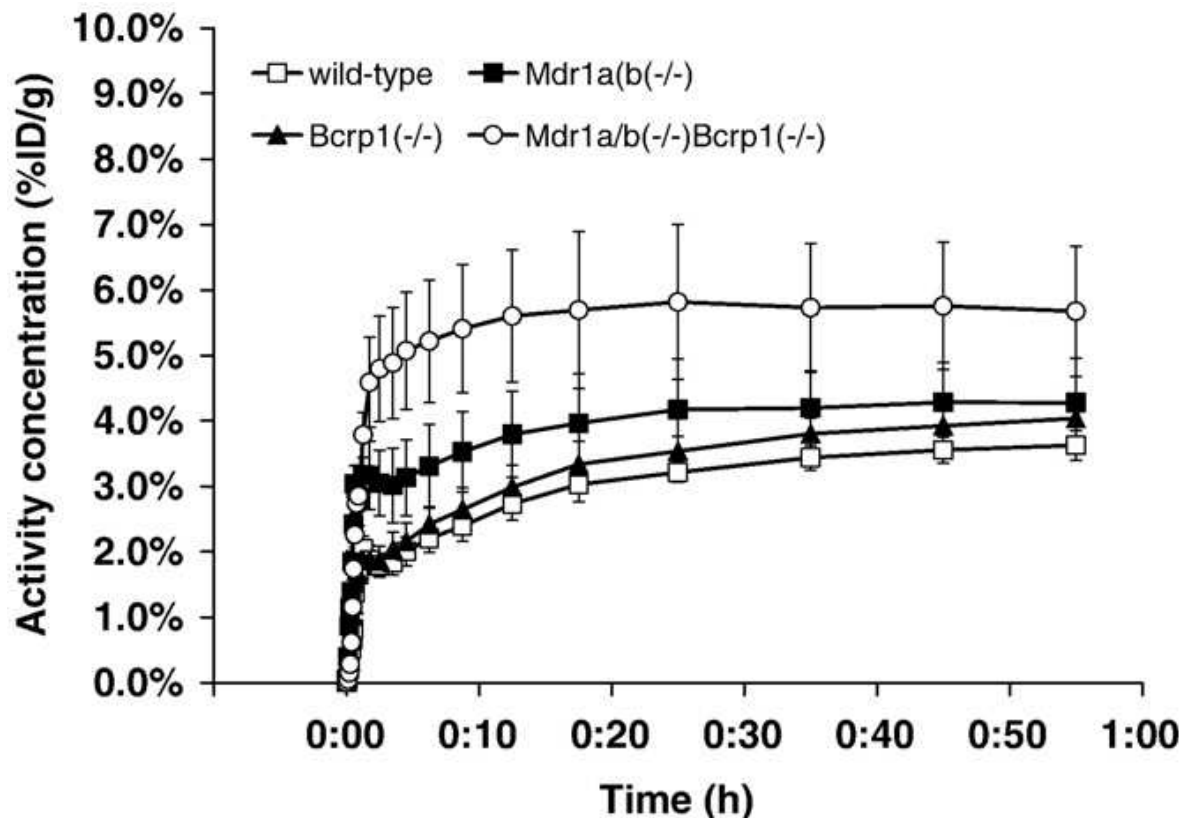


Abb.14: Vergleich der Konzentrationen des PET-Tracers in Gehirnen der verschiedenen Mäusegruppen. Es ist hier schön veranschaulicht, dass in den BCRP-Knock-out-Mäusen eine geringere Aufnahme ins Gehirn erfolgte als bei anderen Gruppen (Mairinger *et al.*, 2010).

Damit wurde die Hypothese einer BCRP-Selektivität *in vivo* in Frage gestellt. Es wurde hingegen eine Interaktion mit P-gp nachgewiesen. Das Faktum, dass bei den P-gp/BCRP-Knock-out-Mäusen die höchsten Konzentrationen gemessen wurden, führt zu der Annahme, dass BCRP und P-gp eine konzertierte Rolle an der Blut-Hirn-Schranke haben.

Es wurden zusätzlich noch Untersuchungen zur Plasmastabilität des PET-Tracers durchgeführt. Dazu wurde er in Mäuseplasma inkubiert und mittels HPLC festgestellt, dass er metabolisch nicht stabil ist und vor allem in ein polares Bruchstück übergeht, das das [^{11}C]-Atom enthält.

Daraus wurde die Conclusio gezogen, dass womöglich der vorzeitige Zerfall von [^{11}C]Methyl2-(chinolin-2-carboxamido)-4-((4-(2-(6,7-dimethoxy-1,2,3,4-tetrahydroisochinolin-2-yl)ethyl)phenyl)carbamoyl)benzoat dazu führte, dass keine selektiven BCRP-Interaktionen nachgewiesen werden konnten.

Dieser Schluss eröffnete den Raum für neue Untersuchungen, die bei der Erhöhung der Plasmastabilität des PET-Tracers ansetzten. Hier befinden wir uns am Ausgangspunkt dieser Diplomarbeit.

Es wurde in Erwägung gezogen, dass das Molekül amidohydrolytisch aufgespalten wird, da Kühnle, 2010 jene Bruchstücke charakterisieren konnte (Kühnle, 2010), die in Abb.15 veranschaulicht werden sollen.

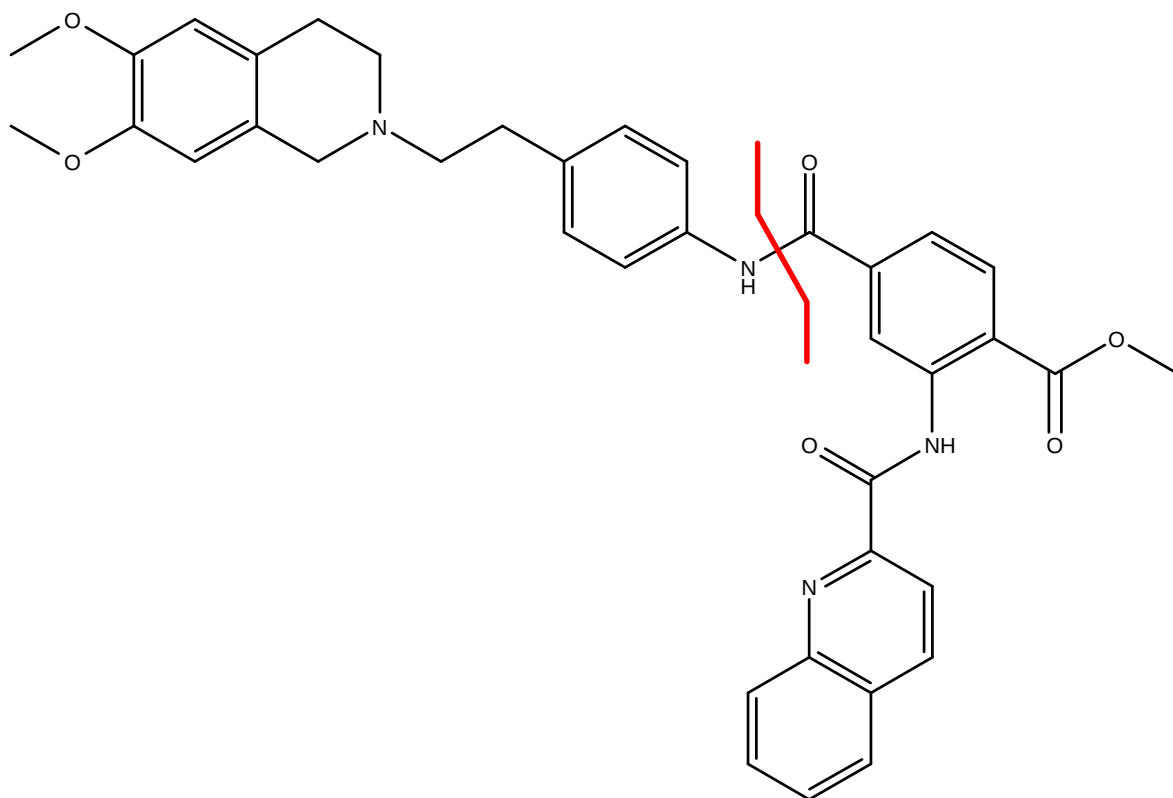


Abb. 15: Metabolische Bruchstelle des BCRP Modulators Methyl 2-(chinolin-2-carboxamido)-4-((4-(2-(6,7-dimethoxy-1,2,3,4-tetrahydroisochinolin-2-yl)ethyl)phenyl)carbamoyl)benzoat. Es wurde nachgewiesen, dass das Molekül hier amidohydrolytisch im Blutplasma gespalten wird (Kühnle, 2010).

Auf Basis der besprochenen Verbindung sollten Strukturmodifikationen durchgeführt werden, die bei gleichbleibend hoher BCRP-Selektivität zu einer verbesserten Plasmastabilität führten.

2.6. Ziel der Diplomarbeit

Ausgangspunkt der eigenen Untersuchungen war die Leitstruktur Methyl 2-(chinolin-2-carboxamido)-4-((4-(2-(6,7-dimethoxy-1,2,3,4-tetrahydroisochinolin-2-yl)ethyl)phenyl)carbamoyl)benzoat (Kühnle *et al.*, 2009; Mairinger *et al.*, 2010).

Durch Umpositionierung der Reste am Anthranilsäurering und damit einer Veränderung der e^- -Verteilung im Aromaten, sollte der Versuch einer Erhöhung der metabolischen Stabilität synthetisch umgesetzt werden.

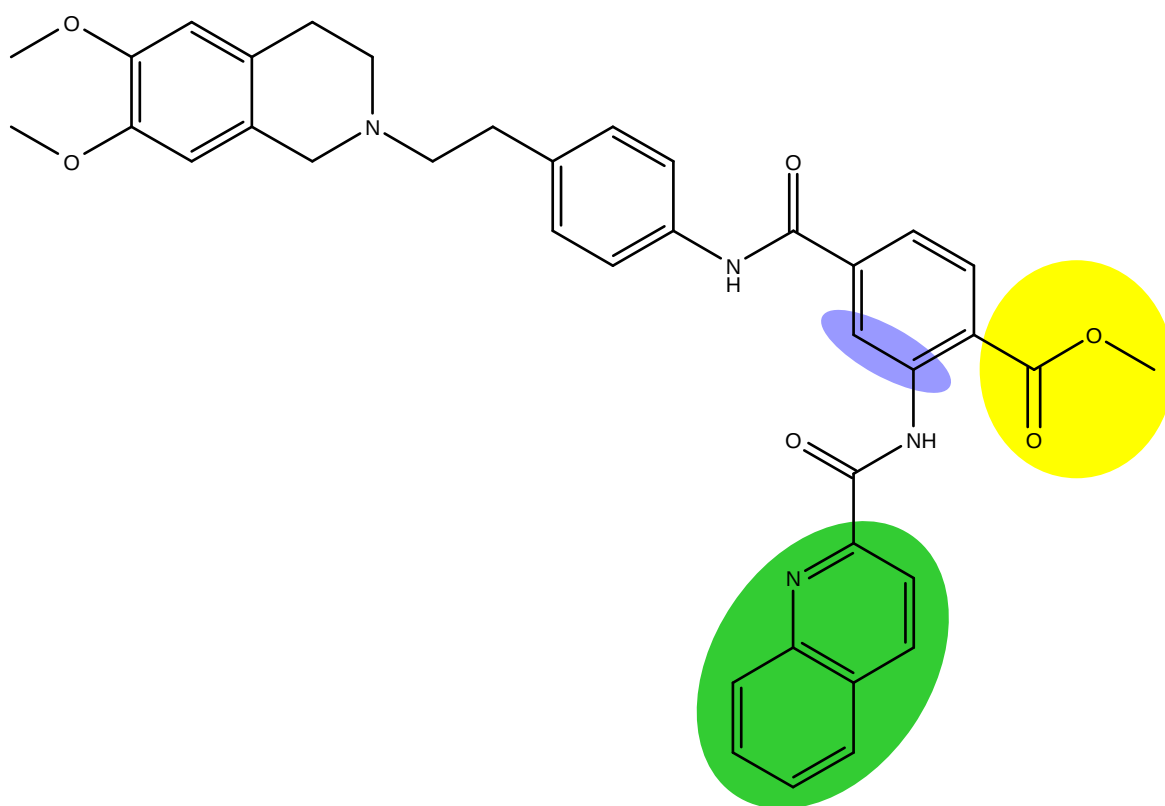
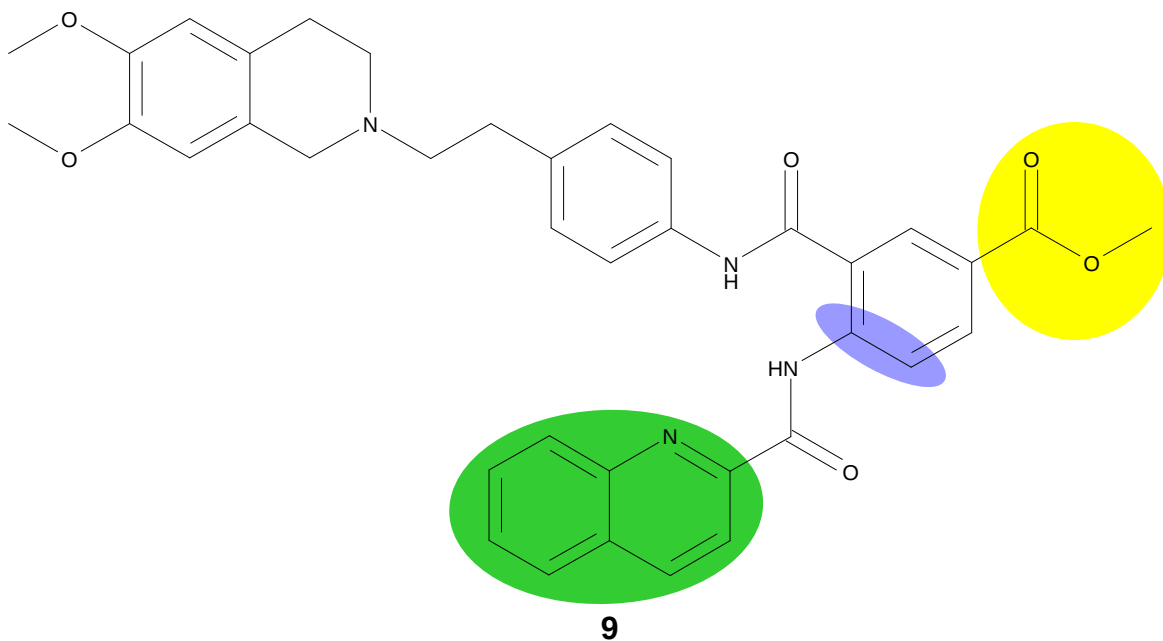
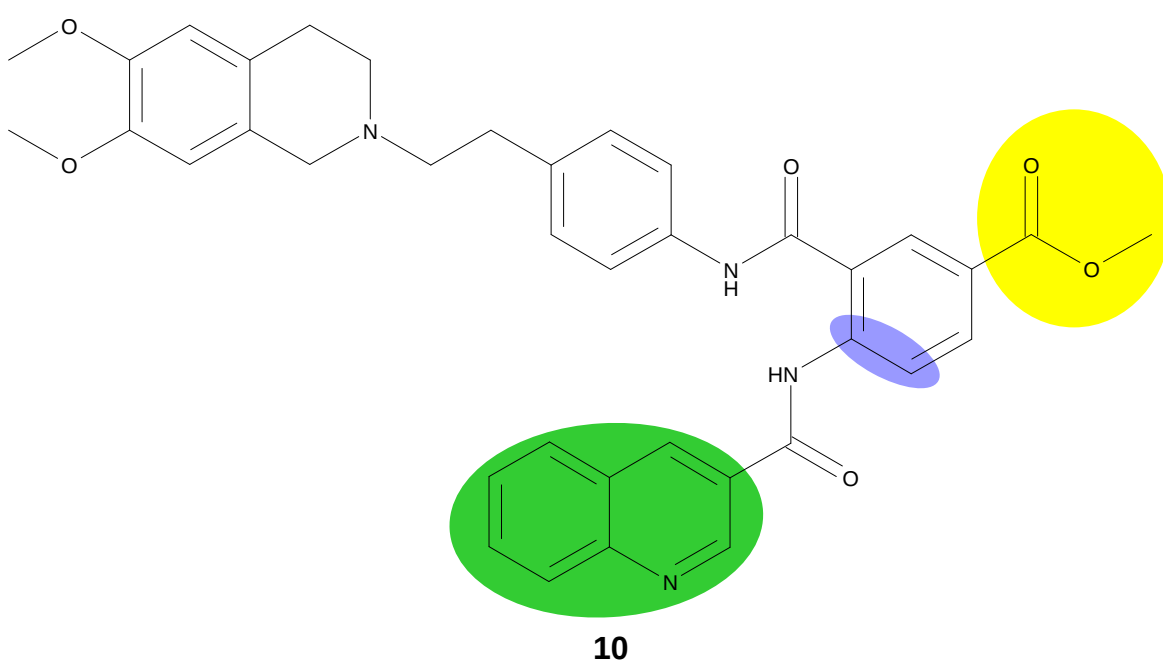


Abb.16: Leitstruktur Methyl 2-(chinolin-2-carboxamido)-4-((4-(2-(6,7-dimethoxy-1,2,3,4-tetrahydroisochinolin-2-yl)ethyl)phenyl)carbamoyl)benzoat

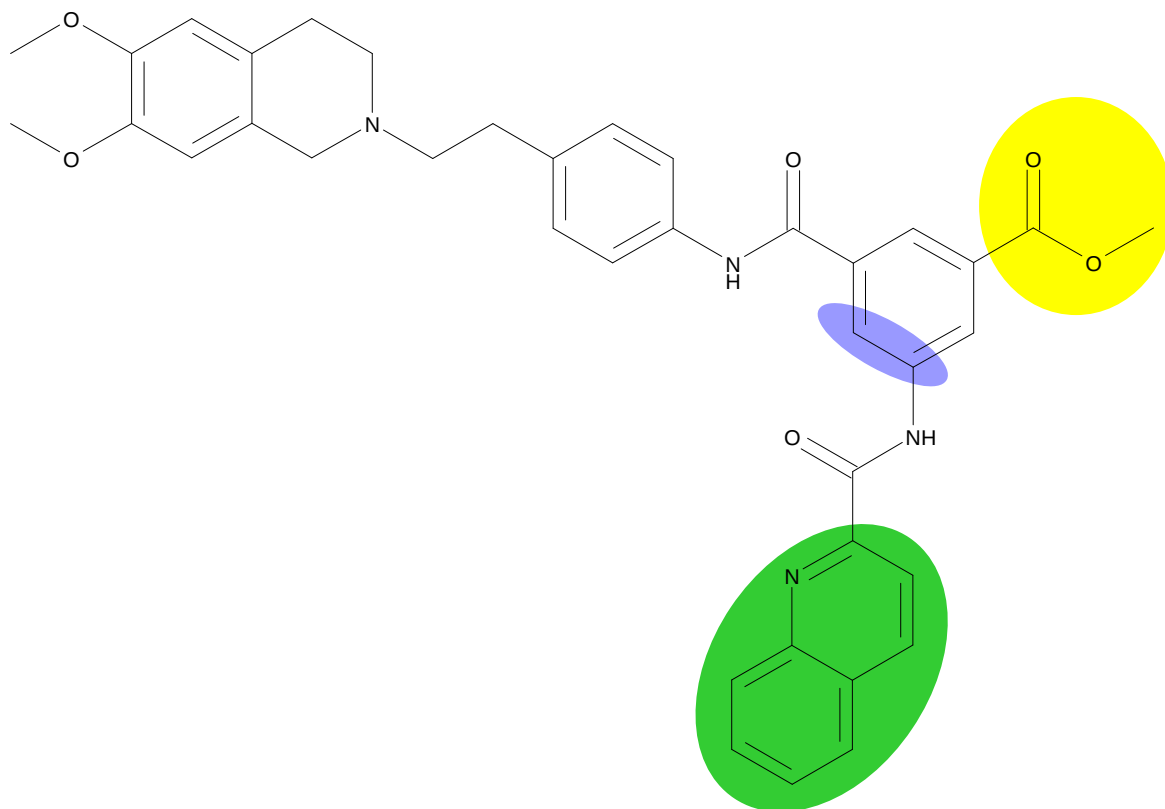
Um das im vorigen Kapitel bereits angeführte Vorhaben einer Modifikation dieser Verbindung durchzuführen, wurden folgende zu synthetisierende Zielstrukturen ins Auge gefasst:



Methyl 4-(chinolin-2-carboxamido)-3-((4-(2-(6,7-dimethoxy-1,2,3,4-tetrahydroisochinolin-2-yl)ethyl)phenyl)carbamoyl)benzoat
 Verbindung **9**; Bezeichnung: TAR3



Methyl 4-(chinolin-3-carboxamido)-3-((4-(2-(6,7-dimethoxy-1,2,3,4-tetrahydroisochinolin-2-yl)ethyl)phenyl)carbamoyl)benzoat
 Verbindung **10**; Bezeichnung: TAR4

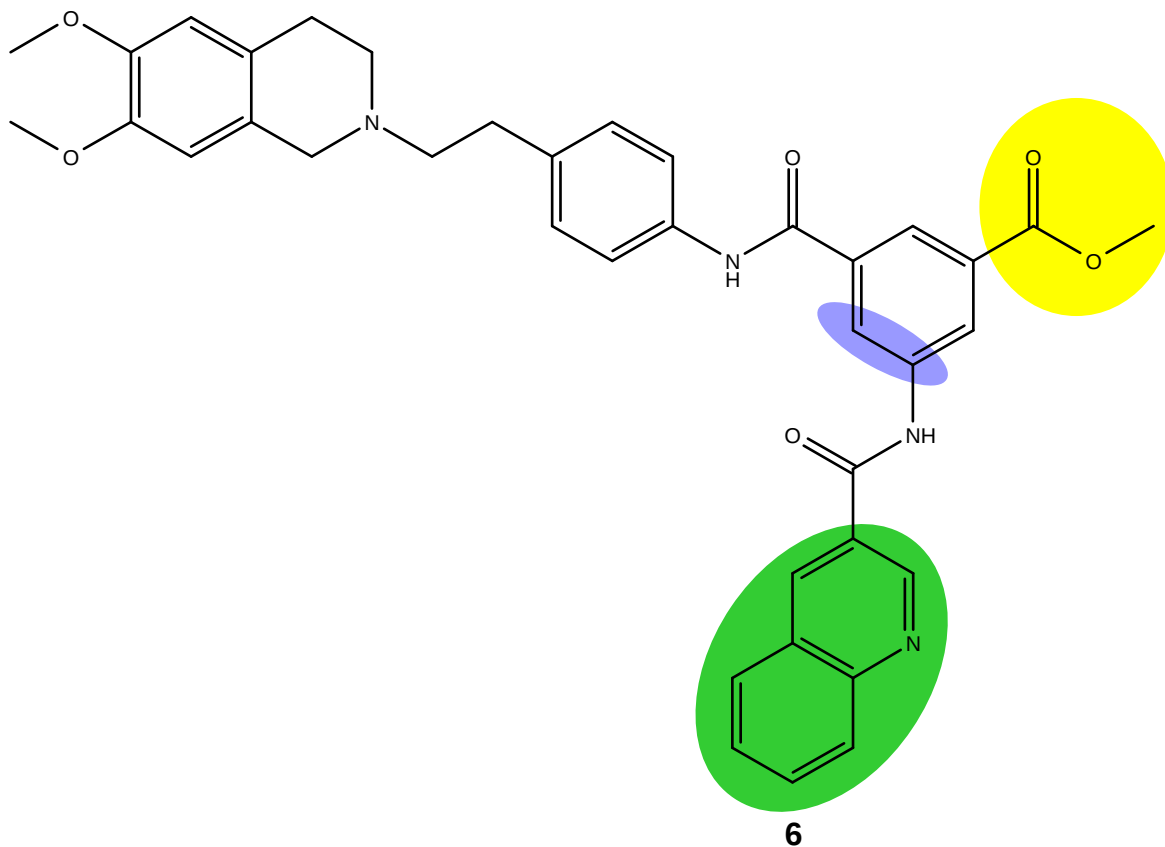


5

Methyl 3-(chinolin-2-carboxamido)-5-((4-(2-(6,7-dimethoxy-1,2,3,4-tetrahydroisochinolin-2-yl)ethyl)phenyl)carbamoyl)

benzoat

Verbindung **5**; Bezeichnung: TAR7



Methyl 3-(chinolin-3-carboxamido)-5-((4-(2-(6,7-dimethoxy-1,2,3,4-tetrahydroisochinolin-2-yl)ethyl)phenyl)carbamoyl)benzoat
 Verbindung **6**; Bezeichnung: TAR8

Abb.17: Angestrebte Zielstrukturen dieser Diplomarbeit

3. Synthese

Als erstes wurden Untersuchungen zu den Synthesen von Zielverbindung **5** und **6** durchgeführt. Dafür waren folgende Syntheseschritte notwendig (Abb.18 und 19):

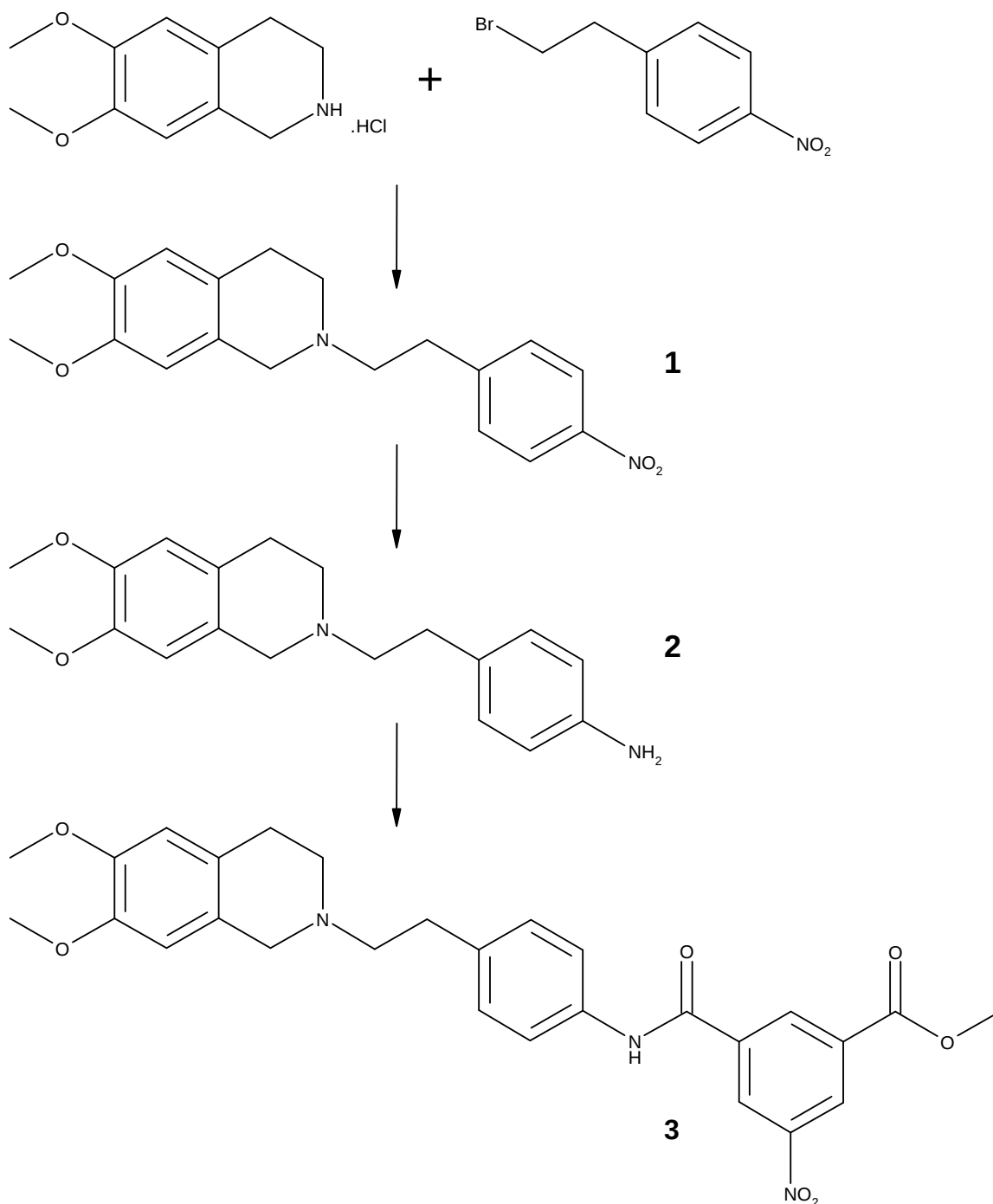


Abb.18: Erster Teil des Syntheseschemas für Zielstruktur **5** (TAR7)

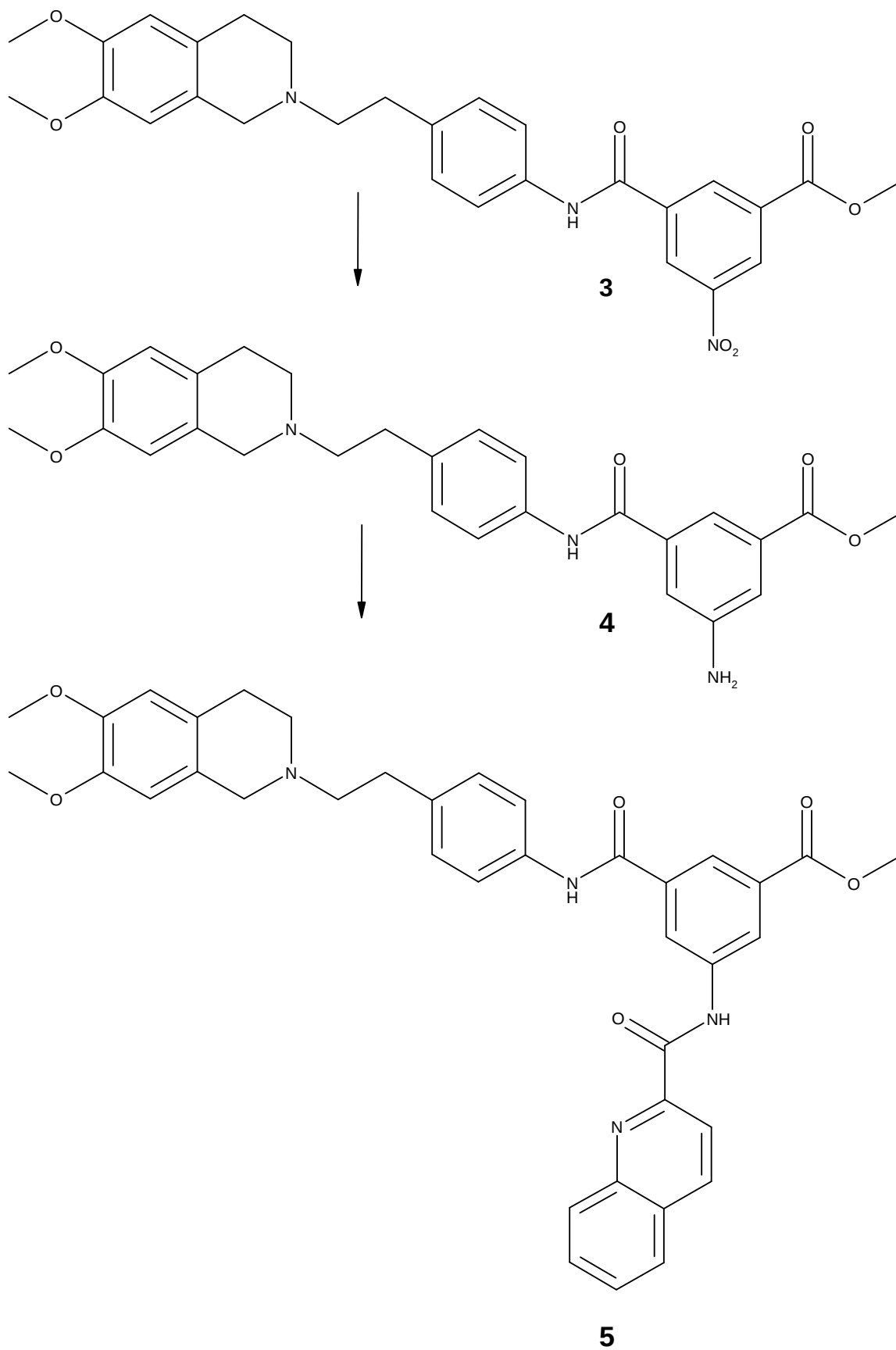


Abb.19: Fortsetzung des Syntheschemas für Zielstruktur **5** (TAR7)

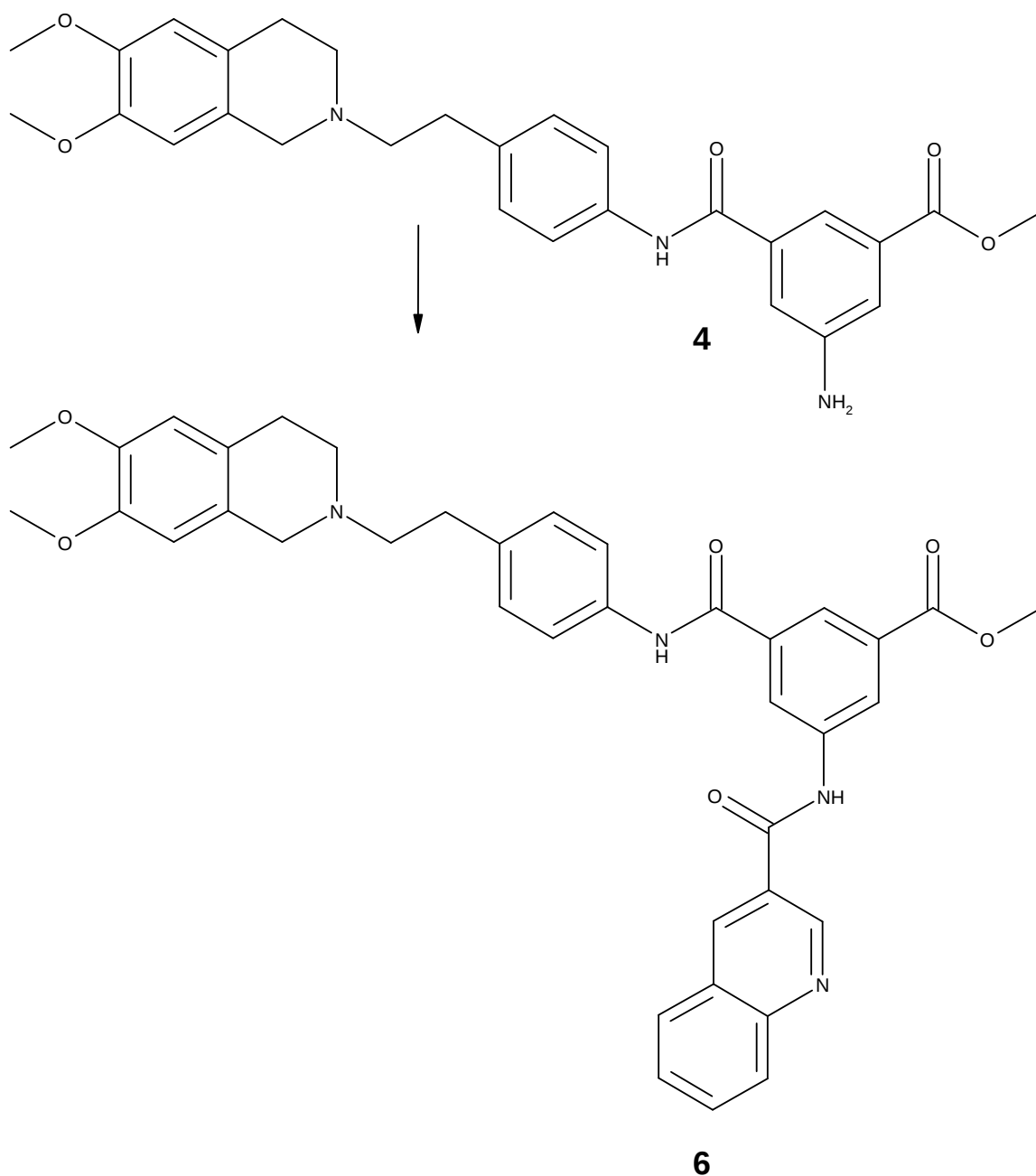


Abb.20: letzter Syntheseschritt zur Erreichung von Zielstruktur **6** (TAR8); Das Anilinderivat **4** ist gemeinsame Vorstufe für die beiden Zielstrukturen **5** und **6**

Verbindung **1** wurde mittels nucleophiler Substitution des 4-Nitrophenethyl-bromids durch das sekundäre Amin von 6,7-Dimethoxy-1,2,3,4-tetrahydroisochinolin.HCl gewonnen. Die Reaktion wurde mit K_2CO_3 und KI in DMF unter Argonatmosphäre durchgeführt (Sharp, 1998). Das Produkt wurde durch Zugabe von MeOH und H_2O

unter Kühlung aus der Lösung gedrängt, abgenutscht und in 96% EtOH umkristallisiert. Es wurde eine Ausbeute von 86 % erzielt.

