

**Biologie-orientierte Synthese (BIOS) von
naturstoffabgeleiteten Substanzbibliotheken
und deren biologische Evaluierung**

Zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)
von der Fakultät für Chemie
der Technischen Universität Dortmund
angenommene

DISSERTATION

von
Diplom-Chemiker
Wolfram Wilk
aus Düsseldorf

- 1. Gutachter: Prof. Dr. Herbert Waldmann**
- 2. Gutachter: Prof. Dr. Martin Hiersemann**

Tag der mündlichen Prüfung: 30. März 2010

Die vorliegende Arbeit wurde unter Anleitung von Prof. Dr. Herbert Waldmann am Fachbereich Chemie der Universität Dortmund und am Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie, Dortmund in der Zeit vom 01. Dezember 2006 bis 30. März 2010 angefertigt.

Meinen Eltern,
meinem Bruder Matthias
und
meiner Freundin Anke
für ihre außergewöhnliche Unterstützung

„Überraschung und Verwunderung sind der Anfang des Begreifens.“

José Ortega y Gasset (1883 – 1955)

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|-----------|---|-----------|
| 1. | Einleitung | 1 |
| 2. | Allgemeiner Teil..... | 3 |
| 2.1 | Auffinden biologisch relevanter Strukturen..... | 3 |
| 2.2 | Naturstoffe als prävalidierte Startpunkte für BIOS..... | 5 |
| 2.3 | BIOS – Die Entwicklung des SCONP-Konzepts..... | 6 |
| 2.4 | Anwendungsbeispiele von BIOS in der Chemischen Biologie | 10 |
| 2.5 | Das PSSC-Konzept und seine Verwendung in BIOS..... | 12 |
| 2.6 | Durch PSSC und SCONP zu biologisch aktiven Molekülen..... | 14 |
| 2.7 | Software zur Exploration des Strukturgerüstbaumes | 16 |
| 2.8 | Möglichkeiten des Scaffold Hunter's zur Identifikation biologisch aktiver Moleküle | 17 |
| 3. | Ziele der Arbeit | 19 |
| 4. | Spezieller Teil – Pyrone I | 21 |
| 4.1 | Hintergrund der Strukturgerüstbaum-Überlagerung | 21 |
| 4.2 | Belegung von naturstoffbasierten Substanzgerüsten durch Strukturgerüstbaum-Überlagerung am Beispiel der γ -Pyrone..... | 23 |
| 4.3 | Totalsynthese des Naturstoffs Cyercen A und seines α -Pyrone Analogons .. | 27 |
| 4.4 | Synthese der Pyrone Substanzbibliothek..... | 31 |
| 4.5 | Biochemische Validierung | 39 |
| 4.6 | Monoaminoxidasen | 41 |
| 4.7 | Entwicklung des Monoaminoxidase-Assays..... | 43 |
| 4.8 | Ergebnisse des Monoaminoxidase-Assays..... | 44 |
| 4.9 | „Signal Transducers and Activators of Transcription“ | 51 |
| 4.10 | Ergebnisse der STAT-Assays | 53 |
| 4.11 | Sphingomyelinasen | 56 |
| 4.12 | Ergebnisse der Spingomyelinase-Assays | 58 |
| 4.13 | Zusammenfassung – Strukturgerüstbaum-Überlagerung | 60 |

| | | |
|------------|--|------------|
| 5. | Spezieller Teil – Pyrone II | 67 |
| 5.1 | Anwendung des PSSC-Ansatzes zur Identifikation von LSD1-Inhibitoren ... | 67 |
| 5.2 | LSD1..... | 69 |
| 5.3 | Untersuchung der Pyronbibliothek | 71 |
| 5.4 | Synthese und Aktivität von Chromenderivaten..... | 79 |
| 5.5 | Zusammenfassung und Ausblick zu den LSD1 Versuchen..... | 84 |
| 6. | Spezieller Teil – Macroline..... | 87 |
| 6.1 | Macroline als Inhibitoren der MptpB-Phosphatase des Mycobacterium tuberculosis | 87 |
| 6.2 | Synthese einer Macrolinbibliothek..... | 89 |
| 6.3 | Experimente zur Inhibition von Phosphatasen | 98 |
| 6.4 | Lineweaver-Burk-Analyse..... | 101 |
| 6.5 | Zusammenfassung | 107 |
| 7. | Zusammenfassung..... | 112 |
| 8. | Experimenteller Teil | 121 |
| 8.1 | Messgeräte und Hilfsmittel | 121 |
| 8.2 | Versuche zu Kapitel 4.4 – α -Pyrone | 125 |
| 8.3 | Versuche zu Kapitel 4.4 – γ -Pyrone | 168 |
| 8.4 | Versuche zu Kapitel 5.5 – Synthese von Chromenderivaten | 186 |
| 8.5 | Versuche zu Kapitel 4.8 – Fluoreszenzbasierte Hemmversuche für MAO A und B | 191 |
| 8.6 | Versuche zu Kapitel 6.2 – Festphasensynthese von Macrolinen | 193 |
| 8.7 | Versuche zu Kapite 6.2 – Zwischenstufen der Lösungssynthese von Macrolinen | 205 |
| 8.8 | Versuche zu Kapitel 6.4 – Kinetische Analyse des Bindungsmodus..... | 208 |
| 9. | Literaturverzeichnis | 210 |
| 10. | Abkürzungsverzeichnis | 216 |
| 11. | Anhang | 218 |

| | |
|--------------------------------|-----|
| Danksagung | 288 |
| Lebenslauf..... | 289 |
| Eidesstattliche Erklärung..... | 290 |

1. Einleitung

Das Auffinden geeigneter niedermolekularer Proteinliganden zur Verwendung als chemische Sonden in biologischen Systemen zur Klärung medizinischer Fragestellungen ist eine große Herausforderung. Die Biologie-orientierte Synthese (BIOS) ist ein neues Konzept zur Darstellung von Substanzbibliotheken, welches helfen soll, qualitativ hochwertige, das heißt mit biologisch aktiven Verbindungen angereicherte Substanzkollektionen, zu generieren. Hierzu werden Substanzbibliotheken mit eingeschränkter Diversität von biologisch prävalidierten Grundstrukturen erzeugt. Dies ermöglicht eine Beschränkung des großen chemischen Deskriptorraums auf solche Verbindungen, die mit höherer Wahrscheinlichkeit eine Bioaktivität zeigen.

Die Vorgehensweise der Biologie-orientierten Synthese umfasst mehrere Werkzeuge, die das Auffinden biologisch relevanter Strukturen erleichtern. So ist zunächst ein Konzept namens SCONP zu nennen. Diese Abkürzung steht für „Structural Classification Of Natural Products“. SCONP sieht eine hierarchische Anordnung von chemischen Strukturgerüsten in einer Baumform vor. Hierbei sind in der Mitte – quasi am Stamm des Baumes – monozyklische Verbindungen angeordnet, die entlang von Ästen nach außen hin immer komplexer werden, so dass auf der Außenfläche des Baumes vielzyklische Strukturen aufzufinden sind. Die Darstellung des Strukturraumes und die Navigation entlang der Äste können zum Beispiel mit dem Scaffold Hunter, einer extra zu diesem Zweck entwickelten Software geschehen. Ein weiteres Hilfsmittel zur Präevaluation von Substanzbibliotheken ist ein chemoinformatisches Verfahren namens „Protein structure similarity clustering“ (PSSC). Hierbei wird die Proteinfaltstruktur um das aktive Zentrum betrachtet. Es kann davon ausgegangen werden, dass bei der Bindung zwischen einem Protein und einem dazugehörigen Liganden eine Komplementarität zwischen der Substruktur des Proteins und dem chemischen Grundgerüst des Liganden bestehen muss. So sollten

1. Einleitung

mit einer gewissen Wahrscheinlichkeit aktive Proteinzentren mit ähnlicher Substruktur mit Liganden mit vergleichbaren Grundgerüsten gebunden werden können. Dieser Ansatz führt mit höherer Wahrscheinlichkeit zu neuen Liganden für verschiedene Proteine innerhalb eines Clusters als die Untersuchung einer ungerichteten Substanzbibliothek.^[1,2,3,4,5,6,7]

Das BIOS-Konzept konnte bereits in ersten Studien validiert werden.^[8,9] Zur Weiterentwicklung und Verfeinerung dieses neuen Syntheseansatzes sind jedoch weitere Fallstudien notwendig. Solche Fallbeispiele wurden im Rahmen dieser Arbeit analysiert.

2. Allgemeiner Teil

2.1 Auffinden biologisch relevanter Strukturen

In der chemischen Biologie werden niedermolekulare Verbindungen als Werkzeuge zur Untersuchung und Beeinflussung biologischer Systeme eingesetzt. Diese Manipulation kann zum Beispiel durch die Verwendung chemischer Sonden erreicht werden, welche eine Störung innerhalb des biologischen Systems hervorrufen, die nach Analyse Rückschlüsse auf das System ermöglicht.^[10]

Dieser Ansatz benötigt jedoch im allgemeinen kleine Moleküle, im englischen auch "small molecules" genannt, die als chemische Sonden eingesetzt werden können. Zur Identifizierung solcher Sonden durchsuchen chemische Biologen große Substanzbibliotheken in systematischer Weise. Der Erfolg dieser Untersuchungen hängt allerdings von der Qualität der eingesetzten Substanzkollektionen ab, dabei kann von hoher Qualität gesprochen werden, wenn ein hoher Anteil bioaktiver, nicht-aggregat-bildender Verbindungen vorliegt.

Der heutige Stand der Synthesemethoden ermöglicht die Herstellung zahlenmäßig großer Substanzbibliotheken. Hierbei kommen chemische Techniken wie Parallelsynthesen – in Lösung oder auf fester Phase und mittels manueller oder robotergestützter Syntheseführung – zum Einsatz. Dank dieser technischen Möglichkeiten wurde angenommen, dass durch die ungerichtete Synthese großer Substanzbibliotheken die Zahl der so generierten biologisch aktiven Moleküle erhöht werden könnte. Überraschenderweise zeigte die biologische Anwendung dieser kombinatorischen Substanzbibliotheken jedoch, dass der überwiegende Teil der synthetisierten Verbindungen biologisch inaktiv waren. Der Anteil aktiver Verbindungen war dabei so gering, dass der Vorteil der einfachen und schnellen Synthese durch die geringe Trefferquote in biologischen Assays nivelliert wurde. Weitergehende Untersuchungen zeigten, dass der chemische Deskriptorraum, im

englischen auch „chemical space“ genannt, welcher alle chemischen Moleküle und somit auch solche ohne Bioaktivität umfasst, unüberschaubar groß ist.^[11] So wurde geschätzt, dass der chemische Deskriptorraum der kleinen Moleküle, bestehend aus Kohlenstoff-, Sauerstoff-, Stickstoff- und/oder Schwefelatome umfassenden Gerüsten von 30 Atomen aus etwa 10^{63} einzelnen Strukturen besteht.^[12] Ein so großer Raum kann aber nicht mehr durch ungerichtete chemische Synthese komplett abgedeckt werden. Die Schwierigkeiten und der große Aufwand, aus vielen Millionen chemischer Substanzen die biologisch aktiven Verbindungen herauszufiltern, zeigt, dass nur ein kleiner Teil des chemischen Deskriptorraums biologisch relevant ist. Es ist somit von großem Vorteil, sich synthetisch lediglich auf diesen Bereich des chemischen Deskriptorraums zu konzentrieren.^[13]

Es existieren bereits mehrere Ansätze zur Generierung hochwertiger Substanzbibliotheken, so zum Beispiel das Konzept der „Diversity Oriented Synthesis“ (DOS).^[14] Ein alternatives Konzept wurde in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. H. Waldmann entwickelt. In der „Biologie-orientierten Synthese“ (im Folgenden als „BIOS“ abgekürzt) von Substanzbibliotheken wird die Synthese vornehmlich auf die biologisch relevanten Bereiche des chemischen Deskriptorraumes fokussiert. Um dies zu erreichen, werden Substanzbibliotheken um biologisch prävalidierte und somit biologisch relevante Startpunkte im chemischen Deskriptorraum aufgebaut. Als prävalidierte Startpunkte können zum Beispiel biologisch aktive Naturstoffe dienen. Aus diesen wird mittels eines cheminformatischen Algorithmus eine Kernstruktur – im Englischen auch „Scaffold“ genannt – herauskristallisiert und als Grundstruktur für die Generierung einer kombinatorischen Substanzbibliothek verwendet.^[15] In Kapitel 2.3 soll dies näher erläutert werden. Nachdem das BIOS-Konzept ursprünglich für Naturstoffe etabliert wurde, sind in einer erweiterten Form auch Grundstrukturen biologisch aktiver Verbindungen nicht-natürlicher Herkunft, wie zum Beispiel bekannter Pharmaka, in das Konzept eingearbeitet worden.^[16,17]

2.2 Naturstoffe als prävalidierte Startpunkte für BIOS

Seit langer Zeit spielen Naturstoffe eine wichtige Rolle in der Behandlung von Krankheiten und anderen Pathologien.^[18,19] Darüber hinaus wurde eine Vielzahl von Naturstoffen verwendet, um biologische Systeme zu untersuchen und zu verstehen.^[20]

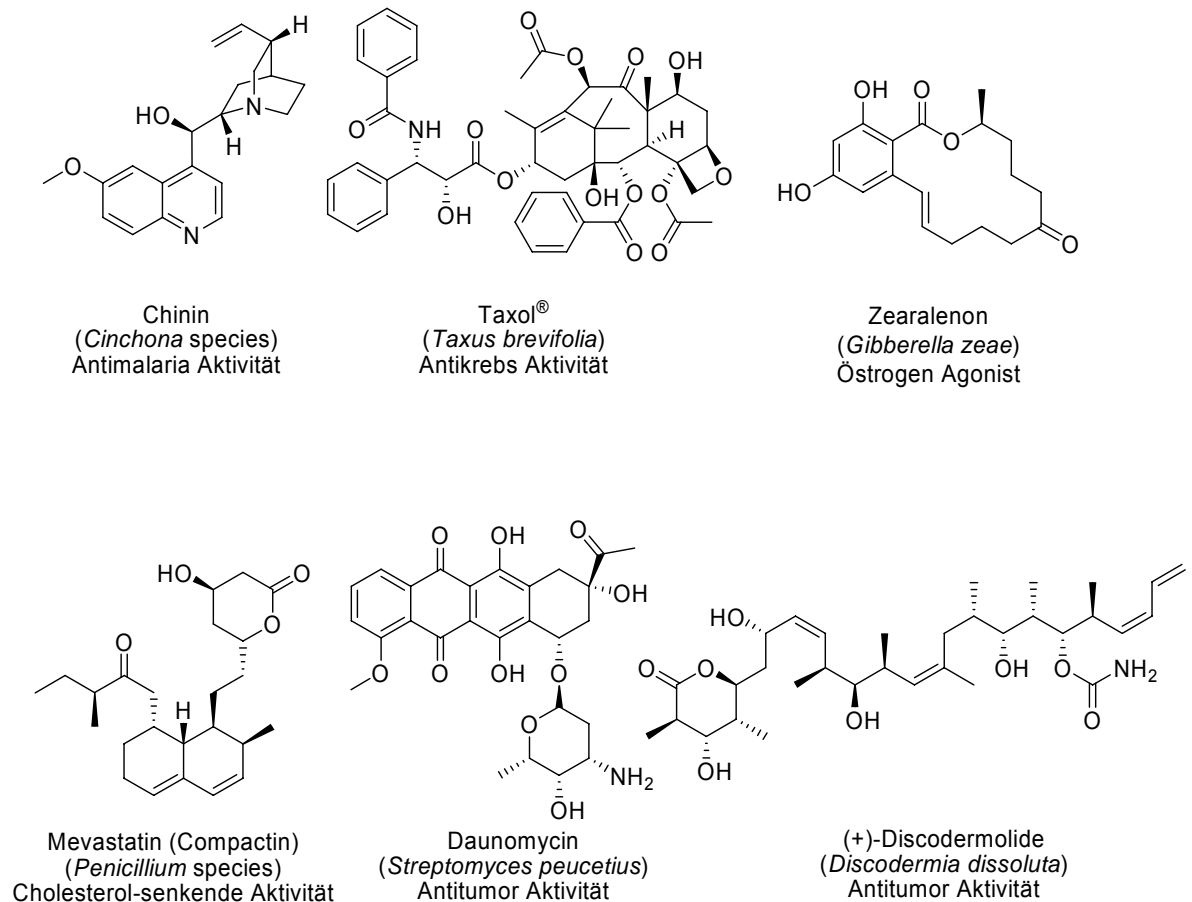


Abbildung 1: Naturstoffe und ihre biologische Aktivität.

Biologisch aktive Naturstoffe sind ein Produkt der Evolution und verschaffen dem sie produzierenden Organismus einen gewissen Vorteil (Abbildung 1). Durch diese evolutionsgesteuerte Generierung von Naturstoffen wird nur ein kleiner Teil des kohlenstoffbasierten chemischen Deskriptorraumes erfasst. Eine ähnliche Beobachtung kann im Falle des Protein-Deskriptorraumes gemacht werden, da sich auch in diesem Fall in der Evolution eine verhältnismäßig kleine Zahl an Aminosäure-Sequenzen und Faltungen durchgesetzt hat.^[21] Werden bei der Präevaluierung des

chemischen Deskriptorraumes also die evolutionäre Präevaluierung von Naturstoffen zugrunde gelegt und die Konservierung bestimmter bevorzugter tertiärer Proteinstrukturen berücksichtigt, so kann der biologisch relevante chemische Deskriptorraum stark eingegrenzt werden.

Da eine hochaffine Bindung zwischen einem Protein und einem Liganden auf einer Komplementarität beider Partner während der Interaktion beruht, kann darauf geschlossen werden, dass auch der Strukturraum der Ligandenbindungsstellen der Proteine und jener der dazugehörigen Liganden komplementär sein muss.

Obwohl der durch Naturstoffe definierte chemische Deskriptorraum nicht den einzigen chemischen Strukturraum mit biologisch aktiven Verbindungen beschreibt, bietet dieser Ansatz die Möglichkeit, die Größe des biologisch relevanten chemischen Deskriptorraumes einzuschränken, so dass dieser durch chemische Synthese angegangen werden kann.^[22,23] Durch vorherige Arbeiten aus der Arbeitsgruppe Waldmann konnte gezeigt werden, dass bereits kleine Substanzbibliotheken naturstoffabgeleiteter Grundstrukturen trotz limitierter Diversität zu erfolgreicher Identifizierung von biologisch aktiven kleinen Molekülen eingesetzt werden können.^[24]

2.3 BIOS – Die Entwicklung des SCOMP-Konzepts

Wie in den vorangegangenen Kapiteln beschrieben, bieten Naturstoffe erfolgversprechende Startpunkte zur Synthese biologisch relevanter kleiner chemischer Moleküle. Dies machten sich Waldmann *et al.* zu Nutze und führten eine hierarchische Klassifikation bekannter Naturstoffe nach cheminformatischen Regeln ein. Diese ermöglichte eine Visualisierung des chemischen Deskriptorraumes, der durch die Naturstoffe und ihre Kerngerüste definiert wird.^[25,26]

Da einem Großteil der kleinen Moleküle mit biologischer Relevanz sowie Pharmaka Ringsysteme zugrunde liegen, wurde der Fokus dieser hierarchischen Klassifizierung auf die Strukturreduktion hin zu zyklischen Strukturen gelegt. Zyklische Systeme führen in der Regel zu einer Einschränkung der Freiheitsgrade der gesamten

Molekülstruktur, sodass aus entropischen Gründen eine erhöhte Targetaffinität bestehen kann. Um nun komplexe Naturstoffe als Startpunkte für das Erstellen von Substanzbibliotheken zu finden, wurden Strukturgerüste durch Anwendung einer Gruppe definierter Regeln der organischen und medizinischen Chemie generiert. So wurde der schrittweise Abbau des zugrunde liegenden Naturstoffgerüsts in kleinere Strukturen erreicht. Durch diesen reduktionistischen Ansatz gelang es, eine Reihe von Strukturgerüsten in einer baumartigen Anordnung zu korrelieren. Dabei beschreibt jedes chemische Grundgerüst einen eigenen Teil des chemischen Deskriptorraumes und ist eine Unterstruktur des eigentlichen Naturstoffes. So erlaubt der Strukturgerüstbaum die Verknüpfung komplexerer Strukturgerüste mit einfacheren Strukturen und bietet ein Werkzeug, molekulare Komplexität von mehrfach annelierten Ringsystemen zu Monozyklen im inneren Ring des Baumes zu verfolgen. Die Entwicklung dieser Baumstruktur ermöglicht somit, chemische Strukturen in einer intuitiven, aber zugleich chemisch bedeutsamen Weise zu korrelieren (Abbildung 2).