Der nächste Syntheseschritt bestand aus einer Reduktion der Nitrogruppe von **1** zum entsprechenden Anilinderivat durch katalytische Hydrierung. Die Reaktion wurde unter Druck in einer Parr-Apparatur mit einem Pd/C Katalysator durchgeführt. Das Rohprodukt von Verbindung **2** wurde in 96 % EtOH umkristallisiert und in einer Ausbeute von 75 % erhalten.

Für die Synthese von Verbindung **3** musste noch der zu substituierende 5-Nitroisophthalsäure-mono-methylester in das entsprechende Carbonsäurechlorid **11** überführt werden.

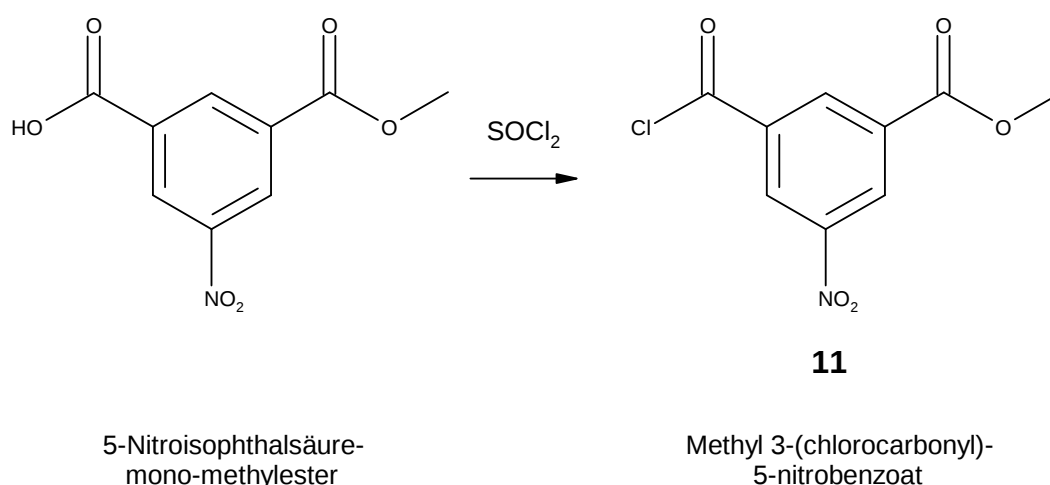


Abb.21: Herstellung des Carbonsäurechlorids **11**

Die Reaktion wurde unter Feuchtigkeitsausschluss in einem Überschuss von SOCl₂ bei 70 °C durchgeführt. Nach Entfernen des überschüssigen SOCl₂ wurde das Carbonsäurechlorid **11** als Rohprodukt zur Umsetzung mit dem Amin **2** weiterverwendet, um das Amid **3** zu erhalten.

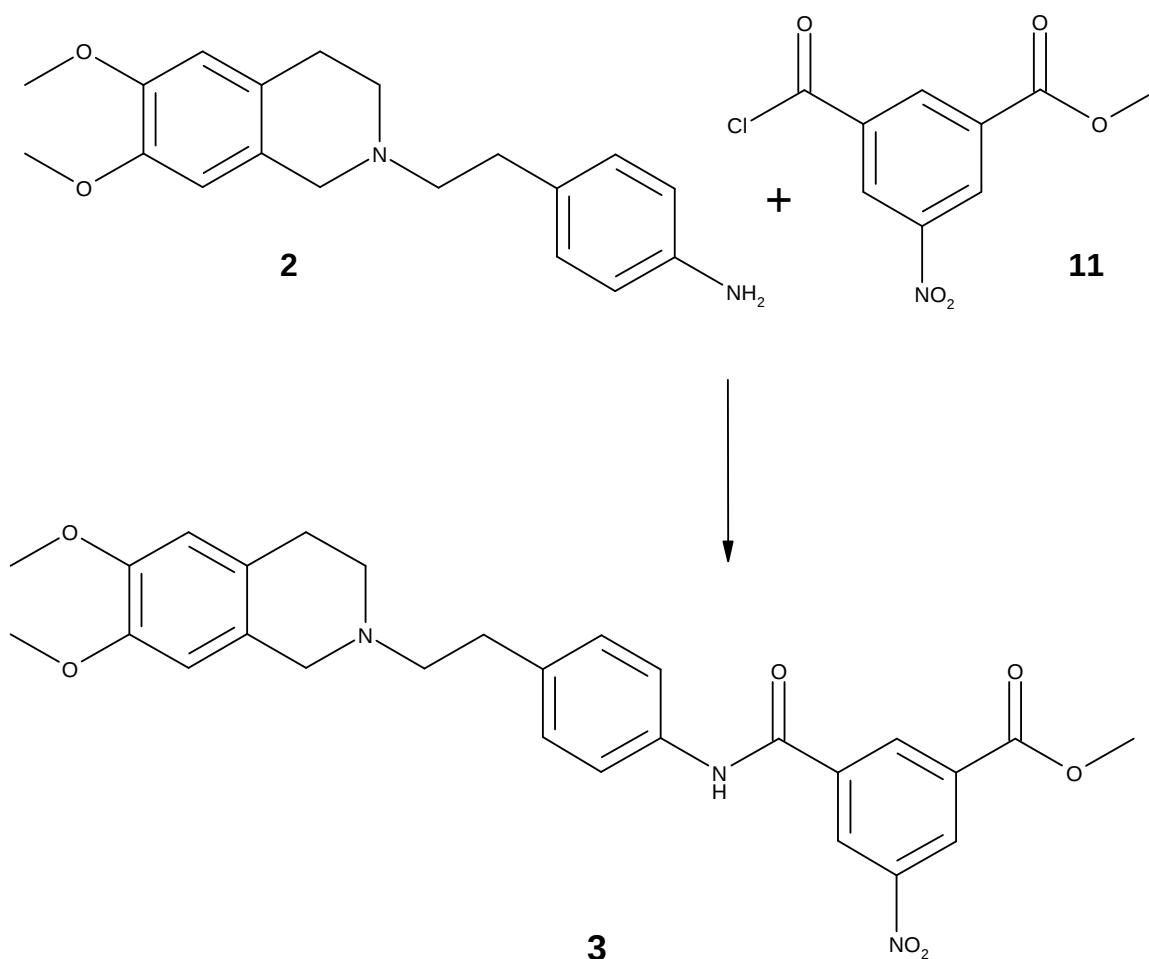


Abb.22: Herstellung des Nitrobenzoats **3** (TAR5)

Die Edukte wurden in CH_2Cl_2 gelöst und über Nacht unter Feuchtigkeitsausschluss mit Triethylamin (TEA) bei Raumtemperatur (RT) rühren gelassen. Nach der Umkristallisation des Produkts in MeOH konnte Verbindung **3** in einer Ausbeute von 65 % erhalten werden.

Verbindung **4** wurde durch Reduktion der Nitrogruppe von **3** hergestellt. Wieder wurde eine katalytische Hydrierung in einer Parr-Apparatur mit Pd/C als Katalysator durchgeführt. Das Rohprodukt wurde durch Umkristallisation in einer Mischung aus 7:3 MeOH/ H_2O gereinigt und eine Ausbeute von 64 % erhalten.

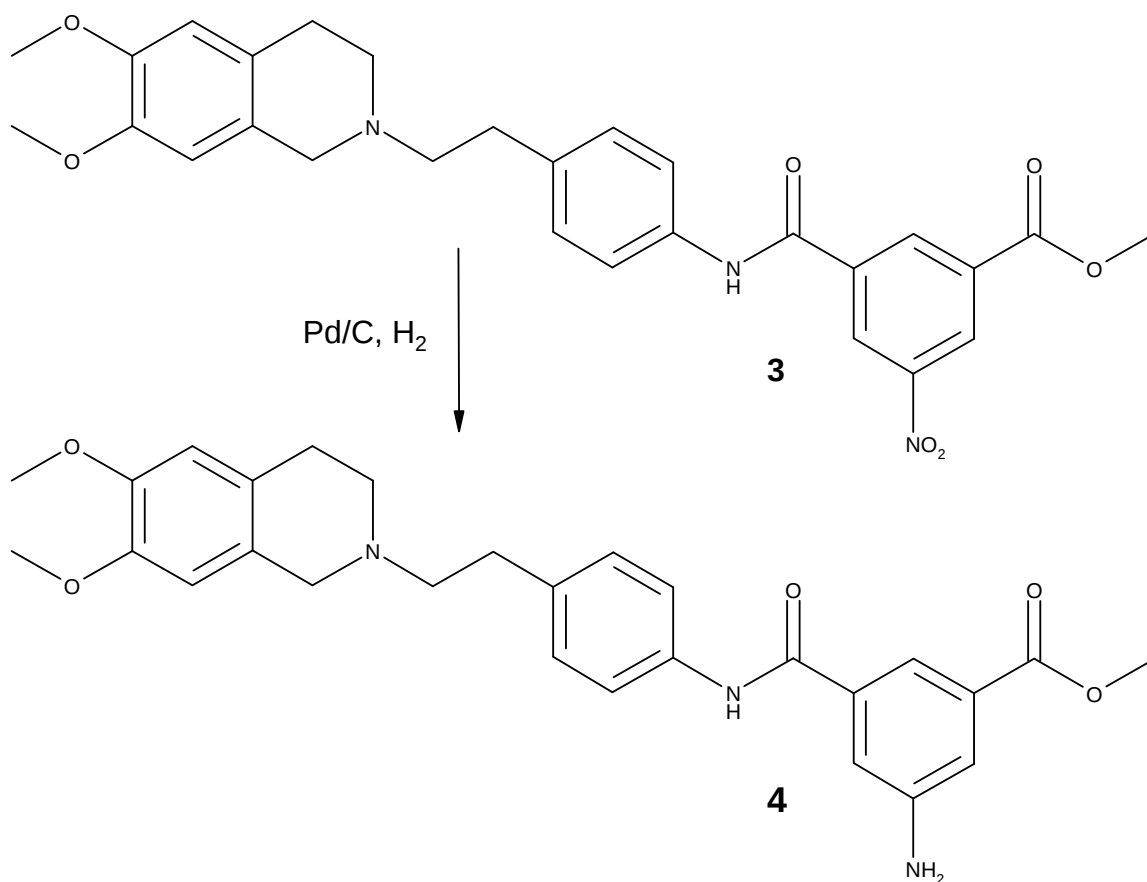


Abb.23: Reduktion des Nitrobenzoats **3** (TAR5) zum Anilinderivat **4** (TAR6)

Für die letzten Syntheseschritte zu den Zielsubstanzen **5** und **6** mussten wieder die entsprechenden Carbonsäurechloride der zu substituierenden Reste hergestellt werden. Es handelte sich dabei um 2-Chinolincarbonylchlorid für Verbindung **5** und 3-Chinolincarbonylchlorid für Verbindung **6**.

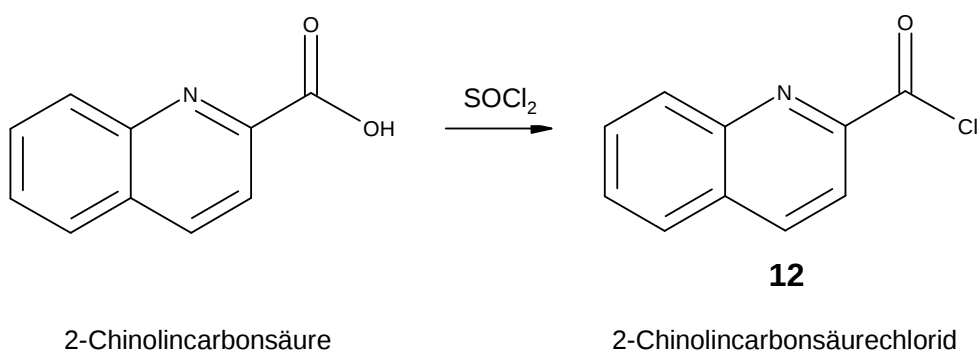


Abb.24: Herstellung des Carbonsäurechloride **12**

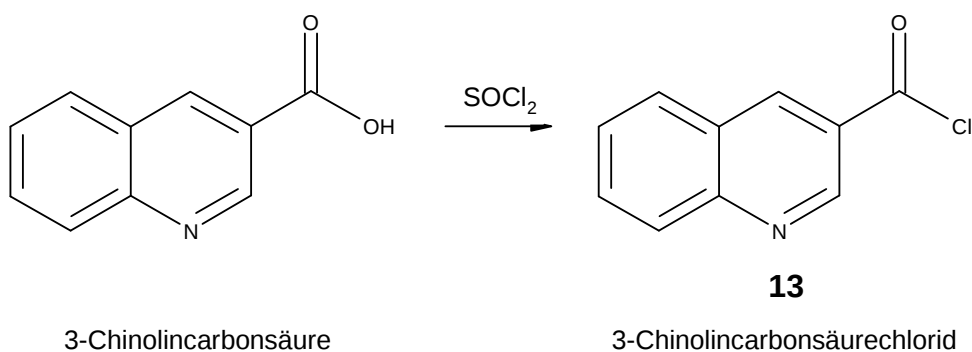


Abb.25: Herstellung der Carbonsäurechloride **13**

Konnten die bisher besprochenen Synthesen erfreulicherweise unproblematisch durchgeführt werden, so stellte der letzte entscheidende Schritt doch eine Zäsur dar. Die Zielstruktur **5** konnte noch mit größerer Leichtigkeit erreicht werden, jedoch bereitete die Synthese und Isolierung von Zielstruktur **6** Probleme, denen zwar mit unterschiedlichen Strategien begegnet wurde, die jedoch letztlich zu sehr geringen Ausbeuten führten.

Zur Synthese von Zielstruktur **5** wurde 2-Chinolincarbonsäure in einem Überschuss von SOCl₂ unter Feuchtigkeitsausschluss zum Carbonsäurechlorid umgesetzt und nach Entfernen des überschüssigen SOCl₂ mit dem Rohprodukt weitergearbeitet. Es wurde ebenso wie das Aminobenzoat **4** in CH₂Cl₂ aufgenommen und mit TEA unter Feuchtigkeitsausschluss über Nacht bei RT rühren gelassen, um **5** durch eine Additions-Eliminierungs-Reaktion zu erhalten.

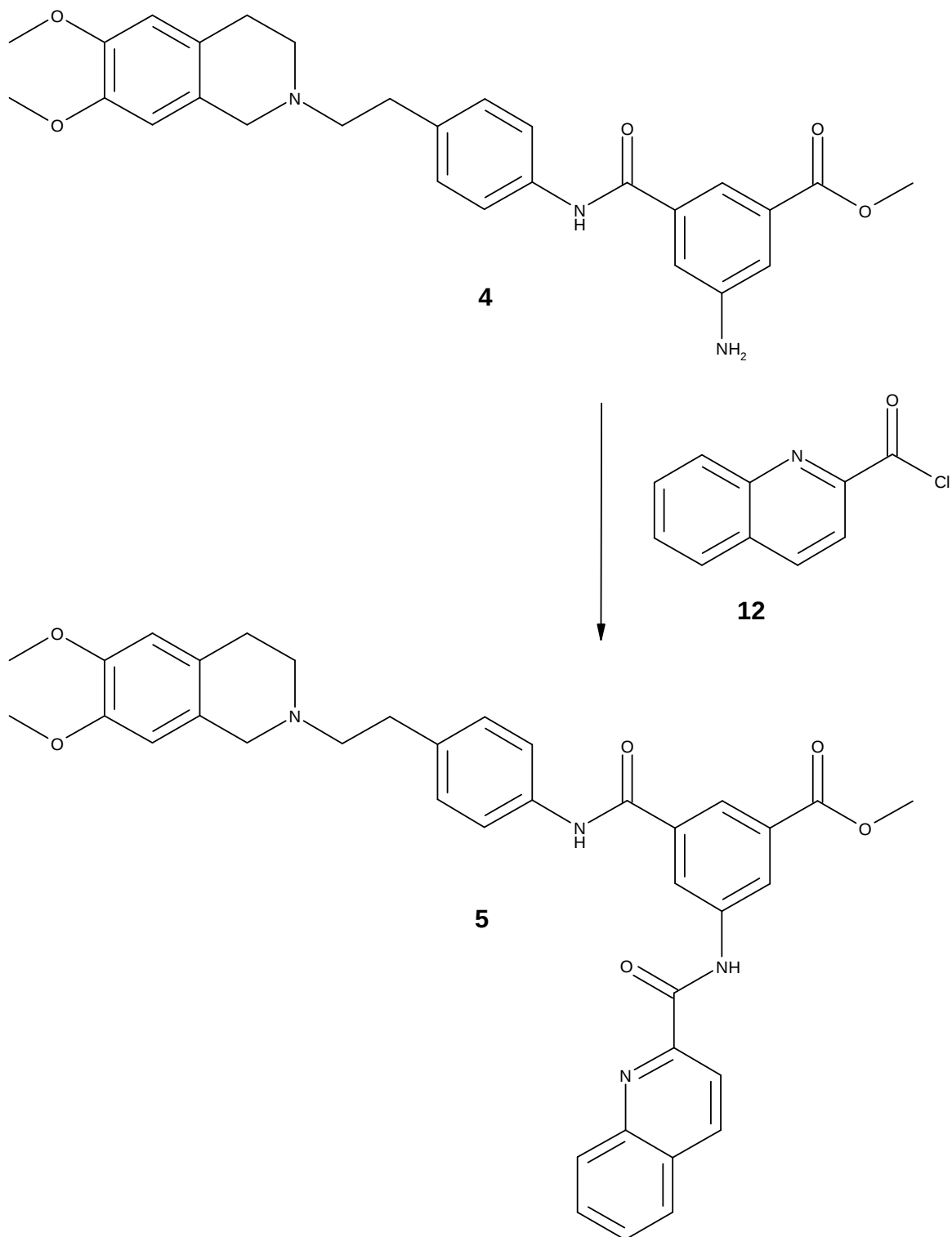


Abb.26: Herstellung von Zielstruktur 5 (TAR7)

Die Ausbeute war aber mit 42 % geringer als bei vorangegangenen Reaktionen. (Über alle Syntheseschritte bedeutete dies eine Ausbeute von 11 %.) Weiters konnte auch keine zufriedenstellende Reinigung durch Umkristallisation erreicht werden und somit musste eine Trennung mittels Säulenchromatographie durchgeführt werden, was weitere Einbußen bei der Ausbeute bedeutete. Jedoch lag das Interesse weniger darauf, ein effizienteres Syntheseverfahren für **5** zu finden, als vielmehr auch einen Zugang zu den restlichen Zielstrukturen zu finden.

In analoger Weise zur Synthese von **5** wurde nun auch versucht Verbindung **6** zu gewinnen, nämlich in einer Kopplung des Aminobenzoats **4** mit dem 3-Chinolincarbonsäurechlorid **13**. Die Herstellung dessen ist in Abb.22 dargestellt.

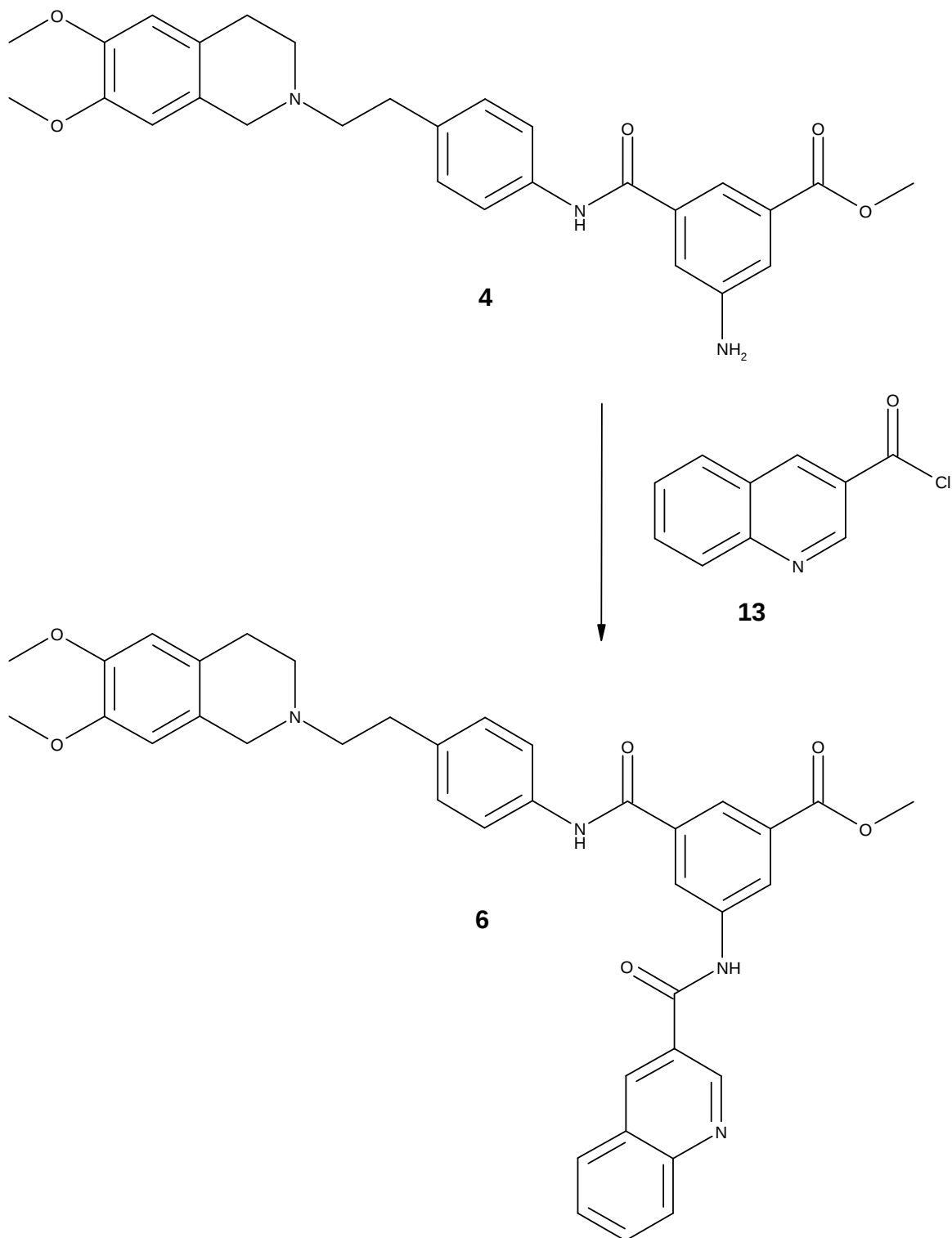


Abb.27: Herstellung von Zielstruktur **6** (TAR8), über das 3-Chinolincarbonylsäurechlorid

Es stellte sich jedoch leider heraus, dass oben genanntes Verfahren zur Herstellung des 2-Chinolincarbonylchlorids nicht unmittelbar auf die des 3-

Chinolincarbonsäure-chlorids übertragbar war. So wurde alternativ versucht mit Kopplungsreagentien die 3-Chinolincarbonsäure an **4** zu binden. Es wurden gleichzeitig mehrere kleine Ansätze mit verschiedenen Kopplungsreagentien gemacht:

- a) mit 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid Hydrochlorid (EDC·HCl), einem Carbodiimid und 4-(Dimethylamino)-pyridin (4-DMAP) als Katalysator in CH₂Cl₂ mit Trockenrohraufsatz für 12 h bei RT,
- b) mit Dicyclohexylcarbodiimid (DCC), ebenfalls einem Carbodiimid und 4-DMAP in CH₂Cl₂ unter Argonatmosphäre für 12 h bei RT,
- c) mit 2-(1H-Benzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-tetramethyluronium tetrafluoroborat (TBTU) einem Kopplungsreagens mit Benzotriazolgrundstruktur, und Triethylamin (TEA) in wasserfreiem Dimethylformamid (DMF) mit Trockenrohraufsatz für 12 h bei RT,
- d) mit 2-(1H-Benzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-tetramethyluronium hexafluorophosphat (HBTU), ebenfalls einem Kopplungsreagens mit Benzotriazolgrundstruktur, Diisopropylethylamin (DIPEA) und 1-Hydroxybenzotriazol (HOBt) in CH₂Cl₂ bei 0 °C. Das Amin **4** wurde in CH₂Cl₂ aufgenommen und tropfenweise zur bereits gelösten Carbonsäure hinzugegeben. Der Reaktionslösung wurde erlaubt RT zu erreichen und anschließend wurde für 48 h gerührt.

Die mit DC durchgeführte Kontrolle des Reaktionsverlaufs zeigte, dass eine Umsetzung der Edukte kaum bis gar nicht stattgefunden hatte.

Schließlich wurde noch einmal versucht Zielstruktur **6** durch eine Amidierung mit Hilfe eines Carbonsäurechlorids zu erhalten. Allerdings wurde die Weise der Herstellung des Carbonsäurechlorids selbst leicht abgeändert, da der Verdacht bestand, dass bereits hier das Scheitern der Synthese seinen Ursprung hatte, indem die 3-Chinolincarbonsäure mit vorher angewandter Methode nicht zum 3-

Chinolincarbonylchlorid umgesetzt werden konnte. Statt SOCl_2 wurde nun wasserfreies Toluol als Lösungsmittel verwendet und SOCl_2 als Reagens im Überschuss hinzugegeben. Es wurde wieder unter Feuchtigkeitsausschluss gearbeitet. Restliches Vorgehen bei der Synthese entsprach dem vorangegangenen Versuch.

Tatsächlich konnte Zielstruktur **6** erhalten werden. Zur Aufreinigung war eine aufeinanderfolgende mehrfache säulenchromatographische Trennung nötig. Die Ausbeute war sehr gering, reichte aber um ^1H -NMR- und ^{13}C -NMR-Spektren aufnehmen zu können.

Parallel dazu wurde auch am zweiten Syntheseweg gearbeitet, der zu den Zielstrukturen **9** und **10** führen sollte (siehe Abb.25 und Abb.26).

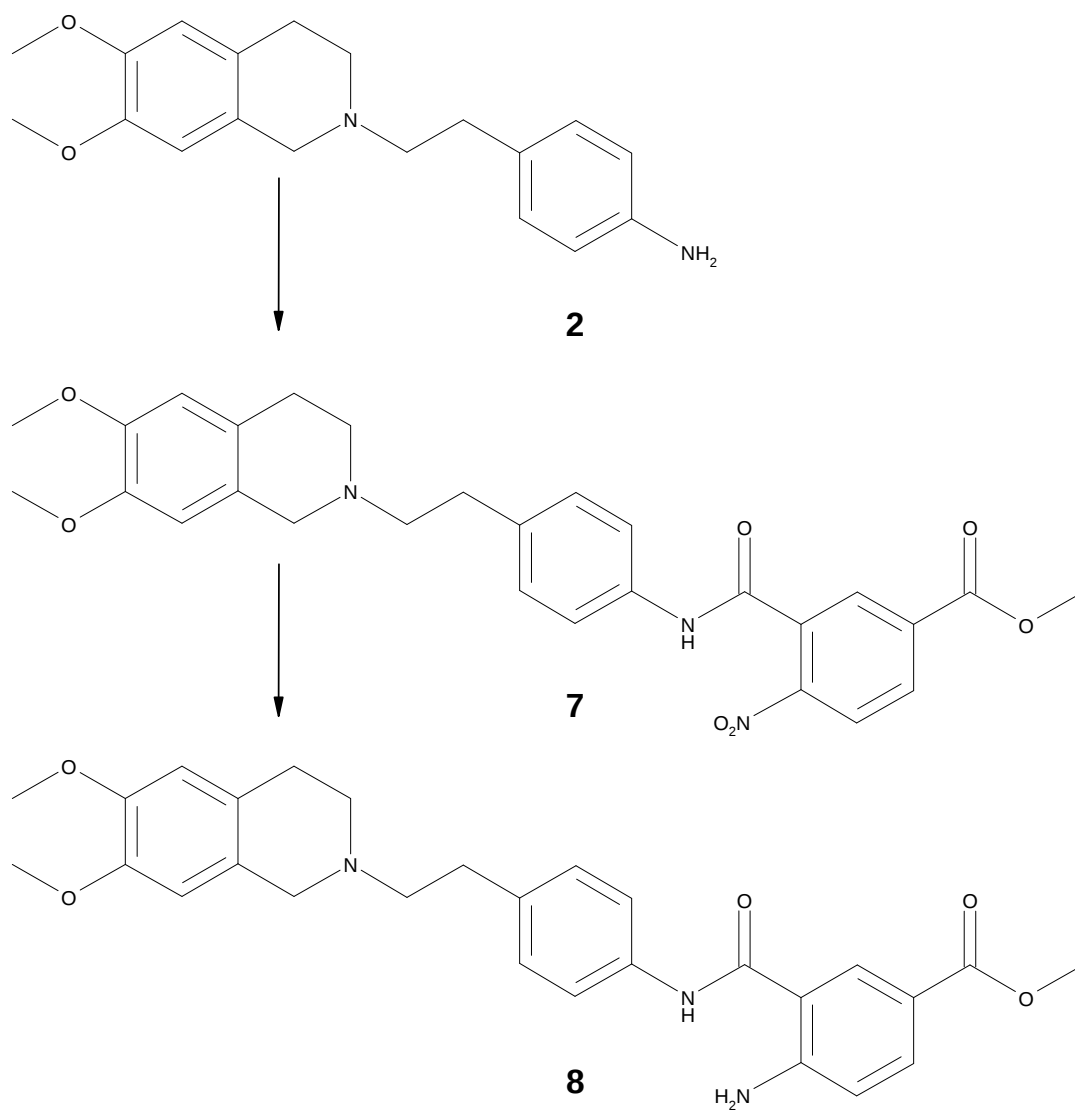


Abb.28: Erster Teil des Synthesewegs zur Zielstruktur **9** (TAR3)

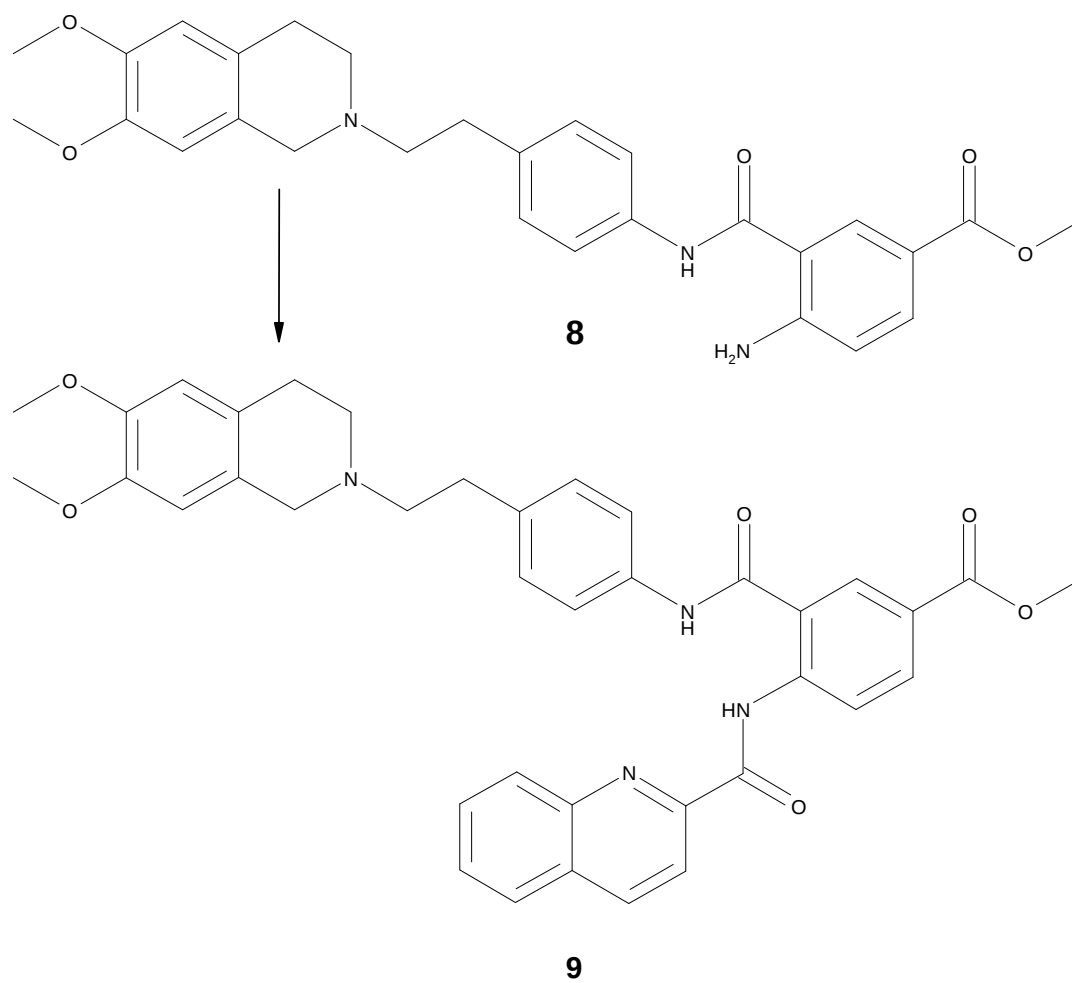


Abb.29: Fortsetzung des Synthesewegs zur Zielstruktur **9** (TAR3)

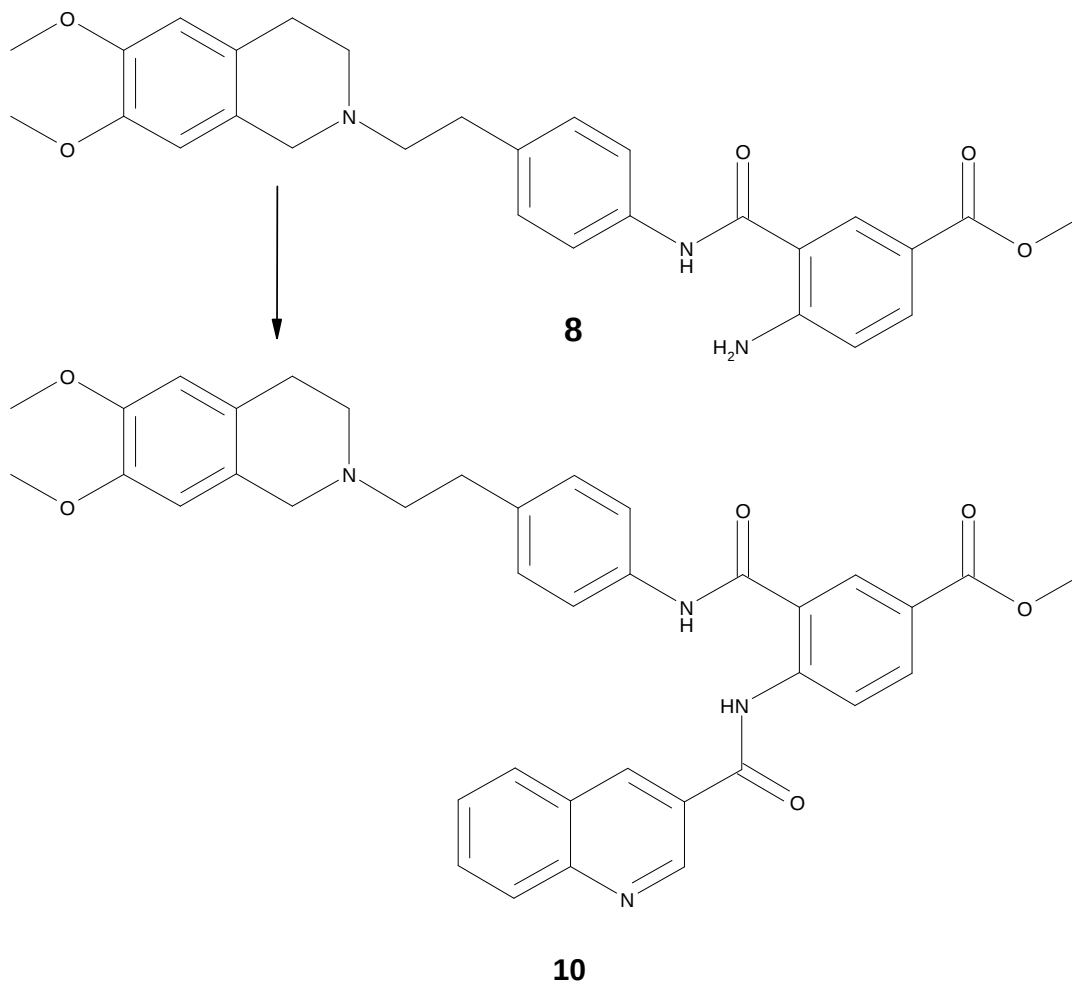


Abb.30: letzter Syntheseschritt für Zielstruktur **10** (TAR4); Das Anilinderivat **8** ist gemeinsame Vorstufe für die beiden Zielstrukturen **9** und **10**

Um zu Verbindung **7** zu gelangen war noch folgender Zwischenschritt nötig:

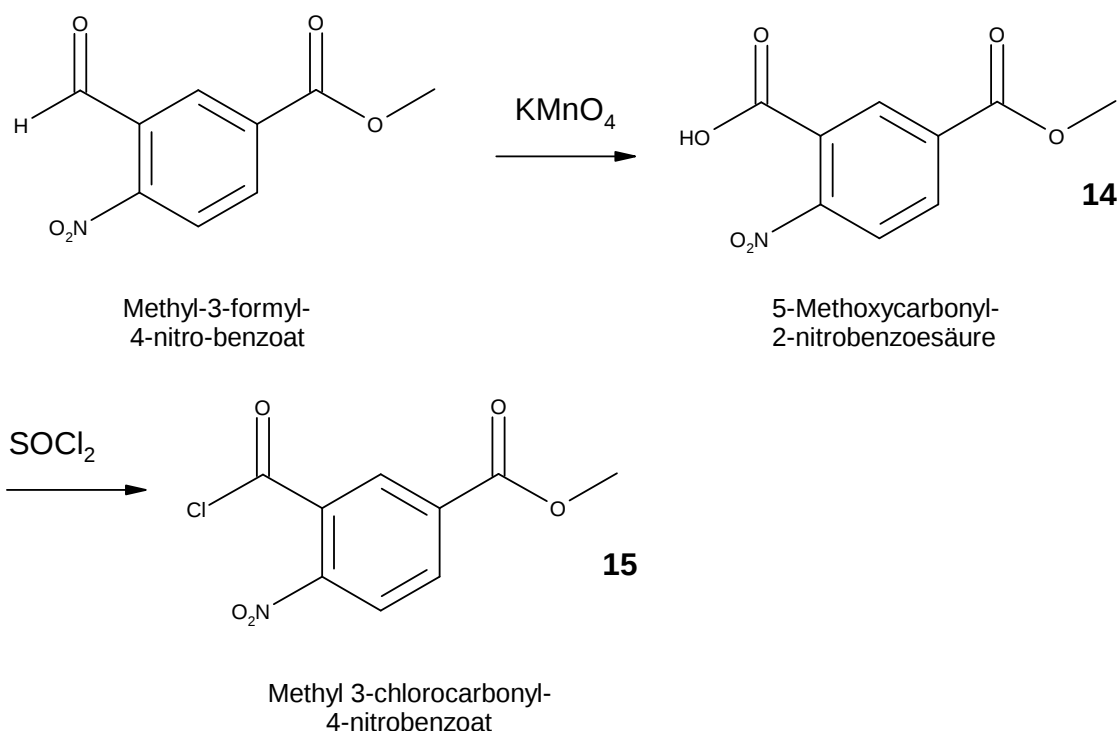


Abb.31: Herstellung der Verbindungen **14** und **15** als weitere Synthesebausteine

Methyl-3-formyl-4-nitrobenzoat wurde mit KMnO_4 zur Säure **14** oxidiert. Methyl-3-formyl-4-nitrobenzoat wurde in Aceton aufgenommen und dann langsam bei 0°C mit KMnO_4 versetzt. Der Reaktion wurde erlaubt RT zu erreichen und sobald sie abgeschlossen war, wurde überschüssiges KMnO_4 mit Oxalsäure zu MnO_2 reduziert und **14** abfiltriert. Es stellte sich heraus, dass zu große Ansätze meist zu niedrigeren Ausbeuten führten, daher wurde mit parallelen Ansätzen gearbeitet und schließlich eine Ausbeute von 61 % erzielt.

Die Überführung zum Carbonsäurechlorid **15** wurde mit einem Überschuss von SOCl_2 bei 70°C unter Feuchtigkeitsausschluss erreicht. Es wurde anschließend sofort mit dem Rohprodukt weitergearbeitet.

Verbindung **7** wurde analog zu **3** hergestellt. Das Carbonsäurechlorid **15** und das Anilinderivat **2** wurden in CH_2Cl_2 aufgenommen und mit TEA bei RT über Nacht unter Feuchtigkeitsausschluss rühren gelassen.

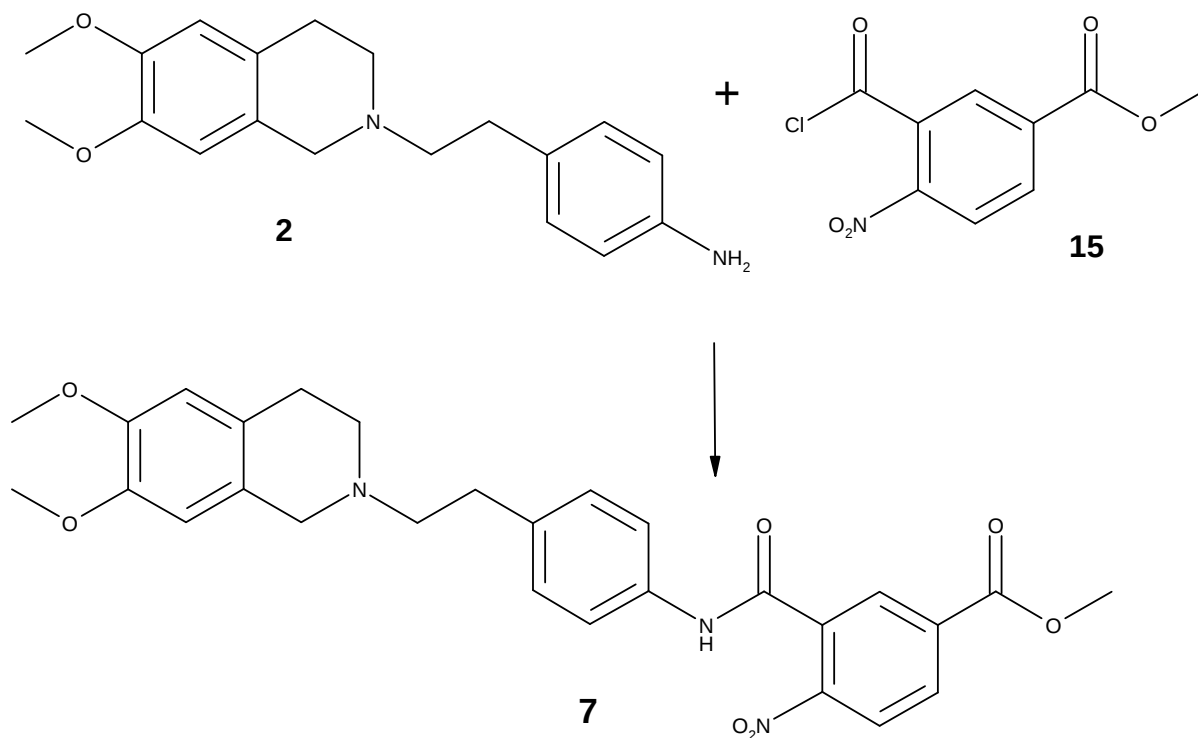


Abb.32:Herstellung des Nitrobenzoats **7**

Die Synthese führte zu einer Ausbeute von etwa 57 %. Die Reinigung erfolgte durch Säulenchromatographie und das abgetrennte Produkt wurde in einer 1:1 Mischung von Aceton/H₂O umkristallisiert.

War der erste Syntheseweg noch dahingehend erfolgreich, dass beide Zielstrukturen zumindest tatsächlich synthetisiert werden konnte, so konnte der zweite Syntheseweg schon nach dem oben besprochenen Schritt nicht mehr sinnvoll realisiert werden.

Die katalytische Hydrierung zum Aminbenzoat **8** wurde wieder in der Parr-Apparatur unter Druck durchgeführt.

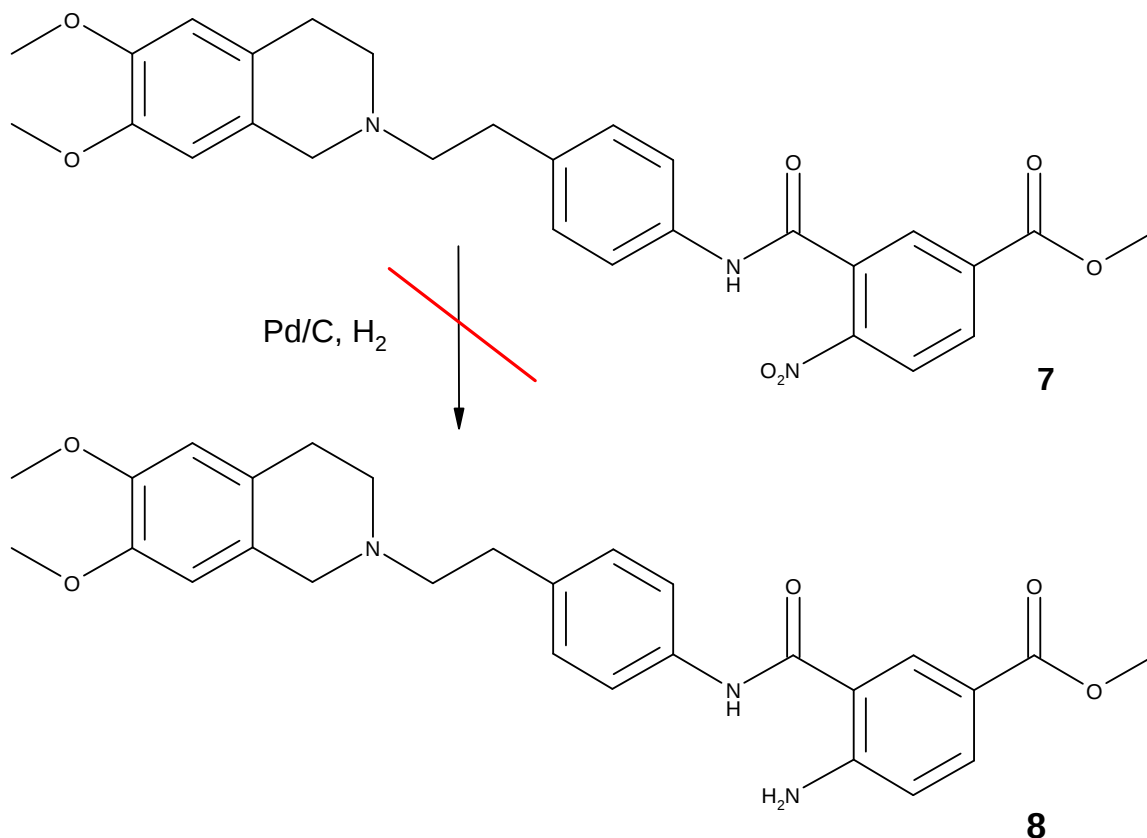


Abb.33: Die Reduktion des Nitrobenzoats **7** (TAR1) zum Anilinderivat **8** (TAR2) scheiterte an der Unmöglichkeit die Substanz in reiner Form darzustellen. Trotzdem wurde nach einigen chromatographischen Schritten versucht mit der nicht vollständig gereinigten Verbindung die Zielstrukturen **9** und **10** zu synthetisieren.

Allerdings nahm die Reaktion einen längeren Zeitraum in Anspruch. Nach einer Dauer von 30 h konnte mittels DC keine Zunahme der Umsetzung zum Produkt mehr beobachtet werden. Weiters entstanden durch die Reaktion auch sehr viele Nebenprodukte. Es konnten keine NMR-Spektren aufgenommen werden, die auf ein reines Produkt hätten schließen lassen, obwohl eine Aufreinigung mit zwei aufeinanderfolgenden Säulenchromatographien durchgeführt wurde. Andere Methoden einer Reduktion unterblieben aus zeitlichen Gründen.

Trotzdem wurde versucht mit der nicht reinen Verbindung **8** als Edukt zu den Zielstrukturen **9** und **10** zu gelangen (Abb.30 und 31).

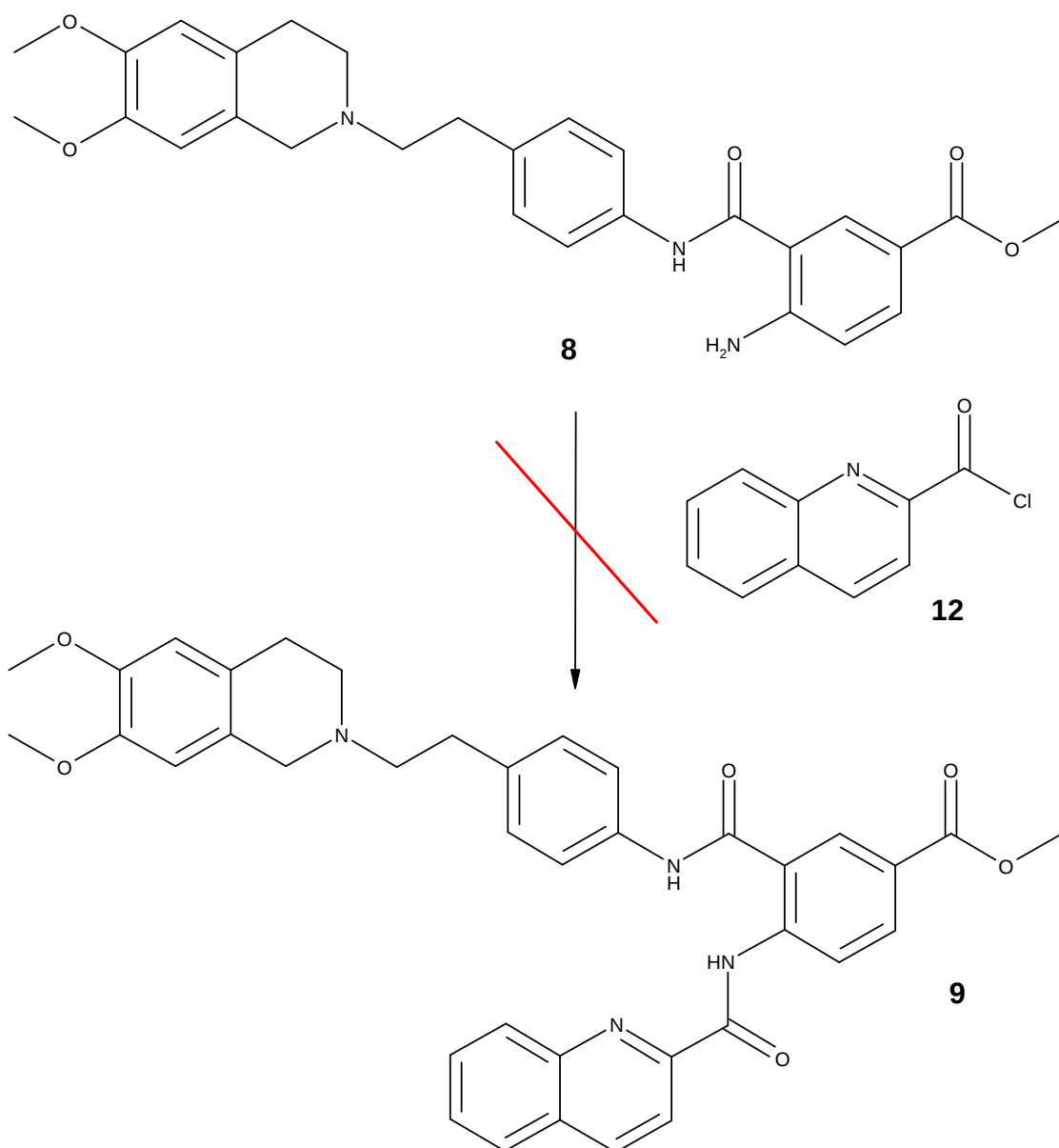


Abb.34: Gescheiterter Syntheseversuch von Zielstruktur **9** (TAR3), eine Abtrennung vom komplexen Nebenproduktgemisch war nicht möglich

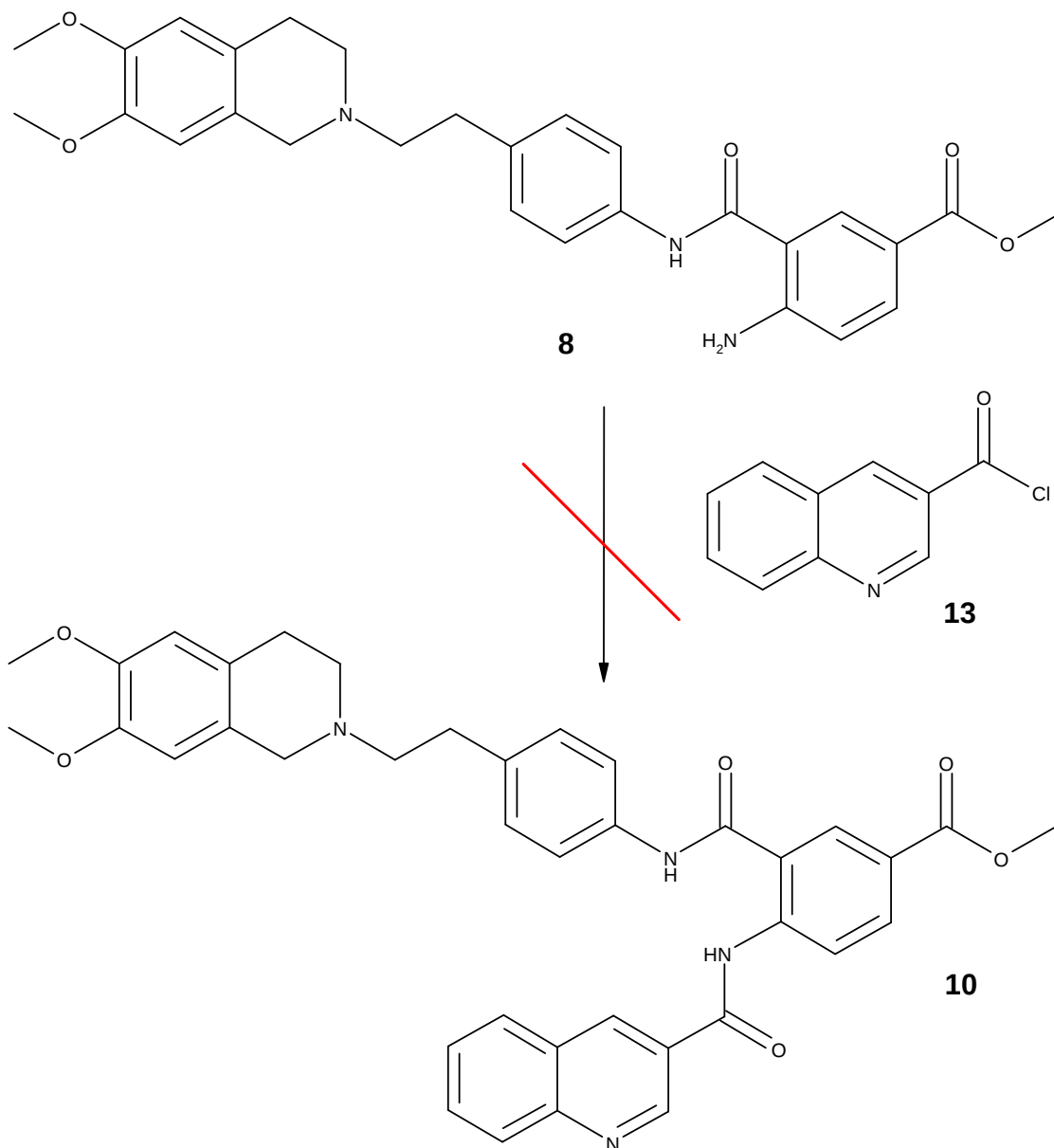


Abb.35: Die Herstellung von Zielstruktur **10** (TAR4) scheiterten ebenfalls an der Unmöglichkeit die Verbindung in reiner Form darzustellen

Dies schlug allerdings ob etlicher Nebenprodukte fehl, die ebenfalls nicht durch säulenchromatographische Aufarbeitung abgetrennt werden konnten. Auch hier mussten aufgrund zeitlicher Aspekte weitere Syntheseveruche unterlassen bleiben.

Zuletzt ist noch anzuführen, dass es mit Ausnahme von Verbindung **14** bei keiner der synthetisierten Verbindungen möglich war, ein Massenspektrum mit der gängigen Elektronenstoßionisation (EI) als Ionisierungsmethode aufzunehmen, da in diesen nur Fragmente und keine Molekülionenpeaks erkennbar waren. Möglicherweise ist dies auf die hohe molekulare Masse und die starke Hydrophilie der Verbindungen zurückzuführen. Somit wurden mit der schonenderen Elektrospray-Ionisations-Methode (ESI) hochauflösende Massenspektren aufgenommen, welche zu zufriedenstellenden Ergebnissen führten.

4. Materialien, Methoden und Ergebnisse

^1H und ^{13}C NMR Spektren wurden auf einem BrukerTM Avance DPx200 Spektrometer (200 MHz für ^1H und 50 MHz für ^{13}C Spektren) aufgenommen. Die Spektren wurden entweder in CDCl_3 oder in $\text{d}_6\text{-DMSO}$ aufgenommen. Die chemische Verschiebung wird in Parts per Million (ppm) angegeben und ist bezogen auf TMS (Tetramethylsilan) als internen Standard. Die Signale stehen für: s, Singulett; d, Dublett; t, Triplett; q, Quartett; m, Multiplett

Die Massenspektren wurden auf einem Shimadzu GC-17Ai/MS-QP5050A aufgenommen. Die Peakintensität ist relativ in % zum stärksten Signal angegeben.

Die hochauflösenden Massenspektren wurden auf einem BrukerTM micrOTOF-Q II aufgenommen.

CHN-Analysen wurden am Institut für physikalische Chemie der Universität Wien von Mag. Johannes Theiner aufgenommen.

Schmelzpunkte wurden mit einem ReichertTM Kofler Heiztischmikroskop aufgenommen und sind unkorrigiert.

Säulenchromatographie wurde mit MerckTM Kieselgel 60 durchgeführt.

Dünnschichtchromatographie wurde mit MerckTM DC Metallfolien, Kieselgel 60 F254 durchgeführt.

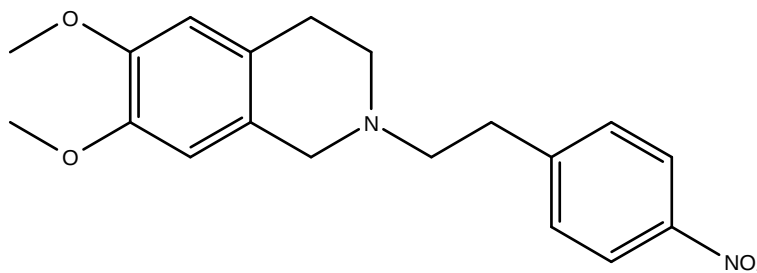
Alle angegebenen Reaktionstemperaturen entsprechen den Ölbadtemperaturen.

Abkürzungsverzeichnis

4-DMAP	4-(Dimethylamino)-pyridin
ABC	ATP binding cassette
ADP	Adenosindiphosphat
ATP	Adenosintriphosphat
BCRP	Breast Cancer Resistance Protein
CDCl ₃	Deuteriertes Chloroform
CH ₂ Cl ₂	Dichlormethan
CHN	Molekulare Zusammensetzung
CHO	Chinese Hamster Ovary
CYP	Cytochrom P
DC	Dünnschichtchromatographie
DCC	N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid
DIPEA	Diisopropylethylamin
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDC	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid
EI	Elektronenstoßionisation
ESI	Elektrosprayionisation
EtOAc	Ethylacetat
EtOH	Ethanol
HBTU	2-(1H-Benzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-tetramethyluronium hexafluorophosphat
HCl	Hydrochlorid
HIV	Humanes Immundefizienz Virus
HOBT	1-Hydroxybenzotriazol
HPLC	High-Performance-Liquid-Chromatographie
HR-MS	Hochaufgelöstes Massenspektrum
K ₂ CO ₃	Kaliumcarbonat

KI	Kaliumiodid
MCF	Michigan Cancer Foundation
MDR	Multi-Drug-Resistance
MeOH	Methanol
MRP	Multi-Drug-Resistance-Protein
MS	Massenspektrum
Na ₂ SO ₄	Natriumsulfat
NBS	Nukleotidbindungsstelle
NMR	Kernspinresonanzspektroskopie
Pd/C	Palladium/Aktivkohle
PET	Positron-Emissions-Tomographie
P-gp	P-Glykoprotein
RT	Raumtemperatur
SOCl ₂	Thionylchlorid
TBTU	2-(1H-Benzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'- tetramethyluronium tetrafluoroborat
TEA	Triethylamin
THF	Tetrahydrofuran
TMS	Tetramethylsilan
ZNS	Zentralnervensystem

Verbindung 1



6,7-Dimethoxy-2-[2-(4-nitrophenyl)ethyl]-1,2,3,4-tetrahydroisochinolin

Materialien:

6,7-Dimethoxy-1,2,3,4-tetrahydroisochinolin.HCl

4-Nitrophenethylbromid

K₂CO₃

KI

DMF

Methode:

Es werden 30 mmol (6,89 g) 6,7-Dimethoxy-1,2,3,4-tetrahydroisochinolin·HCl, 30 mmol (6,90 g) 4-Nitrophenethyl-bromid, 33 mmol (4,56 g) K₂CO₃ und 6 mmol (1,00 g) KI unter Argonatmosphäre in DMF gelöst beziehungsweise suspendiert. Die Mischung wird 18 h lang auf 70 °C erhitzt. Danach wird auf 50 °C abgekühlt und 10 ml MeOH hinzugegeben. Nach weiterem Abkühlen bis auf 30°C werden 70 ml H₂O langsam hinzugefügt. Das Reaktionsgemisch wird dann 1h lang auf 10°C gekühlt und der aus der Lösung gedrängte Feststoff abgenutscht und mit 2 x 40 ml H₂O gewaschen. Das feste Produkt wird im Exsiccator unter Vakuum getrocknet.

Das Rohprodukt wird schließlich in 96% EtOH umkristallisiert und ergibt leicht gelbliche Kristalle.

Ausbeute: 8,82 g $\triangleq$ 86% der theoretischen Ausbeute (10,26 g)

Summenformel: C₁₉H₂₂N₂O₄

Molekülmasse: 342.39

Schmelzpunkt: gefunden: 116 – 118 °C

Lit.: 116 – 118 °C (Sharp, 1998)

Bezeichnung: ATH1x

¹H-NMR (CDCl₃, 200 MHz):

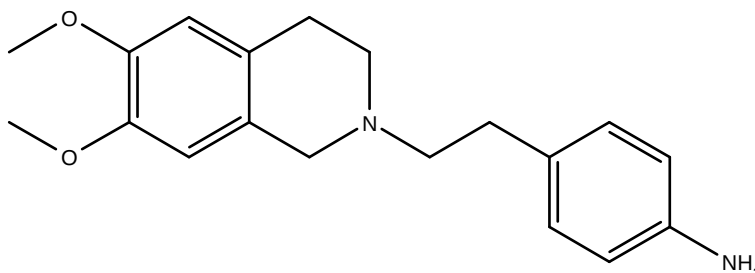
$\delta = 2,75 - 2,92$ ppm	(m, 3 x CH ₂)	6H
$\delta = 2,97 - 3,10$ ppm	(m, CH ₂)	2H
$\delta = 3,67$ ppm	(s, CH ₂)	2H
$\delta = 3,84$ ppm	(s, OCH ₃)	3H
$\delta = 3,85$ ppm	(s, OCH ₃)	3H
$\delta = 6,53$ ppm	(s, Ar-H)	1H
$\delta = 6,61$ ppm	(s, Ar-H)	1H
$\delta = 7,41$ ppm	(A-Teil des AB-Systems, J= 8,5 Hz, Ar-H)	2H
$\delta = 8,15$ ppm	(B-Teil des AB-Systems, J= 8,5 Hz, Ar-H)	2H

¹³C-NMR (CDCl₃, 50 MHz):

$\delta = 28,6$ ppm	(CH ₂)
$\delta = 33,9$ ppm	(CH ₂)
$\delta = 51,1$ ppm	(N-CH ₂)
$\delta = 55,7$ ppm	(N-CH ₂)
$\delta = 56,1$ ppm	(O-CH ₃)
$\delta = 56,1$ ppm	(O-CH ₃)
$\delta = 59,1$ ppm	(N-CH ₂)

$\delta = 109,6$ ppm	(Ar-CH)
$\delta = 111,6$ ppm	(Ar-CH)
$\delta = 123,8$ ppm	(2x Ar-CH)
$\delta = 126,1$ ppm	(2x Ar-C _q)
$\delta = 129,7$ ppm	(2x Ar-CH)
$\delta = 146,7$ ppm	(Ar-C _q)
$\delta = 147,5$ ppm	(Ar-C _q)
$\delta = 147,9$ ppm	(Ar-C _q)
$\delta = 148,4$ ppm	(Ar-C _q)

Verbindung 2



4-[2-(6,7-Dimethoxy-1,2,3,4-tetrahydroisochinolin-2-yl)ethyl]anilin

Materialien:

6,7-Dimethoxy-2-[2-(4-nitrophenyl)ethyl]-1,2,3,4-tetrahydroisochinolin (**1**)

96% EtOH

Pd/C

Methode:

Es werden 15 ml EtOH in einem Dreihalskolben für 20 min unter Argonatmosphäre gebracht. Danach werden 0,46 g Pd/C vorsichtig, aber zügig im EtOH suspendiert und weitere 20 min unter Argonatmosphäre rühren gelassen. Währenddessen werden 13,50 mmol (4,62 g) **1** (ATH1x) mit 120 ml EtOH in einem Hydriergefäß in Lösung gebracht.

Der suspendierte Katalysator wird in das Hydriergefäß mit der Lösung des Eduktes überführt und dieses wieder für 20 min unter Argonatmosphäre gebracht.

Danach wird das Reaktionsgefäß in eine Parr-Apparatur eingespannt, das sich über der Lösung befindende Argon mittels Wasserstrahlpumpe mehrmals abgesaugt und anschließend für 10 h eine Hydrierung bei 25 psi durchgeführt.

Nach Beendigung der Reaktion wird der Katalysator durch Filtration abgetrennt und gründlich mit EtOH gewaschen. Die vereinigten Filtrate werden mit dem Rotavapor eingedampft und der Rückstand wird im Exsiccator unter Vakuum getrocknet.

Das Rohprodukt wird schließlich in 96% EtOH umkristallisiert und ergibt leicht gelbe Kristalle.

Ausbeute: 3,16g $\triangleq$ 75% theoretischer Ausbeute (4,22 g)

Summenformel: C₁₉H₂₄N₂O₂

Molekülmasse: 312.41

Schmelzpunkt: gefunden: 128 – 131 °C

Lit.: 129 °C (Klinkhammer *et al.*, 2009)

Bezeichnung: ATH2x

¹H-NMR (CDCl₃, 200 MHz):

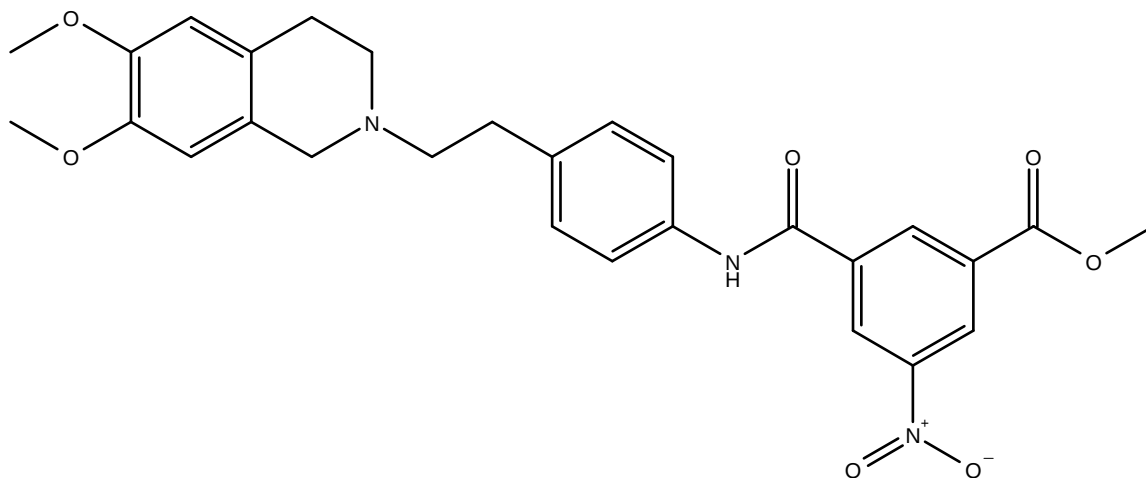
$\delta = 2,65 - 2,90$ ppm	(m, 4 x CH ₂)	8H
$\delta = 3,53$ ppm	(bs, NH ₂)	2H
$\delta = 3,65$ ppm	(s, CH ₂)	2H
$\delta = 3,83$ ppm	(s, OCH ₃)	3H
$\delta = 3,84$ ppm	(s, OCH ₃)	3H
$\delta = 6,53$ ppm	(s, Ar-H)	1H
$\delta = 6,60$ ppm	(s, Ar-H)	1H
$\delta = 6,63$ ppm	(A-Teil des AB-Systems, J= 8,3 Hz, Ar-H)	2H
$\delta = 7,03$ ppm	(B-Teil des AB-Systems, J= 8,3 Hz, Ar-H)	2H

¹³C-NMR (CDCl₃, 50 MHz):

$\delta = 28,6$ ppm	(CH ₂)
$\delta = 33,1$ ppm	(CH ₂)
$\delta = 51,0$ ppm	(N-CH ₂)
$\delta = 55,7$ ppm	(N-CH ₂)
$\delta = 55,8$ ppm	(O-CH ₃)
$\delta = 55,9$ ppm	(O-CH ₃)

$\delta = 60,6 \text{ ppm}$	(N-CH ₂)
$\delta = 109,4 \text{ ppm}$	(Ar-CH)
$\delta = 111,3 \text{ ppm}$	(Ar-CH)
$\delta = 115,2 \text{ ppm}$	(2x Ar-CH)
$\delta = 126,1 \text{ ppm}$	(Ar-C _q)
$\delta = 126,6 \text{ ppm}$	(Ar-C _q)
$\delta = 129,4 \text{ ppm}$	(2x Ar-CH)
$\delta = 130,2 \text{ ppm}$	(Ar-C _q)
$\delta = 144,4 \text{ ppm}$	(NH ₂ -C)
$\delta = 147,1 \text{ ppm}$	(CH ₃ -O-C)
$\delta = 147,4 \text{ ppm}$	(CH ₃ -O-C)

Verbindung 3



Methyl 3-((4-(2-(6,7-dimethoxy-1,2,3,4 tetrahydroisochinolin-2-yl)ethyl)phenyl)carbamoyl)-5-nitrobenzoat

Materialien:

4-[2-(6,7-Dimethoxy-1,2,3,4-tetrahydroisochinolin-2-yl)ethyl]anilin (**2**)

Methyl 3-(chlorocarbonyl)-5-nitrobenzoat (**11**)

TEA

CH₂Cl₂

Methode:

Es werden 5 mmol (1,56 g) **2** (ATH2x) in 75 ml CH₂Cl₂ gelöst und nach Hinzufügen von 15 mmol (2,11 ml) TEA bei RT mit einem Trockenrohrsaufsatz gerührt.

Das rohe, aus der vorangegangenen Reaktion erhaltene, **11** wird ebenfalls in CH₂Cl₂ aufgenommen und dann tropfenweise zur Lösung des Anilins und des TEA hinzugegeben. Die Reaktionsmischung wird über Nacht bei RT gerührt.

Nach Beendigung der Reaktion wird die CH₂Cl₂ – Phase einmal mit 100 ml H₂O und dreimal mit 100 ml gesättigter NaHCO₃ – Lösung gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet, anschließend filtriert und am Rotavapor eingedunstet. Zurück bleibt das Produkt in Form ölig Konsistenz.

Die Umkristallisation in MeOH ergibt orange Kristalle.