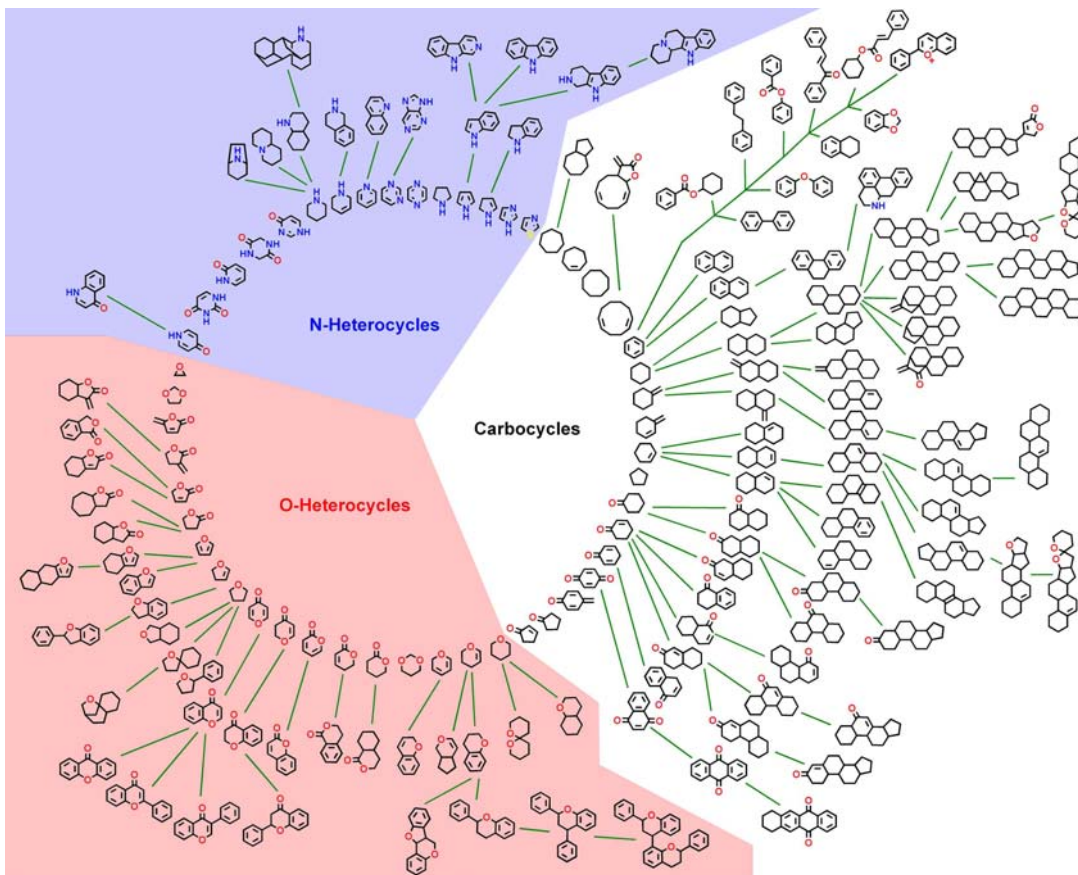


Abbildung 2: Ausschnitt aus dem chemischen Strukturgerüstbaum nach dem SCONP-Ansatz, bei dem Strukturgerüste gezeigt sind, die bei mindestens 0.2% der Naturstoff aus dem "Dictionary of Natural Products (DNP)" auftreten.

Die Bedeutung dieses Naturstoffbasierten Strukturgerüstbaumes liegt in der einfacher erkennbaren Korrelation zwischen verschiedenen Strukturklassen.

Neben dem naturstoffbasierten chemischen Deskriptorraum existieren weitere biologisch interessante Strukturräume. Ein Beispiel hierfür ist der Strukturräum entwickelter Pharmaka, denn auch dieser kann als biologisch relevant und prävalidiert betrachtet werden.

Weitere Erweiterungen des BIOS-Konzepts sind Strukturgerüstbäume unter Verwendung biochemischer und/oder biologischer Daten oder aber die Anwendung des „Brachiation“-Konzept, in welchem hierarchische Fragmentsequenzen durch intuitives „Hangeln“ innerhalb des Strukturbaumes aufgebaut und somit korreliert werden können. „Brachiation“ beschreibt das Wechseln von komplexen zu

einfacheren Strukturen mit sukzessive vereinfachtem Aufbau entlang der Linien biologischer Relevanz. Dieses Verfahren kann mit dem Verhalten von Primaten verglichen werden, die sich in Bäumen von Ast zu Ast schwingen.^[16,17] So erhaltene Bäume sind nicht mehr auf den chemischen Deskriptorraum der Naturstoffe begrenzt, sondern können auch andere chemische Substanzen, zum Beispiel aus dem Strukturraum der Pharmaka, umfassen. Diese fortgeschrittenen cheminformatischen Ansätze des BIOS-Konzepts erlauben eine umfassendere Analyse möglicher chemischer Strukturen, die sich als Startpunkte für die Synthese von Substanzbibliotheken eignen.

2.4 Anwendungsbeispiele von BIOS in der Chemischen Biologie

Die Arbeitsgruppe um Prof. Dr. H. Waldmann hat in den letzten Jahren mehrere Studien veröffentlicht, die die Validität des BIOS Konzeptes belegen (Abbildung 3). Im Folgenden sollen zunächst einige ausgewählte Beispiele aufgezeigt werden, die hauptsächlich auf dem ursprünglichen SCONP Konzept beruhen.

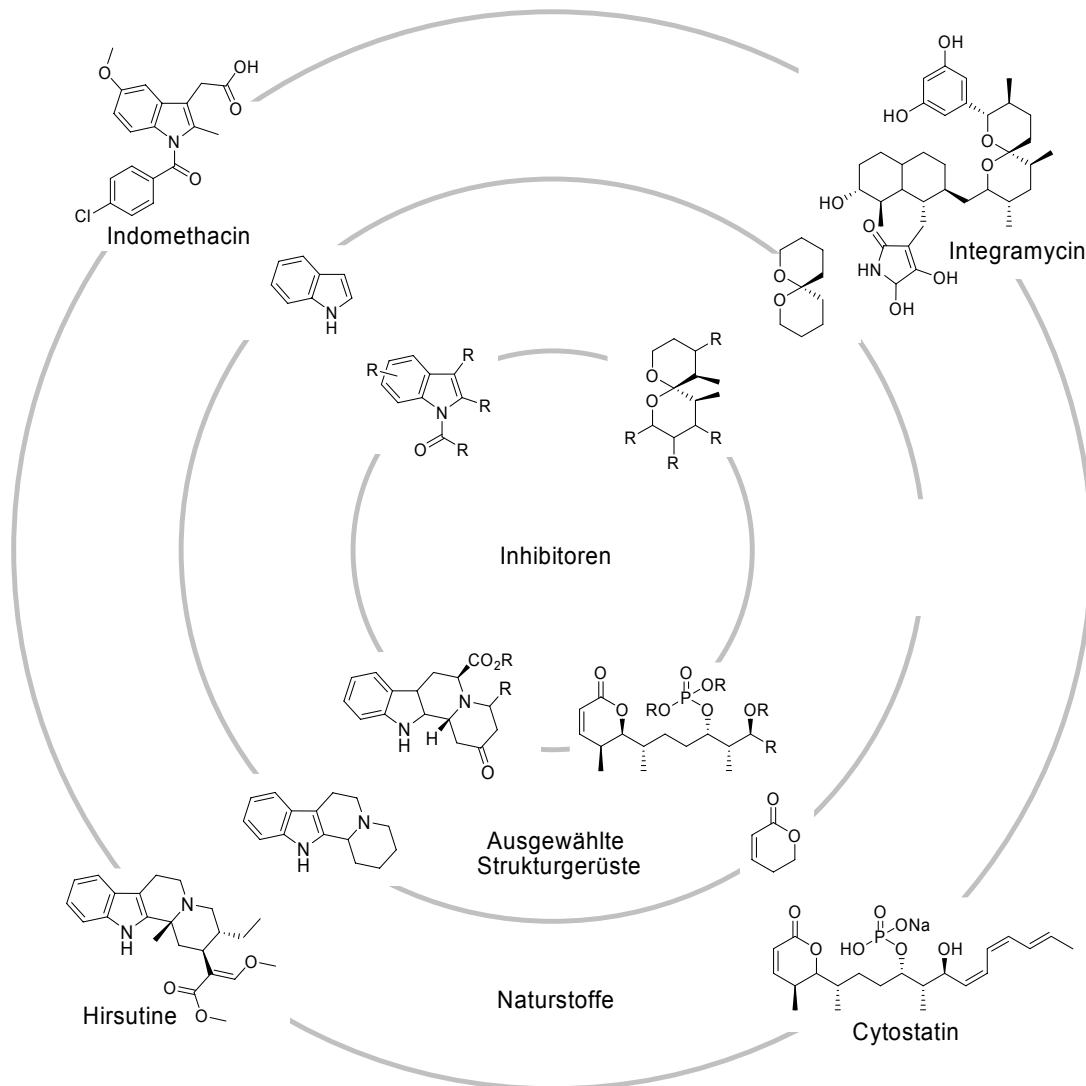


Abbildung 3: Fokussierte Substanzbibliotheken biologisch-prävalidierter Grundstrukturen weisen erhöhte biologische Aktivität auf. Der äußere Ring obiger Abbildung zeigt einen exemplarischen Naturstoff, der als Startstruktur fungiert. Der mittlere Ring stellt das verwendete Strukturgerüst heraus, während im inneren Ring die *via* BIOS konzipierten Substanzbibliotheken aufgezeigt werden.

Ein Beispiel aus der Gruppe der Sauerstoff-Heterozyklen sind die Spiroketale. Diese Stoffklasse tritt unter anderem in Pheromonen der Insektenwelt auf und spielt als Fragment in zahlreichen komplexen Naturstoffen eine Rolle, wie zum Beispiel dem HIV-1 Integrase-Inhibitor Integramycin (Abbildung 3). Nach der SCONP-Analyse stellen [5.5]Spiroketale biologisch relevante prävalidierte Grundstrukturen dar, wie durch die Synthese und anschließende Testung einer fokussierten [5.5]Spiroketal-Bibliothek gezeigt werden konnte. Diese enthielt zum Beispiel mikromolare Inhibitoren der dual-spezifischen Phosphatase VHR und Modulatoren der Mikrotubulipolymerisation.^[27]

Eine zweite Substanzklasse, die sich durch den SCONP-Ansatz als interessant herausstellte, sind α,β -ungesättigte δ -Lactone. Dieses Strukturelement findet sich unter anderem in dem potenten Protein-Phosphatase 2A Inhibitor Cytostatin wieder (Abbildung 3). Darüber hinaus gehören α,β -ungesättigte δ -Lactone zu den häufigsten Strukturelementen von Naturstoffen und sind das charakteristische Element von wachstumshemmenden, immunsuppressiven und enzyminhibierenden Verbindungen. Es wurde deshalb eine Substanzbibliothek von α,β -ungesättigten δ -Lactonen in zwei zellbasierten, biologischen Tests untersucht. Dies führte zum einen zur Entdeckung neuer Modulatoren des Zellzyklus und zum anderen zu potenten Inhibitoren des Virusbefalls von Wirtszellen durch den sekretorischen Transportweg.^[28] Weitere Tests und Synthesen führten zu hochselektiven Phosphatase-Inhibitoren mit optimierten Eigenschaften.^[29,30]

In der Gruppe der Stickstoff-Heterozyklen sind Indolactame als Modulatoren der Protein Kinase C (PKC) bekannt. In einer weiteren Arbeit wurde der chemische Deskriptorraum um diese Struktureinheit erfolgreich *via* kombinatorischer Synthese untersucht.^[31,32]

Indomethacin (Abbildung 3) ist ebenfalls ein wichtiges, biologisch aktives Indolderivat, welches zu den nichtsteroidalen Antirheumatika (NSAR) gehört. Durch die Arbeiten in

Prof. Dr. H. Waldmanns Gruppe konnte gezeigt werden, dass Derivate des Indomethacins eine neue Klasse von Kinaseinhibitoren darstellt.^[33]

Eine weitere Arbeit auf dem Gebiet der indolbasierten Heterozyklen beschäftigte sich mit der Entwicklung neuer Phosphatase-Inhibitoren. Zu diesem Zweck wurden 354 chemisch diverse Naturstoffe biologisch evaluiert. So wurden die strukturell komplexen Alkaloide Yohimbin und Ajmalin als moderate Cdc25A-Phosphatase-Inhibitoren identifiziert. Die Ergebnisse der SCONP-Analyse und Brachiation entlang des prävalidierten Astes des naturstoffbasierten Strukturgerüstbaumes führte zu tetrazyklischen Indolo[2,3-a]chinolizidin-Gerüsten. Dieses Strukturgerüst tritt regelmäßig bei Naturstoffen auf – zum Beispiel bei dem antiviralen Naturstoff Hirsutin (Abbildung 3). Auch hier wurde eine fokussierte Substanzbibliothek mit chemischer Diversität um das Indolochinolizidin-Gerüst erstellt und führte zu zwei neuen Phosphatase-Inhibitoren mit Hemmeigenschaften in der Größenordnung der Naturstoffe. Nach Ausweitung der biologischen Untersuchungen auf andere Phosphatasen wurden strukturell neue Inhibitoren der *Mycobacterium tuberculosis* Phosphatase MptpB identifiziert.^[15,34,35,36]

Ein wichtiger Aspekt des BIOS-Konzeptes ist die Tatsache, dass eine gegebene Struktur nicht im Detail nachgebaut werden muss. Lediglich das zugrunde liegende Strukturgerüst muss erhalten bleiben. Dieses Prinzip wurde durch die Identifizierung selektiver Proteinphosphatase Cdc25-Inhibitoren belegt, die auf Basis des Strukturgerüsts des Sesquiterpenoids Dysidiolid synthetisiert wurden.^[37]

2.5 Das PSSC-Konzept und seine Verwendung in BIOS

In Analogie zum SCONP-Ansatz wurde ein Konzept entwickelt, welches eine Klassifizierung von Proteinen nach den Faltungsmotiven in den ligandenbindenden Bereichen der einzelnen Proteindomänen durchführt.^[1] Da die Faltung einer Proteindomäne in der Natur sehr viel stärker konserviert ist als die dazugehörigen Aminosäuresequenzen und die Zahl der verschiedenen Faltungen relativ gering ist,

wurde in der Arbeitsgruppe um Prof. Dr. H. Waldmann eine Methode zur Zusammenstellung von Proteinclustern entwickelt. Aber nur jeweils ein kleiner Teil eines Proteins ist in die Bindung zu einem Liganden involviert und somit ist es zum Beispiel gerechtfertigt, beim Clustern der Strukturen lediglich das aktive Zentrum zu verwenden. Wird davon ausgegangen, dass bei der Bindung zwischen einem Protein und einem dazugehörigen Liganden eine Komplementarität zwischen der Substruktur des Proteins und dem chemischen Grundgerüst des Liganden bestehen muss, so sollten aktive Proteinzentren mit ähnlicher Substruktur von Liganden mit vergleichbaren Grundgerüsten gebunden werden können. Natürlich wird ein Ligand nicht an alle Proteindomänen innerhalb eines Clusters binden, da immer noch spezifische Wechselwirkungen zwischen den Seitengruppen der bindenden Substanz und individuell verschiedenen Aminosäuren des Proteins auftreten. Allerdings sollte eine chemisch-diversifizierte Substanzbibliothek um ein durch PSSC-Analyse prävalidiertes Strukturgerüst mit größerer Wahrscheinlichkeit zu Liganden für verschiedene Proteine innerhalb eines Clusters führen als das Screening einer ungerichteten Substanzbibliothek. Mit anderen Worten, eine BIOS einer Substanzbibliothek auf der Grundstruktur eines Liganden eines Proteins innerhalb eines PSSC-Clusters sollte mit erhöhter Wahrscheinlichkeit auch geeignete Liganden für andere Proteine des PSSC-Clusters liefern. Der PSSC-Ansatz kann auch im Zusammenhang mit Sternbergs Konzept von Protein-Superfolds gesehen werden, welches Ähnlichkeiten der aktiven Proteinzentren in Abwesenheit einzelner Aminosäuresequenzen betrachtet.^[23] Für das PSSC-Konzept der ersten Generation wurde ein Protein ausgewählt und dessen Faltung mit jener aller anderen Proteine aus der Proteindatenbank (PDB) verglichen.^[38,39] Die Faltung der Proteine wurde über die Lage der α -C-Atome der Aminosäuren in einem Koordinatensystem bestimmt. Aus der Liste an Proteinen mit ähnlicher Faltung wurden lediglich pharmazeutisch relevante Proteinsuperfamilien mit niedriger Sequenzähnlichkeit ausgewählt und weiter untersucht.

Um nun größere Proteingruppen oder die gesamte PDB-Datenbank „clustern“ zu können, wurden neue Algorithmen entwickelt, mit dem Ziel eine nicht-voreingenommene, halbautomatische Extraktion, Überlagerung und Clustern der aktiven Zentren zu ermöglichen. Mit diesem neuen Algorithmus wurden bereits 15000 Proteine analysiert und geclustert.^[40]

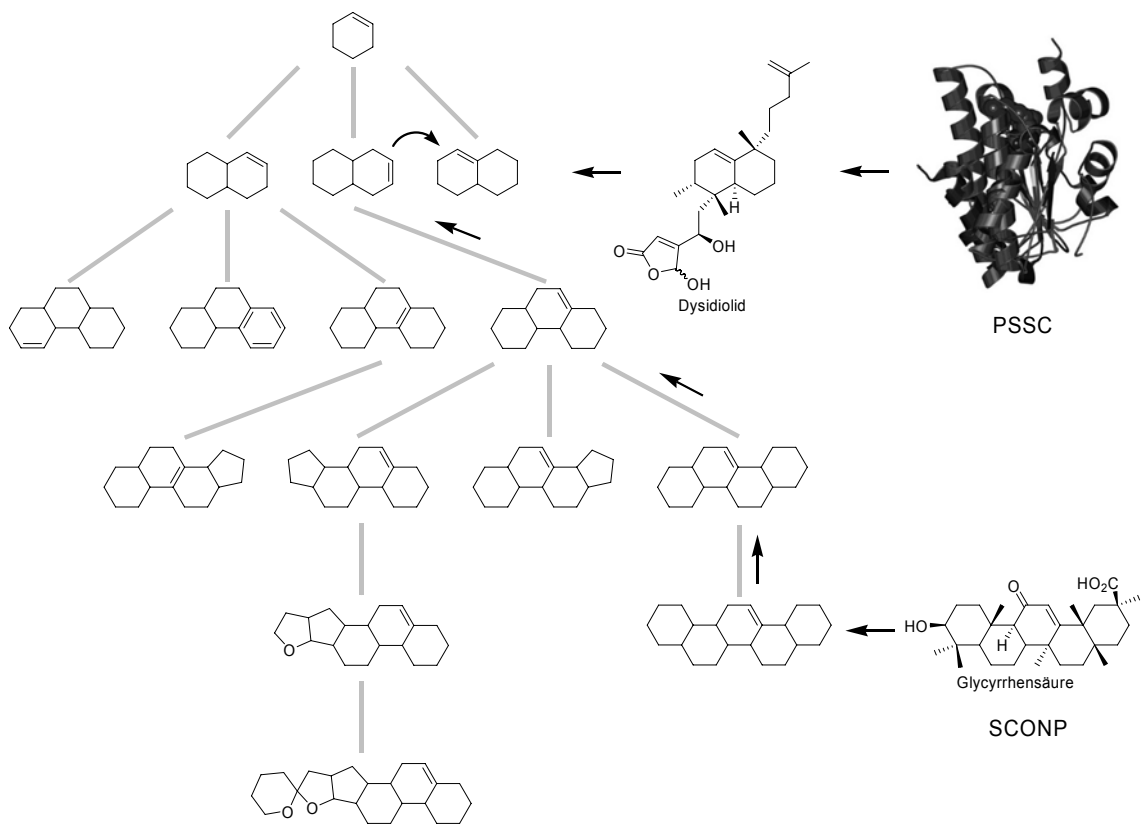
2.6 Durch PSSC und SCONP zu biologisch aktiven Molekülen

Im folgenden Kapitel werden zwei Beispiele aufgezeigt, wie mit Hilfe des PSSC- und des SCONP-Ansatzes Liganden für ausgesuchte, medizinisch relevante Proteine gefunden wurden. In einer PSSC-Studie wurde zunächst ein Proteincluster mit homologen Faltmotiven des Ausgangsproteins Cdc25A erstellt. Die Anwendung des PSSC-Algorithmus führte dann zu einem Cluster, welcher neben der Phosphatase Cdc25A die Acetylcholinesterase und die beiden Isoformen der 11 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase (11 β HSD1 und 11 β HSD2) enthält. Das Grundgerüst des Cdc25A-Inhibitors und γ -Hydroxybutenolid-Naturstoffes Dysidiolid wurde dann als Basis für die Entwicklung einer Substanzbibliothek von 147 γ -Hydroxybutenoliden und strukturell ähnlichen α,β -ungesättigten γ -Lactonen genommen. Eine Untersuchung dieser Verbindungskollektion führte sowohl zu neuen Cdc25A Inhibitoren mit höherer Potenz als die der Ursprungsverbindung Dysidiolid als auch, wie vom PSSC-Ansatz vorhergesagt, mehreren isoenzymspezifische 11 β HSD1- und 11 β HSD2-Inhibitoren. Neben der Validierung des PSSC-Konzeptes sind diese Ergebnisse auch noch von direktem medizinischen Interesse, da 11 β HSD1 ein Zielprotein zur Behandlung von Übergewicht, dem metabolischen Syndrom sowie Diabetes mellitus Typ 2 ist, während die Inhibition von 11 β HSD2 eine Natriumretention verursacht, die zu Bluthochdruck führt.^[1]

In einer zweiten Fallstudie wurde wiederum der PSSC-Ansatz mit einer Analyse des SCONP-Strukturgerüstbaumes verwendet, um mögliche biologisch relevante Grundstrukturen aus dem Naturstoff und Cdc25A-Inhibitor Glycyrrhetinsäure

2. Allgemeiner Teil

abzuleiten. Eine schrittweise „Brachiation“ des pentazyklischen Strukturgerüsts von Glycyrrhetinsäure führte zu bityklischen Dehydrodecalinen (Schema 1). Vor dem Hintergrund, dass der Cdc25A-Inhibitor Dysidiolid ein vergleichbares Strukturgerüst aufweist, wurde eine Dehydrodecalin-Substanzdatenbank *via* kombinierter Lösungs- und Festphasensynthese hergestellt.^[41] Eine Untersuchung dieser ergab mehrere AChE Inhibitoren und drei hochpotente, isoenzym-spezifische 11 β HSD1-Inhibitoren, die auch in zellulären Versuchen aktiv waren.^[25]



Schema 1: Das Zusammenspiel des PSSC- und SCONP-Konzeptes am Beispiel des Proteinclusters bestehend aus Cdc25A-Phosphatase, Acetylcholinesterase und den beiden 11 β HSD- Isoformen.

2.7 Software zur Exploration des Strukturgerüstbaumes

Naturstoffabgeleitete Strukturgerüstbäume haben sich als nützliches Werkzeug zur Vorhersage interessanter Grundgerüststrukturen für anschließende Bibliothekssynthesen herausgestellt. Allerdings schließen diese viele interessante Substanzklassen aus, wie zum Beispiel Grundgerüste rein-synthetischer Pharmaka mit biologischer Aktivität. Das BIOS-Konzept setzt aber nicht voraus, dass eine Substanz in der Natur vorkommen muss.^[42] Bisher konnte Morphin nicht berücksichtigt werden, da noch kein Naturstoff mit einer morphinähnlichen Vierringstruktur gefunden wurde. Andererseits führte die chemische Vereinfachung von Morphin unter anderem zu den medizinisch relevanten Analoga Tramadol (bicyklisch), Pentazocine (tricyklisch) und Levorphanol (tetrazyklisch). Deshalb wurden neue cheminformatische Algorithmen entwickelt, die dazu dienen, den SCONP-Baum um weitere biologisch relevante Strukturen zu erweitern. Der verbesserte Algorithmus erlaubt nun, jeden beliebigen Datensatz an Molekülen zu verwenden, aus diesem einen Strukturgerüstbaum zu erzeugen und somit den dazugehörigen chemischen Strukturraum zu untersuchen.^[43] Außerdem berücksichtigen die neuen Regeln mehr chemische Überlegungen zur Synthese. So werden zum Beispiel Dreiring-Systeme Strukturen wie Epoxidringe, die bei Syntheserouten meist zuletzt eingeführt werden, bei der Extraktion des Substanzgrundgerüsts als erstes von der Grundstruktur abgeschnitten. Auch werden nach dem neuen Regelwerk Makrozyklen mit mehr als zwölf Atomen beibehalten und überbrückte Ringe auf Grund ihrer Einzigartigkeit möglichst lange konserviert, um hohe chemische Diversität zu erhalten.

Zur Ermöglichung eines einfachen und schnellen Überblicks über den durch Datensammlungen gegebenen Strukturraum, wurde das Programm „Scaffold Hunter“ entwickelt, welches zunächst den „Scaffold Tree Generator“ (STG) umfasst, der Substanzdatenbanken auslesen und daraus nach gewissen Regeln Strukturgerüste erstellen kann.^[16] Diese kann das Programm auch in Bäumen anordnen. Mittels des

„Scaffold Tree Navigators“ (STN) können die einzelnen Strukturen eines Baumes mit weiteren Eigenschaften belegt werden, zum Beispiel mit biologischer Aktivität. Auch lässt sich der einzelne Baum durchsuchen, indem jeder Ast durch Hineinzoomen im Detail betrachtet wird.

Des Weiteren können mit Hilfe des Scaffold Hunters virtuelle Gerüste identifiziert werden, die zwar keine Moleküle im ursprünglichen Substanzdatensatz repräsentieren, allerdings zur Vervollständigung des Baumes benötigt werden. Substanzen, die hinter diesen virtuellen Strukturgerüsten stehen, können durchaus die gleiche biologische Aktivität haben wie die Substanzen der jeweiligen Mutter- oder Kind-Strukturgerüste.^[16] Bisher wurde der chemische Strukturraum nur über chemische Regeln kartiert. Ein weitergehender Schritt war in Folge die Kartierung unter Berücksichtigung biologischer Relevanz. Zudem wurde ein Mutter-Kind-Zusammenhang zwischen zwei Strukturgerüsten nur bei gemeinsamer biologischer Aktivität hergestellt – also zum Beispiel bei der Hemmung des gleichen Enzyms.^[17]

2.8 Möglichkeiten des Scaffold Hunter's zur Identifikation biologisch aktiver Moleküle

Zur Demonstration der Möglichkeiten des Scaffold Hunters wurde der PubChem Pyruvatkinase-Screen von 51415 Molekülen analysiert. Mittels des Scaffold Hunters wurden 35868 Strukturgerüste (8684 virtuelle Strukturgerüste) sowie 767 Äste aufgestellt. Virtuelle Strukturgerüste sind vom „Scaffold Hunter“ identifizierte Strukturen, die keine Moleküle repräsentieren, jedoch benötigt werden, um die Aststruktur des Baumes zu ergänzen. Das Filtern der Strukturgerüste nach jenen Strukturen, die die Pyruvatkinase aktivieren oder inhibieren, führte zu einem fokussierten Strukturgerüstbaum. Vier virtuelle Strukturklassen, die auf Ästen dieses Baumes liegen, wurden ausgewählt und 107 Derivate dieser Strukturklassen getestet. Dies führte zur Auffindung von drei Pyruvatkinase-Aktivatoren und sechs Pyruvatkinase-Inhibitoren. Hierbei fiel auf, dass virtuelle Strukturgerüste auf Ästen mit

Aktivatoren neue Aktivatoren sowie virtuelle Strukturgerüste auf Ästen mit Inhibitoren neue Inhibitoren hervorbrachten. Es konnte auch validiert werden, dass die Untersuchung von virtuellen Strukturgerüsten aus Ästen, die von hauptsächlich inaktiven Strukturen abgeleitet wurden, auch keine Modulatoren der Pyruvatkinase hervorbringt.

3. Ziele der Arbeit

In der chemischen Biologie ist die Identifikation geeigneter Protein-Liganden Voraussetzung für die Anwendung kleiner Moleküle zur Beantwortung biologischer Fragestellungen. Um diese herausfordernde Aufgabenstellung zu lösen, haben Waldmann *et al.* das Konzept der Biologie-orientierten Synthese (BIOS) entwickelt. Dieser Ansatz ermöglicht einerseits, biologisch-präevaluierte Startpunkte für weitergehende chemische Synthesen im chemischen Strukturraum zu finden. Eine andere Anwendung des BIOS-Konzeptes ist zum Beispiel die Auswahl geeigneter molekularer Zielproteine für bestehende Substanzkollektionen.

Im Rahmen dieser Arbeit sollten drei weitere Anwendungsmöglichkeiten der Biologie-orientierten Synthese erarbeitet werden.

Um die Informationslücke zwischen Substanzkollektionen und interessanten Zielproteinen zu schließen, sollte mit Dr. S. Wetzel ein cheminformatisches Verfahren zur Targetvorhersage von Substanzbibliotheken evaluiert werden. Bei diesem Verfahren werden zwei Typen von Strukturgerüstbäumen überlagert. Der erste Baum enthält eine Kombination aus Strukturgerüsten und deren biochemische oder aber biologische Aktivitäten. Der zweite Strukturgerüstbaum wurde aus Molekülen erstellt, für die noch keine Aktivität bekannt ist. Hierbei sollte untersucht werden, ob es möglich ist, biochemische Informationen im Sinne einer Annotierung biologischer Eigenschaften von einem Baum auf einen zweiten zu übertragen. Um dieses Verfahren experimentell zu überprüfen, wurde ein Ast des Strukturbaumes als repräsentatives Beispiel ausgewählt. Die Verifizierung dieses Ansatzes sollte am γ -Pyronzweig des Strukturgerüstbaumes erfolgen. Deshalb sollte zu dieser Struktur eine Substanzbibliothek durch Synthese und Zukauf angelegt werden. Hierbei war darauf zu achten, dass die Substanzkollektion mehrere Ebenen des γ -Pyron-Strukturgerüstbaumes umfasst. Da jedoch insbesondere die unterste Ebene des γ -Pyronstrukturgerüstbaumes, die γ -Pyrone, kommerziell nur eingeschränkt erhältlich

3. Ziele der Arbeit

waren, sollte für diese Aufgabenstellung eine Synthese entworfen werden, welche eine einfache und effiziente Synthese strukturell-verschiedener γ -Pyrone ermöglicht. Zur Verifizierung des cheminformatischen Ansatzes sollte die aus mehreren Ebenen des Gerüstbaumes bestehende Substanzbibliothek anschließend in verschiedenen Protein-Assays getestet werden, wobei die Proteine so auszuwählen waren, dass sie zu verschiedenen Klassen gehören.

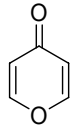


Abbildung 4 γ -Pyrone-Strukturgerüst.

In dem zweiten Teil der Arbeit sollten Inhibitoren der Lysin-spezifischen Demethylase (LSD1), einem neuen pharmazeutisch relevanten Zielprotein, gefunden werden. Die Suche nach Inhibitoren dieser Struktur sollten mittels des „Protein Structure Similarity Clustering“ (PSSC)-Ansatzes identifiziert werden. So gefundene Inhibitoren sollten auf ihre pharmakologischen Eigenschaften hin geprüft werden, um sicher zu stellen, dass sie für biologische Versuche geeignet sind.

Aufbauend auf der Arbeit von Dr. A. Nören-Müller sollte eine Festphasensynthese angewandt werden, um Macrolin-Analoga herzustellen. Diese Verbindungen sind als Inhibitoren der MptpB-Phosphatase bekannt. So sollte der Ligand-Protein-Bindungsmodus durch kinetische Messungen untersucht werden.

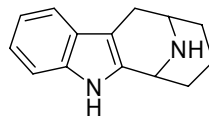


Abbildung 5: Macrolin-Strukturgerüst.

4. Spezieller Teil – Pyrone I

4.1 Hintergrund der Strukturgerüstbaum-Überlagerung

In der pharmazeutischen Forschung ist die Auffindung neuer Leitstrukturen zur selektiven Hemmung einzelner Zielproteine von herausragender Bedeutung. Dabei werden Screenings großer Substanzbibliotheken durchgeführt, die oft mehrere Millionen Substanzen umfassen. Diese Molekülkollektionen werden häufig aus verschiedenen Quellen, zum Beispiel der kombinatorischen Synthese von heterocyclischen Strukturen, aber auch aus Naturstoffen und ihren Analoga zusammengestellt. Wie bereits in der Einleitung herausgestellt, sind Naturstoffe sehr interessante Startpunkte für Substanzbibliotheken, da sie durch die Evolution in gewisser Weise präevaluiert wurden. Allerdings ist die direkte Anwendbarkeit von Naturstoffen als Arzneistoffe limitiert, da aufgrund ihrer meist begrenzten Zugänglichkeit durch Isolation beziehungsweise Totalsynthese häufig nur geringe Substanzmengen erhältlich sind.^[44] Darüber hinaus verfügen Naturstoffe oftmals nicht über die benötigten pharmakokinetischen Eigenschaften für eine medizinische Anwendung. Die Arbeitsgruppe um Waldmann *et al.* hat bereits in früheren Arbeiten einen möglichen Lösungsansatz präsentiert, der dem Problem des limitierten Zugangs zu biologisch relevanten kleinen Molekülen begegnet. Hierzu wurde das Konzept der Biologie-orientierten Synthese (BIOS) entwickelt.^[15,35,45] Ein anderer Ansatz von Schreiber *et al.* versucht dieses Problem mittels des DOS-Konzeptes zu lösen.^[46] Eine große Vereinfachung für das Problem des Auffindens geeigneter Liganden für Proteine wäre es, die mögliche Bioaktivität einzelner Verbindungen vorhersagen zu können. Ein Ansatz hierzu wurde von Backlund *et al.* berichtet, welcher eine Überlagerung einer Gruppe von Naturstoffen mit einer Menge an Referenzsubstanzen mit bekannter biologischer Aktivität durchgeführt hat, um Rückschlüsse auf die Aktivität ersterer zu ziehen.^[47,48]

Dieser Ansatz sollte jedoch auch auf das BIOS-Konzept übertragbar sein. Hierzu würde dann ein Strukturgerüstbaum – basierend auf Molekülen, zu denen biochemische und/oder biologische Aktivität bekannt ist – mit einem zweiten, aus reinen Strukturdaten generierten Strukturgerüstbaum überlagert.

Dieser Idee folgend wurden von Dr. S. Wetzel zwei Strukturgerüstbäume erzeugt. Der erste Strukturgerüstbaum basierte auf Naturstoffen. Der zweite Strukturgerüstbaum wurde aus solchen Verbindungen gebildet, für die biologische Aktivität literaturbekannt ist.^[8,49] Die biologische Aktivität einzelner Strukturen auf einem Ast dieses zweiten Baumes dient als Grundlage für die Analyse des umliegenden chemischen Raumes. In Zusammenarbeit mit Dr. S. Wetzel sollte gezeigt werden, dass bei Bewegung entlang der Äste des Strukturgerüstbaumes (Brachiation) von der literaturbekannten Aktivität eines Strukturgerüsts auch auf die Aktivität anderer umliegender Strukturgerüste geschlossen werden kann. Dies hätte den Vorteil, dass so möglicherweise strukturelle Komplexität unter Konservierung biologischer Aktivität vereinfacht werden könnte, was zur Reduktion des Syntheseaufwandes führen würde. In den Kapiteln dieses Abschnittes soll in Kürze die Strukturgerüstbaum-Überlagerung beschrieben und in Folge der Nutzen dieses Ansatzes gezeigt werden. Hierzu wird die Synthese und Zusammenstellung einer 500 Substanzen umfassenden γ -Pyrone-Substanzkollektion beschrieben. Nachfolgend wird die mittels dieses Ansatzes durchgeführte Auswahl an interessanten Zielproteinen geschildert; schließlich werden die Ergebnisse beschrieben und diskutiert, die bei Tests der Verbindungen in verschiedenen biochemischen Assays erlangt wurden. Als pharmazeutisch relevante Zielproteine wurden hierbei die Monoaminoxidasen, „Signal Transducer and Activator of Transcription“ (STAT) Proteine und die Sphingomylinasen ausgewählt.

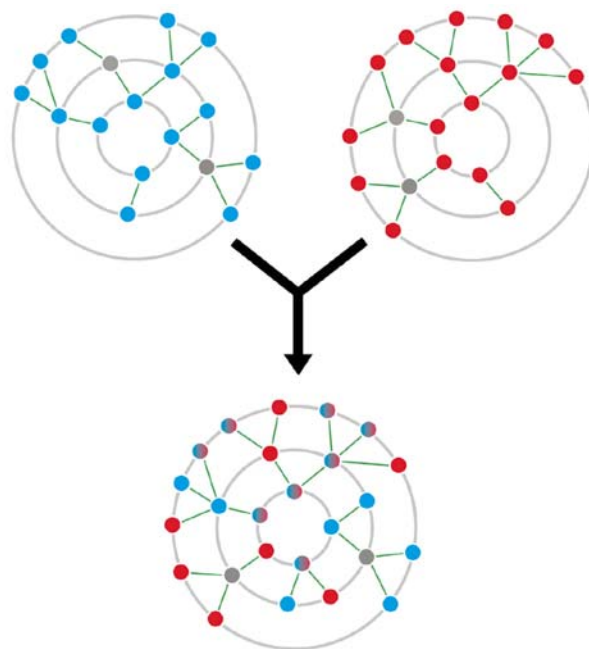
4.2 Belegung von naturstoffbasierten Substanzgerüsten durch Strukturgerüstbaum-Überlagerung am Beispiel der γ -Pyrone

Um die computerchemischen Grundlagen zu erstellen, hat Dr. S. Wetzel in Zusammenarbeit mit Dr. A. Schuffenhauer und Dr. P. Ertl von der Firma Novartis mit Hilfe einer Reihe chemisch basierter Regeln zunächst einen Strukturgerüstbaum aufgebaut, der durch Naturstoffe und Analoga besetzt war, die aus dem „Dictionary of Natural Products (DPN), Version 17.2 von 2008^[50] stammen.^[43] Die mittels dieser Regeln extrahierten Strukturgerüste wurden wie oben beschrieben hierarchisch in Ästen angeordnet. Der so entstehende Baum entspricht jenem, der in der Einleitung dieser Arbeit in Abbildung 2 gezeigt wird.

Zur Generierung eines zweiten analogen Strukturgerüstbaumes wurde eine Datenbank zu Hilfe gezogen, die Moleküle umfasst, die mit biochemischer und biologischer Aktivität belegt sind. Es bot sich an, die WOMBAT-Datenbank zu verwenden, dessen Akronym für „WOrld of Molecular BioAcTivity“ steht. Diese Datenbank umfasst 190.000 Moleküle (Ausgabe 2007.1), deren Aktivität in der Literatur beschrieben ist.^[51,52]

Durch Überlagerung der beiden Strukturgerüstbäume wurde nun ein Baum geschaffen, der die einzelnen Strukturgerüste aus dem naturstoffbasierten und dem mit biochemischer korrelierenden WOMBAT-basierten Strukturgerüstbaum enthielt. Wie im vorangegangenen Kapitel beschrieben, sollte so von den WOMBAT-basierten Strukturgerüsten Rückschlüsse auf vielversprechende Zielproteine für Strukturgerüste des naturstoffbasierenten Strukturgerüstbaumes gezogen werden.

Dr. S. Wetzel hat bei der Überlagerung beider Strukturbäume identische Motive vereinigt und diejenigen Motive, die nur in einem der beiden Bäumen vorkommen, zu einem großen Baum ergänzt. Dieses Prinzip wird in Schema 2 gezeigt.^[8]



Schema 2: Schematische Darstellung der Überlagerung von Strukturgerüstbäumen aus der DNP- (blau) und WOMBAT-Datenbank (rot). Die einzelnen Kreise stehen für Strukturgerüste innerhalb des Baumes. Während der Überlagerung werden identische Gerüste zusammengefasst (rot/blau Kreise); alle anderen Gerüste werden zum Baum hinzugefügt. Graue Punkte stehen für virtuelle, durch den STG-gebildete Gerüste zur Vervollständigung des Baumes. Diese Gerüste sind nicht zwangsläufig chemisch bedeutsam.^[8]

Im Rahmen dieser Arbeit sollte dieses neue Konzept anhand des γ -Pyrone-Astes des naturstoffbasierten Strukturgerüstbaumes validiert werden. Der γ -Pyrone-Ast bot sich an, da für diesen Teil des Baumes mehrere Strukturgerüste sowohl im naturstoffbasierten als auch im WOMBAT-basierten Strukturgerüstbaum vorkommen. Der Ast des naturstoffbasierten Baumes fußt auf 8171 Substanzen des Dictionary of Natural Products (DNP), wobei der γ -Pyrone-Ast des WOMBAT-basierten Baumes aus 1701 Substanzen abgeleitet wurde. Letzteres impliziert, dass eine ausreichende Zahl an Strukturen innerhalb des WOMBAT-basierten Baumes mit biologischer oder biochemischer Aktivität belegt ist. Die nähere Analyse des WOMBAT-basierten γ -Pyrone-Astes ergab, dass dieser die 1701 zugrunde liegenden Substanzen mit 133 Zielproteinen verbindet.^[8] Hierbei sind mehr als 95% der γ -Pyrone nur gegen zwei oder weniger Zielproteine aktiv, so dass in diesem Zusammenhang nicht von promiskuitiven Bindern gesprochen werden kann. Aus diesen Proteinen wurden – wie

in Kapitel 4.5 beschrieben – die Targets ausgewählt, deren mögliche Inhibition durch Verbindungen der Substanzbibliothek getestet wurde.

Aus vorherigen Untersuchungen niedermolekularer Substanzbibliotheken war bekannt, dass fokussierte naturstoffbasierte Substanzbibliotheken in biochemischen Versuchen durchschnittliche Trefferquoten von 1-2% liefern.^[15,25] Somit muss eine Substanzbibliothek mindestens 100-200 Substanzen zur relativ sicheren Auffindung biochemisch aktiver Substanzen umfassen. Vor diesem Hintergrund wurde im Rahmen dieser Arbeit eine Substanzbibliothek mit 500 Strukturen zusammengestellt, die Substanzen mit fünf verschiedenen Strukturgerüsten des γ -Pyrone-Astes umfasste (Abbildung 6). Eine vollständige Übersicht über die zusammengestellte Substanzbibliothek ist im Anhang der Tabelle 1 zu entnehmen.

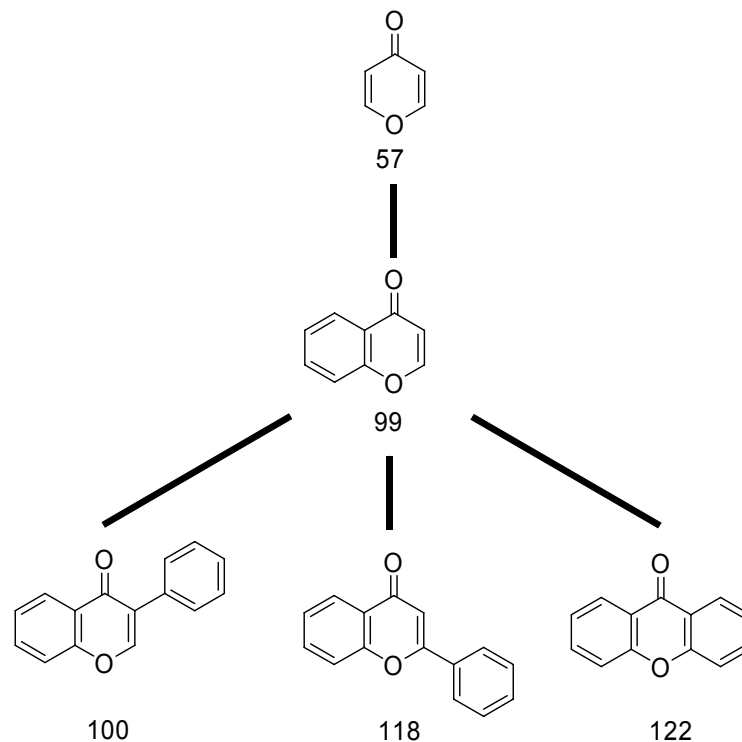


Abbildung 6: Zusammensetzung des γ -Pyrone-Astes. Die Nummer unterhalb des jeweiligen Strukturgerüsts gibt die Anzahl der entsprechenden Derivate dieser Strukturklasse an.