Ausbeute: 1,663 g $\triangleq$ 64,9% einer theoretischen Ausbeute von 2,598 g

Summenformel: $C_{28}H_{29}N_3O_7$

Molekülmasse: 519,55

Schmelzpunkt: 88 – 90°C

Bezeichnung: TAR5

1H -NMR ($CDCl_3$, 200 MHz):

$\delta = 2,68 - 2,98$ ppm	(m, 4 x CH_2)	8H
$\delta = 3,64$ ppm	(s, CH_2)	2H
$\delta = 3,77 - 3,88$ ppm	(m, 2 x OCH_3)	6H
$\delta = 3,99$ ppm	(s, OCH_3)	3H
$\delta = 6,52$ ppm	(s, Ar- H)	1H
$\delta = 6,58$ ppm	(s, Ar- H)	1H
$\delta = 7,23$ ppm	(A-Teil des AB-Systems, $J = 8,3$ Hz, Ar- H)	2H
$\delta = 7,57$ ppm	(B-Teil des AB-Systems, $J = 8,3$ Hz, Ar- H)	2H
$\delta = 8,51$ ppm	(s, N- H)	1H
$\delta = 8,82$ ppm	(s, Ar- H)	1H
$\delta = 8,88 - 8,99$ ppm	(m, Ar- H)	2H

^{13}C -NMR ($CDCl_3$, 50 MHz):

$\delta = 28,8$ ppm	(CH_2)
$\delta = 33,5$ ppm	(CH_2)
$\delta = 51,2$ ppm	(N- CH_2)
$\delta = 53,2$ ppm	(O- CH_3)

$\delta = 55,8$ ppm	(N-CH ₂)
$\delta = 56,0$ ppm	(O-CH ₃)
$\delta = 56,0$ ppm	(O-CH ₃)
$\delta = 60,1$ ppm	(N-CH ₂)
$\delta = 110,0$ ppm	(Ar-CH)
$\delta = 111,5$ ppm	(Ar-CH)
$\delta = 121,0$ ppm	(2x Ar-CH)
$\delta = 126,3$ ppm	(Ar-C _q)
$\delta = 126,3$ ppm	(Ar-CH)
$\delta = 126,6$ ppm	(Ar-CH)
$\delta = 127,0$ ppm	(Ar-CH)
$\delta = 129,5$ ppm	(2x Ar-CH)
$\delta = 132,5$ ppm	(Ar-C _q)
$\delta = 133,5$ ppm	(Ar-CH)
$\delta = 135,4$ ppm	(Ar-C _q)
$\delta = 137,2$ ppm	(Ar-C _q)
$\delta = 137,8$ ppm	(Ar-C _q)
$\delta = 147,3$ ppm	(Ar-C _q)
$\delta = 147,6$ ppm	(Ar-C _q)
$\delta = 148,6$ ppm	(Ar-C _q)
$\delta = 162,6$ ppm	(O=C)
$\delta = 164,4$ ppm	(O=C)

MS	m/z	326 (5 %)
		310 (7 %)
		296 (15 %)
		231 (18 %)
		208 (15 %)
		189 (49 %)
		175 (65 %)
		147 (65 %)

132 (42 %)
 118 (51 %)
 103 (18 %)
 91 (37 %)
 77 (36 %)
 58 (50 %)
 44 (100 %)
 41 (28 %)

Hochauflösende MS (± 5 ppm)

Errechneter Molekülionen-Peak $[M+H]^+$ für $C_{28}H_{29}N_3O_7$: 520,2078
 Ermittelter Molekülionen-Peak $[M+H]^+$: 520,2063

CHN – Analyse ($\pm 0,40$ %)

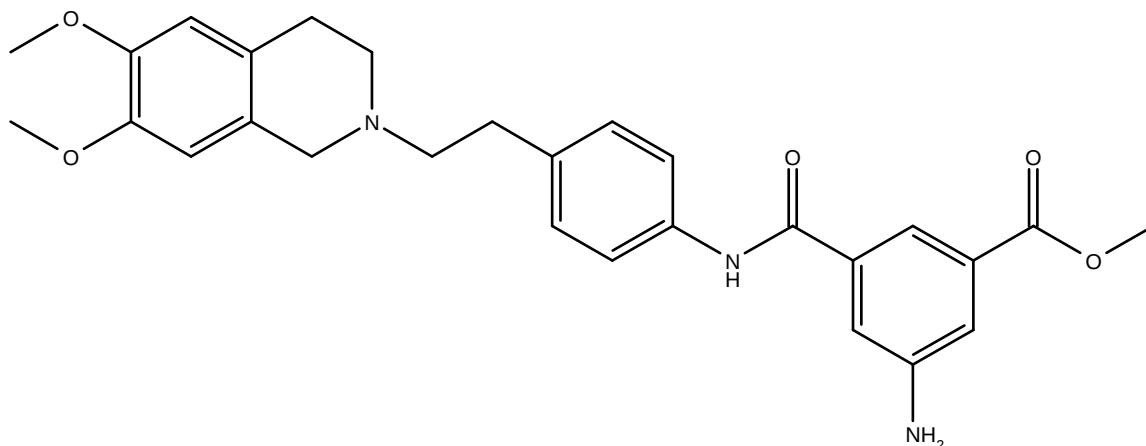
Errechnete molekulare Zusammensetzung für $C_{28}H_{29}N_3O_7 \cdot 0,5H_2O$:

C 63,63 % H 5,72 % N 7,95 %

Ermittelte molekulare Zusammensetzung :

C 63,63 % H 5,41 % N 7,83 %

Verbindung 4



Methyl 3-amino-5-((4-(2-(6,7-dimethoxy-1,2,3,4-tetrahydroisochinolin-2-yl)ethyl)phenyl)carbamoyl)benzoat

Materialien:

Methyl 3-((4-(2-(6,7-dimethoxy-1,2,3,4 tetrahydroisochinolin-2-yl)ethyl)phenyl-carbamoyl)-5-nitrobenzoat (**3**)

Pd/C

MeOH

EtOAc

Methode:

Es werden 10 ml einer 1:1 – Mischung MeOH/EtOAc in einem Dreihalskolben für 20 min unter Argonatmosphäre gebracht. Danach wird 0,21 g Pd/C vorsichtig, aber zügig im EtOH suspendiert und weitere 20 min unter Argonatmosphäre rühren gelassen. Währenddessen werden 4 mmol (2,08 g) **3** (TAR5) mit 30 ml einer 1:1 – Mischung MeOH/EtOAc in einem Hydriergefäß in Lösung gebracht.

Der suspendierte Katalysator wird in das Hydriergefäß mit der Lösung des Eduktes überführt und dieses wieder für 20 min in Argonatmosphäre gebracht.

Danach wird das Reaktionsgefäß in eine Parr-Apparatur eingespannt und anschließend für 10 h unter Wasserstoffatmosphäre bei 39 psi reduziert.

Nach Beendigung der Reaktion wird der Katalysator durch Filtration abgetrennt und solange mit EtOAc gewaschen, wie Produkt im Filtrat nachgewiesen werden kann. Die vereinigten Filtrate werden mit dem Rotavapor eingedampft und das erhaltene Rohprodukt im Exsiccator unter Vakuum getrocknet.

Das Rohprodukt wird schließlich in einer Mischung aus 7:3 MeOH/H₂O umkristallisiert und ergibt leicht gelbe Kristalle.

Ausbeute: 1,25 g $\triangleq$ 64 % theoretischer Ausbeute (1,96 g)

Summenformel: C₂₈H₃₁N₃O₅

Molekülmasse: 489,56

Schmelzpunkt: 176 – 178°C

Bezeichnung: TAR6

¹H-NMR (CDCl₃, 200 MHz):

$\delta = 2,68 - 3,00$ ppm	(m, 4 x CH ₂)	8H
$\delta = 3,65$ ppm	(s, CH ₂)	2H
$\delta = 3,83$ ppm	(s, OCH ₃)	3H
$\delta = 3,84$ ppm	(s, OCH ₃)	3H
$\delta = 3,89$ ppm	(s, OCH ₃)	3H
$\delta = 4,00$ ppm	(s, NH ₂)	2H
$\delta = 6,54$ ppm	(s, Ar-H)	1H
$\delta = 6,60$ ppm	(s, Ar-H)	1H
$\delta = 7,23$ ppm	(A-Teil des AB-Systems, J= 8,4 Hz, Ar-H)	2H
$\delta = 7,40$ ppm	(s, Ar-H)	1H
$\delta = 7,43 - 7,44$ ppm	(m, Ar-H)	1H

$\delta = 7,57 \text{ ppm}$	(B-Teil des AB-Systems, $J = 8,4 \text{ Hz}$, Ar- H)	2H
$\delta = 7,76 \text{ ppm}$	(s, Ar- H)	1H
$\delta = 8,08 \text{ ppm}$	(s, N- H)	1H

^{13}C -NMR (CDCl_3 , 50 MHz):

$\delta = 28,4 \text{ ppm}$	(CH₂)
$\delta = 33,3 \text{ ppm}$	(CH₂)
$\delta = 51,0 \text{ ppm}$	(N- CH₂)
$\delta = 52,5 \text{ ppm}$	(O- CH₃)
$\delta = 55,5 \text{ ppm}$	(N- CH₂)
$\delta = 56,0 \text{ ppm}$	(O- CH₃)
$\delta = 56,0 \text{ ppm}$	(O- CH₃)
$\delta = 59,9 \text{ ppm}$	(N- CH₂)
$\delta = 109,6 \text{ ppm}$	(Ar- CH)
$\delta = 111,5 \text{ ppm}$	(Ar- CH)
$\delta = 117,0 \text{ ppm}$	(Ar- CH)
$\delta = 118,4 \text{ ppm}$	(Ar- CH)
$\delta = 118,7 \text{ ppm}$	(Ar- CH)
$\delta = 120,7 \text{ ppm}$	(2x Ar- CH)
$\delta = 126,0 \text{ ppm}$	(2 x Ar- C_q)
$\delta = 129,4 \text{ ppm}$	(2 x Ar- CH)
$\delta = 131,5 \text{ ppm}$	(Ar- C_q)
$\delta = 136,1 \text{ ppm}$	(Ar- C_q)
$\delta = 136,4 \text{ ppm}$	(Ar- C_q)
$\delta = 136,6 \text{ ppm}$	(Ar- C_q)
$\delta = 147,5 \text{ ppm}$	(2 x Ar- C_q)
$\delta = 147,8 \text{ ppm}$	(Ar- C_q)
$\delta = 165,1 \text{ ppm}$	(O= C)
$\delta = 166,7 \text{ ppm}$	(O= C)

Hochauflösende MS (± 5 ppm)

Errechneter Molekülionen-Peak $[M+H]^+$ für $C_{28}H_{31}N_3O_5$: 490,2336

Ermittelter Molekülionen-Peak $[M+H]^+$: 490,2351

CHN – Analyse ($\pm 0,40$ %)

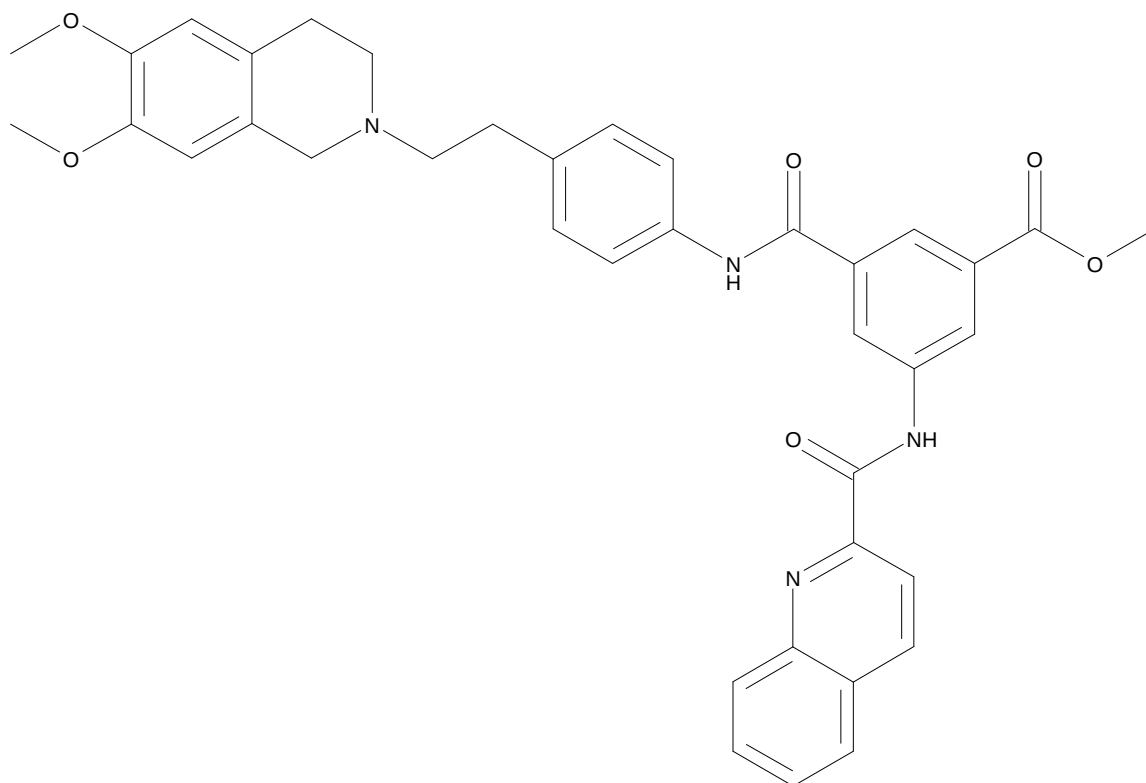
Errechnete molekulare Zusammensetzung für $C_{28}H_{31}N_3O_5 \cdot H_2O$:

C 66,26 % H 6,55 % N 8,28 %

Ermittelte molekulare Zusammensetzung:

C 66,07 % H 6,49 % N 8,07 %

Verbindung 5



Methyl 3-(chinolin-2-carboxamido)-5-((4-(2-(6,7-dimethoxy-1,2,3,4-tetrahydroisochinolin-2-yl)ethyl)phenyl)carbamoyl)benzoat

Materialien:

Methyl 3-amino-5-((4-(2-(6,7-dimethoxy-1,2,3,4-tetrahydroisochinolin-2-yl)ethyl)phenyl)carbamoyl)benzoat (**4**)

2-Chinolincarbonsäurechlorid (**12**)

TEA

CH₂Cl₂

Methode:

Es werden 1,5 mmol (0,73 g) **4** (TAR6) in 20 ml CH₂Cl₂ gelöst und nach Hinzufügen von 4,5 mmol (633 µl) TEA bei RT mit einem Trockenrohrabsatz

gerührt. Das rohe, aus der vorangegangenen Reaktion erhaltene 2-Chinolincarbonsäurechlorid, wird ebenfalls in CH_2Cl_2 aufgenommen und dann tropfenweise zur Lösung des Benzoessäuremethylesters und des TEA hinzugegeben. Das Reaktionsgemisch wird über Nacht bei RT gerührt.

Nach Beendigung der Reaktion wird die CH_2Cl_2 – Phase einmal mit 100 ml H_2O und dreimal mit 100 ml gesättigter NaHCO_3 – Lösung gewaschen, über Na_2SO_4 getrocknet, anschließend filtriert und am Rotavapor eingedampft.

Zur Aufreinigung wird eine Säulenchromatographie (4 EtOAc/1 MeOH) durchgeführt und das erhaltene Produkt anschließend in einer Mischung aus 9:1 MeOH/ H_2O umkristallisiert. Man erhält daraus hellrote Kristalle.

Ausbeute: 0,406 g $\triangleq$ 42% theoretischer Ausbeute (0,967g)

Summenformel: $\text{C}_{38}\text{H}_{36}\text{N}_4\text{O}_6$

Molekülmasse: 644,72

Schmelzpunkt: 169 – 171°C

Bezeichnung: TAR7

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 200 MHz):

$\delta = 2,65 - 3,03$ ppm	(m, 4 x CH_2)	8H
$\delta = 3,66$ ppm	(s, CH_2)	2H
$\delta = 3,84$ ppm	(s, 2 x OCH_3)	6H
$\delta = 3,94$ ppm	(s, OCH_3)	3H
$\delta = 6,54$ ppm	(s, Ar- H)	1H
$\delta = 6,60$ ppm	(s, Ar- H)	1H
$\delta = 7,26$ ppm	(A-Teil des AB-Systems, $J = 8,4$ Hz, Ar- H)	2H
$\delta = 7,60 - 7,72$ ppm	(m, enthält B-Teil des AB- Systems, $J = 8,4$ Hz, Ar- H)	3H
$\delta = 7,75 - 7,93$ ppm	(m, Ar- H)	2H
$\delta = 8,13 - 8,17$ ppm	(d, $J = 8,1$ Hz, Ar- H)	1H

$\delta = 8,24 - 8,46$ ppm	(m, Ar- H)	4H
$\delta = 8,54 - 8,66$ ppm	(m, Ar- H)	2H
$\delta = 10,46$ ppm	(s, N- H)	1H

^{13}C -NMR (CDCl_3 , 50 MHz):

$\delta = 29,0$ ppm	(CH₂)
$\delta = 33,9$ ppm	(CH₂)
$\delta = 51,4$ ppm	(N- CH₂)
$\delta = 53,0$ ppm	(O- CH₃)
$\delta = 56,1$ ppm	(N- CH₂)
$\delta = 56,3$ ppm	(2 x O- CH₃)
$\delta = 60,5$ ppm	(N- CH₂)
$\delta = 109,9$ ppm	(Ar- CH)
$\delta = 111,8$ ppm	(Ar- CH)
$\delta = 119,0$ ppm	(Ar- CH)
$\delta = 121,1$ ppm	(2 x Ar- CH)
$\delta = 122,9$ ppm	(Ar- CH)
$\delta = 123,7$ ppm	(Ar- CH)
$\delta = 126,5$ ppm	(Ar- C_q)
$\delta = 126,9$ ppm	(Ar- C_q)
$\delta = 128,2$ ppm	(Ar- CH)
$\delta = 128,9$ ppm	(Ar- CH)
$\delta = 129,7$ ppm	(2 x Ar- CH)
$\delta = 130,0$ ppm	(Ar- C_q)
$\delta = 130,1$ ppm	(Ar- CH)
$\delta = 131,0$ ppm	(Ar- CH)
$\delta = 132,0$ ppm	(Ar- C_q)
$\delta = 136,3$ ppm	(Ar- C_q)
$\delta = 136,8$ ppm	(Ar- C_q)
$\delta = 137,3$ ppm	(Ar- C_q)

$\delta = 138,5$ ppm	(Ar-CH)
$\delta = 138,9$ ppm	(Ar-C _q)
$\delta = 146,7$ ppm	(Ar-C _q)
$\delta = 147,7$ ppm	(Ar-C _q)
$\delta = 148,0$ ppm	(Ar-C _q)
$\delta = 149,1$ ppm	(Ar-C _q)
$\delta = 163,0$ ppm	(O=C)
$\delta = 164,8$ ppm	(O=C)
$\delta = 166,5$ ppm	(O=C)

MS	m/z	
		451 (50 %)
		336 (23 %)
		333 (100 %)
		300 (60 %)
		273 (15 %)
		245 (9 %)
		206 (31 %)
		190 (8 %)
		164 (46 %)
		150 (15 %)
		149 (15 %)
		129 (40 %)
		128 (79 %)
		121 (15 %)
		102 (10 %)
		91 (13 %)
		77 (17 %)
		57 (10 %)
		42 (13 %)

Hochauflösende MS (± 5 ppm)

Errechneter Molekülionen-Peak $[M+H]^+$ für $C_{38}H_{36}N_4O_6$: 645,2708

Ermittelter Molekülionen-Peak $[M+H]^+$: 645,2727

CHN – Analyse ($\pm 0,40$ %)

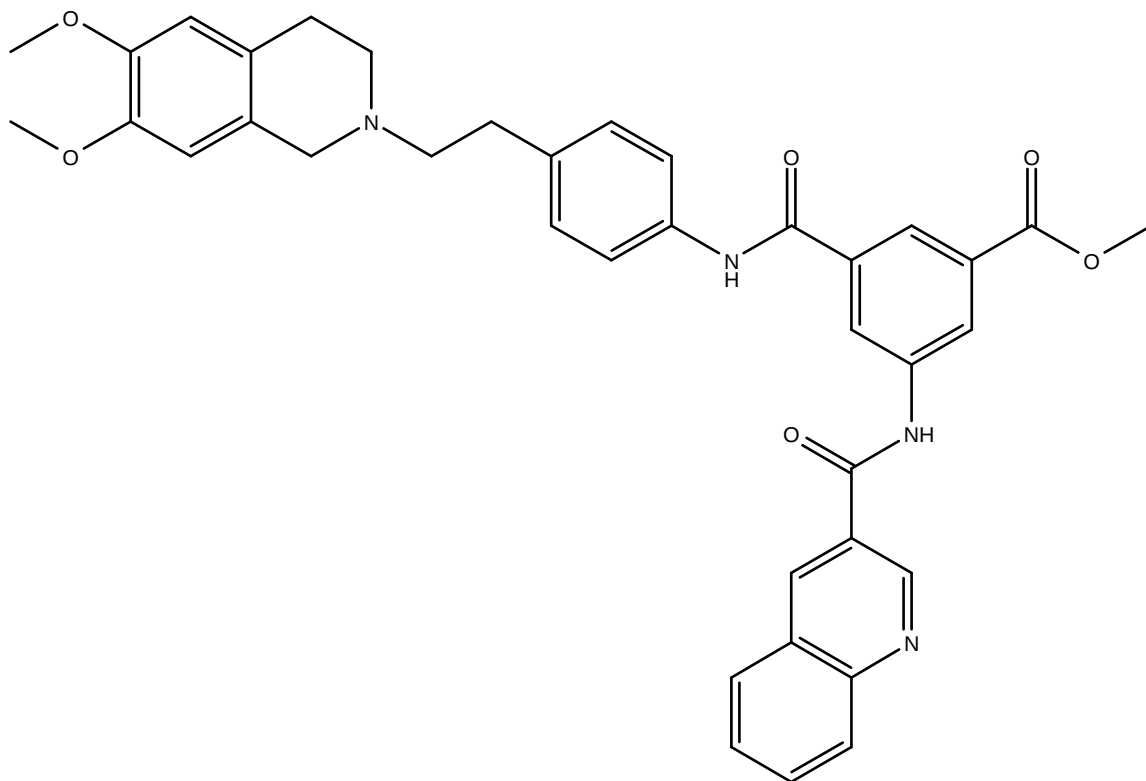
Errechnete molekulare Zusammensetzung für $C_{38}H_{36}N_4O_6 \cdot H_2O$:

C 68,87 % H 5,78 % N 8,45 %

Ermittelte molekulare Zusammensetzung:

C 68,64 % H 5,59 % N 8,46 %

Verbindung 6



Methyl 3-(chinolin-3-carboxamido)-5-((4-(2-(6,7-dimethoxy-1,2,3,4-tetrahydroisochinolin-2-yl)ethyl)phenyl)carbamoyl)benzoat

Materialien:

Methyl 3-amino-5-((4-(2-(6,7-dimethoxy-1,2,3,4-tetrahydroisochinolin-2-yl)ethyl)phenyl)carbamoyl)benzoat (**4**)

3-Chinolincarbonylchlorid (**13**)

TEA

CH₂Cl₂

Methode:

Es werden 1,0 mmol (0,49 g) **4** (TAR6) in 15 ml CH₂Cl₂ gelöst und nach Hinzufügen von 3 mmol (422 µl) TEA bei RT mit einem Trockenrohrabsatz

gerührt. Das rohe, aus der vorangegangenen Reaktion erhaltene 3-Chinolincarbonylchlorid, wird ebenfalls in CH_2Cl_2 aufgenommen und dann tropfenweise zur Lösung des Benzoessäuremethylesters und des TEA hinzugegeben. Die Reaktionsmischung wird über Nacht bei RT gerührt.

Nach Beendigung der Reaktion wird die CH_2Cl_2 – Phase einmal mit 100 ml H_2O und dreimal mit 100 ml gesättigter NaHCO_3 – Lösung gewaschen, mit Na_2SO_4 getrocknet, anschließend filtriert und am Rotavapor das CH_2Cl_2 abgedampft.

Zur Aufreinigung wird eine Säulenchromatographie mit 12 EtOAc/1 EtOH als Laufmittel und eine zweite Säulenchromatographie mit 4 EtOAc/1 MeOH als Laufmittel durchgeführt.

Ausbeute: 0,025 g $\triangleq$ 3,7 % theoretischer Ausbeute (0,670g)

Summenformel: $\text{C}_{38}\text{H}_{36}\text{N}_4\text{O}_6$

Molekülmasse: 644,72

Bezeichnung: TAR8

$^1\text{H-NMR}$ (d_6 -DMSO, 200 MHz):

$\delta = 2,58 - 2,92$ ppm	(m, 4 x CH_2)	8H
$\delta = 3,69$ ppm	(s, 2 x OCH_3) (ein CH_2 -Signal von H_2O -Peak verdeckt)	6H
$\delta = 3,94$ ppm	(s, OCH_3)	3H
$\delta = 6,57 - 6,72$ ppm	(m, Ar- H)	2H
$\delta = 7,25$ ppm	(A-Teil des AB-Systems, $J = 8,3$ Hz, Ar- H)	2H
$\delta = 7,66 - 7,79$ ppm	(m, enthält B-Teil des AB-Systems, Ar- H)	3H
$\delta = 7,86 - 7,97$ ppm	(m, Ar- H)	1H
$\delta = 8,08 - 8,20$ ppm	(m, Ar- H)	2H

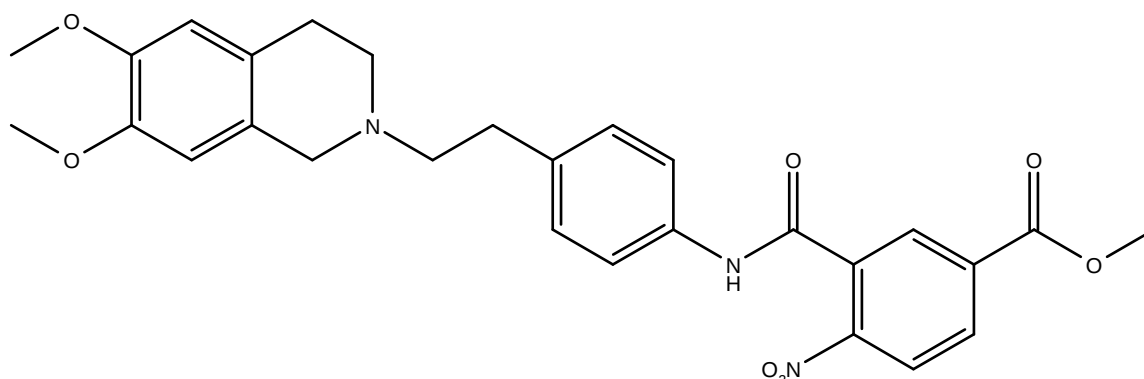
$\delta = 8,31$ ppm	(s, Ar- H)	1H
$\delta = 8,66$ ppm	(s, Ar- H)	1H
$\delta = 8,73$ ppm	(s, Ar- H)	1H
$\delta = 9,05$ ppm	(s, Ar- H)	1H
$\delta = 9,41$ ppm	(s, Ar- H)	1H
$\delta = 10,52$ ppm	(s, N- H)	1H
$\delta = 11,07$ ppm	(s, N- H)	1H

^{13}C -NMR (d_6 -DMSO, 50 MHz):

$\delta = 28,4$ ppm	(CH₂)
$\delta = 32,5$ ppm	(CH₂)
$\delta = 50,6$ ppm	(N- CH₂)
$\delta = 52,6$ ppm	(O- CH₃)
$\delta = 55,1$ ppm	(N- CH₂)
$\delta = 55,5$ ppm	(O- CH₃)
$\delta = 55,6$ ppm	(O- CH₃)
$\delta = 59,6$ ppm	(N- CH₂)
$\delta = 110,1$ ppm	(Ar- CH)
$\delta = 111,8$ ppm	(Ar- CH)
$\delta = 120,7$ ppm	(2 x Ar- CH)
$\delta = 123,5$ ppm	(Ar- CH)
$\delta = 124,2$ ppm	(Ar- CH)
$\delta = 126,0$ ppm	(Ar- C_q)
$\delta = 126,5$ ppm	(Ar- C_q)
$\delta = 126,7$ ppm	(Ar- C_q)
$\delta = 127,1$ ppm	(Ar- C_q)
$\delta = 127,7$ ppm	(Ar- CH)
$\delta = 128,9$ ppm	(2 x Ar- CH)
$\delta = 129,3$ ppm	(Ar- CH)
$\delta = 130,4$ ppm	(Ar- C_q)

$\delta = 131,7$ ppm	(Ar-CH)
$\delta = 136,2$ ppm	(Ar-C _q)
$\delta = 136,3$ ppm	(Ar-CH)
$\delta = 136,4$ ppm	(Ar-C _q)
$\delta = 139,7$ ppm	(Ar-C _q)
$\delta = 147,0$ ppm	(Ar-C _q)
$\delta = 147,2$ ppm	(Ar-C _q)
$\delta = 148,7$ ppm	(Ar-C _q)
$\delta = 149,1$ ppm	(Ar-CH)
$\delta = 164,5$ ppm	(O=C)
$\delta = 164,5$ ppm	(O=C)
$\delta = 165,7$ ppm	(O=C)

Verbindung 7



Methyl 3-((4-(2-(6,7-dimethoxy-1,2,3,4 tetrahydroisochinolin-2-yl)ethyl)phenyl)carbamoyl)-4-nitrobenzoat

Materialien:

4-[2-(6,7-Dimethoxy-1,2,3,4-tetrahydroisochinolin-2-yl)ethyl]anilin (**2**)

Methyl 3-(chlorocarbonyl)-4-nitrobenzoat (**15**)

TEA

CH₂Cl₂

Methoden:

Es werden 5 mmol (1,56 g) **2** (ATH2x) in 75 ml CH₂Cl₂ gelöst und nach Hinzufügen von 15 mmol (2,11 ml) TEA bei RT mit einem Trockenrohraufsatz gerührt.

Das rohe, aus der vorangegangenen Reaktion erhaltene **15** wird ebenfalls in CH₂Cl₂ aufgenommen und dann tropfenweise zur Lösung des Anilins und des TEA hinzugegeben. Das erhaltene Reaktionsgemisch wird über Nacht bei RT gerührt.

Nach Beendigung der Reaktion wird die CH₂Cl₂ – Phase einmal mit 100 ml H₂O und dreimal mit 100 ml gesättigter NaHCO₃ – Lösung gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet, anschließend filtriert und am Rotavapor das CH₂Cl₂ eingeeengt. Zurück bleibt das Produkt in Form öligler Konsistenz.

Eine Umkristallisation des Rohprodukts in einer Mischung von 1:1 Aceton/H₂O ergibt orange Kristalle.

Ausbeute: 1,473 g $\triangleq$ 56,7% einer theoretischen Ausbeute von 2,598 g

Summenformel: C₂₈H₂₉N₃O₇

Molekülmasse: 519,55

Schmelzpunkt: 165 – 166°C

Bezeichnung: TAR1

¹H-NMR (CDCl₃, 200 MHz):

$\delta = 2,62 - 3,02$ ppm	(m, 4 x CH ₂)	8H
$\delta = 3,63$ ppm	(s, CH ₂)	2H
$\delta = 3,81$ ppm	(s, OCH ₃)	3H
$\delta = 3,81$ ppm	(s, OCH ₃)	3H
$\delta = 3,96$ ppm	(s, OCH ₃)	3H
$\delta = 6,49$ ppm	(s, Ar-H)	1H
$\delta = 6,56$ ppm	(s, Ar-H)	1H
$\delta = 7,21$ ppm	(A-Teil des AB-Systems, $J = 8,2$ Hz, Ar-H)	2H
$\delta = 7,49$ ppm	(B-Teil des AB-Systems, $J = 8,2$ Hz, Ar-H)	2H
$\delta = 8,01$ ppm	(A-Teil des Ab-Systems, $J = 8,5$ Hz Ar-H)	1H
$\delta = 8,08 - 8,24$ ppm	(m, $J = 8,0$ Hz, Ar-H)	3H

¹³C-NMR (CDCl₃, 50 MHz):

$\delta = 28,8$ ppm	(CH ₂)
$\delta = 33,5$ ppm	(CH ₂)
$\delta = 51,2$ ppm	(N-CH ₂)
$\delta = 53,1$ ppm	(O-CH ₃)
$\delta = 55,8$ ppm	(N-CH ₂)

$\delta = 55,9$ ppm	(O-CH ₃)
$\delta = 56,0$ ppm	(O-CH ₃)
$\delta = 60,2$ ppm	(N-CH ₂)
$\delta = 109,6$ ppm	(Ar-CH)
$\delta = 111,4$ ppm	(Ar-CH)
$\delta = 120,9$ ppm	(2x Ar-CH)
$\delta = 124,8$ ppm	(Ar-CH)
$\delta = 126,3$ ppm	(Ar-C _q)
$\delta = 126,6$ ppm	(Ar-C _q)
$\delta = 129,4$ ppm	(2x Ar-CH)
$\delta = 129,9$ ppm	(Ar-CH)
$\delta = 131,7$ ppm	(Ar-CH)
$\delta = 133,0$ ppm	(Ar-C _q)
$\delta = 134,6$ ppm	(Ar-C _q)
$\delta = 135,5$ ppm	(Ar-C _q)
$\delta = 137,6$ ppm	(Ar-C _q)
$\delta = 147,2$ ppm	(Ar-C _q)
$\delta = 147,5$ ppm	(Ar-C _q)
$\delta = 148,9$ ppm	(Ar-C _q)
$\delta = 163,5$ ppm	(O=C)
$\delta = 164,5$ ppm	(O=C)

MS	m/z	206 (16 %)
		194 (6 %)
		177 (6 %)
		164 (10 %)
		111 (10 %)
		97 (16 %)
		71 (17 %)
		57 (33 %)
		43 (100 %)

Hochauflösende MS (± 5 ppm)

Errechneter Molekülionen-Peak $[M+H]^+$ für $C_{28}H_{29}N_3O_7$: 520,2078

Ermittelter Molekülionen-Peak $[M+H]^+$: 520,2068

CHN – Analyse ($\pm 0,40$ %)

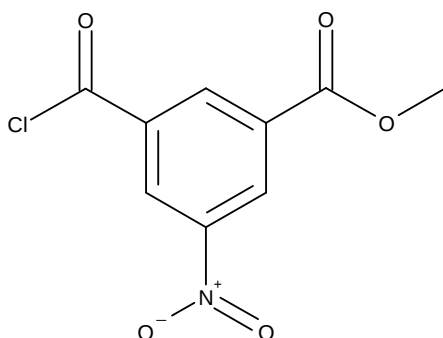
Errechnete molekulare Zusammensetzung für $C_{28}H_{29}N_3O_7 \cdot 0,1H_2O$:

C 64,51 % H 5,65 % N 8,06 %

Ermittelte molekulare Zusammensetzung:

C 64,30 % H 5,40 % N 7,86 %

Verbindung 11



Methyl 3-(chlorocarbonyl)-5-nitrobenzoat

Materialien:

5-Nitroisophtalsäure-mono-methylester

SOCl_2

Methode:

Die Reaktion wird in einem trockenen Kolben (mindestens 4h bei 150°C im Trockenschrank) und unter Feuchtigkeitsausschluss (Trockenrohr) durchgeführt.

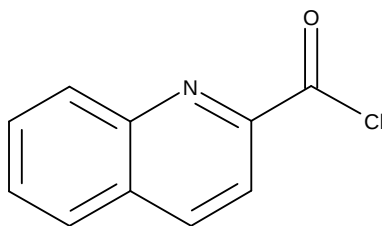
Es werden 6 mmol (1,35 g) 5-Nitroisophtalsäure-mono-methylester in einem Überschuss von SOCl_2 gelöst und unter Rückflusskühlung für vier Stunden auf 70°C erhitzt.

Nach Beendigung der Umsetzung zum Säurechlorid wird der Kolben mit dem Reaktionsgemisch sofort unter Luftausschluss zur Wasserstrahlpumpe überführt. Der Kolben wird im 55°C warmen Wasserbad erhitzt und das SOCl_2 bis zur Trockene abgedampft. Anschließend wird sofort mit dem festen Rohprodukt weitergearbeitet.

Summenformel: $\text{C}_9\text{H}_6\text{NO}_5\text{Cl}$

Molekülmasse: 243,60

Verbindung 12



2-Chinolinecarbonsäurechlorid

Materialien:

2-Chinolinecarbonsäure

SOCl_2

Methode:

Die Reaktion wird in einem trockenen Kolben (mindestens 4h bei 150°C im Trockenschrank) und unter Feuchtigkeitsausschluss (Trockenrohr) durchgeführt.

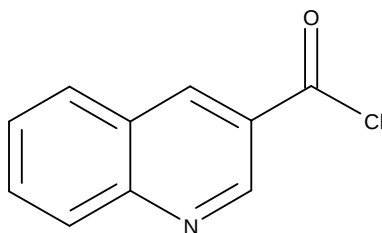
Es werden 2,25 mmol (0,39 g) 2-Chinolinecarbonsäure in einem Überschuss von SOCl_2 gelöst und unter Rückflusskühlung für vier Stunden auf 70°C erhitzt.

Nach Beendigung der Umsetzung zum Säurechlorid wird der Kolben mit dem Reaktionsgemisch sofort unter Luftausschluss zur Wasserstrahlpumpe überführt. Der Kolben wird im 55°C warmen Wasserbad erhitzt und das SOCl_2 bis zur Trockene abgedampft. Anschließend wird sofort mit dem festen Rohprodukt weitergearbeitet.

Summenformel: $\text{C}_{10}\text{H}_6\text{NOCl}$

Molekülmasse: 191,61

Verbindung 13



3-Chinolincarbonylsäurechlorid

Materialien:

3-Chinolincarbonylsäure

SOCl_2

Methode:

Die Reaktion wird in einem trockenen Kolben (mindestens 4h bei 150°C im Trockenschrank) und unter Feuchtigkeitsausschluss (Trockenrohr) durchgeführt.

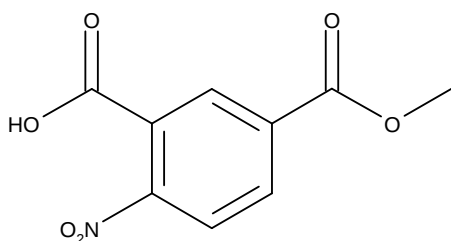
Es werden 2,25 mmol (0,39 g) 3-Chinolincarbonylsäure in wasserfreiem Toluol gelöst und nach Zusatz von 4,5 mmol (315 µl) SOCl_2 unter Rückflusskühlung für vier Stunden auf 100 °C erhitzt.

Nach Beendigung der Umsetzung zum Säurechlorid wird der Kolben mit dem Reaktionsgemisch sofort unter Luftausschluss zur Wasserstrahlpumpe überführt. Der Kolben wird im 55°C warmen Wasserbad erhitzt und Toluol und SOCl_2 bis zur Trockene abgedampft. Anschließend wird sofort mit dem festen Rohprodukt weitergearbeitet.

Summenformel: $\text{C}_{10}\text{H}_6\text{NOCl}$

Molekülmasse: 191,61

Verbindung 14



4-Nitroisophthalsäure-mono-methylester

Materialien:

Methyl-3-formyl-4-nitro-benzoat

KMnO₄

Oxalsäure

Aceton

Methode:

Es werden 5 mmol (1,05 g) Methyl-3-formyl-4-nitro-benzoat in 100 ml Aceton aufgenommen und bei 0 °C gerührt. 7,6mmol (1,17 g) KMnO₄ werden langsam dazugegeben. Dem Reaktionsgemisch wird erlaubt RT zu erreichen. Mittels DC (EtOAc 4/MeOH 1) wird das Reaktionsende bestimmt, dann langsam Oxalsäure hinzugegeben und damit das KMnO₄ zu Braunstein reduziert, bis keine Rosafärbung mehr vorliegt. Anschließend wird die Lösung abfiltriert und der Braunstein solange mit Aceton gewaschen, bis kein Produkt mehr im Waschaceton mittels DC nachgewiesen werden konnte. Das Aceton wird am Rotavapor eingeeengt und das Produkt in 50 ml CH₂Cl₂ aufgenommen. Die CH₂Cl₂-Phase wird zweimal gegen je 200 ml H₂O ausgeschüttelt, mit Na₂SO₄ getrocknet, abfiltriert und schließlich am Rotavapor zur Trockene gebracht.

Eine Umkristallisation in einem 1:1-Gemisch von EtOH/H₂O ergibt hellgelbe Kristalle.

Ausbeute: 0,687 g $\triangleq$ 61% von 1,126 g theoretischer Ausbeute

Summenformel: C₉H₇NO₆

Molekülmasse: 225,16

Schmelzpunkt: 152 – 153 °C

Bezeichnung: TAR9

¹H-NMR (d₆-DMSO, 200 MHz):

$\delta = 3,83 - 4,01$ ppm	(m, OCH ₃)	3H
$\delta = 8,02 - 8,21$ ppm	(m, Ar-CH)	1H
$\delta = 8,23 - 8,45$ ppm	(m, $J = 16,0$ Hz, Ar-CH)	2H

¹³C-NMR (d₆-DMSO, 50 MHz):

$\delta = 53,0$ ppm	(O-CH ₃)
$\delta = 124,4$ ppm	(Ar-CH)
$\delta = 126,8$ ppm	(Ar-C _q)
$\delta = 130,8$ ppm	(Ar-CH)
$\delta = 133,1$ ppm	(Ar-C _q)
$\delta = 133,4$ ppm	(Ar-CH)
$\delta = 151,2$ ppm	(Ar-C _q)
$\delta = 164,1$ ppm	(C=O)
$\delta = 164,6$ ppm	(C=O)

MS	m/z	225 (41 %, M ⁺)
		208 (8 %)

194 (100 %)
180 (13 %)
164 (41 %)
150 (54 %)
136 (57 %)
120 (93 %)
104 (39 %)
92 (37 %)
75 (62 %)

CHN – Analyse ($\pm 0,40$ %)

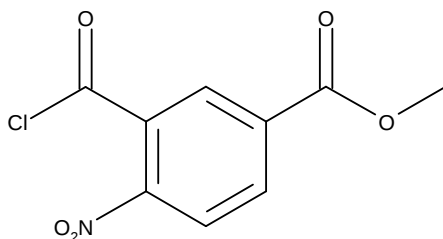
Errechnete molekulare Zusammensetzung für $\text{C}_9\text{H}_7\text{NO}_6$:

C 48,01 % H 3,13 % N 6,22 %

Ermittelte molekulare Zusammensetzung:

C 48,20 % H 3,03 % N 6,14 %

Verbindung 15



Methyl 3-(chlorocarbonyl)-4-nitrobenzoat

Materialien:

4-Nitroisophtalsäure-mono-methylester (**14**)

SOCl_2

Methode:

Die Reaktion wird in einem trockenen Kolben (mindestens 4h bei 150°C im Trockenschrank) und unter Feuchtigkeitsausschluss (Trockenrohr) durchgeführt. Es werden 6 mmol (1,35 g) 4-Nitroisophtalsäure-mono-methylester in einem Überschuss von SOCl_2 gelöst und unter Rückflusskühlung für vier Stunden auf 70°C erhitzt.

Nach Beendigung der Umsetzung zum Säurechlorid wird der Kolben mit dem Reaktionsgemisch sofort unter Luftausschluss zur Wasserstrahlpumpe überführt. Der Kolben wird im 55°C warmen Wasserbad erhitzt und das SOCl_2 bis zur Trockene abgedampft. Anschließend wird sofort mit dem festen Rohprodukt weitergearbeitet.

Summenformel: $\text{C}_9\text{H}_6\text{NO}_5\text{Cl}$

Molekülmasse: 243,60

5. Zusammenfassung

Das Ziel der Diplomarbeit neue potenzielle BCRP-Modulatoren zu synthetisieren ist der vorgenommenen Aufgabenstellung nach nur teilweise erfüllt worden. Es konnten nicht alle vier vorgehabten Zielstrukturen hergestellt werden.

Die Synthese von Verbindung **5** ergab einigermaßen akzeptable Ausbeuten. Es konnten alle zur vollständigen Charakterisierung nötigen Analysen wie ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektroskopie, CHN-Analyse und Massenspektrometrie durchgeführt werden.

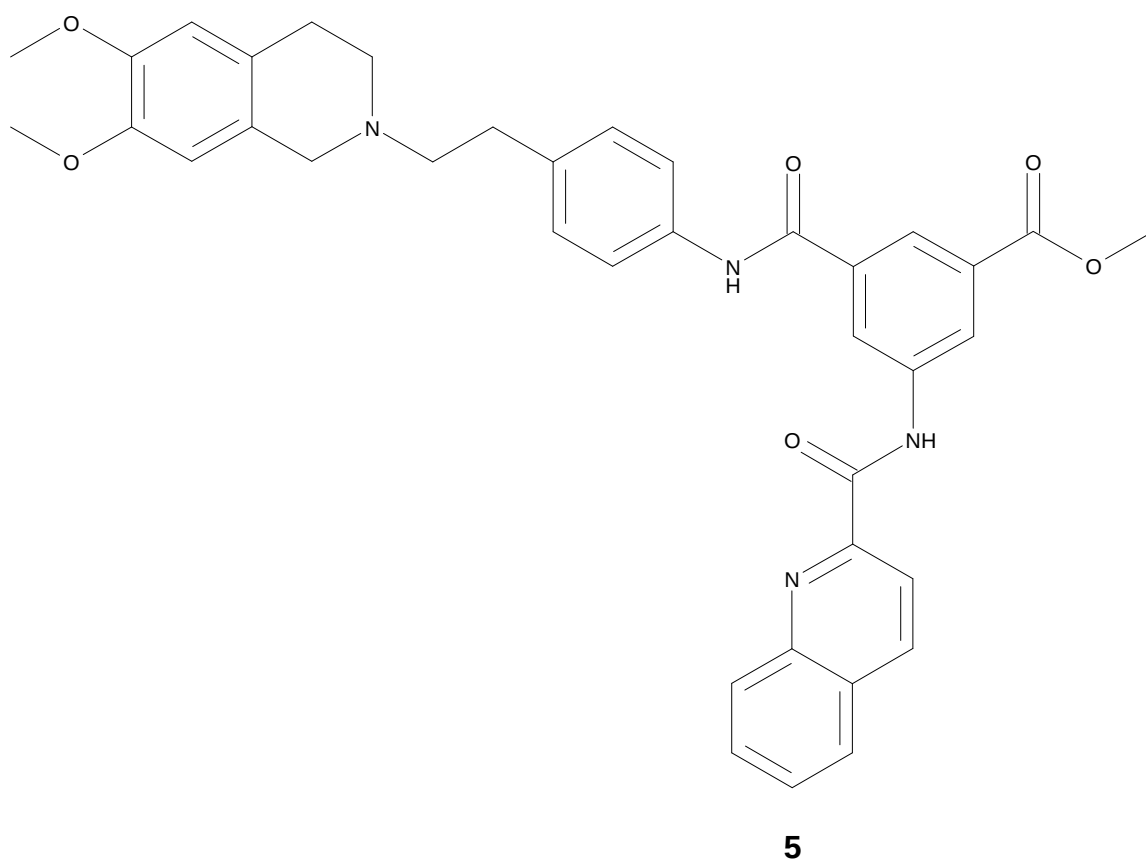


Abb.36: Die synthetisierte und vollständig analytisch charakterisierte Zielstruktur **5**

Die Darstellung von Verbindung **6** lieferte trotz verschiedener methodischer Ansätze nur sehr geringe Ausbeuten. Möglicher Grund ist, dass der hierfür verwendete Substituent 3-Chinolincarbonsäurechlorid weniger reaktiv als der für Verbindung **5** eingesetzte Substituent 2-Chinolincarbonsäurechlorid ist.

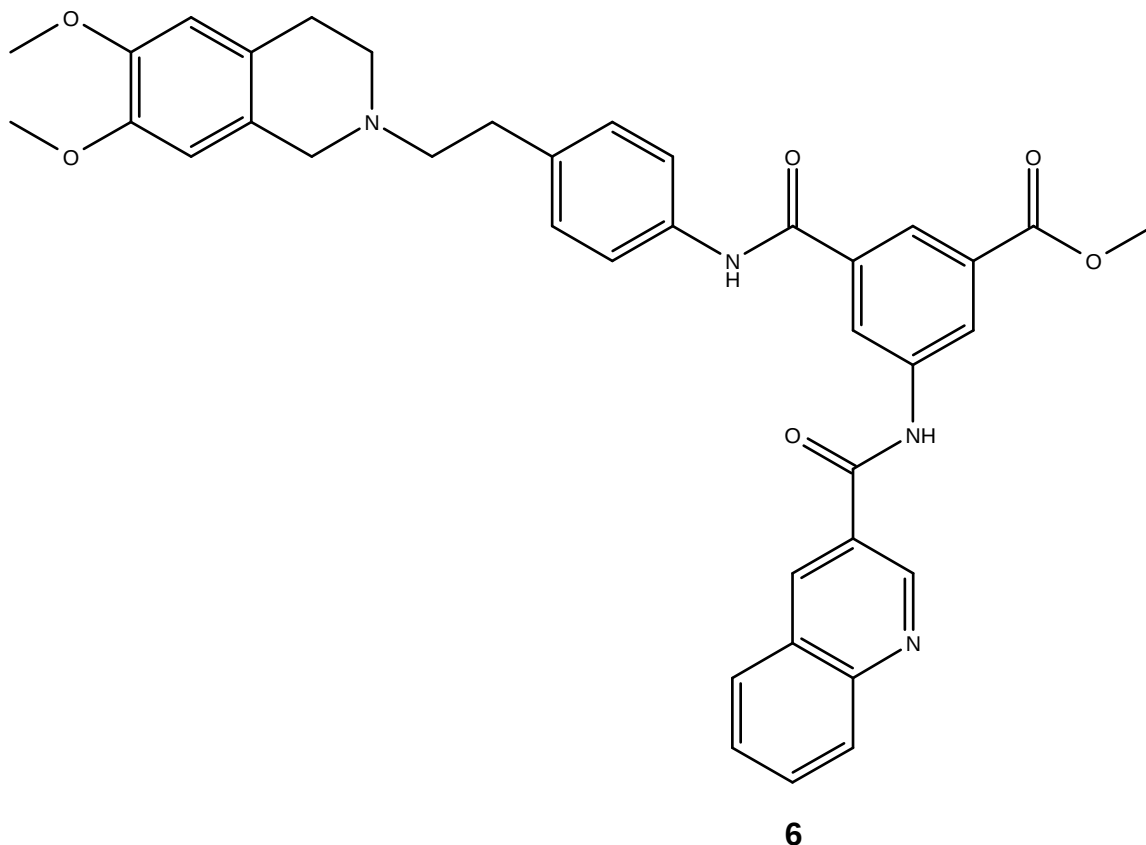


Abb.37: Von der zweiten Zielstruktur **6** konnten nur sehr geringe Ausbeuten erzielt werden, sodass die Verbindung schließlich nur mit Hilfe von ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektren charakterisiert werden konnte.

Es konnten ob der sehr geringen synthetisierten Substanzmenge einzig ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektren aufgenommen werden, wobei die hohen Verluste vor allem in der aufwendigen Reinigung mittels aufeinanderfolgender Säulenchromatographien zurückzuführen sind. Nur am Rande angeführt werden sollen die Probleme, die sich bei diesem Syntheseweg ergaben, wenn aufgrund oftmaliger Fehlschläge eine Zwischenstufe verbraucht war und dann wieder nachgezogen werden musste.

Der zweite Syntheseweg konnte ab dem Schritt zur Herstellung des Anilinderivats **8**, welches die Vorstufe zu den Zielstrukturen **9** und **10** darstellte, nicht mehr sinnvoll realisiert werden. Es entstanden bei der, in dieser Arbeit gut erprobten, Methode der katalytischen Hydrierung mit Pd/C als Katalysator in der Parr-Apparatur sehr viele Nebenprodukte, die es letztendlich nicht gelang abzutrennen. Um alternative Wege einer Synthese von Verbindung **8** zu gehen, die eventuell

weniger Nebenprodukte erbracht hätten, reichte leider der zeitliche Rahmen der Diplomarbeit nicht aus.

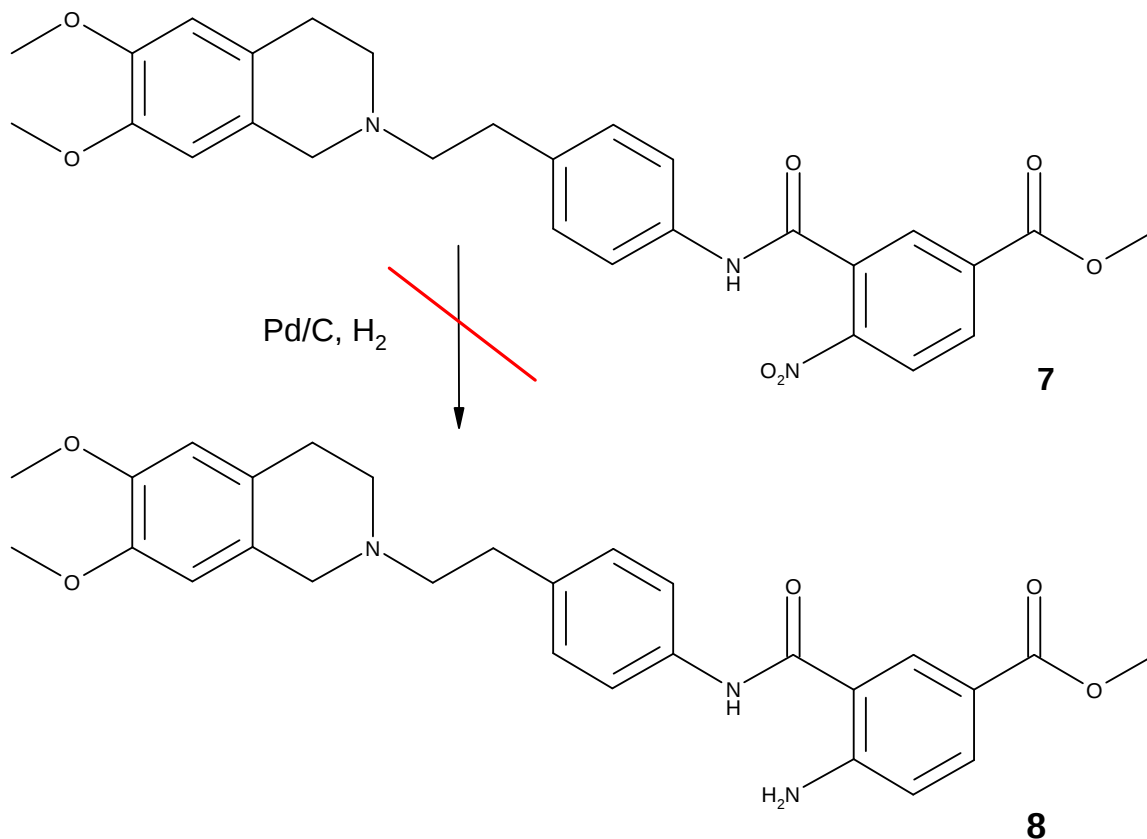


Abb.38: Das Derivat **8** konnte nicht mehr synthetisiert und in reiner Form gewonnen werden.

Verbindungen **9** und **10** wurden zwar zu synthetisieren versucht, allerdings schon mit der nicht vollständig aufgereinigten Zwischenstufe **8**. Es wird zwar vermutet, dass die gewünschten Verbindungen hergestellt werden konnten, allerdings lagen sie in einem komplexen Gemisch an Nebenprodukten vor, die es trotz aufwendiger Reinigungsversuche mittels SC nicht gelang abzutrennen. Somit konnten den zweiten Syntheseweg betreffend ab Verbindung **8** keine der angestrebten Substanzen mehr in reiner Form dargestellt werden.

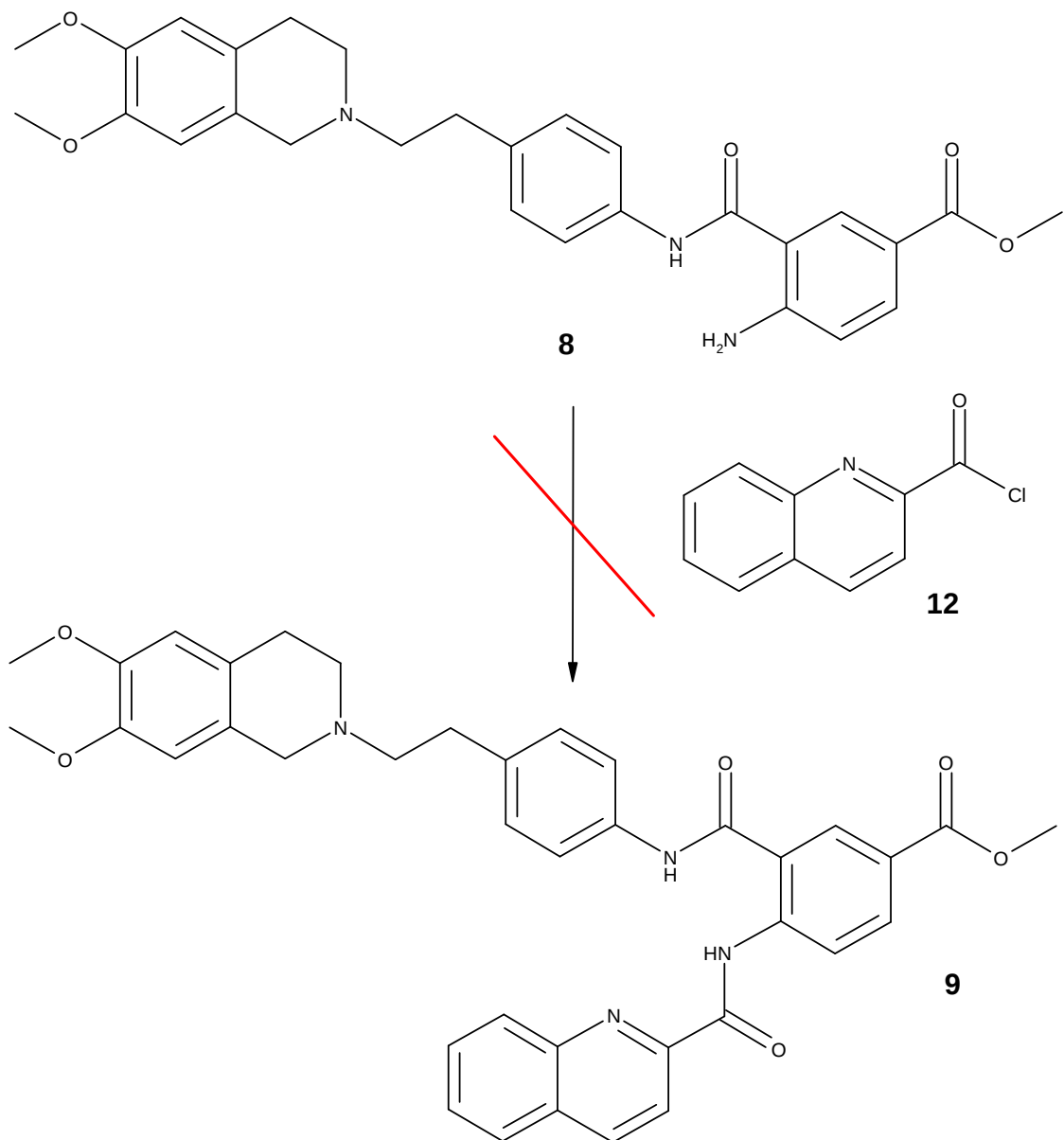


Abb.39: Der gescheiterte Syntheseversuch von Zielstruktur **9**

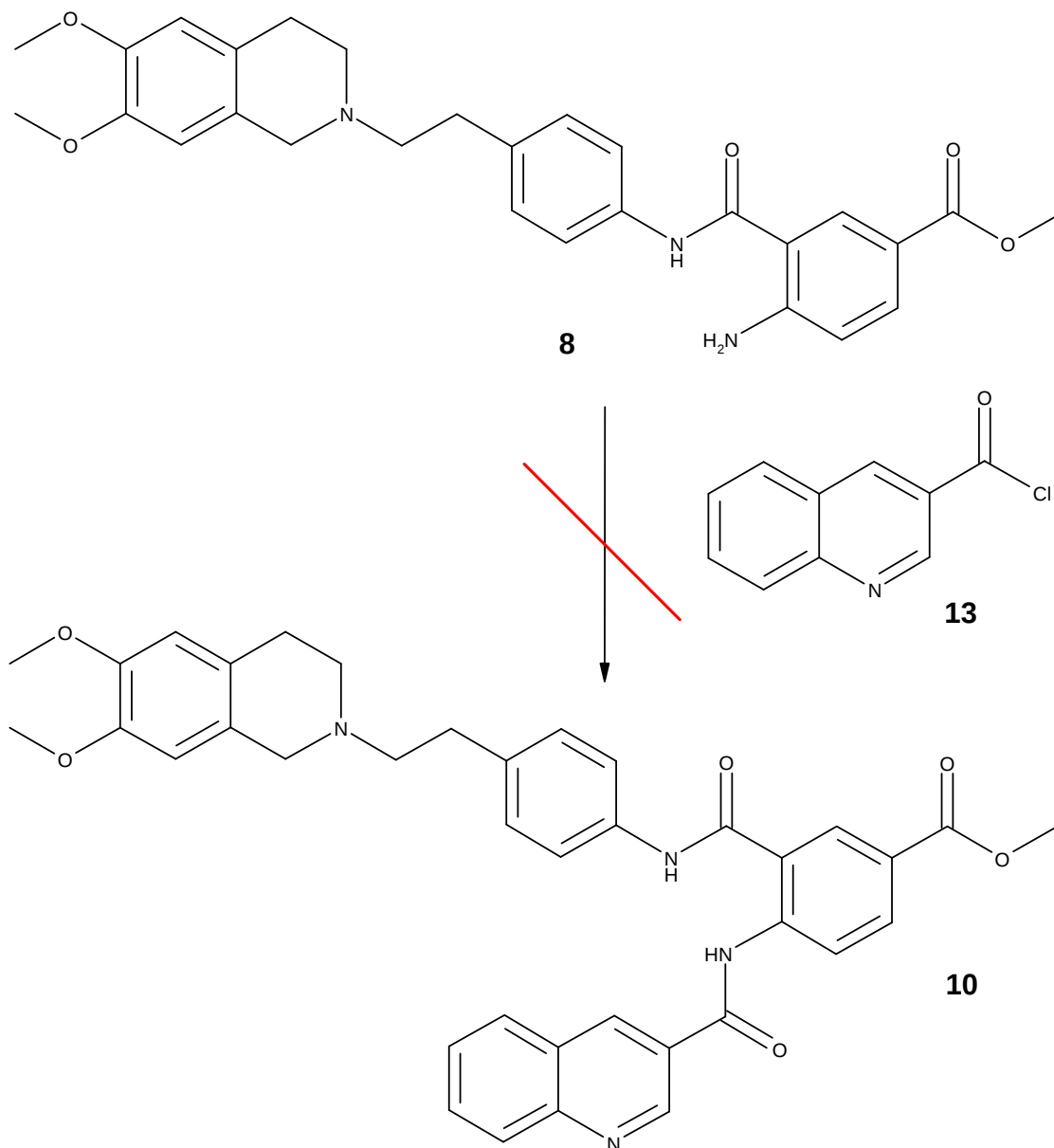


Abb.40: Der gescheiterte Syntheseversuch von Zielstruktur **10**

Auch wurde die Synthese von Derivaten mit anderen Substituenten, z.B. mit einem Austausch der Chinolinamid-Teilstruktur durch unterschiedliche Heterozyklen, unterlassen, da schon Kühnle *et al.* aufgewiesen hatten, dass die Verbindungen mit dem Chinolinamid-Rest die mit Abstand besten IC_{50} -Werte in Bezug auf die Affinität zu BCRP aufwiesen (Kühnle *et al.*, 2009).

Der Grund der Inangriffnahme der Herstellung angegebener Zielstrukturen ergab sich aus den Untersuchungen von Mairinger *et al.* Der in der Studie (Mairinger *et al.*, 2011) synthetisierte PET-Tracer [^{11}C]Methyl 2-(chinolin-2-carboxamido)-4-((4-(2-(6,7-dimethoxy-1,2,3,4-tetrahydroisochinolin-2-yl)ethyl)phenyl)carbamoyl)-benzoat hatte sich bei *in vivo* Untersuchungen in Mäusen als nicht metabolisch stabil erwiesen.

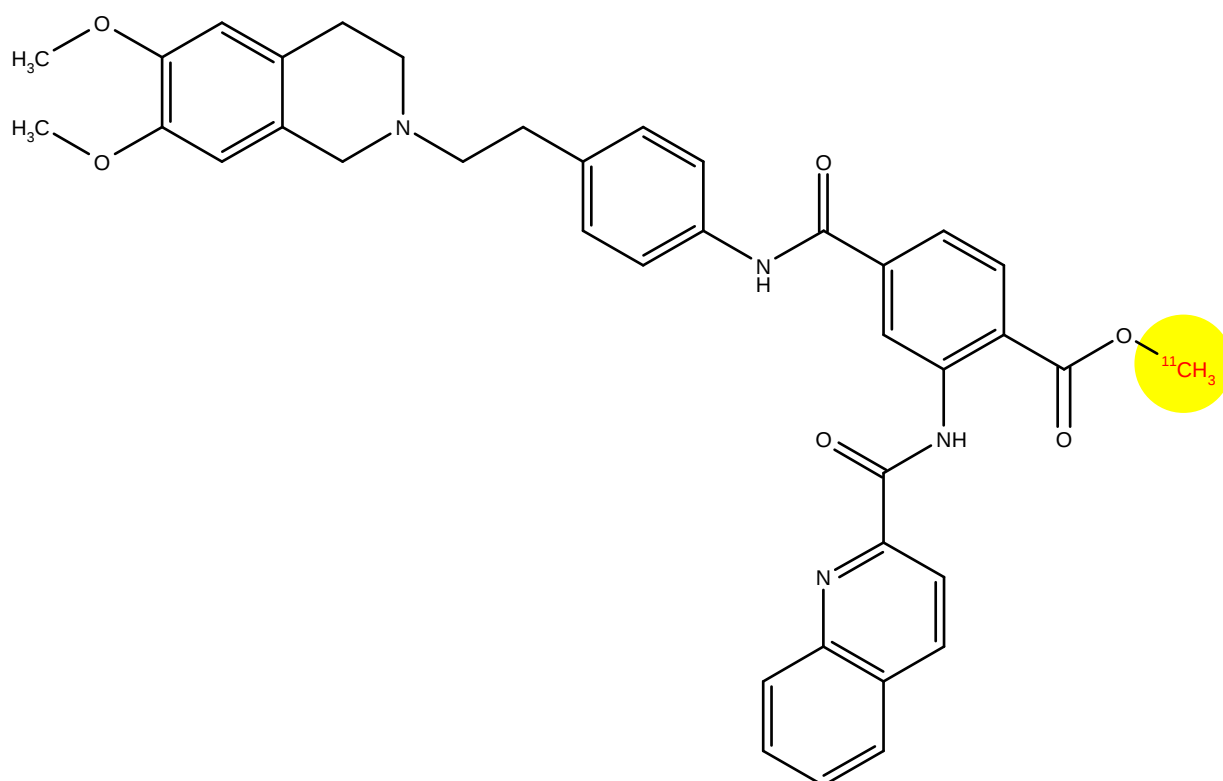


Abb.41: Der PET-Tracer [^{11}C]Methyl 2-(chinolin-2-carboxamido)-4-((4-(2-(6,7-dimethoxy-1,2,3,4-tetrahydroisochinolin-2-yl)ethyl)phenyl)carbamoyl)-benzoat wies keine *in vivo* Plasmastabilität auf (Mairinger *et al.*, 2011)

Mit der leichten Strukturmodifikation, die alleinig in der Umpositionierung des Methylesters am zentralen Anthranilsäurering lag, sollte versucht werden diesem Problem beizukommen.

Dafür wurde vorgeschlagen ein HPLC-System zu etablieren, mit dem das Verhalten der neu synthetisierten Verbindungen in Mäuseplasma überwacht werden könnte.

Sollte sich dies als erfolgreich herausstellen und eine der Zielstrukturen wirklich eine höhere Stabilität als Methyl 2-(chinolin-2-carboxamido)-4-((4-(2-(6,7-dimethoxy-1,2,3,4-tetrahydroisochinolin-2-yl)ethyl)phenyl)carbamoyl)benzoat aufweisen, so könnte dann zu in vivo Untersuchungen mittels PET vorangeschritten werden und somit eine eventuelle Interaktion mit BCRP dargestellt werden.

Zuletzt darf noch als Ausblick eine weitere angedachte Möglichkeit angeführt werden, die zu einer höheren metabolischen Stabilität solcher, in dieser Arbeit behandelter, Tariquidar-Derivate beitragen könnte. Dies soll durch einen Ersatz des Amides durch heteroaromatische Ringe, wie z.B. einem Tetrazolring erfolgen:

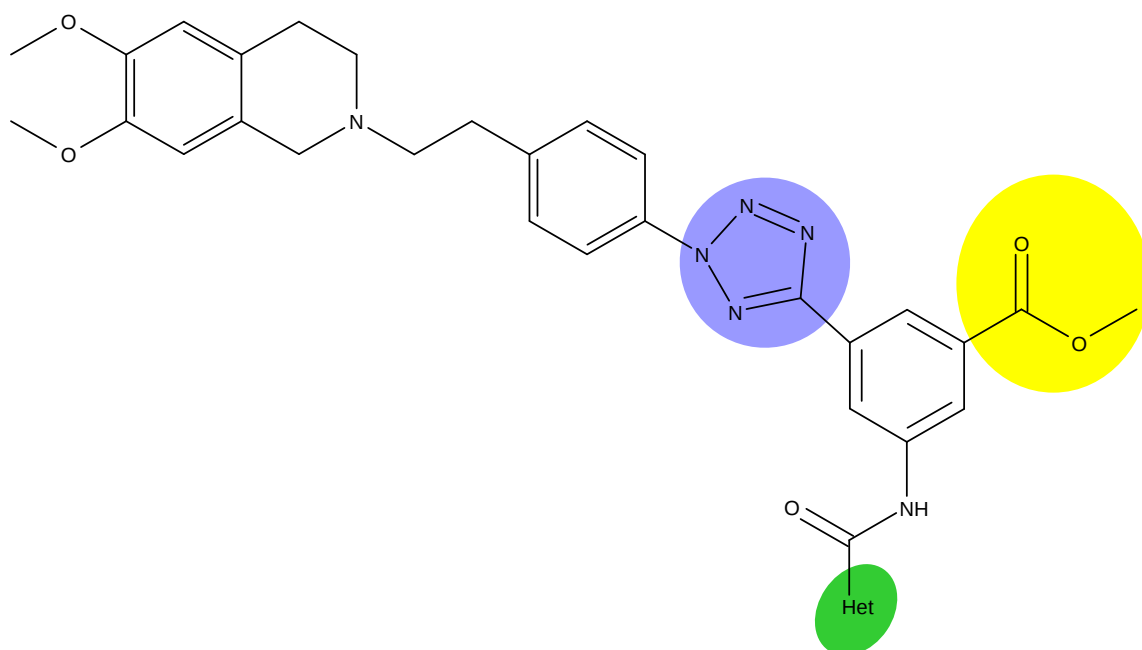
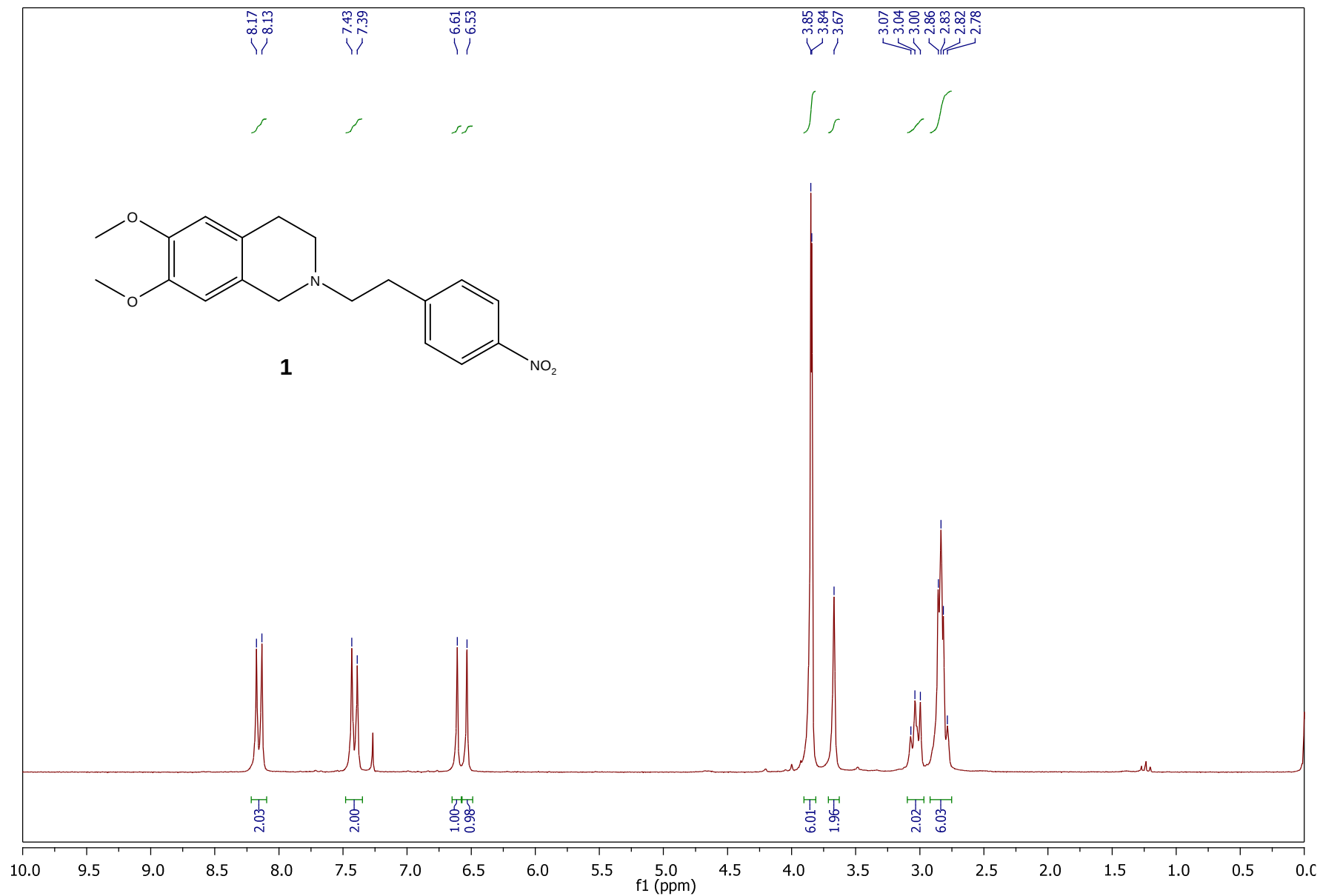


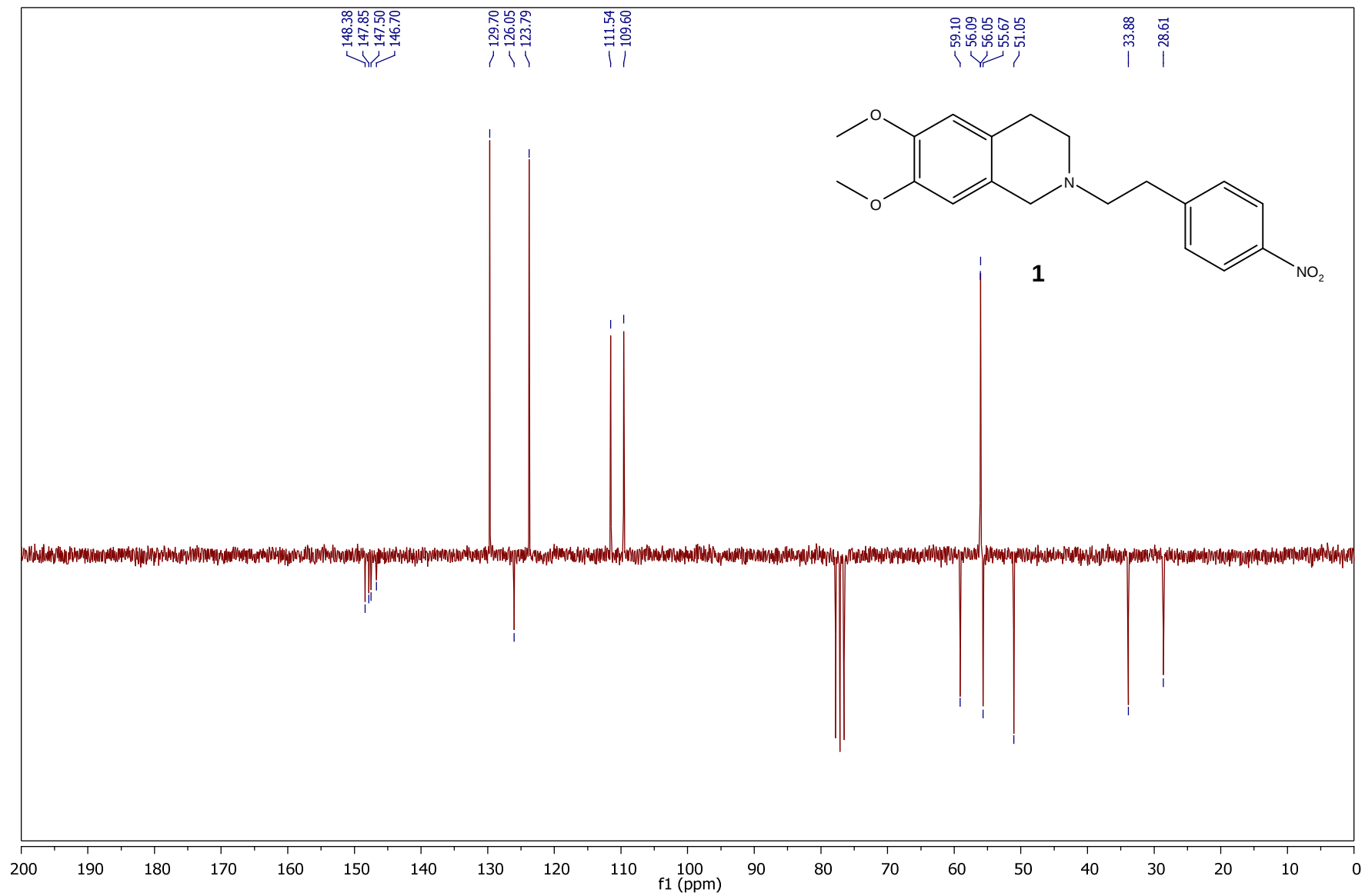
Abb.42: Mögliche Strukturmodifikation eines Tariquidar-Derivates. Das Amid als metabolische Bruchstelle könnte durch einen Tetrazolring ersetzt werden, um so die Plasmastabilität zu erhöhen.