Bei der Zusammenstellung der Substanzkollektion wurde auf ausreichende chemische Diversität geachtet, um einen möglichst großen Teil des chemischen Strukturraumes der γ -Pyrone abzudecken. Ein Teil der Substanzen wurde – wie in

Kapitel 4.4 beschrieben – synthetisiert und die so erhaltene Substanzbibliothek mit käuflich erworbenen Verbindungen angereichert. Bei dem von Dr. S. Wetzel durchgeführten Kauf der Substanzen wurde auf die üblichen Parameter für pharmazeutisch relevante Substanzbibliotheken geachtet, wie der berechnete n-Oktanol/Wasser-Koeffizient (AlogP)^[53], die Zahl der Wasserstoff-Donoren und -Akzeptoren, die Zahl der rotationsfähigen Bindungen sowie die Molekulargewichtsverteilung. Die Verteilung der Parameter lag in den üblichen Grenzen; 78% der Substanzen entsprachen der Rule-of-Five.^[54] Außerdem entsprachen mehr als 50% der naturstoffinspirierten Substanzen den Kriterien, die für Leitstrukturen günstige Eigenschaften vorhersagen.^[55,56,57]

4.3 Totalsynthese des Naturstoffs Cyercen A und seines α -Pyrone Analogons

γ -Pyrone konnten bereits aus vielen Organismen und Pflanzen extrahiert werden. Die erste Isolation eines γ -Pyrone gelang F. W. Sertürner im Jahre 1805 durch die Isolation der Mekonsäure aus *Papaver somniferum*.^[58;59,60,61] Seit diesem Erfolg sind zahlreiche weitere Verbindungen dieser Strukturklasse isoliert worden. Viele dieser Substanzen stammen aus Meeresorganismen. In diesen Lebewesen spielen sie eine wichtige Rolle zur Verteidigung, zur Regeneration sowie zum Sonnenschutz.

1991 veröffentlichten Di Marzo *et al.* die Isolation der Naturstoffe Cyercen A (**1**) und Cyercen B (**2**) aus der Molluske *Cyerce cristallina* (Abbildung 7).^[62] Biochemische Untersuchungen ergaben, dass Cyercen A (**1**) zur Regeneration der Molluske beiträgt.^[62,63] In einem Assay, der die Toxizität der Substanzen auf Fische testet, stellte sich heraus, dass Cyercen A (**1**) im Gegensatz Cyercen B (**2**) toxisch ist, was die Autoren auf die bessere Zellgängigkeit von Cyercen A (**1**) zurückführten.^[62,63]

Aufgrund der biochemischen Eigenschaften wurde Cyercen A (**1**) als Struktur zur Synthese ausgewählt, wobei literaturbekannte Synthesen als Planungsgrundlage verwendet wurden.

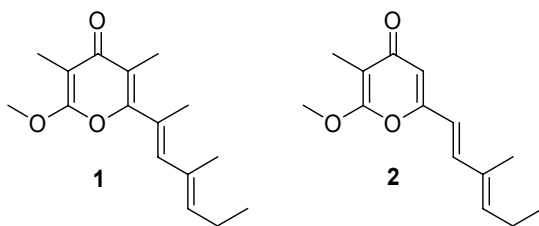
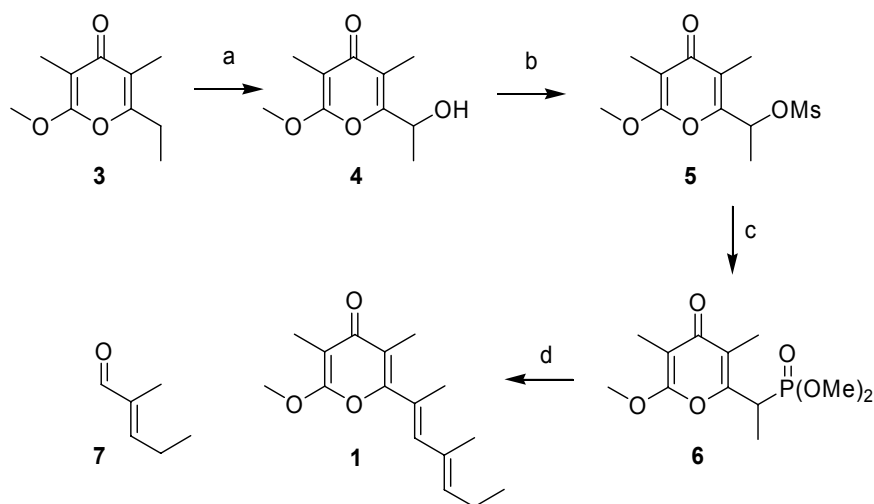


Abbildung 7: Cyercen A (**1**) und Cyercen B (**2**), die aus der gezeigten Molluske *Cyerce cristallina* isoliert wurden.

Moses *et al.* haben zum Beispiel 2004 eine Synthese des Naturstoffs publiziert, bei der der Schlüsselschritt zur Bildung von Cyercen A (**1**) eine Horner-Wadsworth-Emmons-Olefinierung ist, die den Aufbau der *E*-substituierten Doppelbindung ermöglicht (Schema 3).^[64]

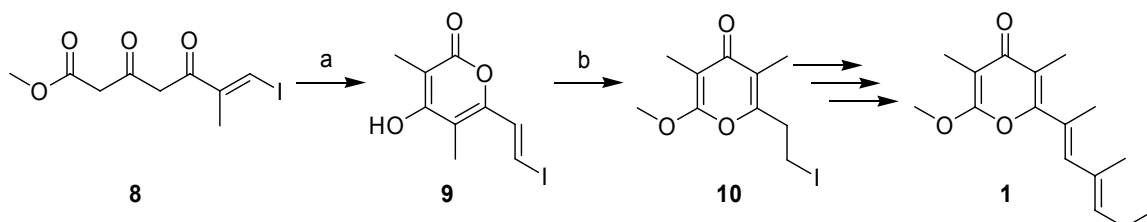
4. Spezieller Teil – Pyrone I



Schema 3: Totalsynthese von Cyercene A (**1**) nach Moses *et al.*: a. LHMDs, THF, $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$, dann Davis Reagenz, 75%; b. MsCl, Et_3N , DCM, 92%; c. NaH, DMF, Diethylphosphit, $0\text{ }^{\circ}\text{C}$, 84%; d. LHMDs, $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ zu $20\text{ }^{\circ}\text{C}$, DMF, dann Zugabe von **7** 87%.

Moses *et al.* gehen bei der gezeigten Synthese von einem bereits aufgebauten und kommerziell erhältlichen γ -Pyrone-Gerüst **3** aus. Deprotonierung von **3** mit LHMDs und anschließende Zugabe von Davis-Reagenz führte zu dem Hydroxypyron **4**, das in das entsprechende Mesylat **5** überführt wurde. Durch Behandlung von **5** mit dem Natriumsalz des Diethylphosphits wurde das gewünschte Startmaterial **6** geliefert, das im folgenden Schlüsselschritt *via* Horner-Wadsworth-Emmons-Olefinierung mit dem Aldehyd **7** zu Cyercen A (**1**) umgesetzt wurde.

Eine weitere Synthese, die in diesem Zusammenhang insbesondere in Bezug auf den Aufbau des γ -Pyrone-Gerüsts von Interesse ist, wurde 2005 von der Arbeitsgruppe um Prof. D. Trauner veröffentlicht (Schema 4).

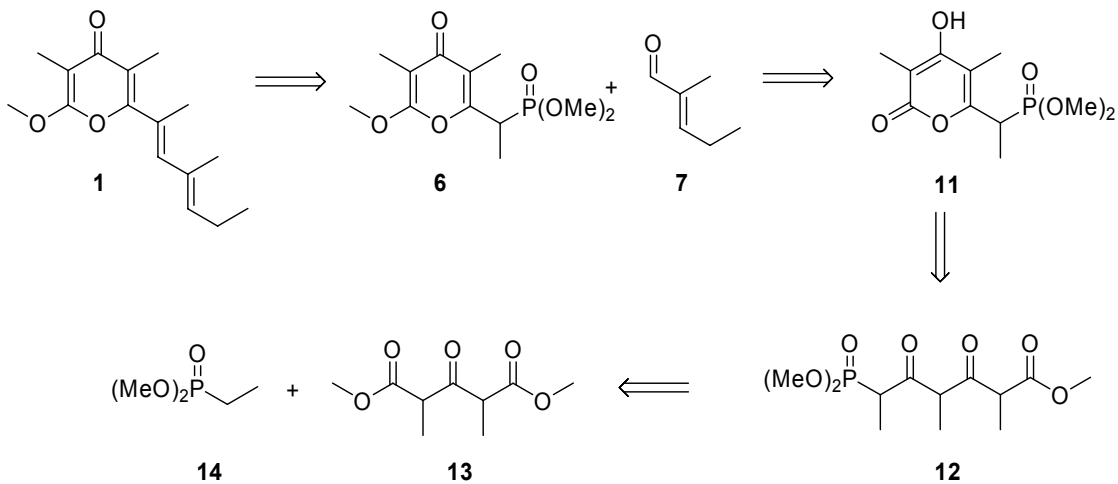


Schema 4: Aufbau des γ -Pyrone-Gerüsts nach Trauner *et al.*: DBU, Benzol, Reflux; MeOSO_4 , DCM, RT, 12 h, 95%.

Bei der gezeigten Synthese wird der Ketodiester **8** eingesetzt. Dieser liegt als komplexes Gemisch an Diastereomeren vor, die nicht aufgereinigt wurden. Durch Zyklisierung mit DBU in Benzol wurde das Hydroxypyron **9** erhalten, das mittels

Methylfluorosulfonat regioselektiv zu **10** umgesetzt wurde. Das so erhaltene Produkt konnte mit unterschiedlichen Vinylstannanen zu verschiedenen Verbindungen der Cyercen-Familie umgesetzt werden.^[65]

Basierend auf diesen vorangegangenen Synthesen wurde eine Retrosynthese entwickelt (Schema 5).

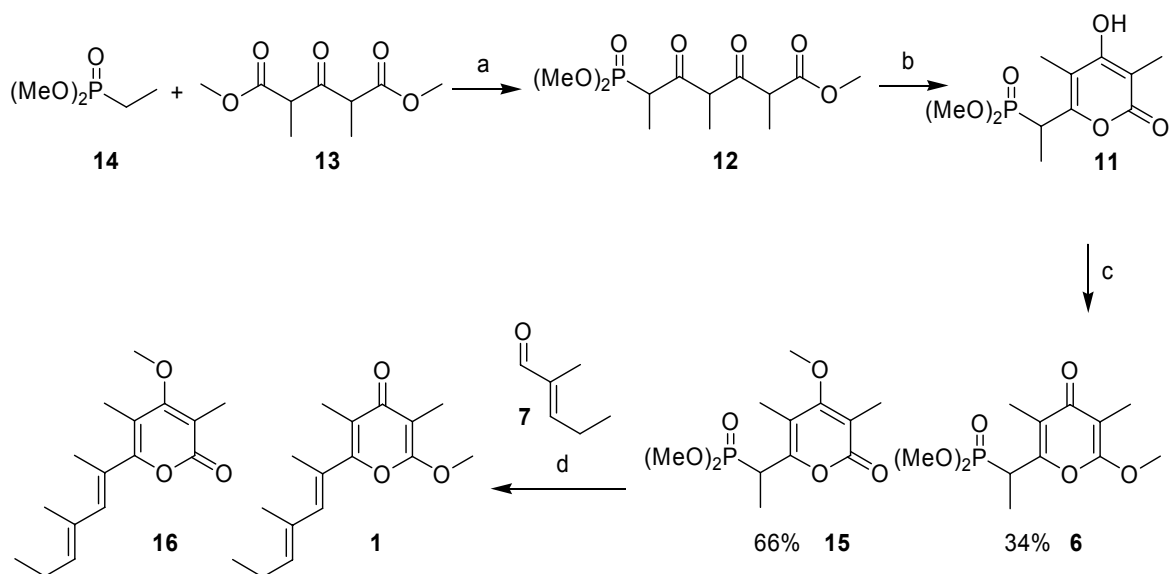


Schema 5: Retrosynthese des Cyercen A (**1**)

Schlüsselschritt der geplanten Synthese sollte wie bei Moses *et al.* die Horner-Wadsworth-Emmons-Olefinierung sein, die es erlaubt, eine Doppelbindung *E*-selektiv in einem Schritt aufzubauen. Das Phosphonat **6** soll wie bei Trauner *et al.* aus dem analogen α -Pyrone **11** durch regioselektive Methylierung gewonnen werden.^[65] Das α -Pyrone **11** könnte dann durch Zyklisierung des Ketodiesters **12** erhalten und das Phosphonat **12** schließlich aus den Komponenten **13** und **14** aufgebaut werden.

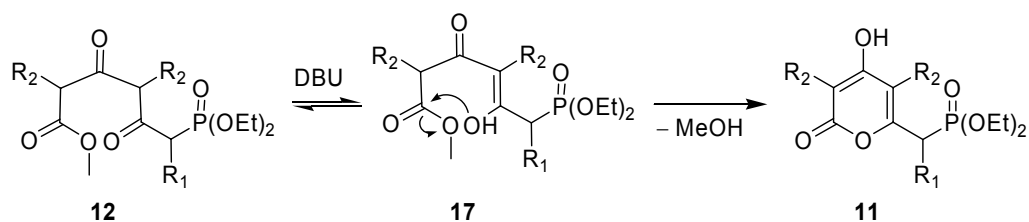
Der Retrosynthese folgend wurde zuerst eine Synthese von Cyercen A (**1**) etabliert. Dabei wurde das Hauptaugenmerk auf einen schnellen und einfachen Zugang zu der Pyron-Substanzklasse gelegt. Die Reaktionsschritte sollten so geplant werden, dass die Synthese auf ein großes Spektrum an Substraten ausweitbar ist. Die Syntheseoptimierung wurde vor Beginn der vorliegenden Arbeit von Dr. S. Chammaa durchgeführt und wird an dieser Stelle aufgeführt, um die Vorarbeiten zur Entwicklung der anschließenden Substanzbibliothek-Synthese zu erläutern.

4. Spezieller Teil – Pyrone I



Schema 3: Totalsynthese von Cyercen A (**1**) und des Lacton-Analogons **16**; a. *n*-BuLi, THF, -78°C ; b. DBU, Toluol, 80°C , 75%; c. Me_2SO_4 , K_2CO_3 , Aceton, Reflux; d. Aldehyd **7**, LHMDS, THF -78°C .

Bei der beschriebenen Synthese wurde das Phosphonat **14** zwecks Deprotonierung zunächst mit einem Überschuss an *n*-BuLi versetzt. In Folge wurde der Ketodiester **13** zu dem Gemisch hinzugegeben. Die Substitution der Methoxy-Gruppe führte zu dem Phosphonat **12** in einer Ausbeute von 75%. Die Umsetzung von **12** mit DBU lieferte das α -Pyrone **11**. Die Zyklisierung, die nach der oben beschriebenen Vorschrift von Liang *et al.* durchgeführt wurde, erbrachte das α -Pyronephosphonat in einer Ausbeute von 86%.^[65] Mechanistisch läuft die Zyklisierung wie in Schema 7 gezeigt ab.



Schema 7: Postulierter Mechanismus der Zyklisierung zum α -Pyrone **11**.

Triebkraft der Reaktion ist einerseits die Bildung eines konjugierten Systems und andererseits die Zunahme der Entropie durch Abspaltung von Methanol. Diese Abspaltung wird durch DBU ($\text{pK}_\text{s} = 12$, in Wasser) begünstigt, welches das enolische Proton bindet ($\text{pK}_\text{s} = 9$, in Wasser).

Es ist literaturbekannt, dass bei der Bildung des γ -Pyrone **6** durch regioselektive Methylierung stets auch das analoge α -Pyron **15** entsteht.^[65] Dr. S. Chammaa fand durch Optimierung der Reaktion heraus, dass Methylsulfonat in Gegenwart von Kaliumcarbonat bessere Ausbeuten an γ -Pyron **6** liefert als Methylfluorosulfonat.^[65] Trotz dieser Optimierungen jedoch war das Verhältnis von α -Pyron **15** zu γ -Pyron **6** gleich 66/34, so dass die Ausbeute für das γ -Pyron **6** nur bei 27% liegt. Das analoge α -Pyron **15** wurde mit einer Ausbeute von 59% gebildet.

Der Schlüsselschritt der Synthese bestand dann in der Einführung der ungesättigten Seitenkette *via* Horner-Wadsworth-Emmons-Olefinierung mit dem Aldehyd **7**, um den Naturstoff Cyercen A (**1**) beziehungsweise das α -Pyron-Analogon (**16**) zu erhalten. Die Wahl fiel auf diesen Reaktionstyp, da er ermöglicht, mit LHMDS als Base *E*-selektiv Doppelbindungen zu knüpfen.^[66] Die Synthese der Olefine folgte in Anlehnung an die Arbeitsvorschriften von Moses *et al.*^[64]

4.4 Synthese der Pyron Substanzbibliothek

Die Synthese der Pyron-Substanzbibliothek folgte der Totalsynthese des Naturstoffs Cyercen A (**1**). Jedoch sollte die Synthesestrategie so umgesetzt werden, dass ein relativ leichter Zugang zu einer fokussierten Pyronsubstanzbibliothek ermöglicht ist.

In vorangegangenen Versuchen hatte Dr. S. Chammaa versucht, das Pyron-Gerüst über eine Festphasensynthese aufzubauen. Dieser Ansatz hätte den Vorteil gehabt, dass in Parallelsynthesen schnell und mit wenigen Aufreinigungsschritten eine Substanzbibliothek hätte aufgebaut werden können. Da die Entwicklung einer solchen Festphasensynthese jedoch nicht zu befriedigenden Ergebnissen führte, wurde alternativ eine auf Scavengerreagenzien basierende Reaktionsroute getestet. Bei der Scavenger-Synthesestrategie werden Festphasen-gebundene Reagenzien eingesetzt, die in der Lage sind, Reaktanten und Reaktionsnebenprodukte durch einfaches Abfiltrieren aus dem Reaktionsgemisch zu entziehen.^[67] Diese Reaktionsführung bietet sich insbesondere bei parallel geführten Lösungssynthesen

zur Erstellung von Substanzbibliotheken an, um zeitaufwendige Aufreinigungsschritte zu vermeiden. Gayo *et al.* zeigten, dass sich gerade Amberlyst- oder Dowex-Ionenaustauscharze anbieten, um dem System zum Beispiel basische Komponenten zu entziehen.

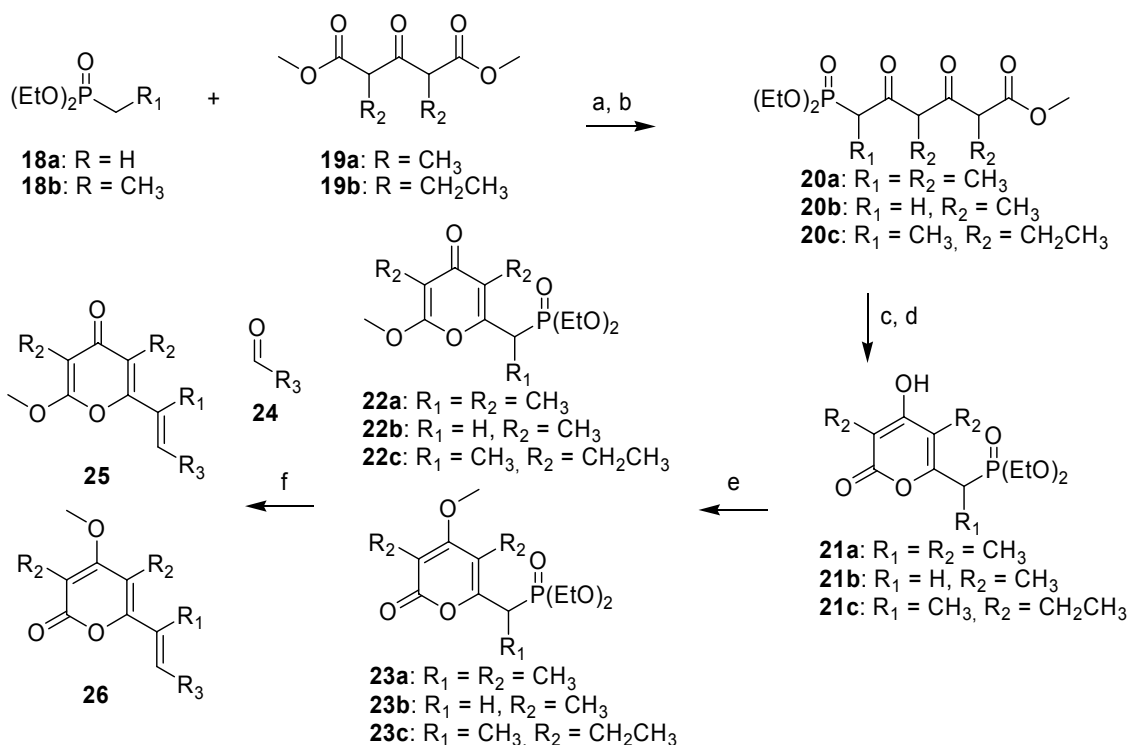
Im Fall der Synthese der Pyron-Substanzkollektion ermöglichte die Strategie, die Aufreinigungsschritte so zu minimieren, dass die Synthese der gewünschten Verbindungen innerhalb von zwei Tagen durchgeführt werden konnte.

Bei der so entwickelten Synthese hat Dr. S. Chammaa den Schwerpunkt auf die Synthese der Phosphonate **22** und **23** gelegt, wohingegen der Autor insbesondere für die Gewinnung der Verbindungen **25** und **26** verantwortlich war. Für die Bibliothekssynthese wurden die kommerziell erhältlichen Phosphonate **18a** und **18b** mit den Ketodiestern **19a** und **19b** umgesetzt. In dieser Stufe der Reaktion konnte somit die erste Diversität des Endproduktes durch die Wahl des Phosphonats **18a** beziehungsweise **18b** und der Ketodiesters **19a** beziehungsweise **19b** bestimmt werden. **19a** und **19b** konnten aus dem nicht substituierten Dimethyl-3-oxopentandioat durch Rühren mit Methyl- oder Ethyliodid in Gegenwart von Kaliumcarbonat bei 60 °C erhalten werden. Die Ketodiester lagen nach Destillation als Diastereomergemische vor. Da die Stereoinformation nach dem Zyklisierungsschritt und somit der Bildung der Doppelbindungen verloren geht, können diese Gemische ohne Diastereomertrennung eingesetzt werden.

Zur Aufreinigung des Produktgemisches des ersten Reaktionsschrittes kam als Scavenger-Harz Amberlyst 15 zum Einsatz. Amberlyst 15 ist ein styrolbasiertes Harz, das mit Sulfonsäuregruppen funktionalisiert ist. Rühren des Reaktionsgemisches mit dem Harz entzog der Lösung die enthaltene Base. Nachfolgende Filtration erbrachte die Ketophosphonate **20a** bis **20c**. Um einen Überschuss an Phosphonat **18a** beziehungsweise **18b** zu entfernen, wurde das Gemisch unter Hochvakuum gerührt. So konnte durch den Einsatz von Amberlyst 15 die sonst nötige

4. Spezieller Teil – Pyrone I

säulenchromatographische Aufreinigung durch einen Filtrationsschritt und Rühren *in vacuo* ersetzt werden.



Schema 4: Scavenger-Synthese der Pyron-Substanzbibliothek a. BuLi, THF, -78 °C; b. schütteln mit Amberlyst 15; c. DBU, Toluol, 80 °C; d. schütteln mit Amberlyst 15; e. Me₂SO₄, K₂CO₃, Aceton, Reflux; f. Aldehyd **24**, LHMSDS, THF -78 °C.

In Analogie zur Naturstoffsynthese wurden die Produkte **20a** bis **20c** mit DBU umgesetzt, um die zyklisierten Pyrongerüste **21a** bis **21c** zu erhalten. Das Gemisch wurde erneut mit Amberlyst 15 behandelt, um überschüssiges DBU abzufangen. Nach einem Filterschritt wurde das Rohprodukt mittels Dimethylsulfat methyliert und so die α - and γ -Phosphonatpyrone **22a** bis **22c** und **23a** bis **23c** erhalten. Nach dieser Synthesestufe wurde der erste säulenchromatographische Aufreinigungsschritt der Synthese durchgeführt.

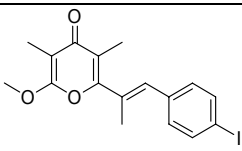
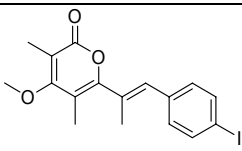
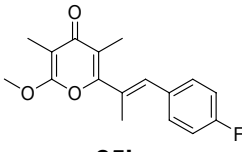
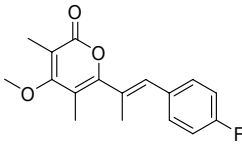
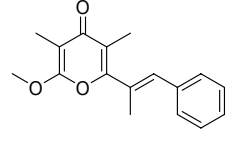
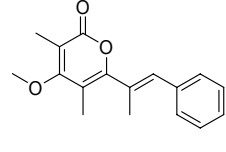
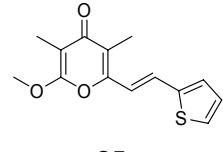
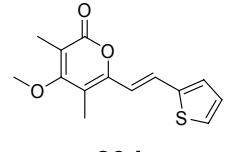
Die aufgereinigten Produkte **22a** bis **22c** und **23a** bis **23c** wurden dann *via* Horner-Wadworth-Emmons-Olefinierung mit verschiedenen Aldehyden **24** umgesetzt, um 18 γ -Pyrone **25** sowie 45 α -Pyrone **26** zu synthetisieren. Zur Synthese wurden wie bei der Naturstoffsynthese die von Moses *et al.* beschriebenen Synthesevorschriften verwendet.^[64] Es zeigte sich, dass ein breites Spektrum an Aldehyden eingesetzt

4. Spezieller Teil – Pyrone I

werden konnte. Neben aromatischen Verbindungen wurden aliphatische Aldehyde verwendet.

Folgende Tabelle zeigt eine Übersicht zu den Ausbeuten jeweiliger γ -Pyrone **25** / α -Pyrone **26**-Paare nach präparativer HPLC oder säulenchromatographischer Aufreinigung.

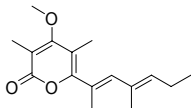
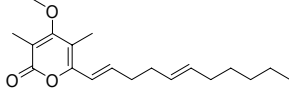
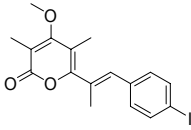
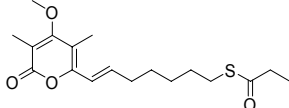
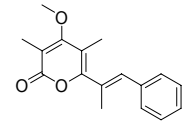
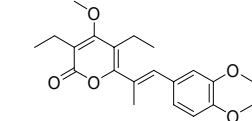
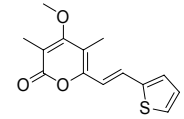
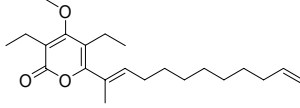
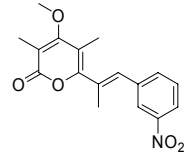
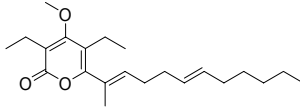
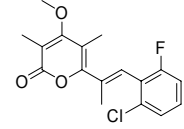
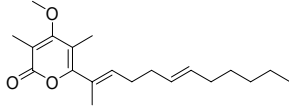
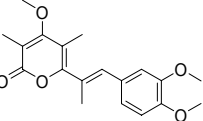
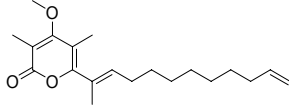
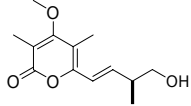
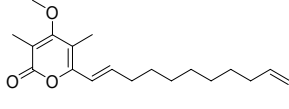
Tabelle 1: Vergleich der Ausbeuten der γ -Pyrone **25** und α -Pyrone **26**.

| γ -Pyrone | Ausbeute | α -Pyrone | Ausbeute |
|---|----------|---|----------|
|  25a | 35% |  26a | 61% |
|  25b | 28% |  26b | 40% |
|  25c | 50% |  26c | 78% |
|  25e | 28% |  26d | 76% |

4. Spezieller Teil – Pyrone I

Die dargelegten Beispiele zeigen, dass unter den gewählten Reaktionsbedingungen die α -Pyrone **26** mit einer höheren Ausbeute gebildet werden als die analogen γ -Pyrone **25**. Nachfolgende Tabelle zeigt eine Übersicht gebildeter α -Pyrone **26** und das Spektrum der synthetisierten Bibliothek nach der Horner-Wadsworth-Emmons-Olefinierung.

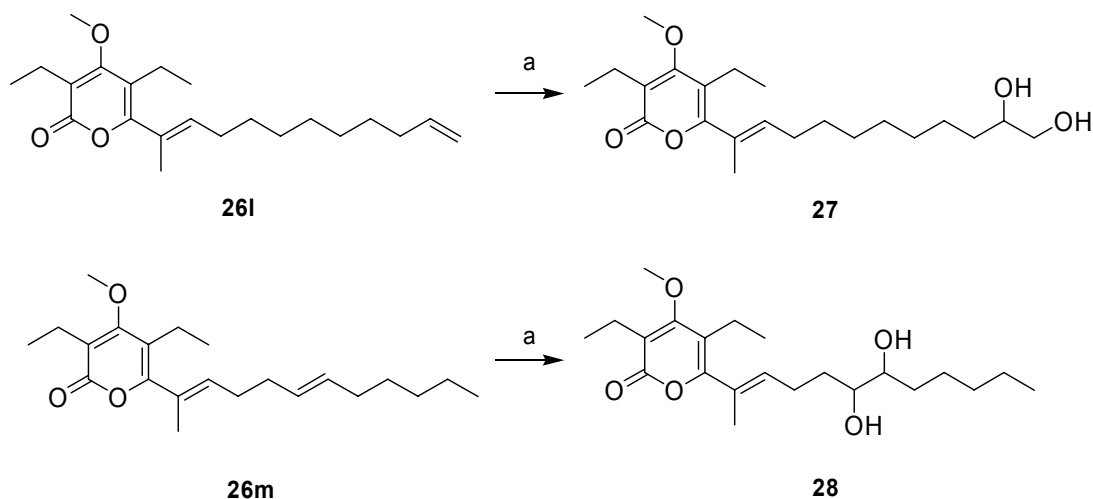
Tabelle 2: Exemplarische Übersicht synthetisierter α -Pyrone

| Eintrag (Nr.) | Struktur | Ausbeute | Eintrag (Nr.) | Struktur | Ausbeute |
|---------------------|---|----------|----------------------|--|----------|
| 1 (16) |  | 60% | 9 (26i) |  | 79% |
| 6 (26a) |  | 61% | 10 (26j) |  | 69% |
| 2 (26c) |  | 78% | 11 (26k) |  | 51% |
| 8 (26d) |  | 65% | 12 (26l) |  | 57% |
| 3 (26e) |  | 63% | 13 (26m) |  | 64% |
| 4 (26f) |  | 73% | 14 (26n) |  | 66% |
| 5 (26g) |  | 73% | 15 (26o) |  | 65% |
| 7 (26h) |  | 50% | 16 (26p) |  | 82% |

Einige der synthetisierten α -Pyrone wurden weitergehend modifiziert. Im Folgenden soll auf diese Modifikationen eingegangen werden. Hierbei handelt es sich überwiegend um Oxidationen zur Einführung von Sauerstoff, der die Löslichkeit der Substanzen und die Möglichkeit zu elektronischen Wechselwirkungen mit Proteinen erhöhen sollte.

Die Modifikationen der α -Pyrone wurde in Zusammenarbeit mit Dr. S. Chammaa durchgeführt. Zu weiteren Derivatisierung boten sich insbesondere jene Verbindungen an, die eine ungesättigte aliphatische Seitenkette umfassen, die zum Beispiel oxidiert werden konnte. Auch Thiole boten sich zur weiteren oxidativen Umsetzung an.

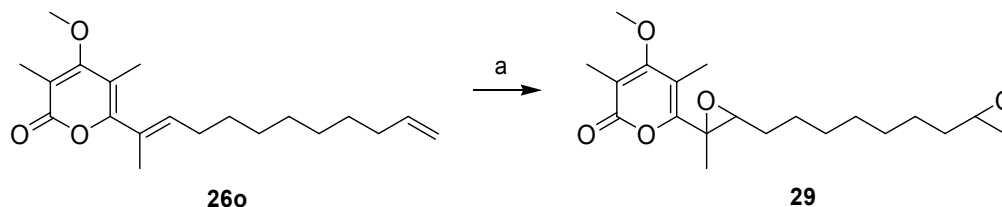
Zunächst wurden die Verbindungen **26l** und **26m**, in denen jeweils eine zur Reaktion geeignete Doppelbindung vorkommt, mit jeweils 1.2 Äquivalenten *N*-Methylmorpholin-*N*-oxid (NMO) umgesetzt. Die Reaktion wurde nach einer Vorschrift von van Rheenen *et al.* durchgeführt.^[68] Dabei erfolgte eine selektive Oxidation der geringer substituierten Doppelbindung von **26l**, so dass **27** mit einer Ausbeute von 70% isoliert werden konnte. Analog wurde auch die Doppelbindung von **26m** oxidiert und **28** mit einer vergleichbaren Ausbeute von 72% gewonnen.



Schema 7: Oxidation der Verbindungen **26l** und **26m** zum Diol: a. NMO, 1.2 Äq., OsO₄, 0.01 Äq., Aceton/Wasser = (3/1), 40 h, RT.

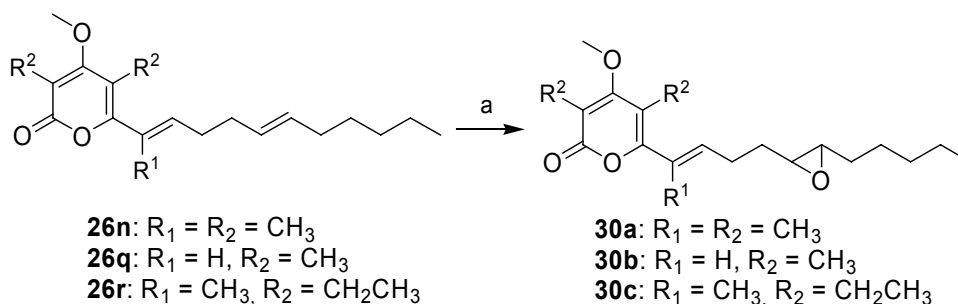
Die Verbindung **26o** wurde weiterhin epoxidiert. Hierzu wurden als Oxidationsmittel 3.3 Äquivalente *meta*-Chlorperbenzoesäure (mCPBA) verwendet. Die Reaktion wurde

hierbei in Anlehnung an die Vorschriften von Jana *et al.* durchgeführt.^[69] Die Stereoselektivität der Reaktion wurde weder bestimmt noch optimiert, da lediglich untersucht werden sollte, ob das Epoxid **29** grundsätzlich biochemische Aktivität besitzt (Schema 10).



Schema 10: Oxidation der Verbindung **26o** zum Epoxid: a. mCPBA, 3.3 Äq., DCM, 6 h, RT.

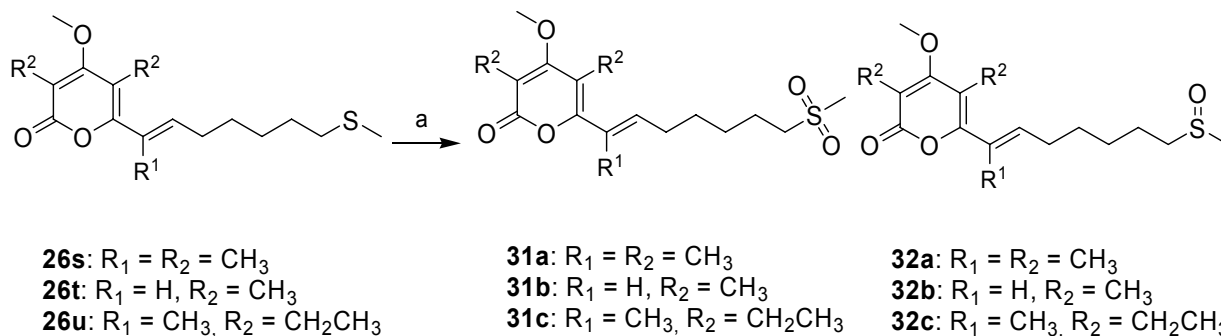
Als weitere Variante zur Einführung von Sauerstoffatomen wurden auch die Verbindungen **26n**, **26q** und **26r** mittels *meta*-Chlorperbenzoesäure oxidiert.^[69] In diesem Fall wurden lediglich 1.5 Äquivalente des Oxidationsmittels eingesetzt. Zudem wurde eine kürzere Reaktionszeit gewählt, so dass eine selektive Epoxidierung der weniger substituierten Doppelbindung erreicht werden konnte (Schema 11).



Schema 11: Oxidation der Verbindung **26n**, **26q** und **26r** zum Epoxid **30a** bis **30c**: a. mCPBA, 1.5 Äq., DCM, 1 h, RT.

4. Spezieller Teil – Pyrone I

Neben den Oxidationen von Doppelbindungen wurden auch Thiol-enthaltende Pyrone oxidiert.^[69] Um den Schwefel in den Verbindungen **26s** bis **26u** zu modifizieren, wurden 1.4 Äquivalente mCPBA als Oxidationsmittel verwendet (Schema 12).



Schema 12: Umsetzung des Sulfids zum Sulfon **31a** bis **31c** und Sulfoxid **32a** bis **32c**: a.mCPBA, DCM, RT.

Das erhaltene Gemisch des Sulfons **31a** bis **31c** und Sulfoxids **32a** bis **32c** konnte säulenchromatographisch getrennt und aufgereinigt werden. Es fällt auf, dass ein etwa gleichverteiltes Gemisch aus Sulfoxid und Sulfon bei dieser Reaktionsführung auftrat. Dies hängt mit der kurz gewählten Reaktionszeit von 5 min zusammen, welche bewusst zur Darstellung eines Gemisches gewählt wurde. Die nachfolgende Tabelle zeigt die Ausbeuten und Produktverteilungen für die jeweiligen Oxidationen.^[69]

Tabelle 3: Ausbeuten der Oxidation der Sulfide **26s** bis **26u** zu **31a** bis **31c** beziehungsweise **32a** bis **32c**.

| Sulfon | Ausbeute | Sulfoxid | Ausbeute |
|------------|----------|------------|----------|
| 31a | 29 | 32a | 40 |
| 31b | 32 | 32b | 38 |
| 31c | 32 | 32c | 39 |

4.5 Biochemische Validierung

Die Synthese von γ - und α -Pyrone sowie die Anreicherung der Substanzbibliothek mit Verbindungen höherer Strukturebenen des γ -Pyrone-Astes führte zu einer Bibliothek von 500 γ -Pyrone und etwa 50 α -Pyrone, die auf biochemische Aktivität getestet werden sollten.

Zur Auswahl vielversprechender Zielproteine hat Dr. S. Wetzel durch Überlagerung des γ -Pyrone-Astes des Naturstoff- und des WOMBAT-basierten Strukturgerüstbaumes Rückschlüsse auf interessante Targets für die Strukturen des Naturstoff-Baumes gezogen. Auf diesem Wege konnten 133 verschiedene Proteine ermittelt werden, für die bereits Inhibition durch γ -Pyrone berichtet wurde. Aus diesen Proteinen wurden in Zusammenarbeit mit Dr. S. Wetzel medizinisch relevante Zielproteine ausgewählt. Neben pharmazeutischer Relevanz wurde darauf geachtet, dass die Targets zu verschiedenen Proteinfamilien gehören und biochemische und/oder biologische Aktivitätstests zur Verfügung standen.

Die Auswahl fiel nach diesen Anhaltspunkten auf Proteine dreier Klassen. Zu diesen zählten die Monoaminoxidasen A und B, deren Inhibitoren pharmazeutische Relevanz im Einsatz als Antidepressiva und in der Alzheimer- und Parkinson-Therapie besitzen.^[70,71,72,73] Vom Autor der Arbeit wurde ein Assays zur Analyse der Substanzkollektion entwickelt und die biochemische Untersuchung der Substanzbibliothek durchgeführt. Zudem wurden die Verbindungen in Assays untersucht, die die Inhibition der „Signal Transducers and Activators of Transcription“ (STATs) 1, 3 und 5B Proteine testen. Diese Proteine gelten als vielversprechende Targets in der Krebstherapie und Entzündungshemmung.^[74,75,76,77,78,79] Die Inhibitionstests wurden in diesem Fall von B. Sperl und Dr. T. Berg am Max Planck Institut für Biochemie in München durchgeführt.

Als Beispiel einer dritten Proteinfamilie wurde die saure Sphingomyelinase ausgewählt, die in der Apoptose, der Niemann-Pick A/B Erkrankung und in

Sekundärinfektionen während der zystischen Fibrose involviert ist.^[80,81] Die Assays zum Test der γ -Pyron-Substanzkollektion wurden von Dipl.-Chem. A. Roth und Prof. Dr. C. Arenz an der Humboldt-Universität in Berlin in Zusammenarbeit mit A. Yektaoglu (M.Sc.) und Prof. Dr. A. Giannis an der Universität Leipzig durchgeführt. Für alle Assays wurden zunächst Vorversuche unternommen, um einen Überblick über die mögliche Anzahl aktiver Verbindungen zu erhalten. Nach diesen Vorversuchen folgten IC_{50} -Messungen für die einzelnen Treffer.

In den folgenden sechs Kapiteln werden zunächst die jeweiligen Targets sowie ihre bekannten Protein-Hemmer vorgestellt. Zum einen werden dann zu jeder Proteinfamilie die erhaltenen Inhibitor-Daten mit bereits veröffentlichten Inhibitoren verglichen und zum anderen wird diskutiert, inwieweit zwischen den in der WOMBAT-Datenbank aufgeführten γ -Pyron-Inhibitoren eine Korrelation zu den im Rahmen dieser Arbeit gefundenen Protein-Hemmern besteht.

4.6 Monoaminoxidasen

Bei den Monoaminoxidasen (MAOs) lassen sich die Untertypen MAO A und MAO B unterscheiden. Beide katalysieren die oxidative Deaminierung einer Reihe von Monoaminen wie den Neurotransmittern Histamin, Dopamin, Noradrenalin und Adrenalin. Die beiden Isoformen unterscheiden sich sowohl in ihrer Sensitivität gegenüber verschiedenen Inhibitoren als auch in ihren Substraten.

MAO A ist insbesondere für die Oxidation von Serotonin und Adrenalin verantwortlich. So werden vor allem Hemmer der MAO A-Enzymisoform bei schweren und atypischen Depressionen eingesetzt, wenn andere Antidepressiva versagen.^[70,71,72]

Die Isoform MAO B wandelt Benzylamin und 2-Phenylethylamin um. Selektive MAO B-Hemmer sind zugelassen für die Behandlung von Parkinson, da sie den Abbau von endogenem oder exogenem zugeführtem Dopamin verhindern.^[70,71,72]

Trotz reichhaltiger Forschungen und zugelassenen Wirkstoffen, ist die Entwicklung selektiver Monoaminoxidase-Inhibitoren noch immer aktuell.^[73]

Zu den unselektiven und irreversiblen MAO-Hemmern gehören Tranylcypromin (**33**), das unter den Handelsnamen „Parnate“ und „Jatrosom“ bekannt ist, sowie Phenelzin (**34**), dessen Medikamentenform den Namen „Nardil“ trägt. Tranylcypromin (**33**) und Phenelzin (**34**) zählen zu den wenigen bekannten Inhibitoren dieser Klasse, die trotz der Inhibition beider Enzym-Isoformen klinisch angewendet werden.^[82,83] Ein reversibler, unselektiver MAO-Hemmer, der natürlichen Ursprungs ist, ist das Harmalin (**35**), das aus verschiedenen Pflanzen wie der Lianenart *Banisteriopsis caapi* gewonnen werden kann.^[84]

4. Spezieller Teil – Pyrone I

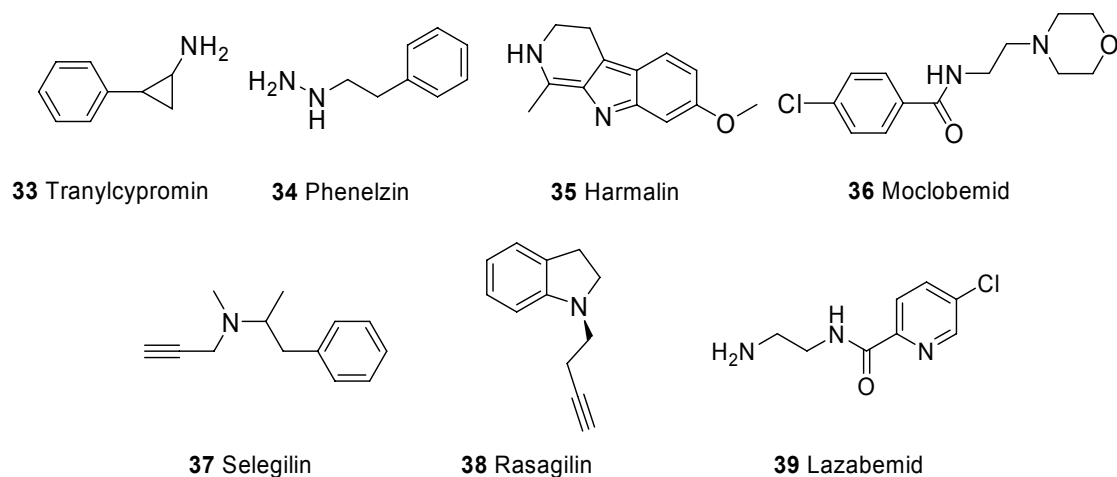


Abbildung 8: MAO A und B-Inhibitoren in der klinischen Anwendung.