6. Spektren

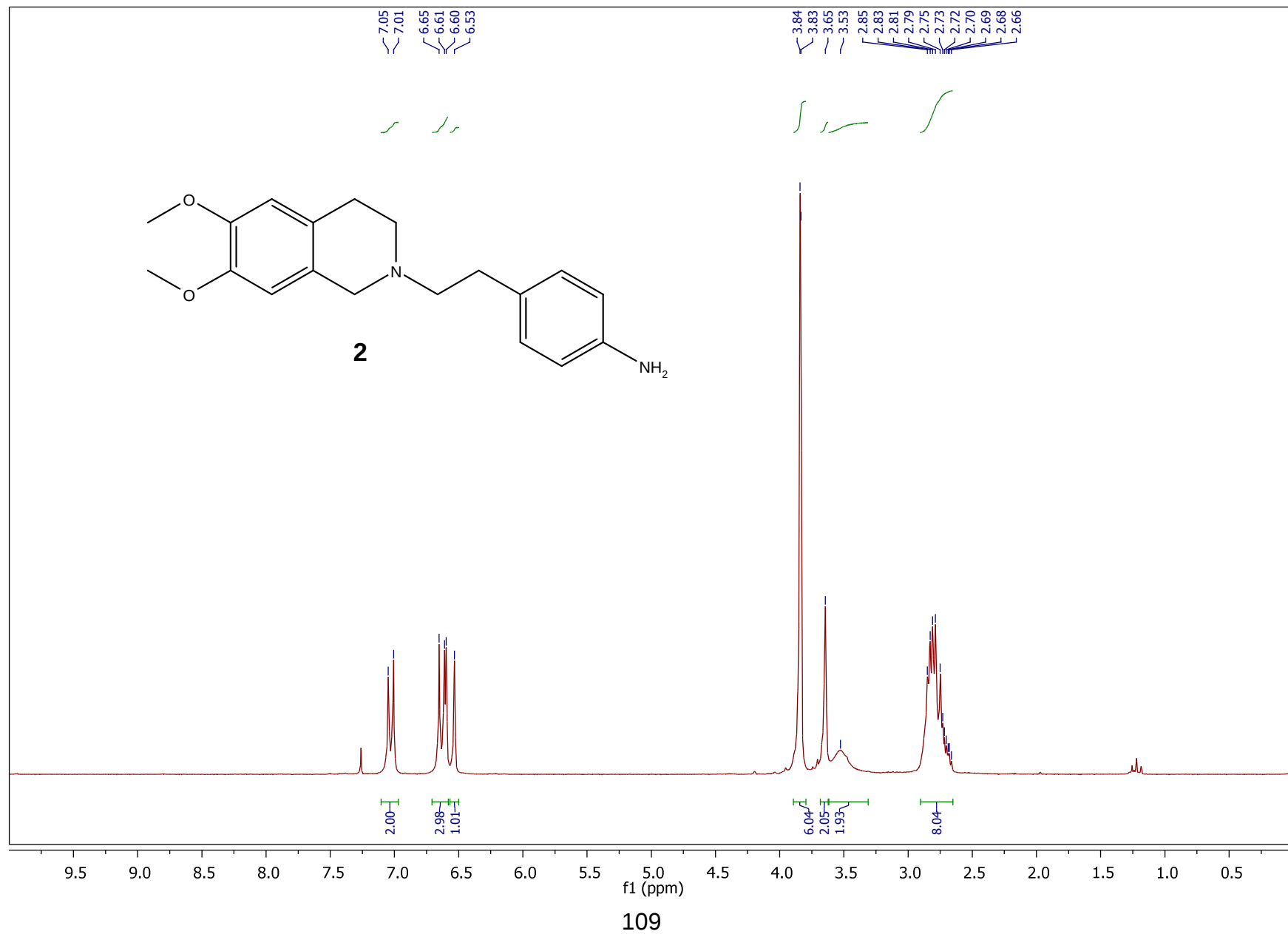
NMR 1, Verbindung 1 (ATH1x), ¹H-NMR (200 MHz, CDCl₃)



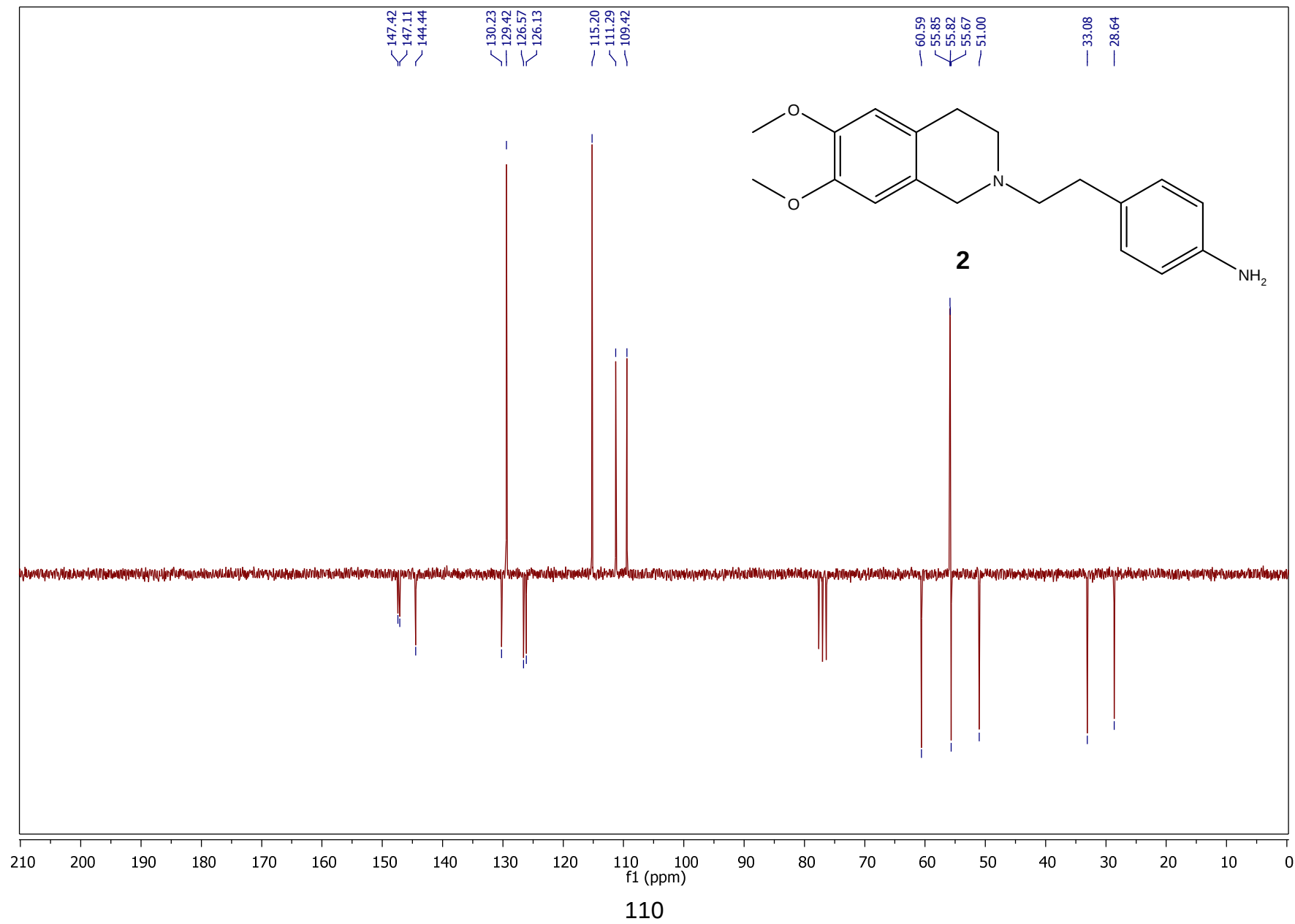
NMR 2, Verbindung 1 (ATH1x), ^{13}C -NMR (50 MHz, CDCl_3)



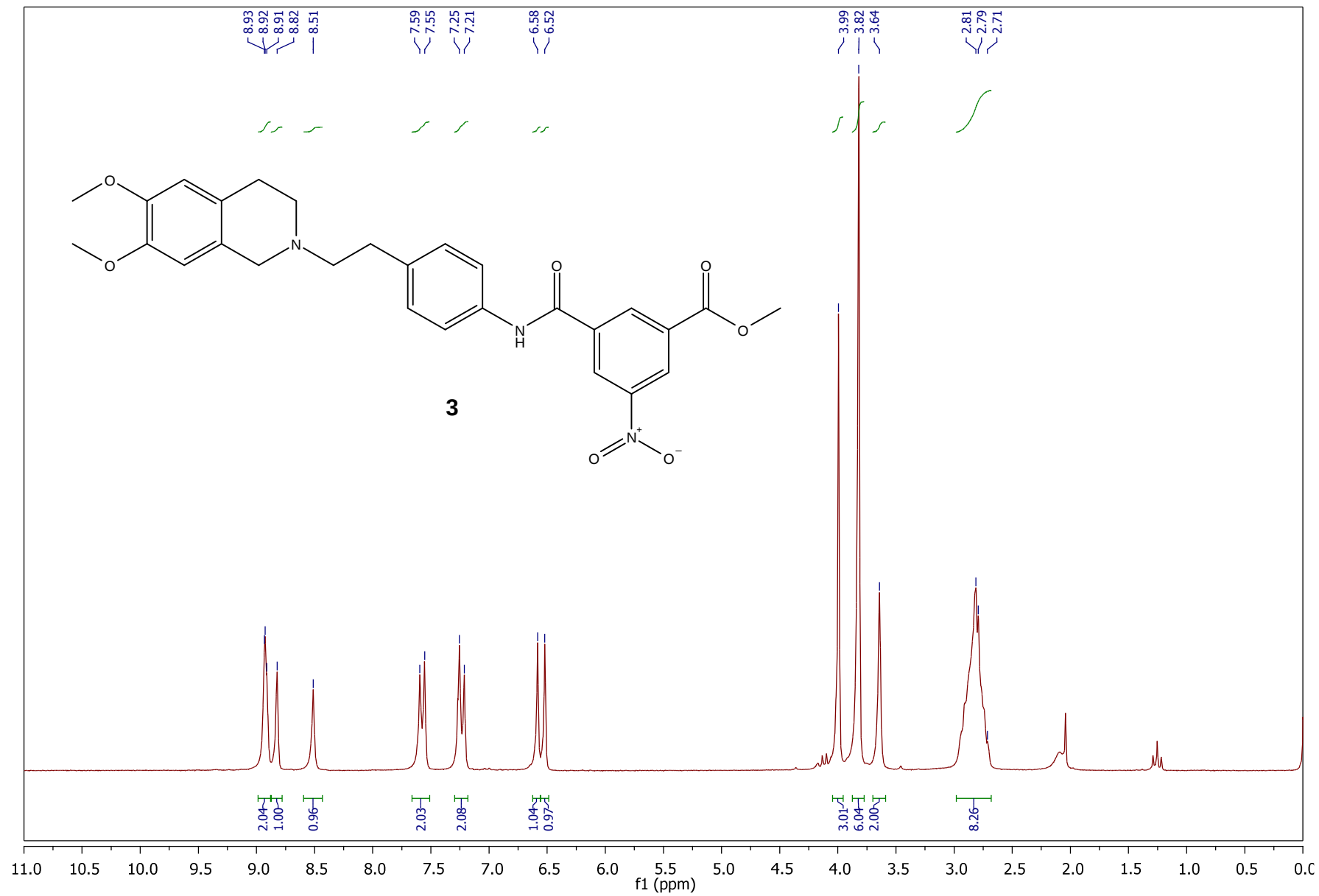
NMR 3, Verbindung 2 (ATH2x), ¹H-NMR (200 MHz, CDCl₃)



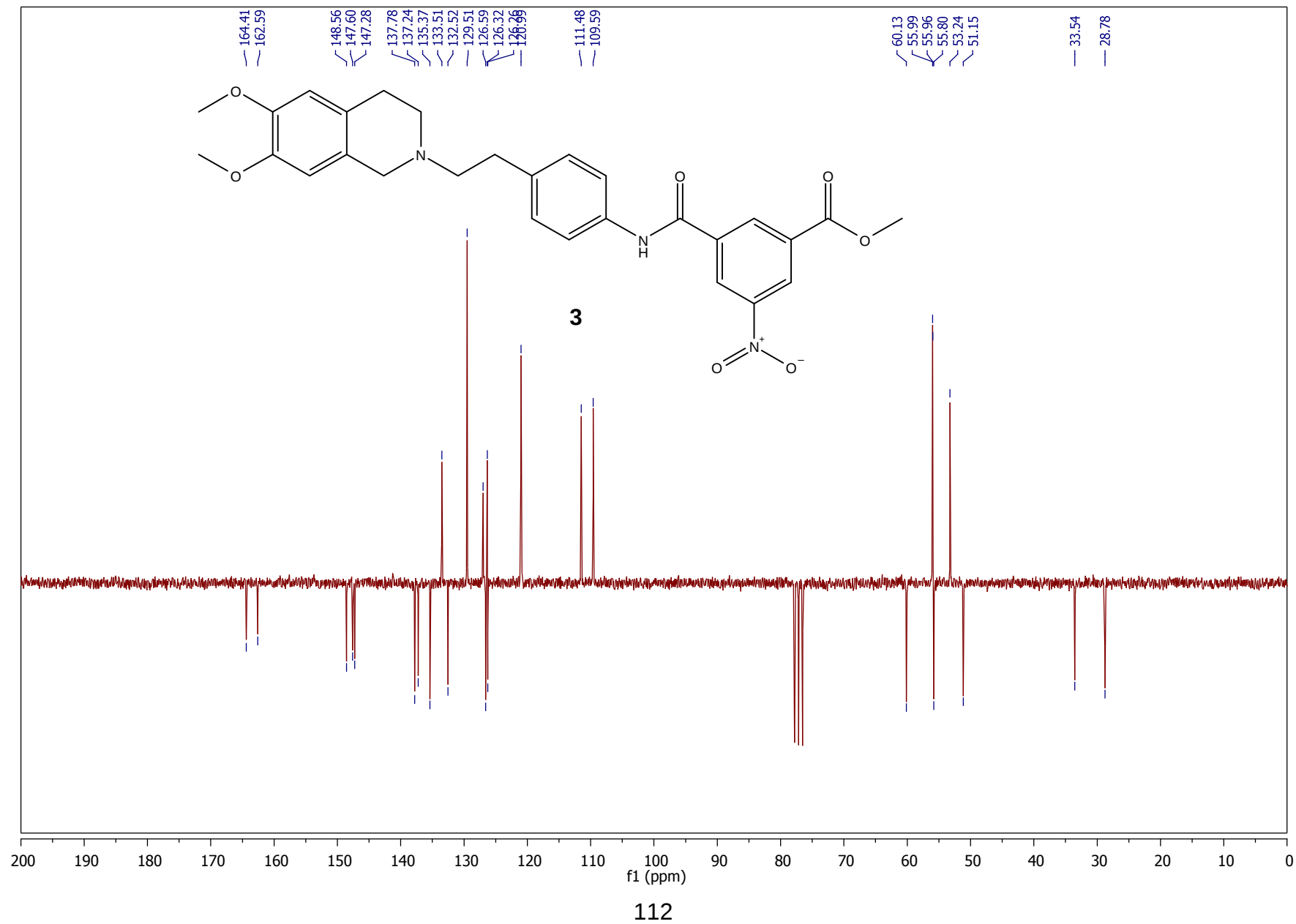
NMR 4, Verbindung 2 (ATH2x), ¹³C-NMR (50 MHz, CDCl₃)



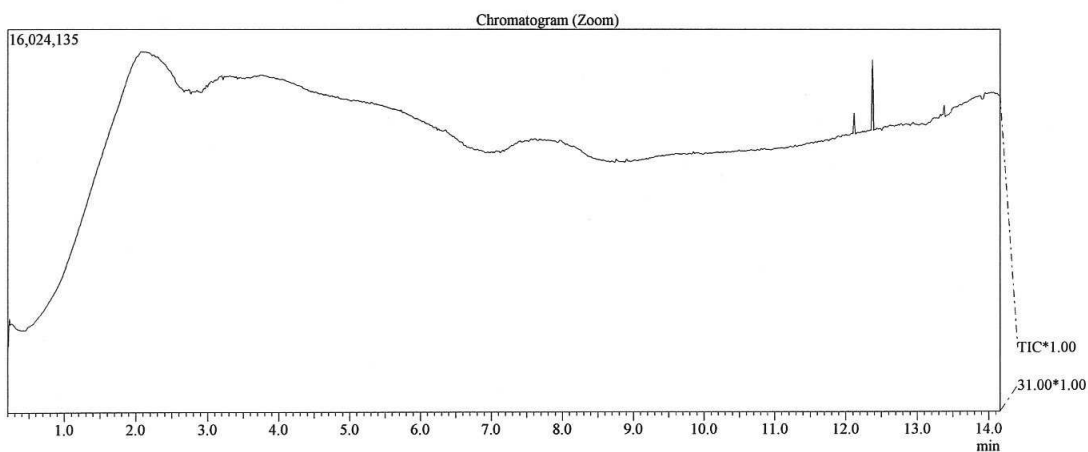
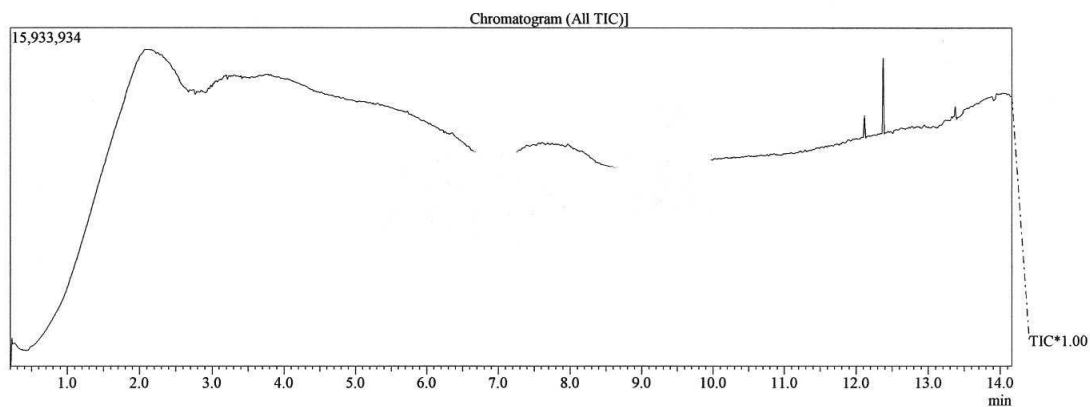
NMR 5, Verbindung 3 (TAR5), ¹H-NMR (200 MHz, CDCl₃)



NMR 6, Verbindung 3 (TAR5), ¹³C-NMR (50 MHz, CDCl₃)

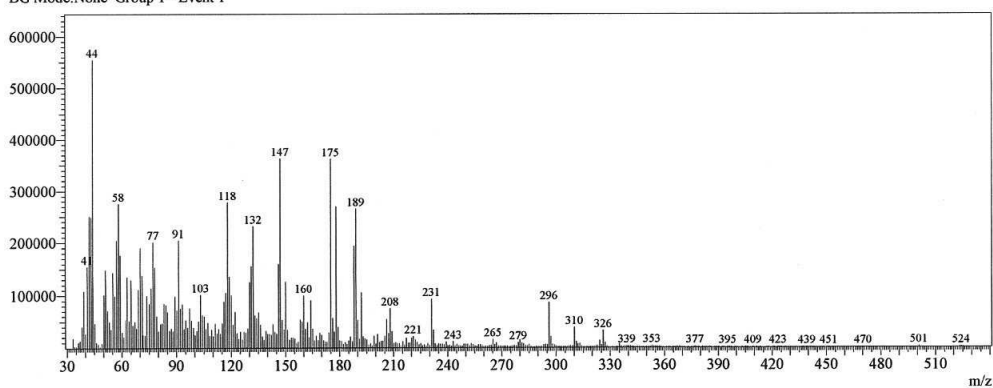


C:\GCMSsolution\Data\tar5.QGD



Spectrum

Line#:1 R.Time:14.142(Scan#:1674)
MassPeaks:387
RawMode:Single 14.142(1674) BasePeak:44.10(555193)
BG Mode:None Group 1 - Event 1

**MS 1, Verbindung 3 (TAR5)**

Display Report

Analysis Info

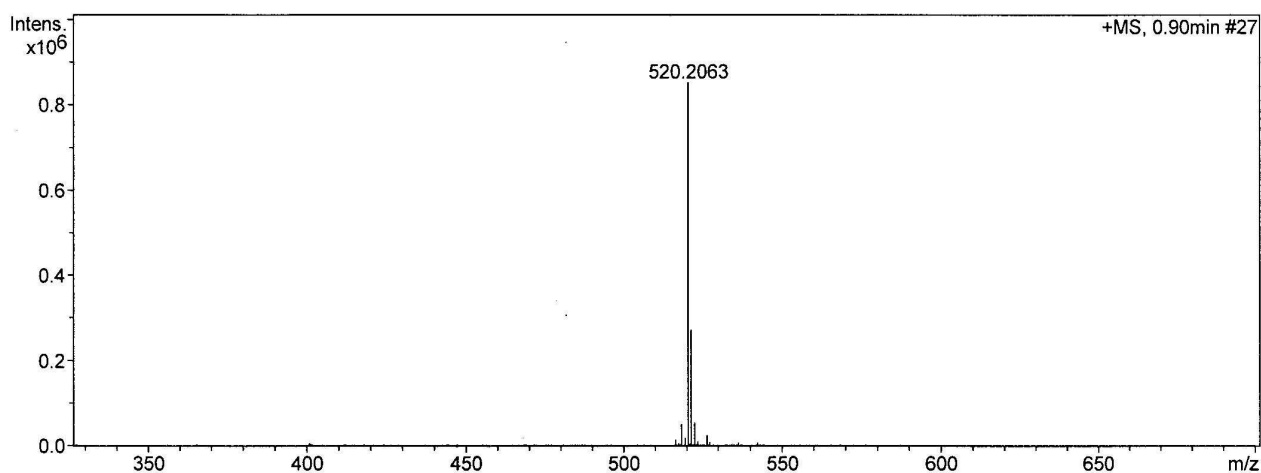
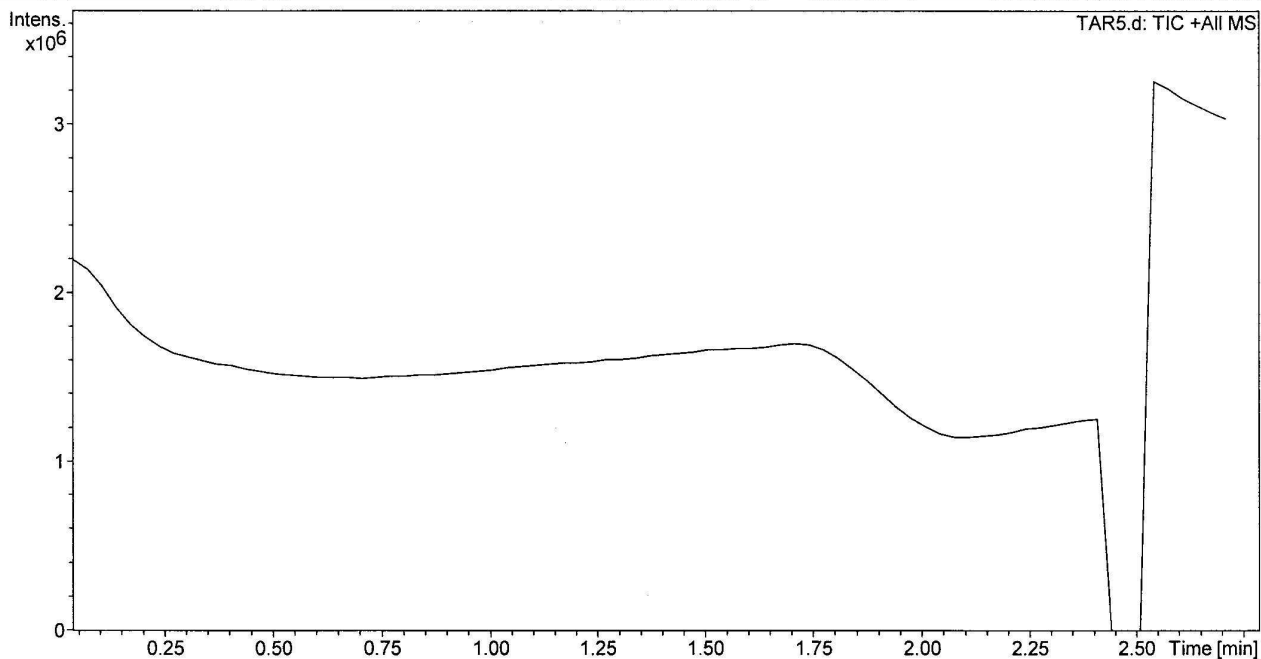
Analysis Name D:\Data\SAH\Extern\Gruppe Erker\Arzt\TAR5.d
Method Substanzen_pos.m
Sample Name TAR5
Comment

Acquisition Date 9/7/2011 12:01:50 PM

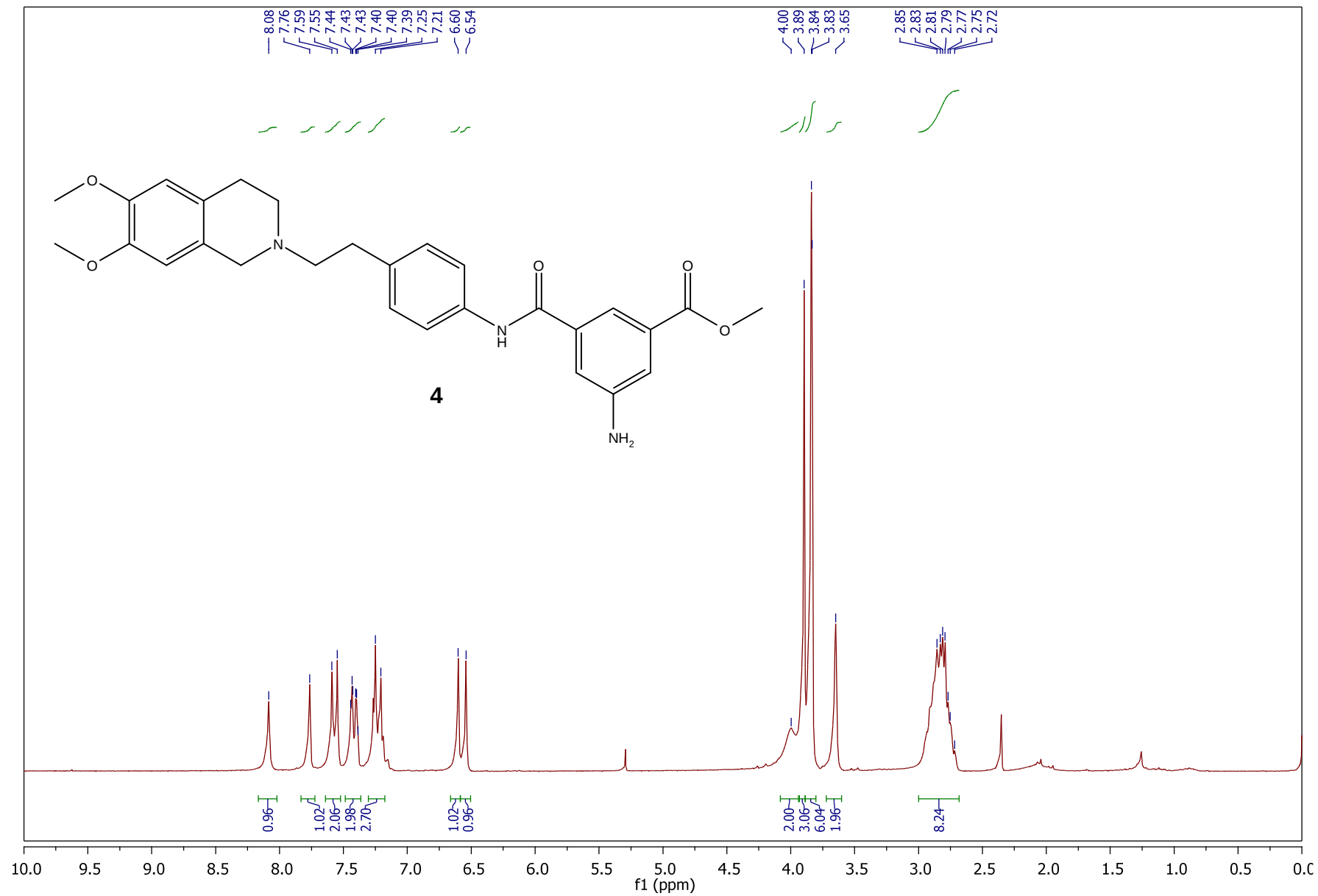
Operator JFI
Instrument micrOTOF-Q II 10240

Acquisition Parameter

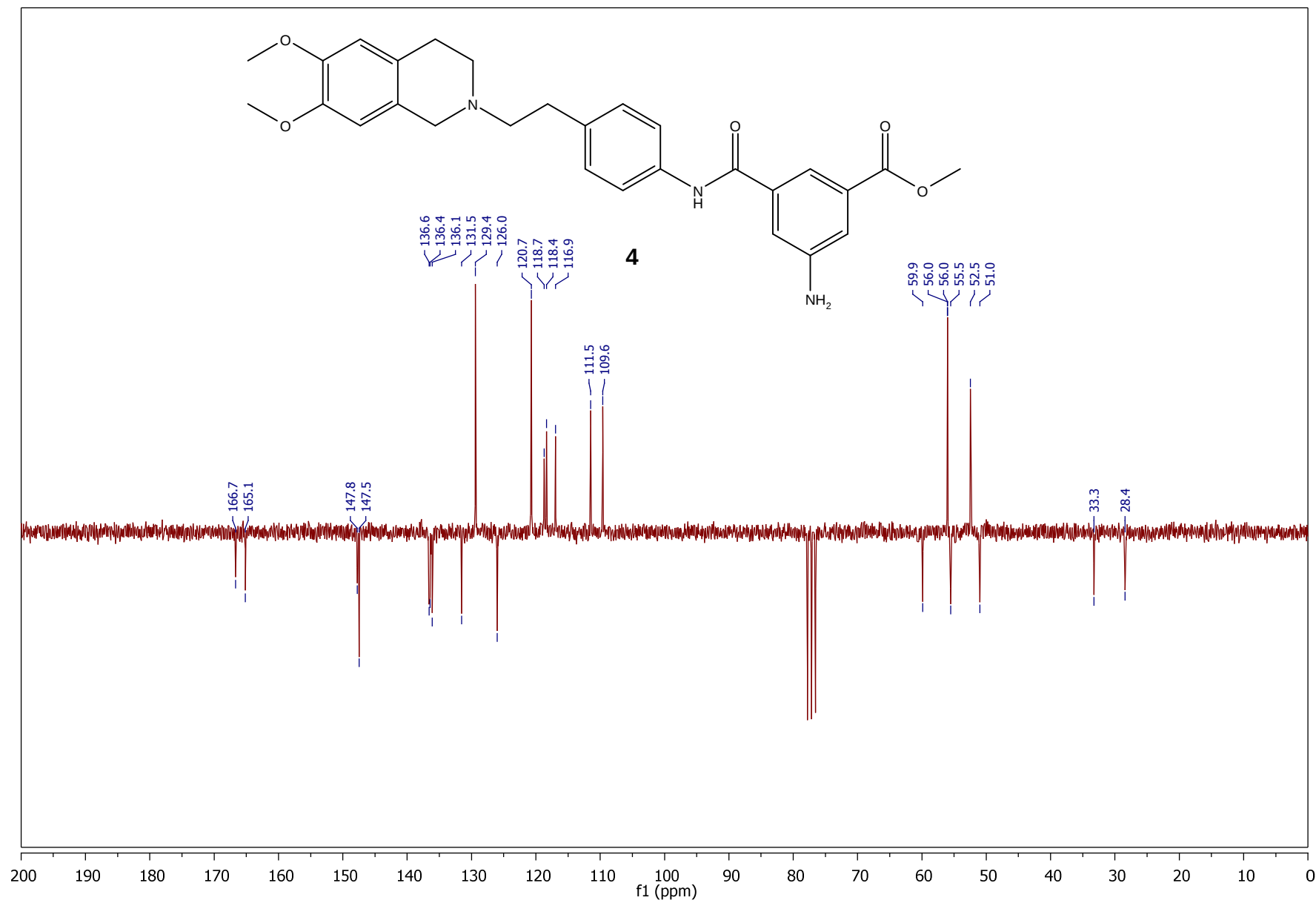
Source Type	ESI	Ion Polarity	Positive	Set Nebulizer	0.4 Bar
Focus	Not active	Set Capillary	4500 V	Set Dry Heater	180 °C
Scan Begin	150 m/z	Set End Plate Offset	-500 V	Set Dry Gas	4.0 l/min
Scan End	700 m/z	Set Collision Cell RF	150.0 Vpp	Set Divert Valve	Waste