Neben diesen drei unselektiven MAO-Inhibitoren gibt es auch einige reversible Hemmer, die in der klinischen Anwendung sind. Ein reversibler MAO A Hemmer ist Moclobemid (**36**), dessen Handelsname „Aurorix“ beziehungsweise „Manerix“ ist. Die Substanz wird in der Regel eingesetzt, um Depressionen und Angstzustände zu mildern. In der Anwendung bedeutet „selektiv“ in diesem Fall, dass bei der Verabreichung einer einzelnen 300 mg Dosis Moclobemid (**36**) 80% MAO A und 30% MAO B inhibiert.^[82]

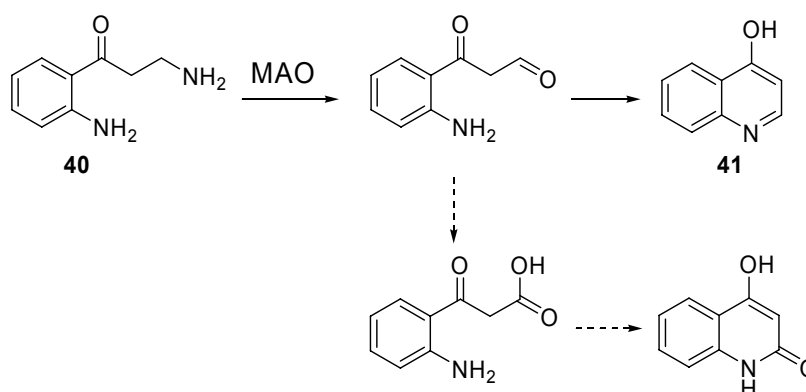
Zwei selektive, irreversible MAO B Inhibitoren sind Selegilin (**37**) und Rasagilin (**38**).

Selegilin (**37**) auch unter dem Namen „Emsam“ in der klinischen Anwendung bekannt, wird sowohl in frühen Stadien der Parkinson-Therapie sowie gegen Altersdemenz eingesetzt. In üblichen klinischen Dosen inhibiert es MAO B selektiv, wobei höhere Dosierung zu Spezifitätsverlust und somit auch zur Inhibition von MAO A führt.^[85] Auch Rasagilin (**38**) (Handelsname „Azilect“) hemmt irreversibel die MAO B-Isoform, wobei die Inhibition fünf- bis zehnfach stärker ist als die von Selegilin (**37**). Rasagilin (**38**) ist gegenüber MAO A um den Faktor vierzehn selektiver in der Inhibition von MAO B.^[86] Ein reversibler und selektiver MAO B Inhibitor ist Lazabemid (**39**), der sich momentan in präklinischen Studien befindet.^[87]

Das folgende Kapitel soll nun näher auf die Entwicklung des Monoaminoxidase-Assays eingehen, mit dem die Substanzbibliothek vermessen werden sollte.

4.7 Entwicklung des Monoaminoxidase-Assays

Zur Vermessung der zusammengestellten γ -Pyrone-Substanzbibliothek und der synthetisierten α -Pyrone auf Inhibition der beiden Enzyme MAO A and B wurde ein fluoreszenzbasiertes Detektungsverfahren gewählt, bei dem Kynuramin (**40**) zu 4-Hydroxychinolin (**41**) umgesetzt wird (Schema 13). Als Enzyme wurden die beiden Monoaminoxidasen in Form von Mikrosomen aus mit *Baculovirus* infizierten Insektenzellen eingesetzt.



Schema 13: Umsetzung von Kynuramin (**40**) zu 4-Hydroxychinolin (**41**) durch MAO.

Der durchgeführte Assay basierte auf einem System von Novaroli *et al.*^[88] Zunächst wurde der Assay so optimiert, dass das Reaktionsvolumen von 200 μL auf 100 μL , dann auf 50 μL und schließlich auf 14 μL verringert werden konnte. Für dieses Volumen wurden die optimalen Enzym- und Substratkonzentrationen bestimmt und das so optimierte System mittels der kommerziellen Inhibitoren Clorgyline (**42**) für MAO A und Selegilin (**37**) für MAO B validiert (Abbildung 9).

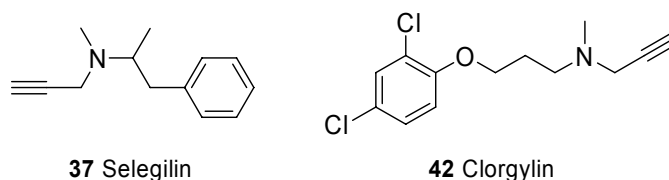


Abbildung 9: Verwendete Referenzinhibitoren.

Für die eigentliche Untersuchung der Substanzbibliothek wurden dann alle Messungen mindestens als Triplikate durchgeführt. Auf jeder Messplatte wurden eine Positivkontrolle (kein Inhibitor, 100% Aktivität) und eine Negativkontrolle (kein Enzym,

0% Aktivität) mitvermessen. Zudem wurde auf jeder Platte ein Referenzinhibitor als zusätzliche Qualitätskontrolle mitgetestet. So wurde auf jeder MAO A-Messplatte Clorgyline (**42**) und auf jeder MAO B-Platte Selegilin (**37**) mitvermessen.

Die zusammengestellte Substanzbibliothek wurde im Folgenden in einem initialen Aktivitätstest vermessen. Die Zunahme der Fluoreszenz wurde für 30 min im kontinuierlichen Kinetikmodus des Spektrometers vermessen. Genaue Konzentrationen sind dem experimentellen Teil zu entnehmen.

Alle Substanzen, die weniger als 20% Enzymrestaktivität bei einer Konzentration von 100 μM im Initialscreen ergaben, wurden in einem konzentrationsabhängigen Test mit elf verschiedenen Konzentrationen von 100 μM abwärts vermessen. Zur Validierung der Ergebnisse wurden in einem weiteren Test alle Inhibitoren mit einem IC_{50} -Wert kleiner als 1.5 μM erneut konzentrationsabhängig – bei elf verschiedenen Konzentrationen startend bei 10 μM – vermessen. Schließlich wurde für alle Verbindungen, die nur in einem der beiden Vortests Aktivität zeigten, auch der IC_{50} -Wert der anderen enzymatischen Isoform vermessen, um Selektivität zu beweisen.

4.8 Ergebnisse des Monoaminoxidase-Assays

Der Test der 500 γ -Pyrone umfassenden Substanzbibliothek in den beiden Monoaminoxidase-Aktivitäts-Assays ergab, dass bei einer InhibitorKonzentration von 100 μM 145 Substanzen die Enzymaktivität von MAO A auf unter 20% senkten. Für die Enzym-Isoform MAO B haben 108 Substanzen die Aktivität des Proteins auf unter 20% gesenkt. Für diese Verbindungen wurden in Folge IC_{50} -Werte bestimmt. Eine vollständige Übersicht über die aktiven Verbindungen ist dem Anhang zu entnehmen. (Anhang Tabelle 2)

Für die Substanzen, die die Enzymrestaktivität unter die festgelegte Grenze gesenkt haben, wurden in den folgenden konzentrationsabhängigen Messungen mehr als 60 interessante Verbindungen für MAO A- und 35 MAO B-Inhibitoren identifiziert, welche

alle einen IC_{50} -Wert kleiner oder gleich $10 \mu\text{M}$ aufwiesen. Die Analyse dieser Verbindungen ergibt, dass 25% (15 Verbindungen) einen IC_{50} -Wert für MAO A haben, der kleiner war als $1 \mu\text{M}$. Für MAO B wurden 11 Verbindungen (31%) ermittelt, die einen IC_{50} -Wert aufwiesen, der kleiner war als $1 \mu\text{M}$.

Die literaturbekannten IC_{50} -Werte für das reversibel an MAO A bindende Moclobemid (**36**) liegen zwischen 6 und $400 \mu\text{M}$.^[89] Der große Rahmen dieser Inhibitionsdaten ist vor dem Hintergrund unterschiedlicher Durchführungen der Versuche (unterschiedliche Quellen des Enzyms, verschiedene Messtemperaturen und Inkubationszeiten) zu erklären. Es kann dennoch erkannt werden, dass die im Rahmen dieser Arbeit gefundenen Inhibitoren in der Größenordnung der literaturbekannten MAO-Hemmer liegt. Für einen genauen Vergleich der Daten müssten die K_I -Werte mit Enzym der gleichen Quelle bestimmt werden.

Es bietet sich weiterhin ein Vergleich der inhibitorischen Wirkung der MAO B-Inhibitoren mit Lazabemid (**39**) an, für das ein IC_{50} -Wert von 32 nM gemessen wurde. Hier ist deutlich, dass die besten gefundenen Inhibitoren um den Faktor zehn schwächer sind, als der von der Firma Hoffmann-La Roche entwickelte Wirkstoff.^[90]

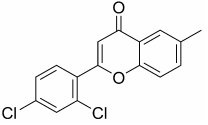
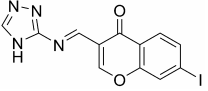
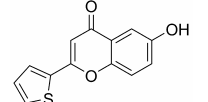
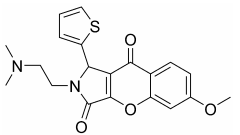
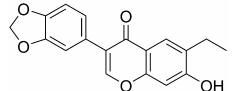
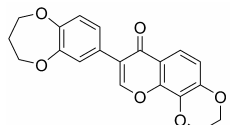
Ein anderes Kriterium, das diskutiert werden soll, ist die Inhibitorselektivität gegenüber den beiden Enzym-Isoformen. Sieben Inhibitoren konnten gefunden werden, die hundertfach selektiver für MAO A als für MAO B waren, während sieben Inhibitoren inverse Selektivität in der gleichen Größenordnung zeigten. Im Vergleich dazu zeigt der Wirkstoff Moclobemid (**36**) bei der Verabreichung einer einzelnen 300 mg Dosis an einen Patienten eine Inhibition von 80% der MAO A-Isoform und 30% der MAO B-Isoform.^[82] Da diese Daten aus der klinischen Anwendung stammen und die hier bestimmten IC_{50} -Werte in *in vitro* Experimenten gemessen wurden, sind die Werte nicht direkt vergleichbar. Allerdings zeigen die Werte, dass beide Enzym-Isoformen so ähnlich sind, dass eine Inhibition der jeweils anderen Struktur nicht ganz ausgeschlossen werden kann. Für den irreversiblen MAO B Inhibitor Rasagilin (**38**) ist so zum Beispiel eine Selektivität gegenüber MAO A um den Faktor vierzehn

4. Spezieller Teil – Pyrone I

bekannt.^[86] Dass bei den konzentrationsabhängig durchgeführten Inhibitionsmessungen jeweils sieben Verbindungen identifiziert werden konnten, die selektiv nur eine der beiden Isoformen inhibieren, kann somit als Erfolg betrachtet werden.

Eine Auswahl an aktiven Verbindungen und zugleich selektiven MAO-Inhibitoren ist in Tabelle 4 aufgeführt. Die drei ersten Tabelleneinträge zeigen selektive MAO A Inhibitoren, wobei die folgenden drei Einträge Verbindungen präsentieren, die selektiv die MAO B-Isoform inhibieren. Alle aufgeführten Verbindungen weisen einen IC₅₀-Wert um 1 µM auf.

Tabelle 4: Ausgewählte MAO-Isoformen-selektive Inhibitoren.

| Eintrag | Struktur | IC ₅₀ [µM] MAO A | IC ₅₀ [µM] MAO B |
|---------|---|--------------------------------|--------------------------------|
| 1 |  | 0.95 ± 0.07 | > 50 |
| 2 |  | 1.31 ± 0.04 | > 50 |
| 3 |  | 0.94 ± 0.03 | > 50 |
| 4 |  | > 50 | 0.34 ± 0.17 |
| 5 |  | > 50 | 0.31 ± 0.03 |
| 6 |  | > 50 | 0.54 ± 0.06 |

4. Spezieller Teil – Pyrone I

Da die 500 γ -Pyrone, die in den beiden MAO Assays getestet wurden, aus allen drei Ebenen des γ -Pyrone-Astes stammen, lässt sich die Aktivitätsverteilung über die drei Ebenen des Astes analysieren.

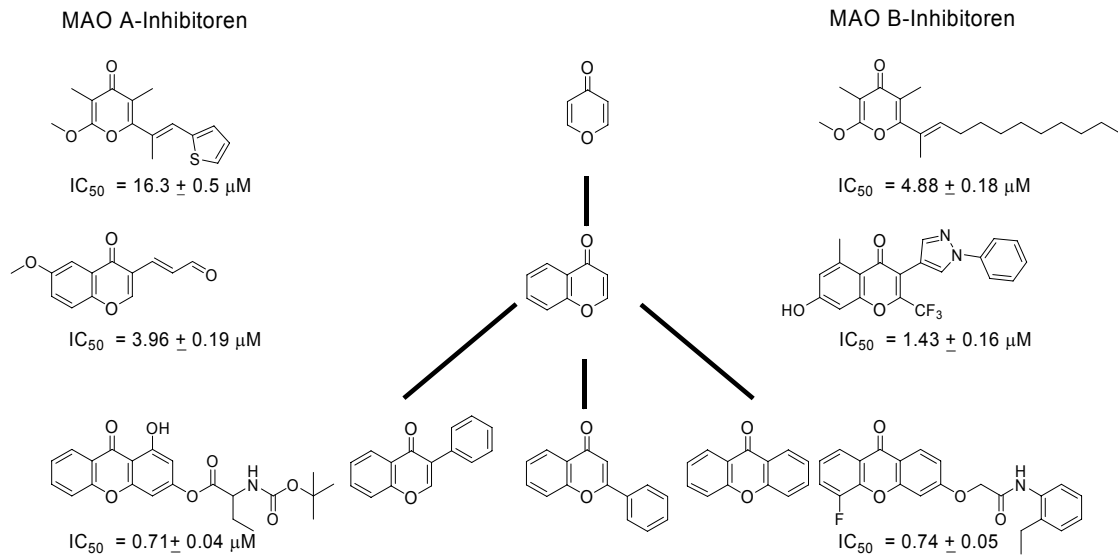


Abbildung 10: Die Abbildung zeigt mittig den γ -Pyrone-Ast des Naturstoffbaumes. Auf der linken Seite sind drei exemplarische selektive MAO A-Inhibitoren für die jeweilige Ebene des Astes angeordnet. Der IC_{50} -Wert der MAO B-Isoform ist für diese Verbindungen kleiner $100 \mu M$. Analog sind rechts drei MAO B Inhibitoren aufgezeigt, die ebenfalls selektiv gegenüber der anderen MAO-Isoform sind (IC_{50} -Wert kleiner $100 \mu M$).

Interessanterweise wurden aktive Verbindungen in jeder Hierarchie des Strukturgerüstbaumes und allen Strukturfamilien des Astes gefunden (Abbildung 10). Die meisten Inhibitoren (50 aus 122 Verbindungen) konnten für das Xanthon-Gerüst ermittelt werden. In Anbetracht der Tatsache, dass zwölf Xanthone einen IC_{50} -Wert kleiner $1 \mu M$ aufweisen, wird deutlich, dass diese Strukturfamilie einen vielversprechenden Ansatzpunkt für weitere Substanzbibliotheken im Bereich der MAO-Inhibitorentwicklung darstellt. Innerhalb der Flavon-Familie wurden die meisten selektiven MAO A-Inhibitoren identifiziert (19 aus 118 Verbindungen), so dass dieses Strukturgerüst sich als ein interessanter Startpunkt zur Entwicklung von MAO A Inhibitoren erweist.

Da bei der Zusammenstellung der fokussierten 500 γ -Pyrone umfassenden Substanzkollektion auf ein hohes Maß an chemischer Diversität geachtet wurde, ist die Struktur-Wirkungsanalyse nicht für alle Strukturfamilien des Astes möglich. Die

hohe Zahl der MAO-inhibierenden Xanthone ermöglichte jedoch, für diese Substanzklasse einen Zusammenhang zwischen der Struktur und der Inhibition der MAO-Isoformen zu bestimmen. Es fällt insbesondere auf, dass bei diesem Strukturmotiv die Substitutionen an den Positionen zwei und vier die inhibitorische Wirkung für beide MAO-Isoformen verringerten, wohingegen die Substitution an Position drei lediglich die Hemmung von MAO A veränderte (Abbildung 11).



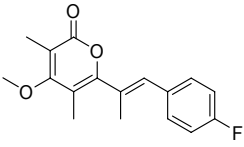
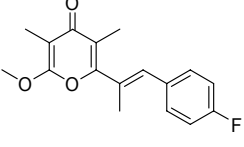
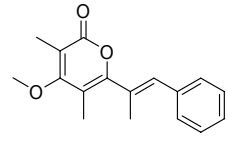
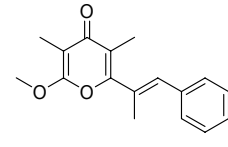
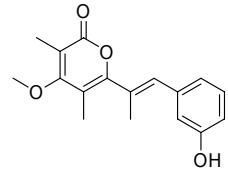
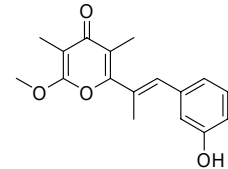
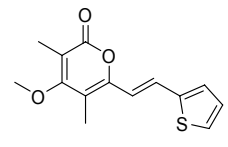
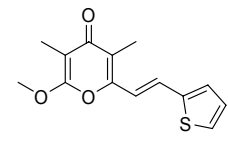
Abbildung 11: Struktur-Wirkungsbeziehung der MAO A und B-Hemmung durch Xanthon-Derivate.

Neben der γ -Pyrone Substanzbibliothek wurden auch die synthetisierten α -Pyrone in den beiden MAO-Assays getestet. Die Analyse der Daten ergab, dass von den 45 α -Pyrone vier Substanzen für MAO A einen IC_{50} -Wert von kleiner als $10 \mu\text{M}$ aufwiesen. Eine Verbindung hatte einen IC_{50} -Wert von kleiner als $1 \mu\text{M}$. Somit wurden unter den α -Pyrone MAO A-Inhibitoren mit einem IC_{50} -Wert von kleiner als $10 \mu\text{M}$ mit einer Trefferquote von 8.8% gefunden, was auch für fokussierte Substanzkollektionen ein hoher Wert ist.^[15,25] Für MAO B wurden drei α -Pyrone mit einem IC_{50} -Wert von kleiner als $10 \mu\text{M}$ identifiziert, von denen eine Verbindung einen IC_{50} -Wert von kleiner als $1 \mu\text{M}$ aufwies. Somit ist auch für die MAO B-Inhibitoren mit einer α -Pyrone-Substruktur eine hohe Trefferquote von 6.6% erzielt worden.^[15,25] Die Wahrscheinlichkeit, unter den α -Pyrone einen Monoaminoxidase-Inhibitor zu finden, ist mit der Trefferquote vergleichbar, unter den 18 γ -Pyrone aktive Substanzen zu identifizieren. Bei der MAO A-Hemmung wurden unter den γ -Pyrone zwei Verbindungen mit einem IC_{50} -Wert kleiner als $10 \mu\text{M}$ identifiziert. Die Trefferquote liegt in diesem Fall bei 11.1%. Es wurden ebenso zwei MAO B-Inhibitoren unter den γ -Pyrone identifiziert, so dass auch diese Quote mit 11.1% recht hoch ist. In der

4. Spezieller Teil – Pyrone I

nachfolgenden Tabelle 5 wird eine vergleichende Übersicht ausgewählter α - und γ -Pyrone aufgeführt.

Tabelle 5: Übersicht über die MAO A- und MAO B-Hemmung ausgewählter α - und γ -Pyrone. Die Startkonzentration lag bei den Messversuchen für beide Enzymisoformentypen bei 100 μ M.

| α -Pyrone | MAO A IC ₅₀ [μ M] | MAO B IC ₅₀ [μ M] | γ -Pyrone | MAO A IC ₅₀ [μ M] | MAO B IC ₅₀ [μ M] |
|---|--------------------------------------|--------------------------------------|--|--------------------------------------|--------------------------------------|
|  <p>26v</p> | 13.71 \pm 0.94 | > 100 |  <p>25b</p> | 18.10 \pm 1.53 | > 100 |
|  <p>26b</p> | 15.95 \pm 1.28 | > 100 |  <p>25c</p> | 18.18 \pm 1.05 | > 100 |
|  <p>26w</p> | 17.78 \pm 1.10 | > 100 |  <p>25d</p> | 49.04 \pm 7.10 | 82.03 \pm 1.93 |
|  <p>26h</p> | 21.16 \pm 12.80 | > 100 |  <p>25e</p> | 16.25 \pm 0.47 | > 100 |

Die Parallelsynthese von α - und γ -Pyrone ermöglicht, den Einfluß des jeweiligen Heterozyklus auf die Protein-Inhibition zu untersuchen. Wird die Inhibition von α - und γ -Pyrone-Analogen verglichen, fällt auf, dass bei gleich bleibendem Substitutionsmuster die Aktivität und Selektivität identisch bleiben (Tabelle 5).

Aus den Assay-Daten der 45 getesteten α -Pyrone konnte darüber hinaus eine Struktur-Wirkungsbeziehung zur Hemmung der MAO A- und MAO B-Isoenzyme aufgestellt werden (Abbildung 12).