NMR 7, Verbindung 4 (TAR6), ^1H -NMR (200 MHz, CDCl_3)



NMR 8, Verbindung 4 (TAR6), ^{13}C -NMR (50 MHz, CDCl_3)



Display Report

Analysis Info

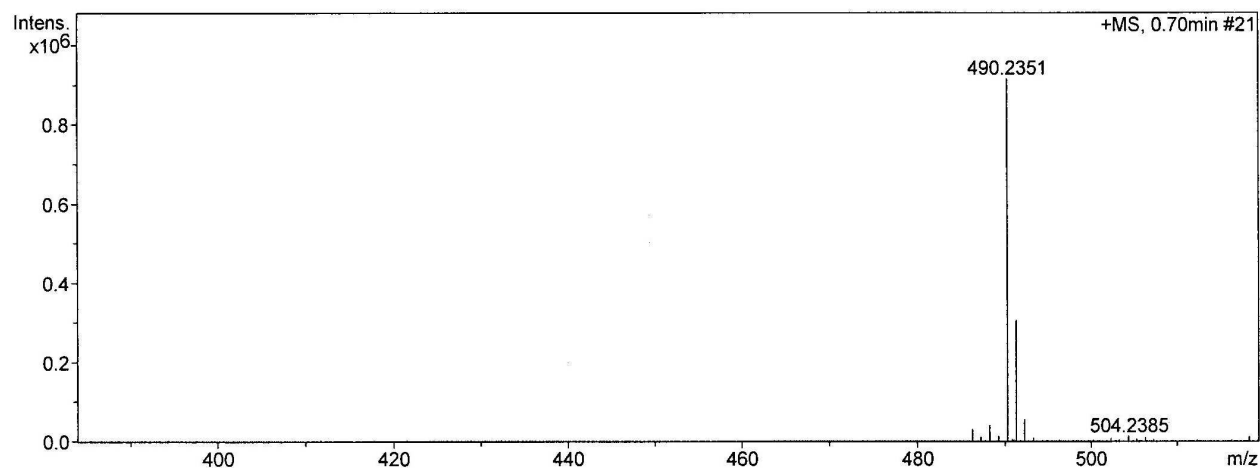
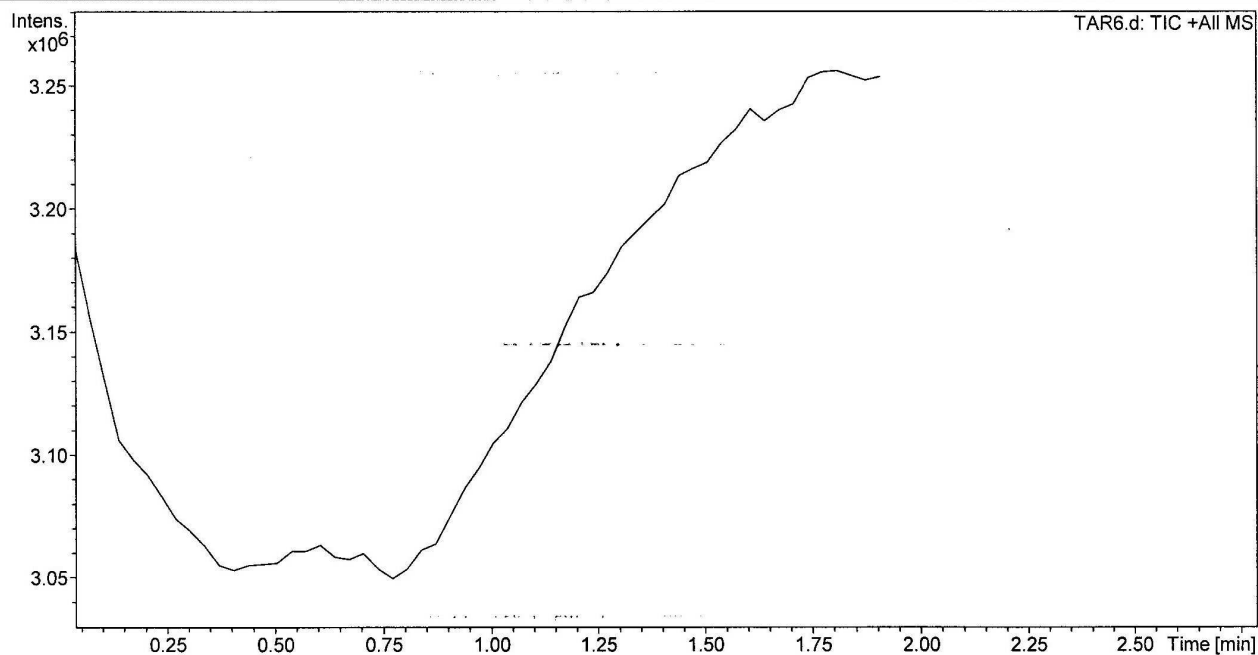
Analysis Name D:\Data\SAH\Extern\Gruppe Erker\Arzt\TAR6.d
Method Substanzen_pos.m
Sample Name TAR6
Comment

Acquisition Date 9/7/2011 12:08:42 PM

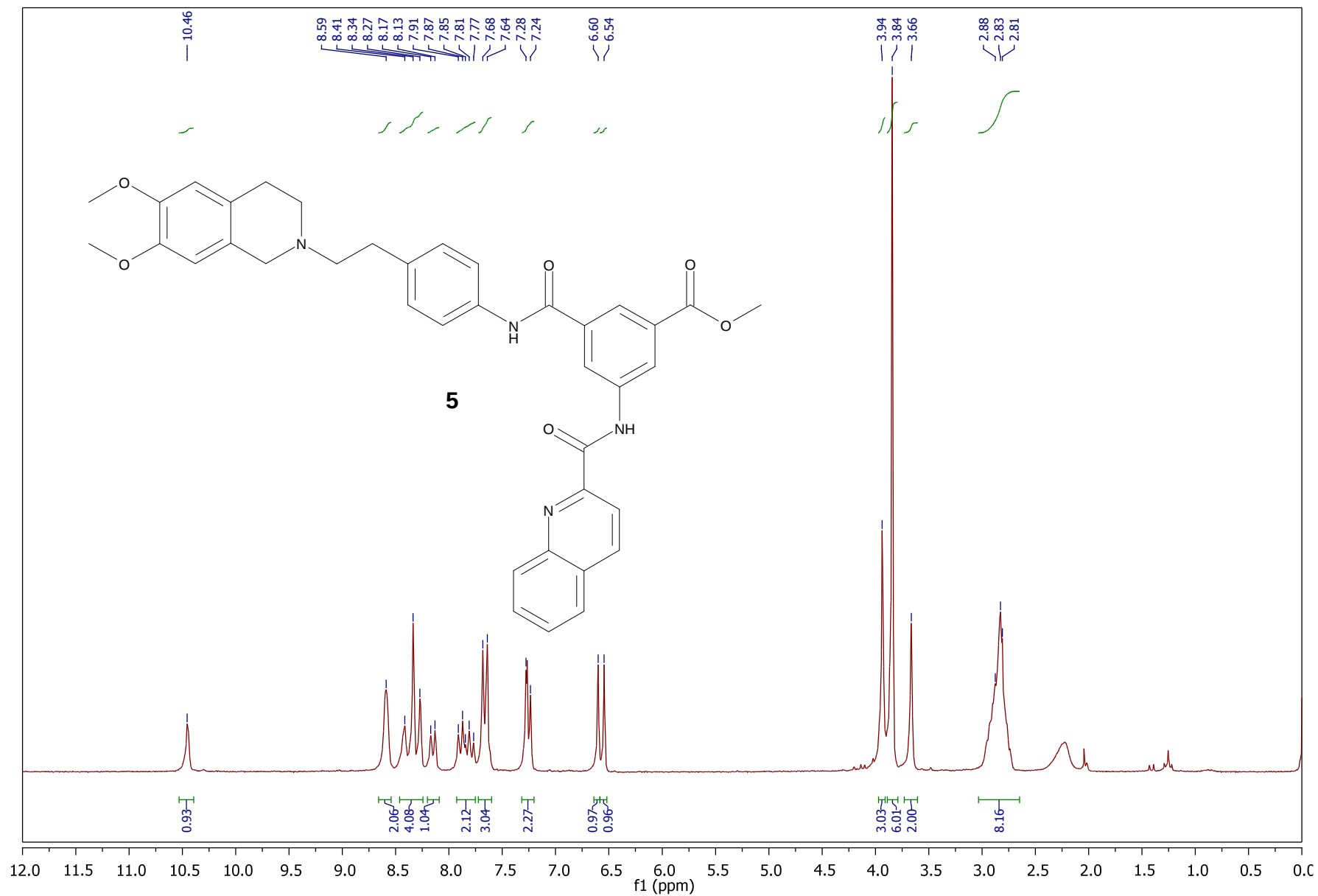
Operator JFI
Instrument micrOTOF-Q II 10240

Acquisition Parameter

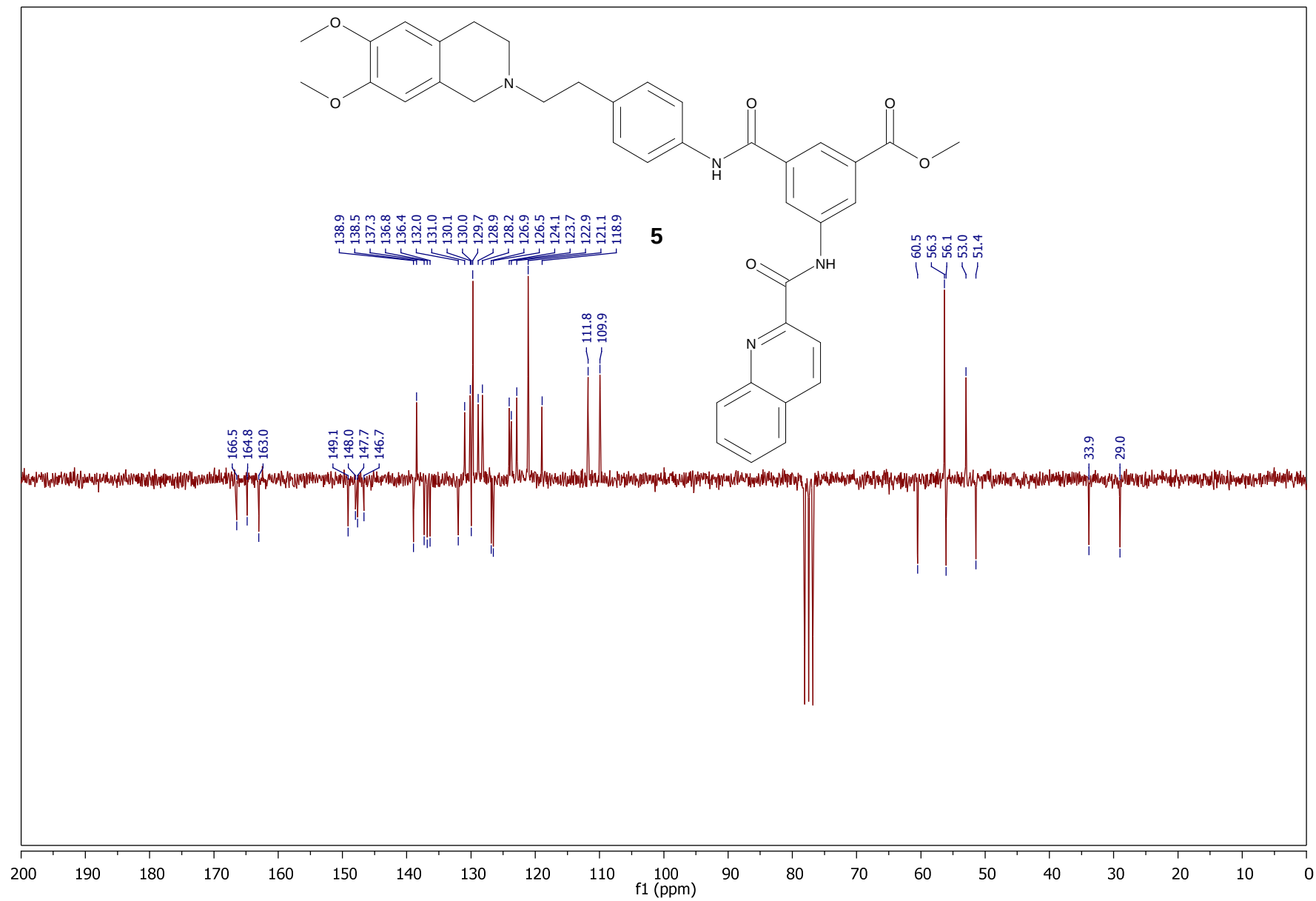
Source Type	ESI	Ion Polarity	Positive	Set Nebulizer	0.4 Bar
Focus	Not active	Set Capillary	4500 V	Set Dry Heater	180 °C
Scan Begin	150 m/z	Set End Plate Offset	-500 V	Set Dry Gas	4.0 l/min
Scan End	700 m/z	Set Collision Cell RF	150.0 Vpp	Set Divert Valve	Waste



NMR 9, Verbindung 5 (TAR7), ¹H-NMR (200 MHz, CDCl₃)



NMR 10, Verbindung 5 (TAR7), ^{13}C -NMR (50 MHz, CDCl_3)

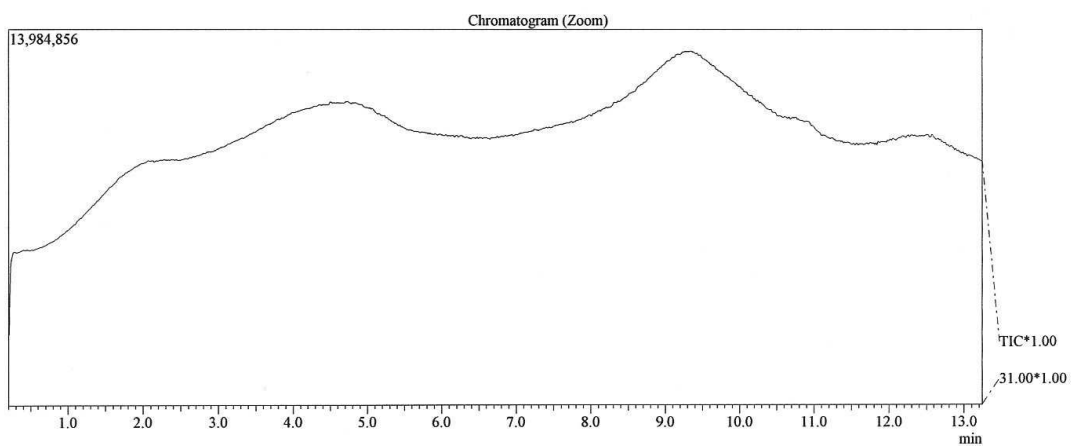
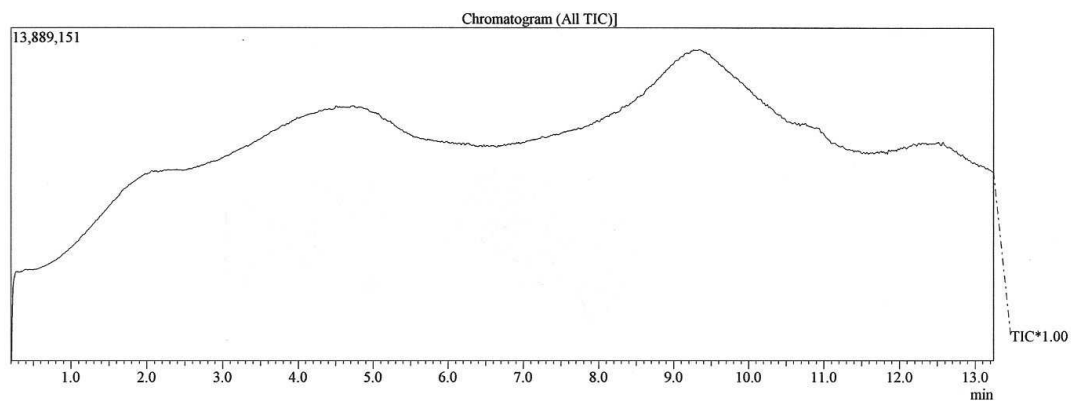


TAR7

280°C

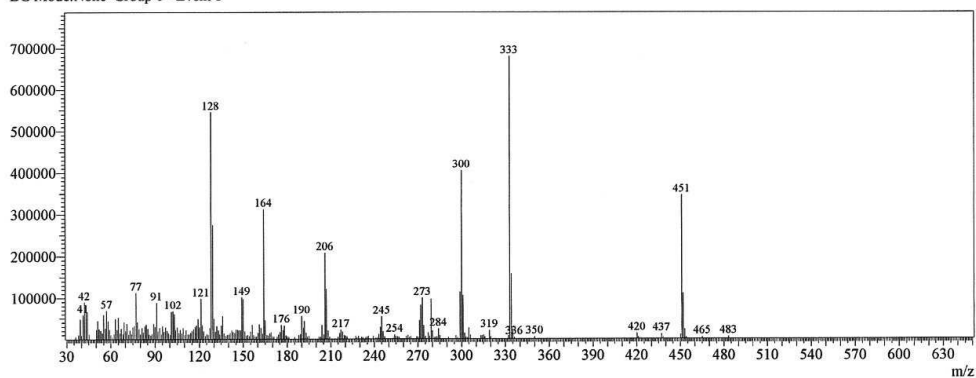
06.05.2011 14:26:26

C:\GCMSsolution\Data\tar7.QGD



Spectrum

Line#:1 R.Time:13.225(Scan#:1564)
 MassPeaks:239
 RawMode:Single 13.225(1564) BasePeak:333.05(680486)
 BG Mode:None Group 1 - Event 1



MS 2, Verbindung 5 (TAR7)

Display Report

Analysis Info

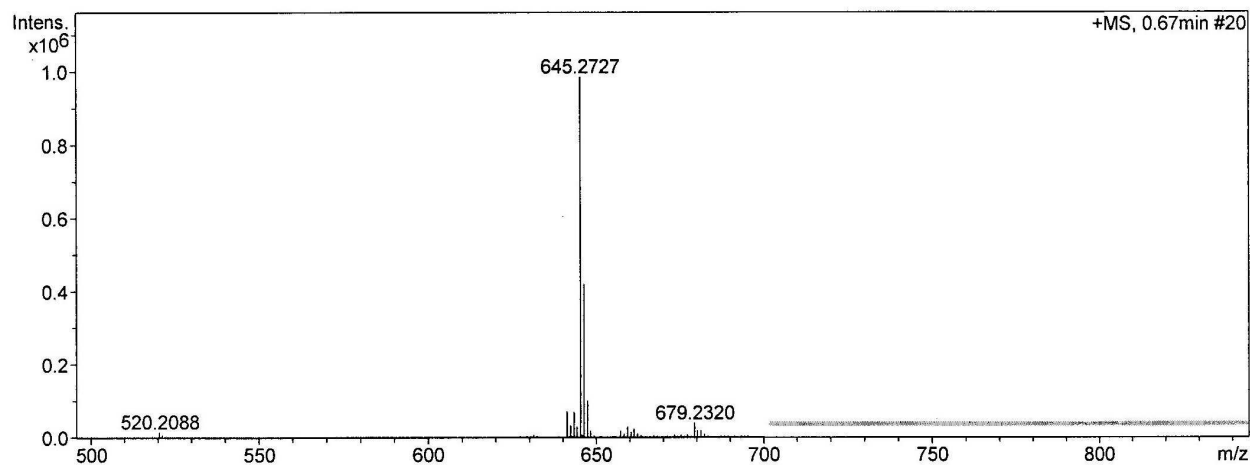
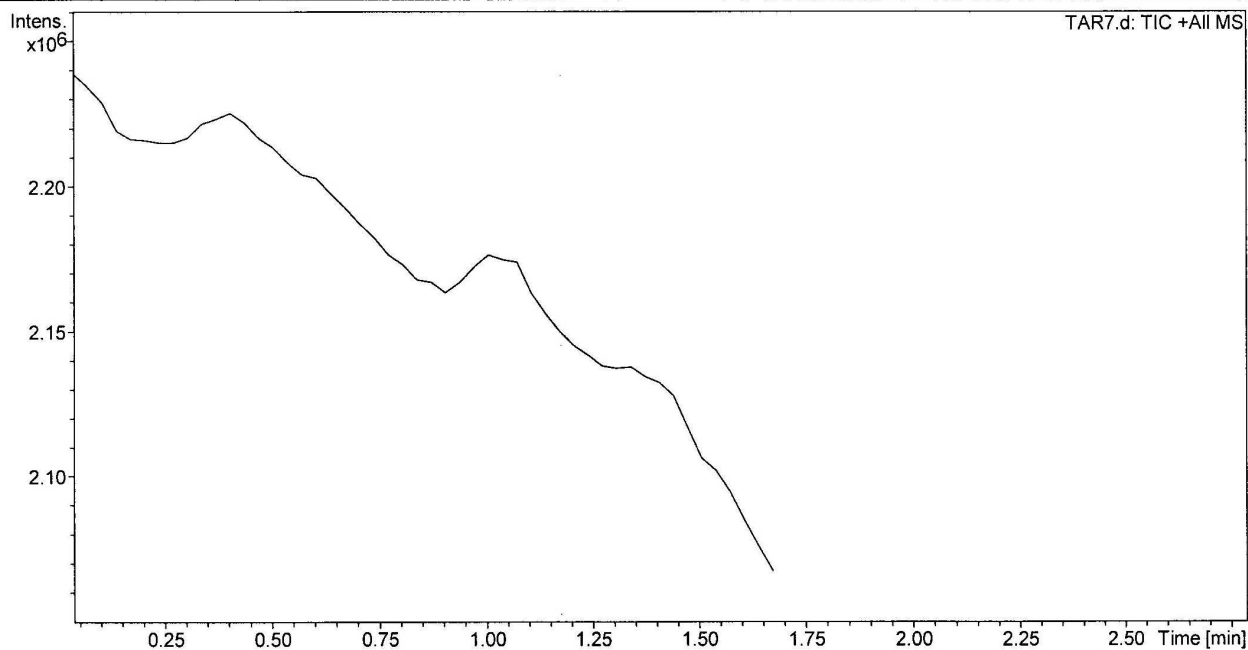
Analysis Name D:\Data\SAH\Extern\Gruppe Erker\Arzt\TAR7.d
Method Substanzen_pos.m
Sample Name TAR7
Comment

Acquisition Date 9/7/2011 12:13:02 PM

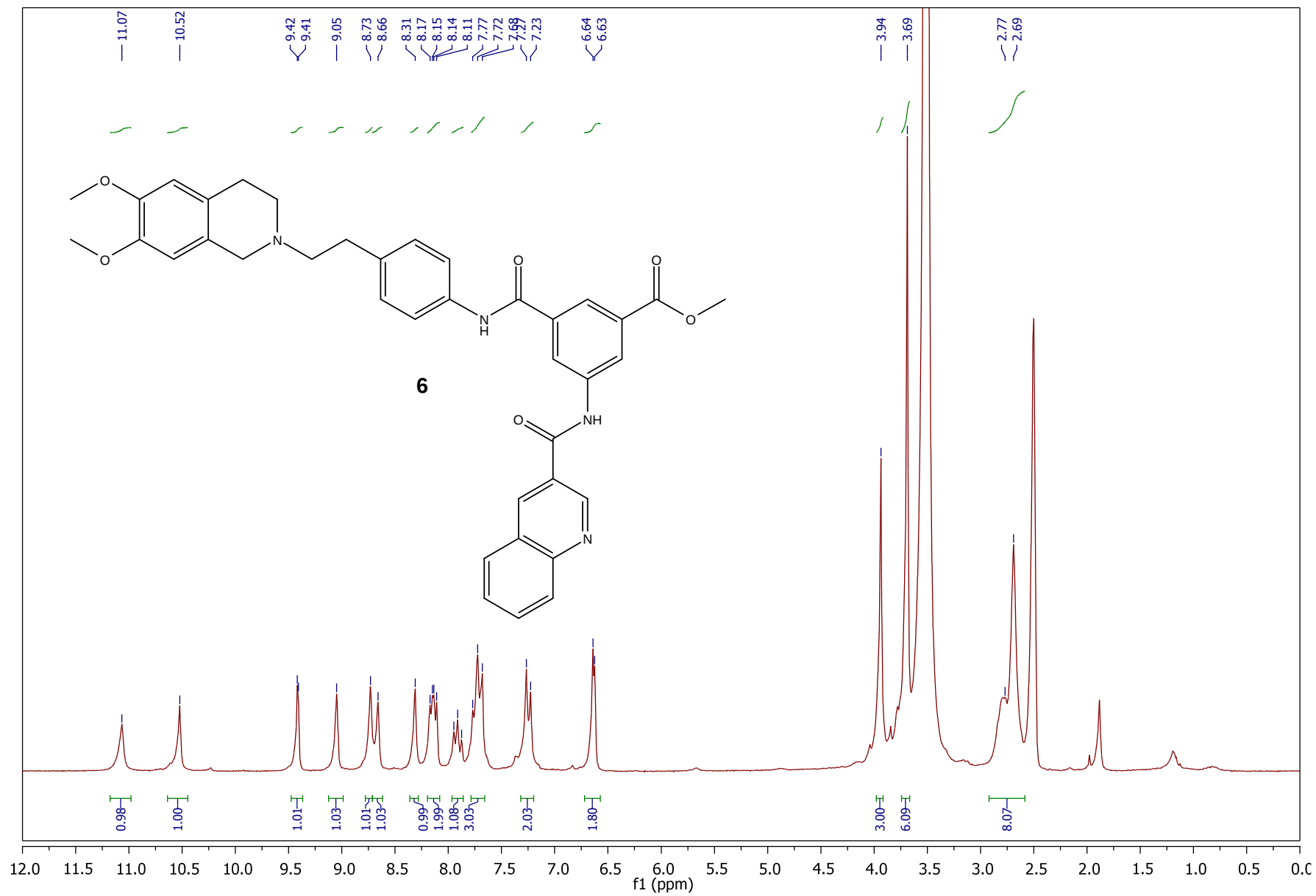
Operator JFI
Instrument microTOF-Q II 10240

Acquisition Parameter

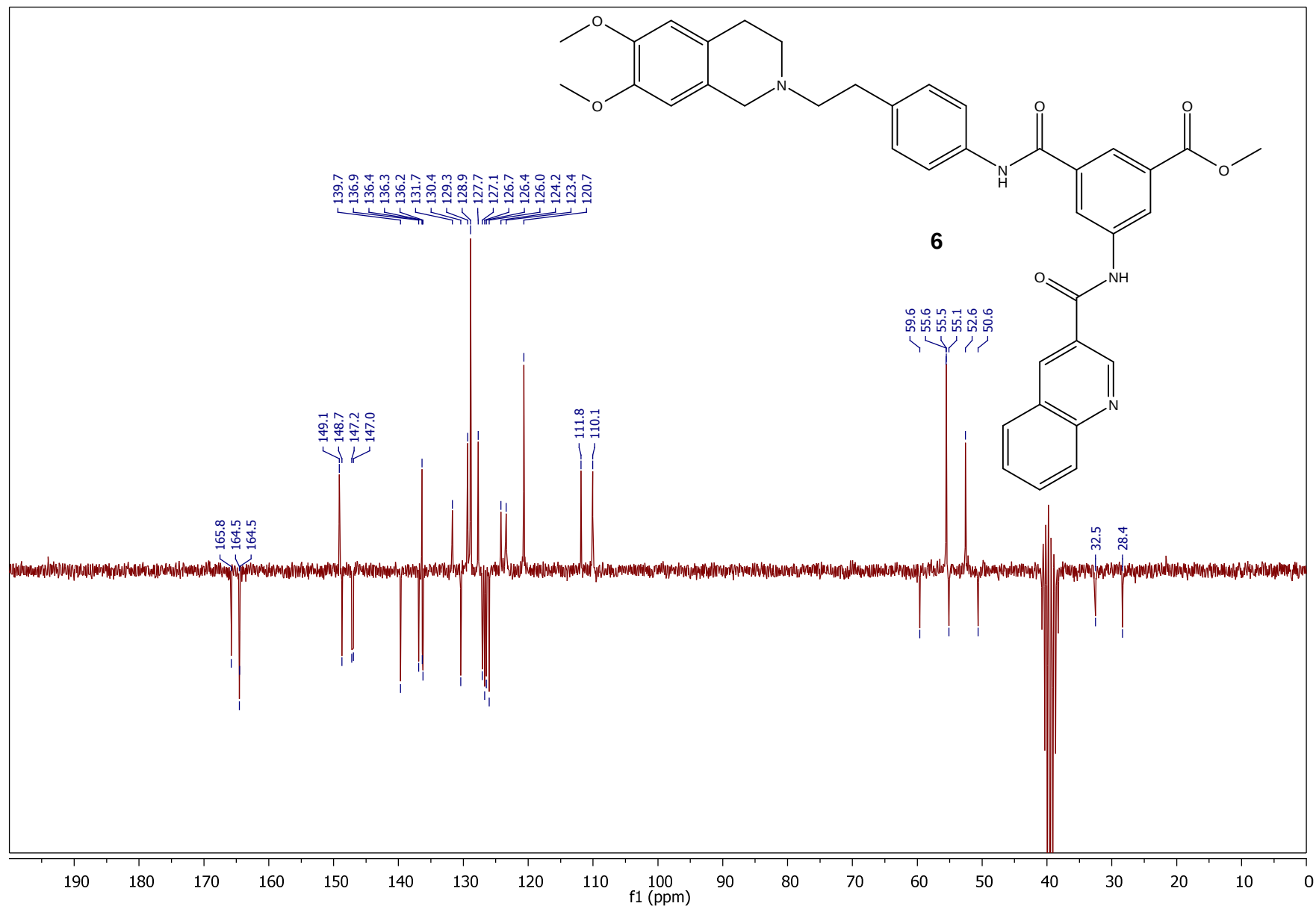
Source Type	ESI	Ion Polarity	Positive	Set Nebulizer	0.4 Bar
Focus	Not active	Set Capillary	4500 V	Set Dry Heater	180 °C
Scan Begin	150 m/z	Set End Plate Offset	-500 V	Set Dry Gas	4.0 l/min
Scan End	700 m/z	Set Collision Cell RF	150.0 Vpp	Set Divert Valve	Waste



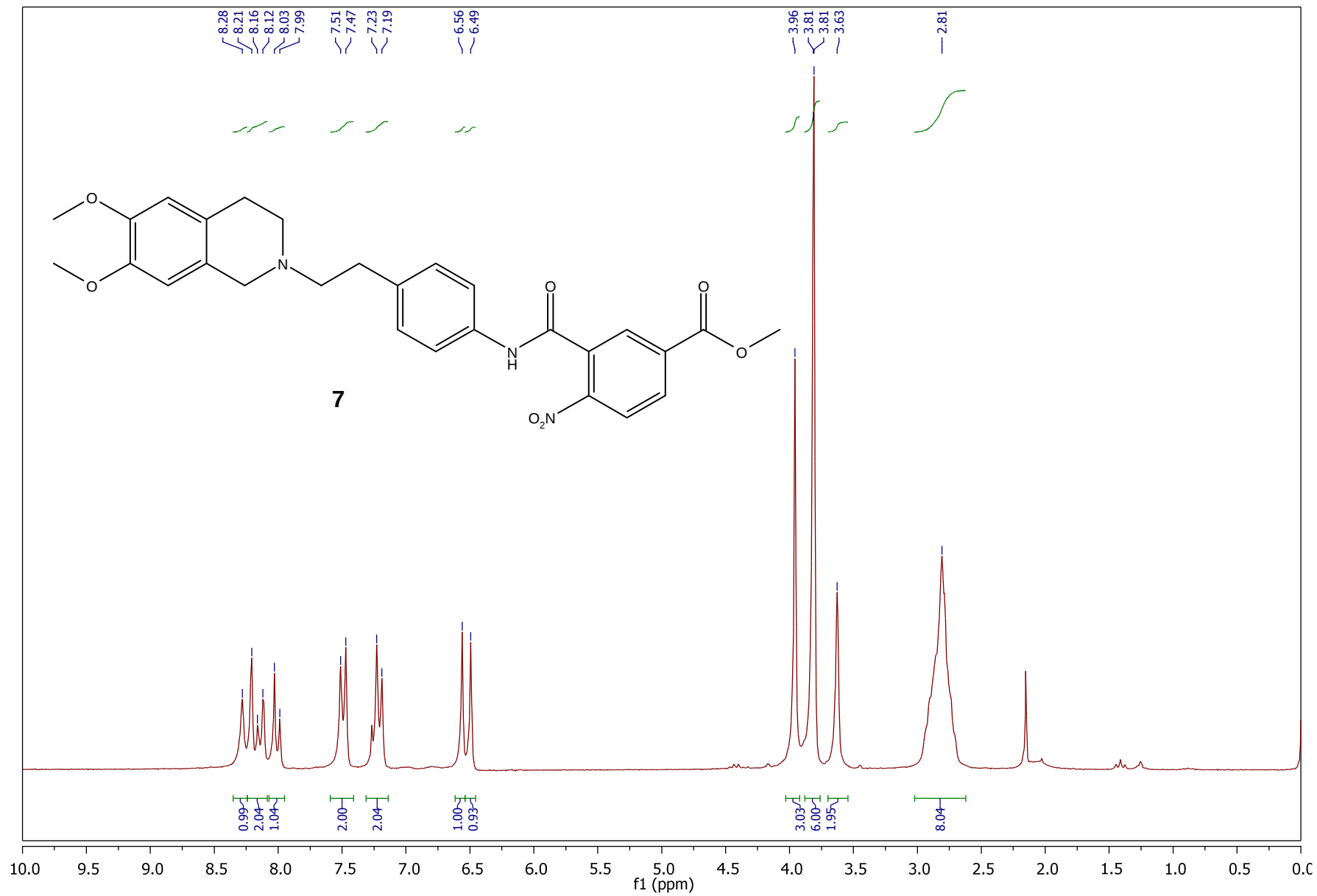
NMR 11, Verbindung 6 (TAR8), ^1H -NMR (200 MHz, d_6 -DMSO)



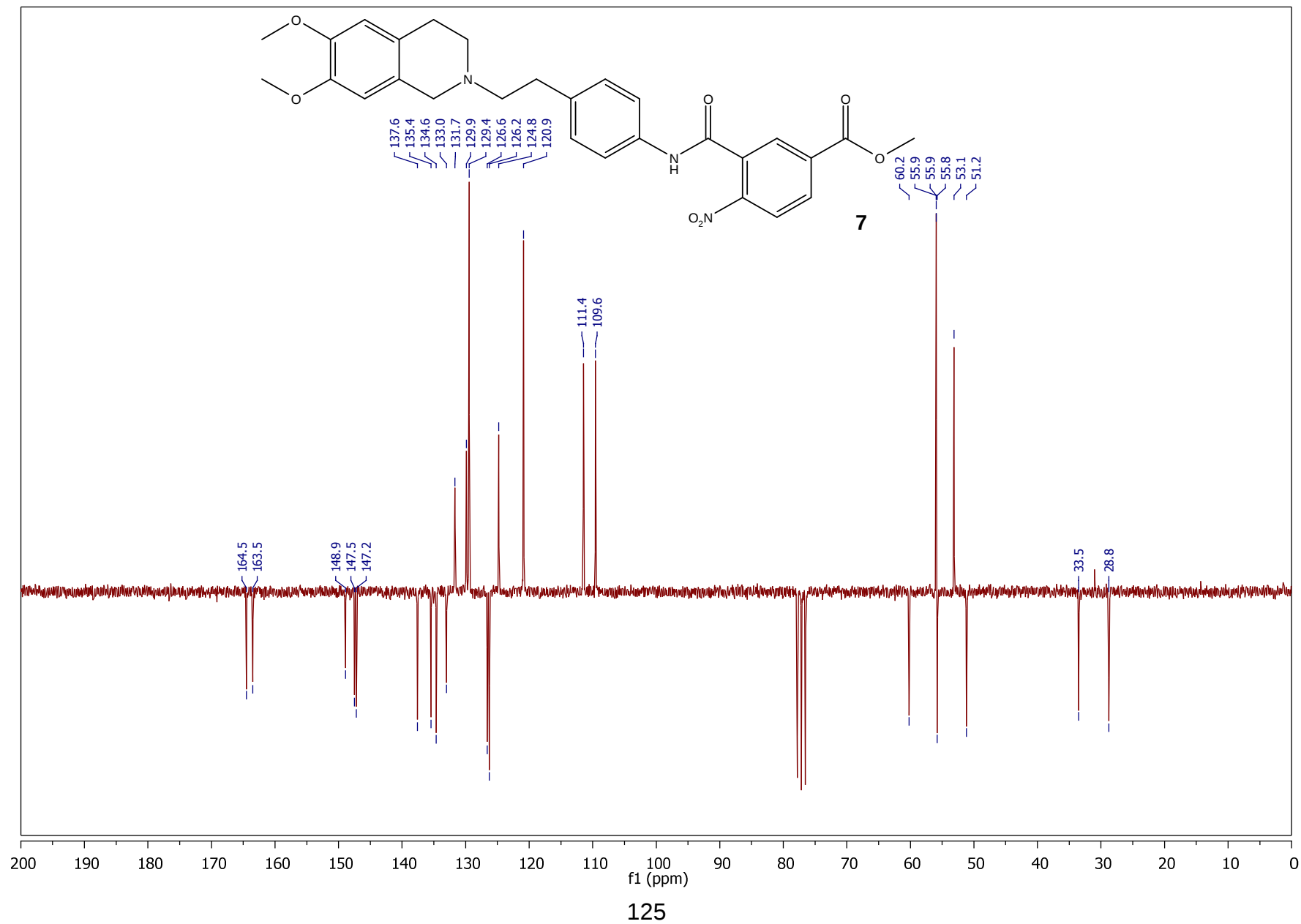
NMR 12, Verbindung 6 (TAR8), ^{13}C -NMR (50 MHz, d_6 -DMSO)