4. Spezieller Teil – Pyrone I

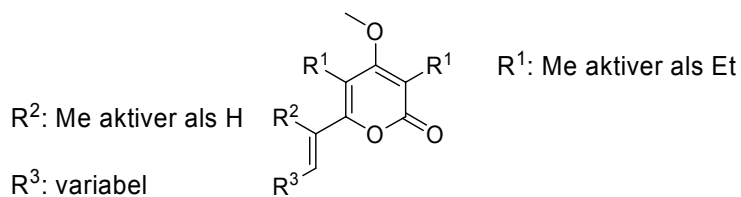


Abbildung 12: Struktur-Wirkungsbeziehung der α -Pyrone.

Zur potenten Hemmung von MAO A und MAO B ist eine Methylgruppe als R¹ begünstigt. Bereits der Austausch des Methylrestes gegen eine Ethylgruppe führt zu Inaktivität, was durch Abschirmungseffekte zu erklären sein könnte. Auch im Falle von R² scheint die Toleranz gering zu sein. So führt die Substitution der zumeist auch an dieser Position in der Natur vorkommenden Methylgruppe gegen ein Proton häufig zu inaktiven Verbindungen. R³ ist in einem weiteren Rahmen variierbar, so wie dies auch bei den meisten Naturstoffen der Fall ist.^[91] Auffällig ist, dass weder Cyercen A (**1**) noch sein α -Pyron-Analogon (**16**) biochemisch aktiv waren.

4.9 „Signal Transducers and Activators of Transcription“

Als weitere Enzymgruppe wurden, wie bereits oben erwähnt, die „Signal Transducers and Activators of Transcription“ (STAT)-Proteine untersucht.

Die Familie der STAT-Proteine bindet an aktivierte Cytokinrezeptoren oder an Rezeptoren von Wachstumsfaktoren durch ihre Src-Homologie (SH2)-Domäne. Nach Bindung kann ein konserviertes Tyrosin in der Aktivierungsdomäne phosphoryliert werden. Diese Phosphorylierung, welche ein essentieller Schritt zur Aktivierung der STAT-Transkriptionsfaktoren darstellt, wird entweder durch die Kinase-Aktivität des Wachstumsfaktorenrezeptors oder durch rezeptorassoziierte Kinasen vermittelt. Das phosphorylierte Tyrosin wird von der SH2 Domäne anderer aktivierter STAT-Proteine erkannt und bewirkt somit eine Ausbildung von Dimeren. In diesen liegen die Proteine um 180° gedreht aufeinander. Diese Dimere werden in den Kern transportiert und regulieren dort die Expression verschiedener Zielgene. Um ein STAT-Protein zu inhibieren, muss also zum Beispiel diese Protein-Protein-Wechselwirkung gestört werden.

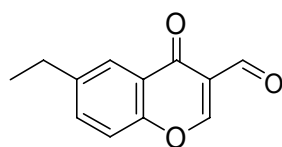
Die dauerhafte Aktivierung von STAT1, -3 und -5 ist ein diagnostischer Marker für die Schwere und die Überlebensraten von Patienten mit verschiedenen Tumoren, wie zum Beispiel Leukämie, Prostata- oder Brustkrebs.^[74] Im Besonderen werden die STAT Proteine-3, -5a und -5b als vielversprechende Ziele in der Krebstherapie untersucht, da ihre Inhibition zur Apoptoseinduktion in verschiedenen Tumorarten führt.^[75,76] STAT 3 wurde des Weiteren als wichtiger Angiogenesefaktor und dadurch als besonders interessantes Zielprotein der Krebstherapie identifiziert.^[77,78,79] Der STAT1 Signalweg gilt auch als aussichtsreicher Ausgangspunkt, um entzündungshemmende Medikamente zu entwickeln.^[92]

Ingesamt sind noch recht wenige niedermolekulare Inhibitoren der STAT-Proteine bekannt. Dies hängt damit zusammen, dass die Modulation von Protein-Protein-Interaktionen mit kleinen organischen Molekülen eine große Herausforderung

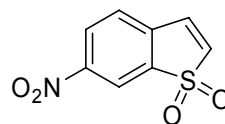
darstellt. Insbesondere gilt die direkte spezifische Inhibition von STATs aufgrund einer sehr flachen Bindungstasche der SH2-Domäne^[93] und der großen Interaktionsfläche^[94] als äußerst schwierig.

Kürzlich identifizierten Berg *et al.* Chromen-Systeme, die als STAT1- und STAT5b-Binder fungieren.^[95] Exemplarisch ist hier einer dieser Inhibitoren **43** gezeigt, der STAT1 mit einem IC₅₀-Wert von 34 ± 5 µM inhibiert und zugleich STAT5b mit einem IC₅₀-Wert von 11 ± 2 µM hemmt.

Die Schwierigkeit der Identifizierung eines STAT3-Inhibitors wird ebenso von der Gruppe von Berg *et al.* beschrieben.^[96,97] Die Gruppe untersuchte kommerzielle Substanzbibliotheken von 17298 Verbindungen auf ihre Fähigkeit hin, die Funktion der STAT3-SH2-Domäne zu inhibieren. Dabei fanden die Autoren der Arbeit lediglich mit einer Trefferquote von 0.8% Verbindungen, die eine 60%-ige Inhibition von STAT3 bewirkten. Aus 5163 Naturstoffen und Naturstoff-Analoga konnten nur neun potentielle STAT3-Binder identifiziert werden. Der potenteste irreversible Inhibitor namens Stattic (**44**) inhibierte das Protein mit einem IC₅₀-Wert von 5.1 µM.



43



44 Stattic

Abbildung 13: STAT3 Inhibitoren.

4.10 Ergebnisse der STAT-Assays

Die Vermessung der γ -Pyrone-Bibliothek sowie der α -Pyrone auf Hemmung von STAT-Proteinen wurde von B. Sperl und Dr. T. Berg am Max-Planck-Institut für Biochemie in München durchgeführt.

In Tabelle 6 ist eine Übersicht der aktiven γ -Pyrone gegeben. In den durchgeführten Tests wurden die Substanzen **45**, **46** and **47** als selektive STAT-Inhibitoren identifiziert.

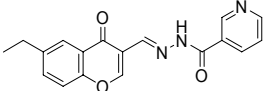
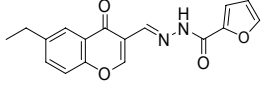
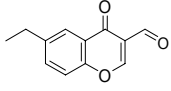
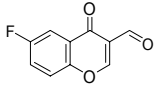
Tabelle 6: *In vitro* Aktivitäten der getesteten γ -Pyrone in biochemischen Versuchen zur STAT-Inhibition in fluoreszenzbasierten Tests. Verbindung **45** (Tabelle 3, Eintrag 1) wurde zum Vergleich als bekannter STAT-Inhibitor mit einer γ -Pyrone-Struktur mitgetestet.

| Eintrag (Nr.) | Struktur | IC ₅₀ [μ M] STAT5b | IC ₅₀ [μ M] STAT3 | IC ₅₀ [μ M] STAT1 |
|------------------|----------|---------------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|
| 1 (45) | | 32 ± 1 | > 500 | > 500 |
| 2 (46) | | 29 ± 1 | 30.5 ± 0.4 | 38 ± 2 |
| 3 (47) | | 39 ± 1 | 22 ± 1 | 14 ± 1 |

Tabelle 6 zeigt zwei neue STAT-Inhibitoren. Strukturell haben diese große Ähnlichkeiten mit den literaturbekannten Inhibitoren von Berg *et al.*^[95] Allerdings zeigen die hier analysierten Verbindungen ein anderes Selektivitätsmuster (Anhang Tabelle 3). Insbesondere Verbindung **47** (Tabelle 6, Eintrag 3) umfasst nicht das sonst meist auftretende Hydrazid-Motiv und gehört mit den zuvor von Berg *et al.* gefundenen Inhibitoren zu den ersten niedermolekularen STAT1-Inhibitoren.^[95]

4. Spezieller Teil – Pyrone I

Tabelle 7: STAT-Inhibitoren der Arbeitsgruppe von Berg *et al.* [95]

| Eintrag (Nr.) | Struktur | IC ₅₀ [μM] | IC ₅₀ [μM] | IC ₅₀ [μM] |
|------------------|---|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| | | STAT5b | STAT3 | STAT1 |
| 2 (48) |  | 53 ± 32 | 54 ± 8 | 52 ± 1 |
| 5 (49) |  | 56 ± 10 | > 500 | > 500 |
| 12 (50) |  | 11 ± 2 | 20 ± 2 | 34 ± 5 |
| 13 (51) |  | 22 ± 4 | 41 ± 11 | 64 ± 8 |

Beide Verbindungen **46** und **47** inhibieren STAT3 mit einem IC₅₀-Wert von 30.5 ± 0.4 μM beziehungsweise 22 ± 1 μM. Wird die Identifikation dieser Hemmer vor dem Hintergrund bewertet, dass Berg *et al.* zuvor 17298 Verbindungen auf ihre STAT3-Inhibition getestet haben und dabei der potenteste irreversible Inhibitor (**44**) einen IC₅₀-Wert von 5.1 μM aufwies, zeigt dies, dass die Strukturgerüstbaum-Überlagerung ein großes Potential hat, passende Targets für Substanzbibliotheken zu finden.

In einem weiteren Schritt wurden Zellexperimente durchgeführt, um die biochemischen Ergebnisse für die Substanzen **45** (Tabelle 6, Eintrag 1) und **46** (Tabelle 6, Eintrag 2) zu verifizieren (Abbildung 14). Der Iminrest der Schiffischen Base **47** (Tabelle 6, Eintrag 3) wird womöglich in dem Puffergemisch oder in den Zellen hydrolysiert, sodass diese Verbindung bei hohen Konzentrationen inaktiv ist. Für Substanz **46** (Tabelle 6, Eintrag 2) wurden Hydrolyseexperimente im Puffergemisch durchgeführt, um zu verifizieren, dass der Inhibitor mindestens drei Stunden, also für die benötigte Messzeit, unter Messbedingungen stabil ist.

4. Spezieller Teil – Pyrone I

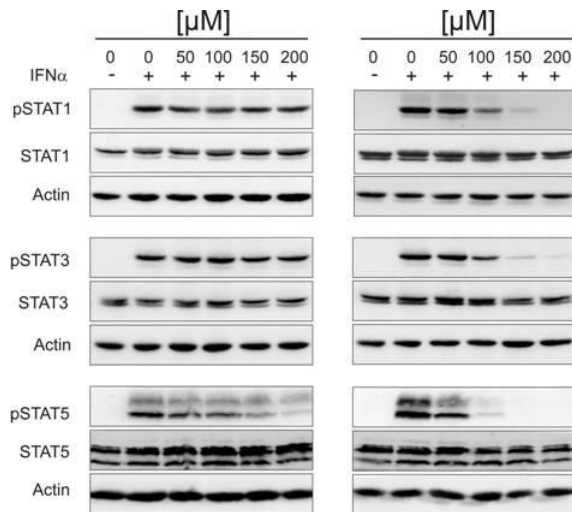


Abbildung 14: Aktivität der Referenzverbindung **45** (Tabelle 3, Eintrag 1, hier links) und des neu identifizierten Inhibitors **46** (Tabelle 6, Eintrag 2, hier rechts) im Westernblot mit *p*Tyr-spezifischen Antikörpern. Da für STAT-Phosphorylierung zunächst die Bindung über die STAT SH2-Domäne zu aktivierten Rezeptoren vorausgesetzt wird, führt die Hemmung dieses Vorgangs zu verminderter Tyrosin-Phosphorylierung des STAT Proteins.

Wird eine Burkitt-Lymphom-Zelllinie (Daudi) mit IFN- α stimuliert, führt dies zu simultaner Tyrosin-Phosphorylierung von STAT5, STAT3 und STAT1.^[98] Dies kann mittels eines Westernblot Experimentes durch Verwendung von Antikörpern gezeigt werden, die STAT-Proteine nur erkennen, wenn sie am entsprechenden Tyrosin-Rest phosphoryliert sind. Die Zellen wurden mit den identifizierten Inhibitoren **45** und **46** präinkubiert, bevor die Zellen mit IFN- α stimuliert wurden. Die Zellexperimente zeigen, dass die Verbindung **45** die Phosphorylierung von STAT5b hemmt, nicht hingegen jene von STAT3 und STAT1. Die Verbindung **46** hingegen inhibiert sowohl die STAT5- und STAT3- als auch die STAT1-Phosphorylierung. Somit zeigen die Zellversuche, dass die beobachteten *in vitro* Effekte auf die Burkitt-Lymphom-Zelllinie übertragen werden können.

4.11 Sphingomyelinasen

Die γ -Pyrone-Substanzbibliothek wurde auch hinsichtlich ihres Potentials zur Inhibition der sauren Sphingomyelinase untersucht. Dieses Enzym katalysiert die Spaltung von Sphingomyelin zu Phosphorylcholin und Ceramid, einem zweiten Botenstoff, der neben anderen in der Regulation der Zelldifferenzierung und -proliferation sowie in der Apoptose involviert ist.^[80] Ein genetischer Defekt und somit ein teilweiser Ausfall der sauren Sphingomyelinase führt zur Ausbildung der Niemann-Pick-Erkrankung des Typs A und B.^[99] Die saure Sphingomyelinase wurde in der neueren Forschung als interessantes Protein in der Krebstherapie erkannt, da es eine Schlüsselrolle in der Entstehung von Lungenödemen^[100] und Lungenemphysemen spielt.^[101]

Lange Zeit gab es nur einen bekannten potenten und selektiven Inhibitor der sauren Sphingomyelinase namens Phosphatidylinositol-3,5-bisphosphat (**52**) (Abbildung 15).^[102] Diese Verbindung weist in der Inhibierung von aSMase zwar einen K_M von $0.53 \mu\text{M}$ auf, ist allerdings aufgrund der fünffachen negativen Ladung für weiterführende Zellexperimente ungeeignet. Dies hängt auch damit zusammen, dass bei *in vivo* Experimenten die beiden langen Fettsäureketten eine Verankerung des Inhibitors in der Zellmembran bewirken würden.

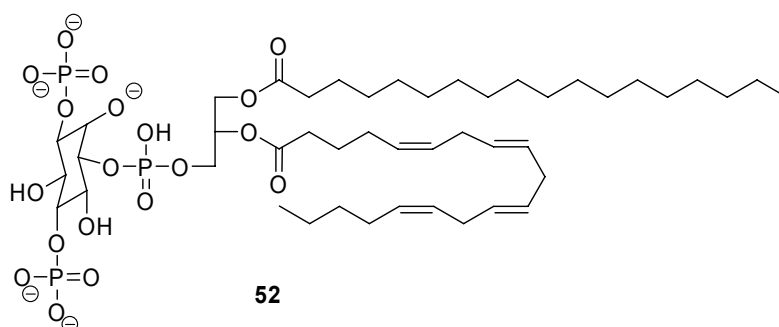


Abbildung 15: Phosphatidylinositol-3,5-bisphosphat (**52**).

Der Mangel an potenten und selektiven Inhibitoren der sauren Sphingomyelinase verhindert somit Fortschritte in Tiermodellen und kultivierten Patientenzellen. Neuere Forschungsarbeiten von Arenz *et al.* führten zu 15 potenten und selektiven Inhibitoren

4. Spezieller Teil – Pyrone I

der aSMase mit einem Bisphosphonat Grundgerüst, deren Aktivität um eine Größenordnung höher war als die des bekannten Phosphatidylinositol-3,5-bisphosphat (**52**) (Abbildung 15).^[103] Zudem waren die Verbindungen selektiv gegenüber dem Isoenzym nSMase. Der bekannte Wirkstoff Zelendronsäure (**53**) inhibiert die aSMase mit einem IC_{50} -Wert von $5.08 \pm 0.74 \mu\text{M}$, während die Substanz (**54**) das Protein mit einem IC_{50} -Wert von $0.02 \pm 0.00 \mu\text{M}$ hemmt. Letztere Verbindung (**54**) hemmt zudem die Lungenödementwicklung in isolierten, perfundierten Rattenlungen und ist 5000-fach selektiv gegenüber dem Isoenzym nSMase.^[103] Zudem sind Inhibitoren aus der Familie der Xanthone bekannt, zu denen auch der Naturstoff α -Mangostin (**55**) gehört, dessenen K_I -Wert bei $12 \mu\text{M}$ liegt.^[104,105]

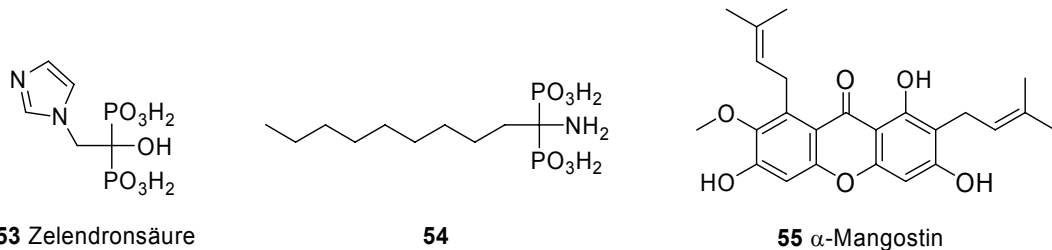


Abbildung 16: aSMase-Inhibitoren.

Da alle Inhibitoren der aSMase auch auf die neutrale Form der Sphingomyelinase getestet wurden, wird auch diese Isoform in Kürze beschrieben. Die aSMase scheint in der TNF_{α} -medierten Apoptose und der Bildung von Exosomen beteiligt zu sein.^[79] Exosome sind bedeutsam für den Zell-Zellkontakt und die retrovirale Krankheitsentstehung.^[106] Im Gegensatz zur aSMase sind jedoch für die neutrale Sphingomyelinase bereits einige potente Inhibitoren verfügbar.^[107,108,109,110] Exemplarisch ist in Abbildung 17 Scyphostatin (**56**) gezeigt, das diese Protein-Isoform kompetitiv mit einem IC_{50} -Wert von $1 \mu\text{M}$ inhibiert.^[111,112]

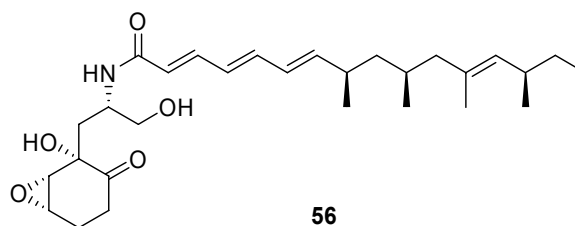
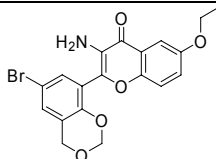
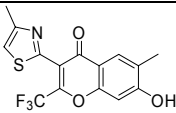
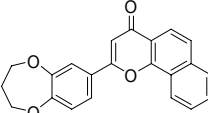
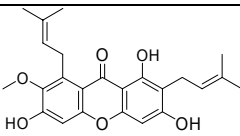
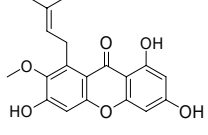
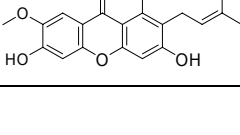


Abbildung 17: nSMase-Inhibitor.

4.12 Ergebnisse der Spingomyelinase-Assays

Zur Vermessung der Protein-Inhibition wurde für die saure Spingomyelinase ein fluoreszenzbasierter Assay verwendet, wohingegen für die neutrale Spingomyelinase ein radioaktives Messverfahren angewendet wurde. Die zu diesem Kapitel gehörigen biochemischen Untersuchungen wurden von Dipl.-Chem. A. Roth und Prof. Dr. C. Arenz an der Humboldt-Universität in Berlin in Zusammenarbeit mit A. Yektaoglu (M.Sc.) und Prof. Dr. A. Giannis an der Universität Leipzig durchgeführt. Die biochemische Untersuchung der 500 γ -Pyrone umfassenden Substanzbibliothek erbrachte drei potente Inhibitoren der aSMase.

Tabelle 8: Ergebnisse der Versuche zur Inhibition der sauren und neutralen Spingomyelinase. Die Einträge 1 bis 3 zeigen die neu identifizierten Inhibitoren der sauren Spingomyelinase, für die gegen die neutrale Form des Proteins ein Selektivitätsprofil aufgenommen wurde. Die Einträge 4 bis 6 zeigen die aus der WOMBAT-Datenbank extrahierten literaturbekannten Inhibitoren.

| Eintrag (Nr.) | Struktur | IC ₅₀ / K _i [μ M] | |
|----------------------------|---|--|---------------|
| | | Saure Form | Neutrale Form |
| 1 (57) |  | 3.1 \pm 2.1 | > 50 |
| 2 (58) |  | 9.5 \pm 2.8 | > 50 |
| 3 (59) |  | 21.5 \pm 6.6 | > 50 |
| 4 ^[104] (60) |  | 12.5 | 113.3 |
| 5 ^[104] (61) |  | 14.6 | 24.7 |
| 6 ^[104] (62) |  | 108 | 202 |

Alle drei gefundenen aSMase-Inhibitoren weisen ein Benzopyrangerüst auf. (Tabelle 8, **57** bis **59**, Eintrag 1 bis 3) Der IC₅₀-Wert für die Hemmung der sauren Sphingomyelinase lag im Falle des besten Inhibitors (**57**, Eintrag 1) bei 3.1 µM und zeigte dabei eine 15-fache Selektivität gegenüber der neutralen Sphingomyelinase. Der bestimmte IC₅₀-Wert liegt somit in einer Größenordnung mit dem Wert, der für die Zelendronsäure (**53**) gemessen wurde.^[103] Da beide Werte von der gleichen Arbeitsgruppe im selben Assay gemessen wurden, kann von einer gewissen Vergleichbarkeit der Werte ausgegangen werden. Allerdings sind die weiteren von Arenz *et al.* hergestellten Bisphosphonat Analoga bis zu 200-fach potenter als die hier gefundenen Verbindungen. Der Vergleich der Aktivität von α-Mangostin (**55**) und seinen Analoga (Eintrag 4-6)^[105], die zwar aus der Familie der γ-Pyrone stammen, jedoch ein Xanthon-Gerüst aufweisen, mit den hier gefundenen Benzopyranen zeigt, dass alle sechs Verbindungen eine vergleichbare Aktivität in Bezug auf die aSMase-Hemmung aufweisen. Allerdings ist es erstaunlich, dass unter den Xanthonen der γ-Pyron-Substanzkollektion keine aktiven Xanthone gefunden werden konnten, obwohl der WOMBAT-basierte Strukturgerüstbaum aktive Moleküle dieser Strukturfamilie zeigte.^[104]

Die Analyse der Struktur-Wirkungsbeziehung aus den vorhandenen Daten ist schwierig, da zu wenig aktive Verbindungen einer Klasse vorliegen. In Bezug auf die literaturbekannten Inhibitoren kann jedoch der Rückschluss gezogen werden, dass Prenylreste womöglich die Selektivität zu Gunsten der Inhibition der sauren Sphingomyelinase verschieben.^[104] Allerdings sind prenylierte Substanzen stark lipophil, wohingegen die neu gefundenen Inhibitoren aktiver und zeitgleich weniger lipophil sind. Somit stellen die hier neu identifizierten aSMase Inhibitoren bessere Startpunkte für weitere Optimierungen dar.