NMR 13, Verbindung 7 (TAR1), ¹H-NMR (200 MHz, CDCl₃)



NMR 14, Verbindung 7 (TAR1), ^{13}C -NMR (50 MHz, CDCl_3)

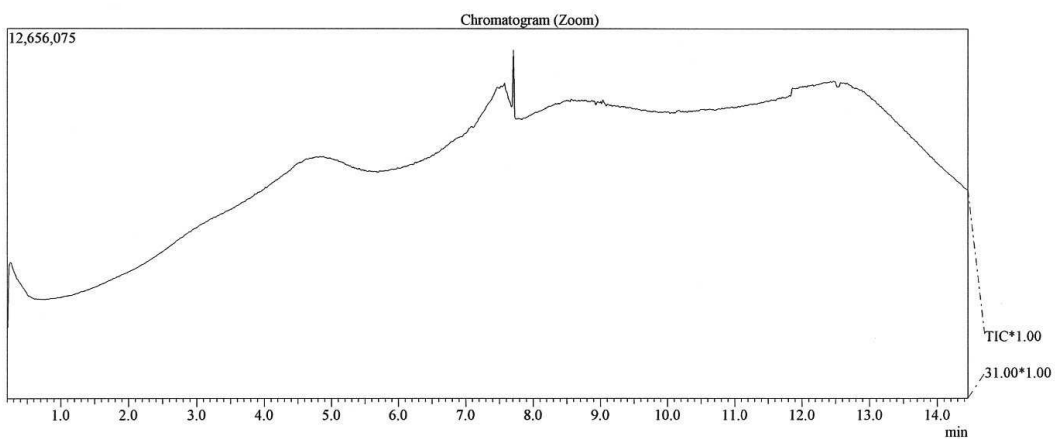
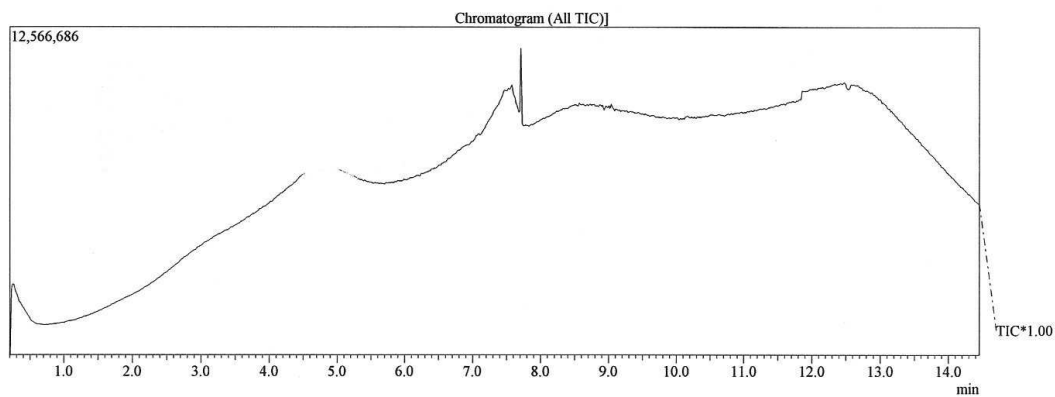


TAR1

180°C

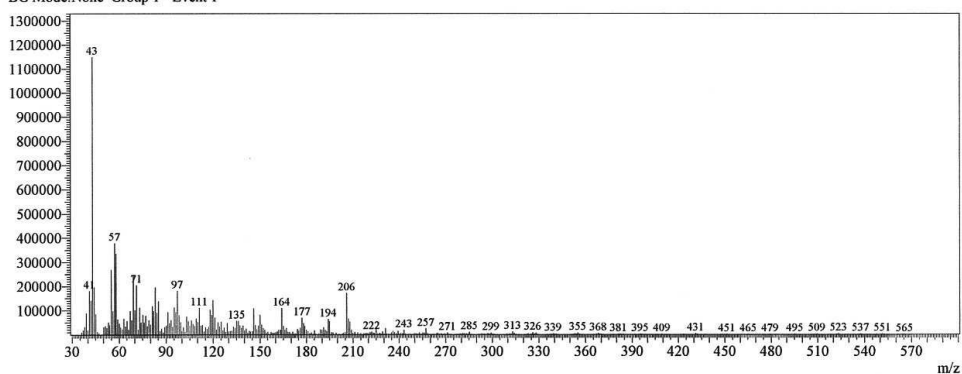
06.05.2011 12:36:44

C:\GCMSsolution\Data\tar1.QGD



Spectrum

Line#:1 R.Time:7.558(Scan#:884)
 MassPeaks:334
 RawMode:Single 7.558(884) BasePeak:43.10(1149521)
 BG Mode:None Group 1 - Event 1



MS 3, Verbindung 7 (TAR1)

Display Report

Analysis Info

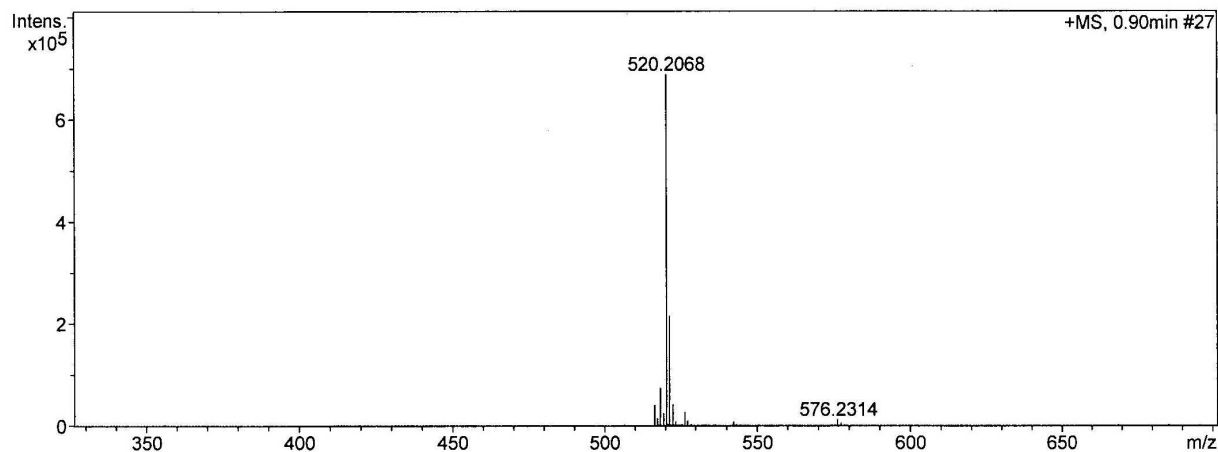
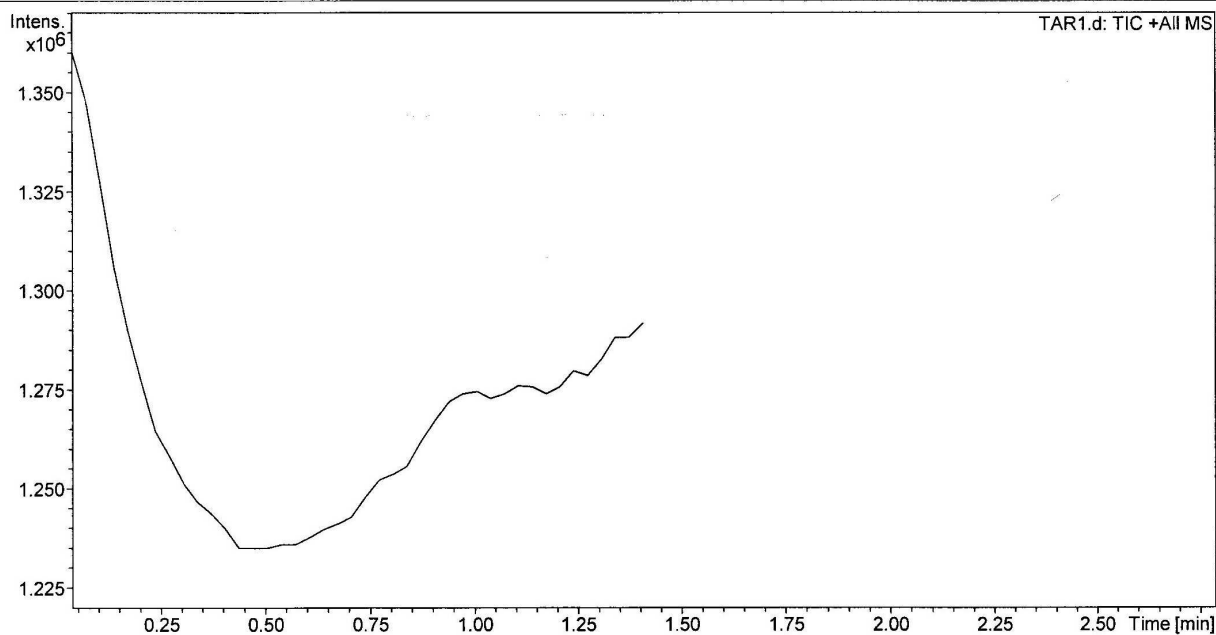
Analysis Name D:\Data\SAH\Extern\Gruppe Erker\Arzt\TAR1.d
Method Substanzen_pos.m
Sample Name TAR1
Comment

Acquisition Date 9/7/2011 11:57:53 AM

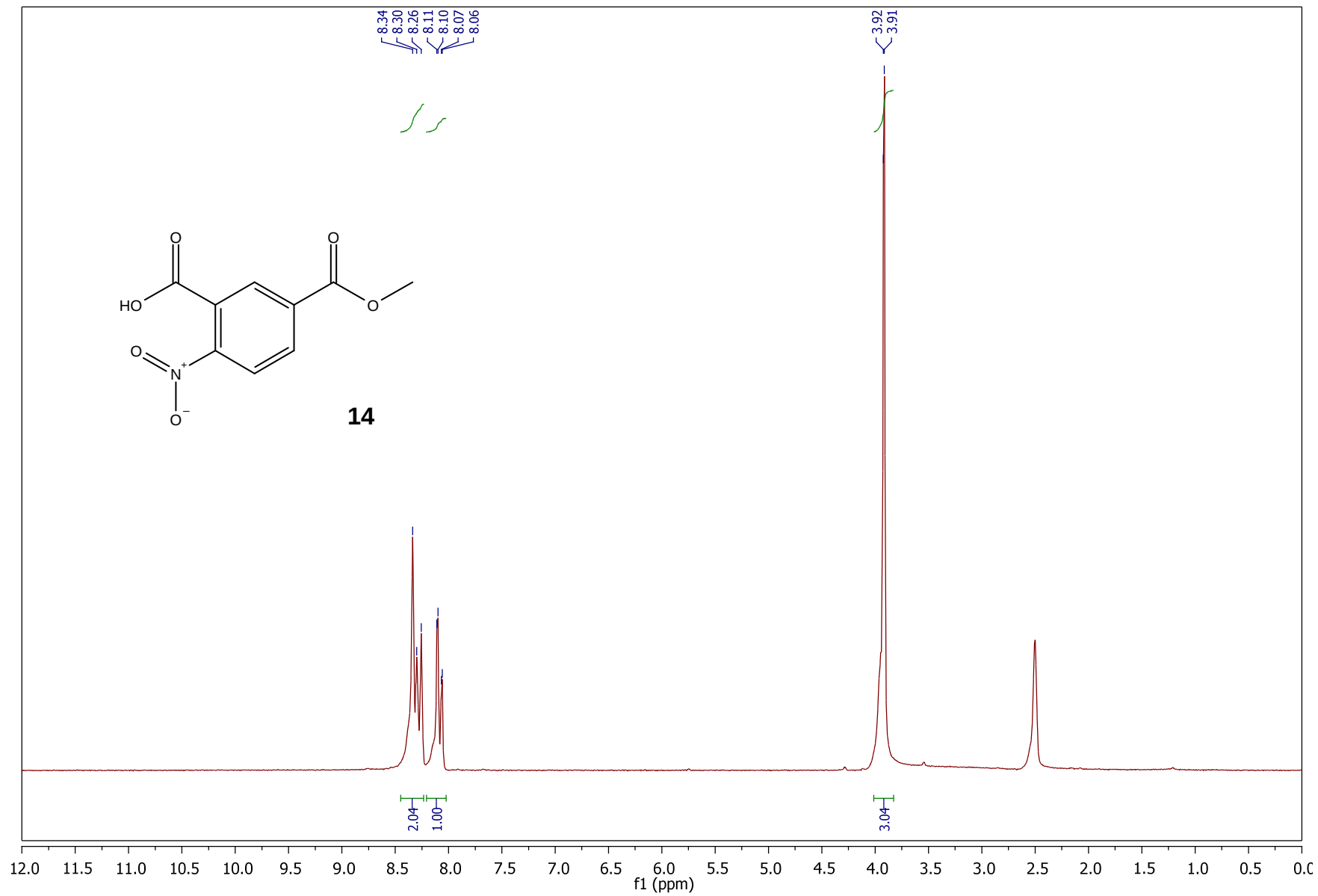
Operator JFI
Instrument micrOTOF-Q II 10240

Acquisition Parameter

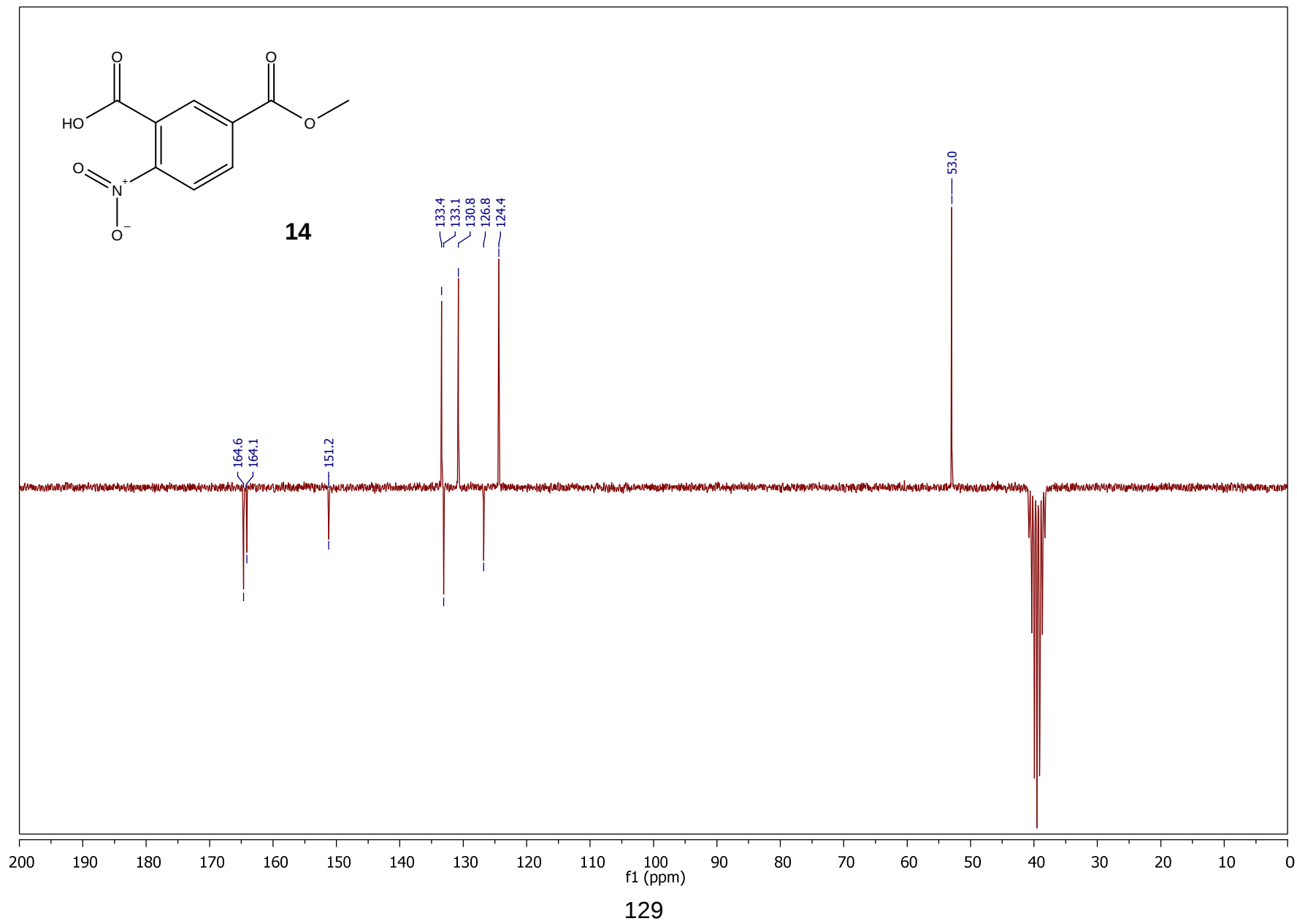
Source Type	ESI	Ion Polarity	Positive	Set Nebulizer	0.4 Bar
Focus	Not active	Set Capillary	4500 V	Set Dry Heater	180 °C
Scan Begin	150 m/z	Set End Plate Offset	-500 V	Set Dry Gas	4.0 l/min
Scan End	700 m/z	Set Collision Cell RF	150.0 Vpp	Set Divert Valve	Waste



NMR 15, Verbindung 14 (TAR9), ¹H-NMR (200 MHz, d₆-DMSO)



NMR 16, Verbindung 14 (TAR9), ^{13}C -NMR (50 MHz, d_6 -DMSO)

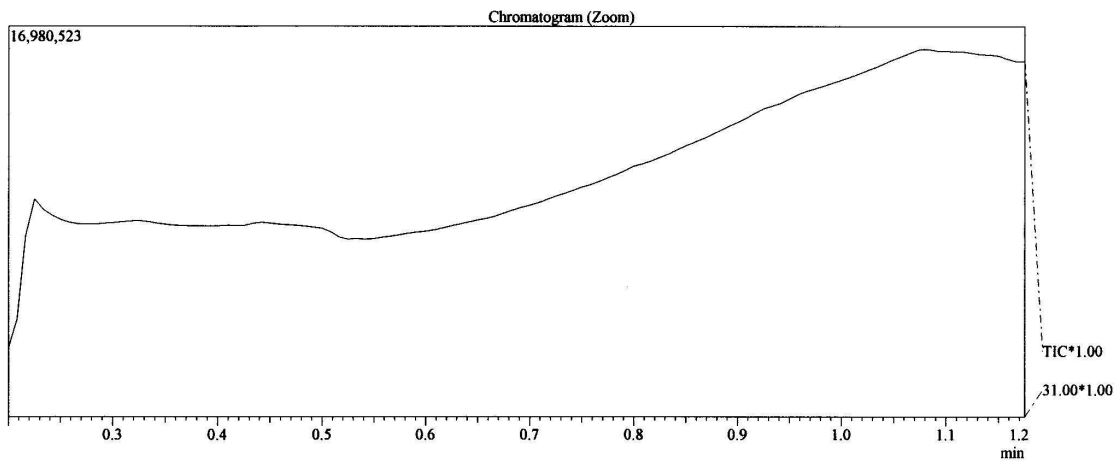
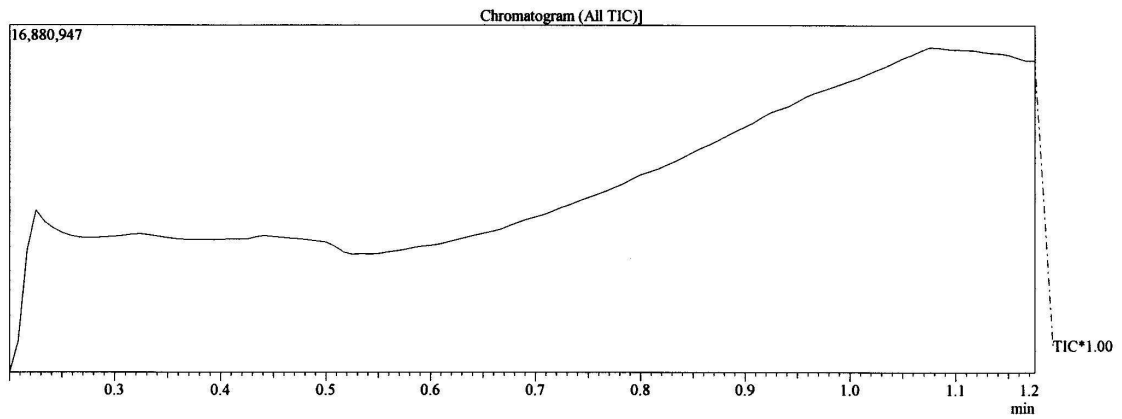


TAR9

50°C

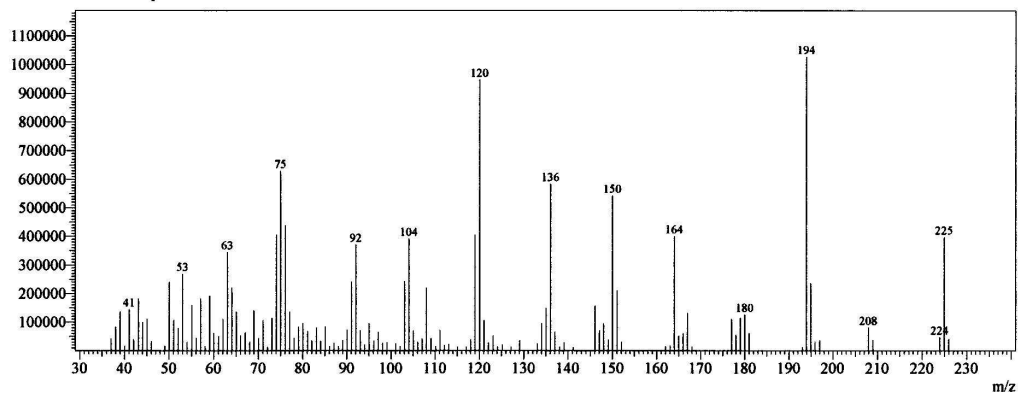
06.05.2011 12:10:06

C:\GCMSolution\Data\tar9.QGD



Spectrum

Line#:1 R.Time:1.158(Scan#:116)
MassPeaks:123
RawMode:Single 1.158(116) BasePeak:193.95(1027271)
BG Mode:None Group 1 - Event 1



MS 4, Verbindung 14 (TAR9)

7. Literaturverzeichnis

Abbott, N.J.; Patabendige, A.; Dolman, D.; Yusof, S.R.; Begley D. J.; 2010. Structure and function of the blood–brain barrier. *Neurobiology of Disease* 37, 13–25

Abbott, N. J.; Rönnbäck, L.; Hansson, E.; 2006. Astrocyte–endothelial interactions at the blood–brain barrier. *Nature Rev Neurosci*, Vol 7, 41-53

Ambudkar, S.V.; Kimchi-Sarfaty, C.; Sauna, Z.E.; Gottesman, M.M.; 2003. P-glycoprotein: from genomics to mechanism. *Oncogene* 22, 7468-7485

Bauer, F.; Kuntner, C.; Bankstahl, J.P.; Wanek, T.; Bankstahl, M.; Stanek, J.; Mairinger, S.; Dörner, B.; Löscher, W.; Müller, M.; Erker, T.; Langer, O.; 2010. Synthesis and in vivo evaluation of [11C]tariquidar, a positron emission tomography radiotracer based on a third-generation P-glycoprotein inhibitor. *Bioorg Med Chem*. 18 (15), 5489-5497

Begley, D.J.; Brightman, M.W.; 2003. Structural and functional aspects of the blood-brain barrier. *Prog Drug Res*, Vol. 61, 41-68

Borst, P.; Evers, R.; Kool, M.; Wijnholds, J.; 2000. A family of drug transporters: the multidrug resistance-associated proteins. *J Natl Cancer Inst*. 2, 92(16), 1295-1302

Brenner, P.; 2006. Die Struktur der Blut-Hirn- und der Blut-Liquor-Schranke. *Dissertation*, 56-60

Cole, S.P.; 1992. The 1991 Merck Frosst Award. Multidrug resistance in small cell lung cancer. *Can J Physiol Pharmacol*., 70 (3), 313-229

Dauchy, S.; Dutheil, F.; Weaver, R.J.; Chassoux, F.; Daumas-Duport, C.; Couraud, P.O.; Scherrmann, J.M.; De Waziers, I.; Declèves, X.; 2008. ABC transporters, cytochromes P450 and their main transcription factors: expression at the human blood-brain barrier. *J. Neurochem.*, 107(6):1518-1528

Deeken, J.F.; Löscher, W.; 2007. The Blood-Brain Barrier and Cancer: Transporters, Treatment, and Trojan Horses. *Clin Cancer Res*, 13(6), 1663-1674

Demeule, M.; Régina, A.; Jodoin, J.; Laplante, A.; Dagenais, C.; Berthelet, F.; Moghrabi, A.; Béliveau, R.; 2002. Drug transport to the brain: Key roles for the efflux pump P-glycoprotein in the blood–brain barrier. *Vascul Pharmacol.* 38(6), 339-348

Dörner, B.; Kuntner, C.; Bankstahl, J.P.; Bankstahl, M.; Stanek, J.; Wanek, T.; Stundner, G.; Mairinger, S.; Löscher, W.; Müller, M.; Langer, O.; Erker, T.; 2009. Synthesis and small-animal positron emission tomography evaluation of [11C]-elacridar as a radiotracer to assess the distribution of P-glycoprotein at the blood-brain barrier. *J Med Chem.* 52 (19), 6073-6082

Dörner, B.; Kuntner, C.; Bankstahl, J.P.; Wanek, T.; Bankstahl, M.; Stanek, J.; Müllauer, J.; Bauer, F.; Mairinger, S.; Löscher, W.; Miller, D.W.; Chiba, P.; Müller, M.; Erker, T.; Langer, O.; 2011. Radiosynthesis and in vivo evaluation of 1-[18F] fluoroelacridar as a positron emission tomography tracer for P-glycoprotein and breast cancer resistance protein. *Bioorg Med Chem.* 19 (7), 2190-2198

Doyle, L.A.; Yang, W.; Abruzzo, L.V.; Krogmann, T.; Gao, Y.; Rishi, A.K.; Ross, D.D.; 1998. A multidrug resistance transporter from human MCF-7 breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci* Vol. 95, 15665-15670

Greenberg, P.L.; Lee, S.J.; Advani, R.; Tallman, M.S.; Sikic, B.I.; Letendre, L.; Dugan, K.; Lum, B.; Chin, D.L.; Dewald, G.; Paietta, E.; Bennett, J.M.; Rowe, J.M.; 2004. Mitoxantrone, etoposide, and cytarabine with or without valspodar in

patients with relapsed or refractory acute myeloid leukemia and high-risk myelodysplastic syndrome: a phase III trial. *J Clin Oncol.* 22(6), 1078-1086

Juliano, R.L.; Ling, V.; 1976. A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants. *Biochim Biophys Acta.* 11; 455(1), 152-162

Kawamura, K.; Konno, F.; Yui, J.; Yamasaki, T.; Hatori, A.; Yanamoto, K.; Wakizaka, H.; Takei, M.; Nengaki, N.; Fukumura, T.; Zhang, M.R.; 2010. Synthesis and evaluation of [¹¹C]XR9576 to assess the function of drug efflux transporters using PET. *Ann Nucl Med.* 24 (5) 403-412

Kawamura, K.; Yamasaki, T.; Konno, F.; Yui, J.; Hatori, A.; Yanamoto, K.; Wakizaka, H.; Takei, M.; Kimura, Y.; Fukumura, T.; Zhang, M.R.; 2011. Evaluation of limiting brain penetration related to P-glycoprotein and breast cancer resistance protein using [(11)C]GF120918 by PET in mice. *Mol Imaging Biol.* 13 (1) 152-160

Klinkhammer, W.; Müller, H.; Globisch, C.; Pajeva, I.K.; Wiese, M.; 2009. Synthesis and biological evaluation of a small molecule library of 3rd generation multidrug resistance modulators. *Bioorg Med Chem.* 17 (6) 2524-2535

Kruijtzter, C.M.; Beijnen, J.H.; Rosing, H.; ten Bokkel Huinink, W.W.; Schot, M.; Jewell, R.C.; Paul, E.M.; Schellens, J.H.; 2002. Increased oral bioavailability of topotecan in combination with the breast cancer resistance protein and P-glycoprotein inhibitor GF120918. *J Clin Oncol.* 20 (13), 2943-2950

Kühnle, M.; Egger, M.; Müller, C.; Mahringer, A.; Bernhardt, G.; Fricker, G.; König, B.; Buschauer, A.; 2009. Potent and selective inhibitors of breast cancer resistance protein (ABCG2) derived from the p-glycoprotein (ABCB1) modulator tariquidar. *J Med Chem.* 52 (4), 1190-1197

Kühnle, M.; 2010. Experimental therapy and detection of glioblastoma: investigation of nanoparticles, ABCG2 modulators and optical imaging of intracerebral xenografts. Dissertation, 1–267. (Universität Regensburg)

Lazarowski, A.; Czornyj, L.; Lubienieki, F.; Girardi, E.; Vazquez, S.; D'Giano C.; 2007. ABC Transporters during Epilepsy and Mechanisms Underlying Multidrug Resistance in Refractory Epilepsy. *Epilepsia*, 48,140–149

Löscher, W.; Potschka, H.; 2005. Drug Resistance in Brain Diseases and the Role of Drug Efflux Transporters. *Nature Rev Neurosci*, Vol 6, 591-602

Löscher, W.; Potschka, H.; 2005. Role of drug efflux transporters in the brain for drug disposition and treatment of brain diseases. *Prog, Neurobiol*, 76, 22-76

Mairinger, S.; 2008. Tariquidar Analogues as PET Precursors for Functional Imaging of P-glycoprotein. *Diplomarbeit*, 12-14;

Mairinger, S.; Langer, O.; Kuntner, C.; Wanek, T.; Bankstahl, J.P.; Bankstahl, M.; Stanek, J.; Dörner, B.; Bauer, F.; Baumgartner, C.; Löscher, W.; Erker, T.; Müller, M.; 2010. Synthesis and in vivo evaluation of the putative breast cancer resistance protein inhibitor [11C]methyl 4-((4-(2-(6,7-dimethoxy-1,2,3,4-tetrahydroisoquinolin-2-yl)ethyl)phenyl)amino-carbonyl)-2-(quinoline-2-carboxylamino)benzoate. *Nucl Med Biol*. 37 (5), 637-644

Matsson, P.; Pedersen, J.M.; Norinder, U.; Bergstrom, C.A.; Artursson, P.; 2009. Identification of novel specific and general inhibitors of the three major human ATP-binding cassette transporters P-gp, BCRP and MRP2 among registered drugs. *Pharm Res*. 26(8), 1816-1831

Miller, D.; Bauer, B.; Hartz, A.M.S.; 2008. Modulation of P-Glycoprotein at the Blood-Brain Barrier: Opportunities to Improve Central Nervous System Pharmacotherapy. *Pharmacol Rev* 60:196–209

Ohtsuki, S.; 2004. New Aspects of the Blood–Brain Barrier Transporters; Ist Physiological Roles in the Central Nervous System. *Biol. Pharm. Bull*. 27(10) 1489-1496

Özvegy, C.; Litman, T.; Szakács, G.; Nagy, Z.; Bates, S.; Váradi, A.; Sarkadi, B.; 2001. Functional characterization of the human multidrug transporter, ABCG2, expressed in insect cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 285(1), 111-117

Rabindran, S.K.; Ross, D.D.; Doyle, L.A.; Yang, W.; Greenberger, L.M.; 2000. Fumitremorgin C reverses multidrug resistance in cells transfected with the breast cancer resistance protein. *Cancer Res.* 60 (1), 47-50

Schinkel, A.H.; 1999. P-Glycoprotein, a gatekeeper in the blood-brain barrier. *Adv Drug Deliv Rev* 36, 179-194

Schinkel, A.H.; Jonker, J.W.; 2003. Mammalian drug efflux transporters of the ATP binding cassette (ABC) family: an overview. *Adv Drug Deliv Rev* 55, 3-29

Sharom, F.J.; 2006. Shedding Light on drug transport: structure and function of the P-glycoprotein multidrug transporter (ABCB1). *Biochem Cell Biol* 84, 979-992

Sharp, M. J.; Mader, C. J.; Strachnan, C. 1998. Synthesis of acridine derivative as multidrug-resistant inhibitor. PCT Int. Appl. WO98/52923 A1

Thomas, H.; Coley, H.M.; 2003. Overcoming Multidrug Resistance in Cancer. *Cancer Control*, Vol 10, No 2, 159-165

van Loevezijn, A.; Allen, J.D.; Schinkel, A.H.; Koomen, G.J.; 2001. Inhibition of BCRP-mediated drug efflux by fumitremorgin-type indolyl diketopiperazines. *Bioorg Med Chem Lett.* 11 (1), 29-32

Wandel, C.; Kim, R.B.; Kajiji, S.; Guengerich, P.; Wilkinson, G.R.; Wood, A.J.; 1999. P-glycoprotein and cytochrome P-450 3A inhibition: dissociation of inhibitory potencies. *Cancer Res.* 59 (16), 3944-3948

Wolf, A.; Bauer, B.; Hartz, A.; 2012. ABC Transporters and the Alzheimer's Disease Enigma. *Front Psychiatry*; 3:54.

Lebenslauf

Geburtsdatum und Ort: 25.04.1986 in Mistelbach

Eltern: Robert und Herta Arzt

Geschwister: Julia Arzt

Schulbildung: 1992 – 1996 Volksschule Hauskirchen
1996 – 2000 Hauptschule Neusiedl an der Zaya
2000 – 2004 BORG Mistelbach

Bundesheer: 2004 – 2005 Bolfras-Kaserne Mistelbach

Studium: seit WS 2005 Diplomstudium Pharmazie

Danksagung

Meinem Betreuer Herrn ao. Univ.-Prof. Dr. Thomas Erker möchte ich für die Ermöglichung der Ableistung meiner Diplomarbeit herzlich danken. Er hat das Thema zur dieser Arbeit vorgeschlagen und für eine freie und gewinnbringende Arbeitsatmosphäre gesorgt, die stets Raum für anregende Gespräche bot. Weiters zu großem Dank bin ich DI (FH) Florian Bauer verpflichtet. Er führte mich mit großer Sorgfalt in die Thematik und Arbeitsweise ein. Auch beim schriftlichen Teil der Diplomarbeit gab er mir wichtige Hilfestellung. Generell möchte ich mich bei der ganzen Arbeitsgruppe unter Leitung von Prof. Erker für die herzliche Aufnahme und für ein freundschaftliches Klima bedanken.

Meinen Eltern und meiner Schwester Julia schulde ich tiefsten Dank. Sie waren mir das gesamte Studium hindurch unverzichtbare Stütze. Ohne sie hinter mir wäre ein Scheitern wohl gewiss gewesen.

Einen nicht zu ermessenden Beitrag an der Beendigung des Studiums leistete ebenso meine Freundin Hanna. Ihre große Geduld und Hilfsbereitschaft konnten so manchen Rückschlag aufwiegen.

Nicht zuletzt danke ich meinem zum guten Freund gewordenen Kollegen Stefan Deibl. Er war mir stets helfender Vorreiter im Studium und ständiger Weggefährte in allem Geistigen.