Auch die synthetisierten α-Pyrone wurden hinsichtlich ihrer Inhibition der aSMase getestet. Jedoch war keine dieser Strukturen biochemisch aktiv.

4.13 Zusammenfassung – Strukturgerüstbaum-Überlagerung

Wie in der Einleitung beschrieben, lassen sich Strukturgerüste in hierarchisch geordneten Bäumen anordnen. Dabei werden die Strukturklassen des Baumes von den äußeren Bereichen Richtung Zentrum strukturell einfacher. Diese Strukturbäume können als Anhaltspunkte zur Auswahl geeigneter Strukturklassen zur Synthese von Substanzbibliotheken dienen. Allerdings fehlte bisher ein Ansatz, in welchem das Wissen über die biologische Aktivität einzelner Strukturgerüste mit möglichen Targets verknüpft wird.

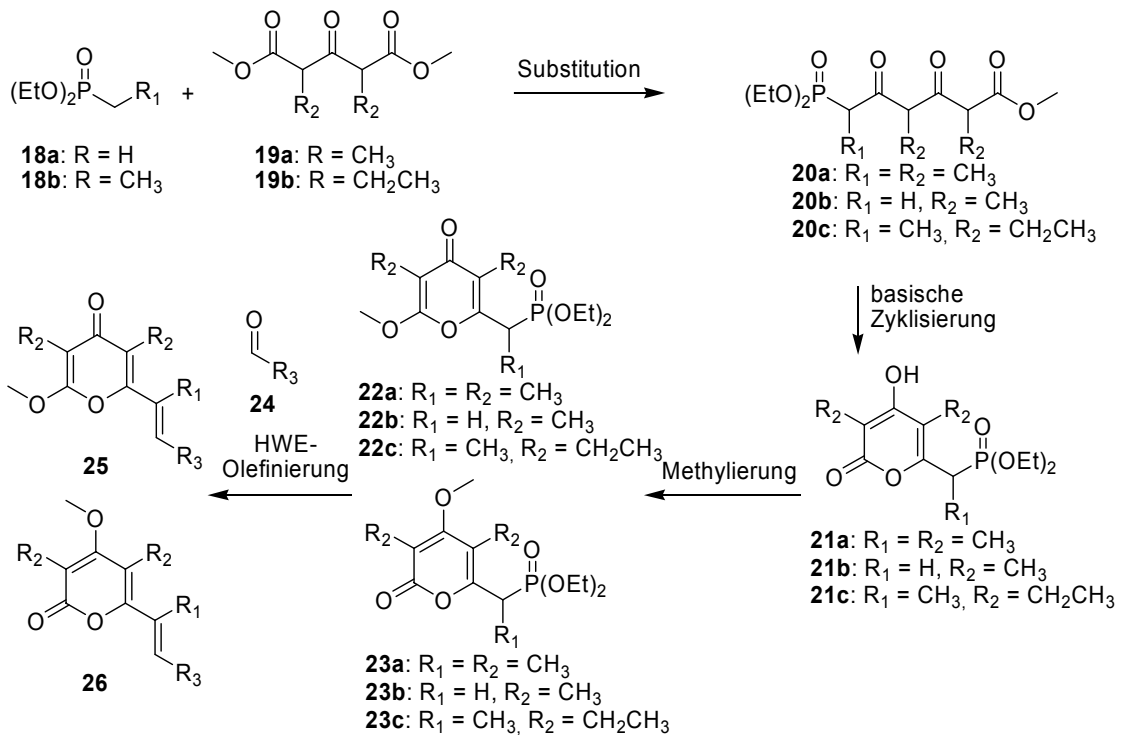
In Zusammenarbeit mit Dr. S. Wetzel wurde dieser Schritt nun exemplarisch für die Strukturklasse der γ -Pyrone-Substanzkollektionen durchgeführt. Die vorliegenden Experimente belegen, dass die Informationslücke zwischen niedermolekularen Molekülen und dazugehörigen Zielproteinen geschlossen werden kann, indem ein naturstoffbasierter Strukturgerüstbaum, dessen Daten aus dem Dictionary of Natural Products (DNP) stammen, mit einer WOMBAT-Datenbank-basierten Strukturgerüstbaum überlagert wird. Diese Überlagerung ermöglicht die gezielte Übertragung von Informationen aus der WOMBAT-Datenbank, die nur Moleküle mit literaturbekannter Aktivität umfasst, auf Strukturgerüste des naturstoffbasierten Strukturgerüstbaumes.

Dr. S. Wetzel hat zur Analyse des γ -Pyrone-Astes des Strukturgerüstbaumes mehr als 8000 γ -Pyrone aus dem DNP mit biologischer Aktivität der korrespondierenden Verbindungen aus der WOMBAT-Datenbank belegt. Auf diesem Wege wurden 133 Targets identifiziert, deren Inhibition durch γ -Pyrone literaturbekannt ist. Aus diesen Zielproteinen wurden als pharmazeutisch relevante Proteine die MAO A- und MAO B-, die STAT1, -3 und -5B-Proteine sowie die saure und neutrale Sphingomyelinase ausgewählt.

Während Dibenzo- und Benzopyrone im ausreichenden Maße kommerziell erhältlich sind, wurde für den Aufbau der γ -Pyrone-Substanzkollektion in Zusammenarbeit mit

4. Spezieller Teil – Pyrone I

Dr. S. Chammaa eine neue Scavenger-Synthese entwickelt. Mittels dieser Synthesestrategie konnten mit einem sauer-funktionalisierten Harz die basischen Reaktanten nach der Substitution sowie nach der Zyklisierung entzogen werden, so dass eine säulenchromatographische Aufreinigung erst nach dem Methylierungsschritt nötig war, um das entstehende α -/ γ -Pyrone-Gemisch zu trennen. Die Horner-Olefinierung lieferte ein breites Spektrum an Verbindungen, die nach Aufreinigung in einer Ausbeute von 28-82% isoliert werden konnten.



Schema 14: Vierstufige Synthese der α - und γ -Pyrone.

Darüber hinaus wurden sechs der hergestellten α -Pyrone mit ungesättigten aliphatischen Resten zu den entsprechenden Epoxiden und/oder Diolen umgesetzt, während sechs α -Pyrone mit Thiol-Funktionen zu Sulfonen und Sulfoxiden oxidiert wurden.

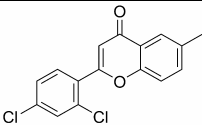
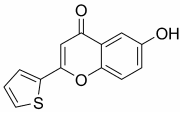
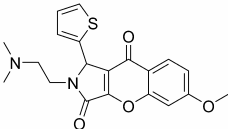
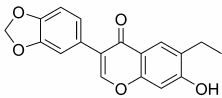
In Folge wurde diese Substanzbibliothek durch weitere γ -Pyrone ergänzt, wobei bei der Auswahl der gekauften Substanzen darauf geachtet wurde, dass alle drei Hierarchieebenen des Astes bevölkert wurden und dass die zusammengestellte Bibliothek akzeptable Wirkstoffähnlichkeit aufwies. Die so zusammengestellte, 500 γ -

4. Spezieller Teil – Pyrone I

Pyrone umfassende Substanzbibliothek wurde biochemischen Assays der genannten Proteine unterzogen.

Zur Bestimmung des MAO-Hemmpotentials der Verbindungen wurde zunächst ein fluoreszenzbasierter Assay entwickelt, der das schnelle Testen der Substanzen ermöglichte. Bei näherer Betrachtung der Inhibitionsergebnisse von MAO A und B fielen die hohen Trefferquoten bei der Identifizierung neuer selektiver Inhibitoren im sub-mikromolaren Bereich auf. Nachfolgende Tabelle zeigt jeweils zwei Beispiele für die aktivsten und zugleich selektivsten MAO A beziehungsweise MAO B Inhibitoren.

Tabelle 9: Ausgewählte MAO-Isoformen-selektive Inhibitoren.

| Eintrag | Struktur | IC ₅₀ [μM] | |
|---------|---|-----------------------|-------------|
| | | MAO A | MAO B |
| 1 |  | 0.95 ± 0.07 | > 50 |
| 2 |  | 0.94 ± 0.03 | > 50 |
| 3 |  | > 50 | 0.34 ± 0.17 |
| 4 |  | > 50 | 0.31 ± 0.03 |

Ingesamt wurden 15 Verbindungen mit einem IC₅₀-Wert kleiner als 1 μM gefunden. Da IC₅₀-Werte einer gewissen Ungenauigkeit unterliegen und von Assay zu Assay je nach Enzymquelle und Inkubationszeit differieren können, lässt sich kein genauer Vergleich mit literaturbekannten Inhibitoren ziehen. Allerdings fällt auf, dass die identifizierten Inhibitoren etwa in einer Größenordnung mit dem reversibel an MAO A bindenden Moclobemid **36** liegen. Unter den MAO B-Inhibitoren wurden 11 Verbindungen mit einem IC₅₀-Wert kleiner als 1 μM gefunden. Allerdings sind diese

4. Spezieller Teil – Pyrone I

Verbindungen etwa 10-fach schwächere MAO B-Binder als das literaturbekannte Lazabemid (**39**). Die Analyse der Selektivität der getesteten MAO-Inhibitoren zeigte, dass die Ausbeute an sieben selektiven MAO-Inhibitoren vor dem Hintergrund der hohen Ähnlichkeit beider Enzym-Isoformen sehr gut ist. Die hohe Zahl an Xanthonen, die die MAO-Isoformen inhibiert haben, ermöglichte eine Struktur-Wirkungsanalyse für diese Substanzklasse. Dies zeigte, dass Substitutionen an der Position zwei und vier die inhibitorische Wirkung für beide Monoaminoxidase-Isoformen verringerte, wohingegen die Substitution an Position drei lediglich die Hemmung von MAO A veränderte (Abbildung 18).

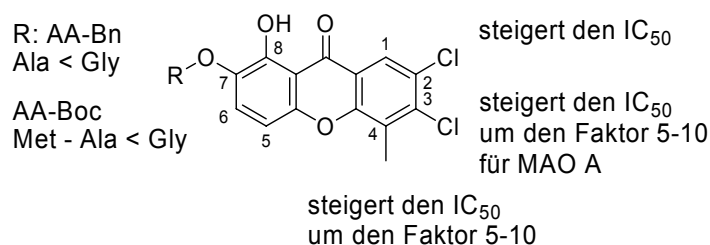
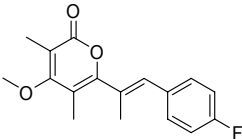
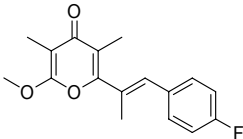


Abbildung 18: Struktur-Wirkungsbeziehung der MAO A- und B-Hemmung durch Xanthon-Derivate.

Auch der Test der α -Pyrone-Kollektion ergab neue Inhibitoren der MAO-Isoformen mit zu den γ -Pyrone vergleichbaren Trefferquoten. Insbesondere fiel auf, dass bei gleichbleibendem Substitutionsmuster die Aktivität und Selektivität zwischen α - und γ -Pyrone kaum variierte (Tabelle 10).

Tabelle 10: Vergleich der MAO-Inhibition zwischen α - und γ -Pyrone.

| α -Pyrone | MAO A IC_{50} [μ M] | MAO B IC_{50} [μ M] | γ -Pyrone | MAO A IC_{50} [μ M] | MAO B IC_{50} [μ M] |
|---|-------------------------------|-------------------------------|--|-------------------------------|-------------------------------|
|  | 13.71 \pm 0.94 | > 100 |  | 18.10 \pm 1.53 | > 100 |

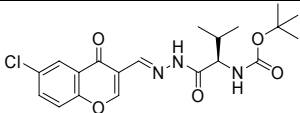
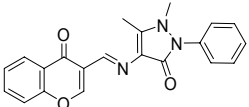
Die Analyse der gefundenen γ -Pyrone-Inhibitoren hinsichtlich ihrer Verteilung innerhalb des Astes im Strukturgerüstbaum zeigt, dass ein weites Spektrum an Strukturen in

4. Spezieller Teil – Pyrone I

allen Hierarchieebenen gefunden werden konnte. Das Prinzip der Brachiation lieferte also positive Ergebnisse in jedem strukturellen Reduktionsschritt.

Die Assays zur Inhibition der STAT-Proteine wurden von der Arbeitsgruppe um Dr. T. Berg durchgeführt. Bei der Untersuchung der γ -Pyrone-Kollektion wurden neue Inhibitoren identifiziert, die strukturelle Ähnlichkeit mit kürzlich von dieser Gruppe veröffentlichten Verbindungen zur Inhibition dieser Proteine haben. Die identifizierten Verbindungen inhibieren sowohl STAT5b, STAT3 und STAT1 (Tabelle 11).

Tabelle 11: *In vitro* Aktivitäten der getesteten γ -Pyrone in biochemischen Versuchen zur STAT- Inhibition in fluoreszenzbasierten Tests.

| Eintrag (Nr.) | Struktur | IC ₅₀ [μ M] STAT5b | IC ₅₀ [μ M] STAT3 | IC ₅₀ [μ M] STAT1 |
|------------------|--|---------------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|
| 1 (46) |  | 29 \pm 1 | 30.5 \pm 0.4 | 38 \pm 2 |
| 2 (47) |  | 39 \pm 1 | 22 \pm 1 | 14 \pm 1 |

Die biochemisch-bestimmte Inhibition konnte auch in Burkitt-Lymphom-Zelllinien nachgewiesen werden. Interessanterweise war kein γ -Pyrone der unteren Astebene aktiv, auch zeigte keines der synthetisierten α -Pyrone starke Hemmeigenschaften.

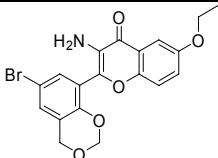
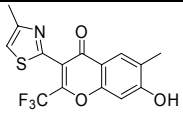
Die kleine Zahl der gefundenen STAT-Inhibitoren muss allerdings vor dem Hintergrund der schwierigen Bindung eines möglichen Liganden an die sehr flache Bindungstasche des Proteins gesehen werden. Berg *et al.* untersuchten in einer vorherigen Arbeit 17298 Verbindungen auf ihr Inhibitionspotential in einem STAT3-Assay und identifizierten dabei insbesondere eine Verbindung, die einen vergleichbaren IC₅₀-Wert aufwies. Der Vergleich der Bibliotheksgröße zeigt das Potential des hier vorgestellten Ansatzes zur Identifikation von Targets für Substanzbibliotheken.

4. Spezieller Teil – Pyrone I

Wie zu erwarten war, funktioniert das Prinzip der strukturellen Vereinfachung von höheren Ebenen des Strukturgerüstbaumes zu niedrigeren Ebenen nicht bei jeder Kombination von Substanz-/Proteinklassen.

Auch in der dritten Proteinklasse, den Sphingomyelinasen wurden drei Benzopyrone identifiziert, die selektiv die saure Sphingomyelinase inhibierten (Tabelle 12).

Tabelle 12: Exemplarische saure Sphingomyelinase-Inhibitoren.

| Eintrag (Nr.) | Struktur | IC ₅₀ / K _I [μM] | |
|------------------|--|--|---------------|
| | | Saure Form | Neutrale Form |
| 1 (57) |  | 3.1 ± 2.1 | > 50 |
| 2 (58) |  | 9.5 ± 2.8 | > 50 |

Die Stoffklasse der Monobenzopyrone wird im Rahmen dieses Projektes erstmalig als eine neue Sphingomyelinase-Inhibitor-Klasse beschrieben. Allerdings inhibieren die Verbindungen die saure Sphingomyelinase etwa 200-fach schwächer als die literaturbekannten Bisphosphonate. Die Untersuchung der α -Pyrone auf ihr Inhibitionspotential ergab genauso wie bei den STAT-Proteinen keine neuen Inhibitoren.

Werden die gefundenen Inhibitoren hinsichtlich des Strukturgerüstbaumes bewertet, fällt auf, dass sie eine höhere Aktivität zeigen als die literaturbekannten Xanthon-Inhibitoren, die *via* WOMBAT zur Auswahl der Proteinklasse führten. Zwar funktioniert das Prinzip der Struktur-Vereinfachung auch in diesem Fall nicht, jedoch zeigt dieses Beispiel, dass von der biochemischen Aktivität, die von Molekülen eines Strukturgerüsts bekannt ist, auf Aktivität umliegender Strukturgerüste geschlossen werden kann.

Wird die Arbeit auf der Ebene der Entwicklung des BIOS-Konzeptes betrachtet, so liefert diese Arbeit ein weiteres Beispiel, dass das hierarchische Anordnen von Strukturmotiven in Baumform und das Navigieren entlang der Äste innerhalb des Baumes ein effektives Verfahren ist, um naturstoffabgeleitete Substanzbibliotheken, zugeschnitten auf bestimmte Proteine, auszuwählen und herzustellen. Gegenüber vorherigen Arbeiten wurde jedoch ein weiterer Schritt durchgeführt und einzelne Struktur motive mit biologischer Aktivität belegt, um die bestehende Informationslücke zwischen Substanzkollektionen und vielversprechenden Zielproteinen zu schließen.

5. Spezieller Teil – Pyrone II

5.1 Anwendung des PSSC-Ansatzes zur Identifikation von LSD1-Inhibitoren

In einem zweiten Teil der Arbeit sollten Inhibitoren der Lysin-spezifischen Demethylase LSD1, welche 2004 erstmals als mögliches Zielprotein in der Tumorthherapie beschrieben wurde, entwickelt werden.^[113] Eine Literaturrecherche zeigte, dass bisher einzig kovalent-wirkende Inhibitoren für dieses Protein beschrieben wurden. (LSD1 und zugehörige kovalente Inhibitoren werden im nachfolgenden Kapitel näher beschrieben.) Zur besseren Aufklärung der zellulären Funktion von LSD1 *in vivo* als auch um potentielle Startpunkte für die Entwicklung medizinisch-relevanter Inhibitoren aufzuzeigen, wurden im Rahmen dieser Arbeit erste Anstrengungen unternommen, nicht-kovalente LSD1-Inhibitoren zu finden.

Um dies zu bewerkstelligen, wurde der „Protein Structure Similarity Clustering“ (PSSC)-Ansatz verwendet.^[26] Der PSSC-Ansatz basiert wie in der Einleitung beschrieben auf dem Prinzip, dass strukturell ähnliche Bindungsmotive in Proteine auch ähnliche Substanzen binden. Proteine werden nach der strukturellen Ähnlichkeit ihres Subfolds im aktiven Zentrum in Gruppen zusammengestellt. So wurde die Liganden-Bindungsstelle von LSD1 von Dr. S. Wetzel *in silico* extrahiert und der extrahierte Kern mittels des Dali-Webserver einer Ähnlichkeitsanalyse gegen alle Proteinstrukturen in der FSSP Datenbank unterzogen.^[114] Diese zeigte eine hohe Ähnlichkeit des aktiven Zentrums von LSD1 mit den beiden Proteinen MAO A und MAO B auf. Dr. S. Wetzel analysierte die Überlagerung von LSD1 sowie MAO A und MAO B genauer und fand heraus, dass LSD1 und die MAO-Isoformen zwar nur eine geringe Sequenz-Ähnlichkeit, dafür aber eine hohe Ähnlichkeit in der dreidimensionalen Struktur haben. (Abbildung 19) Diese Beobachtung entspricht den Überlegungen des PSSC-Ansatzes, die davon ausgehen, dass die dreidimensionale

Ähnlichkeit von Proteinen durch die Evolution eher konserviert wird als die Aminosäuresequenz (Tabelle 13).^[26]

Tabelle 13: Daten zur Überlagerung von MAO A mit LSD1 und MAO B. Die mittlere quadratische Abweichung (RMSD) beschreibt die Ähnlichkeit zweier Proteinstrukturen. Je kleiner der Wert ist, desto ähnlicher sind die Strukturen. Der Z-Faktor beschreibt die statistische Signifikanz der Überlagerung. Hierbei steigen die Werte mit zunehmender statistischer Signifikanz an, wohingegen Werte unter 2 bei zufälligen Überlagerungen auftreten.

| Enzyme | RMSD [Å] | Z-Faktor | Überlagerte Sequenzlänge | Sequenz-ähnlichkeit [%] |
|--------|----------|----------|--------------------------|-------------------------|
| MAO B | 0.5 | 22.7 | 137 | 82 |
| LSD1 | 1.3 | 21.6 | 131 | 37 |

Die hohe strukturelle Ähnlichkeit des Subfolds im aktiven Zentrum der drei beschriebenen Proteine führte zur Hypothese, dass nicht-kovalente MAO-Inhibitoren auch an LSD1 binden. Vor diesem Hintergrund sollte die in Kapitel 4.2 beschriebene, 500 γ -Pyrone umfassende Substanzkollektion hinsichtlich ihres Inhibitions potentials gegen das Enzym LSD1 getestet werden. Die Entscheidung für die γ -Pyronsubstanzbibliothek basierte dabei auf den vorher durchgeführten MAO A und B-Hemmstudien, welche eine Vielzahl an γ -Pyron-basierten MAO A und B-Inhibitoren aufzeigte.

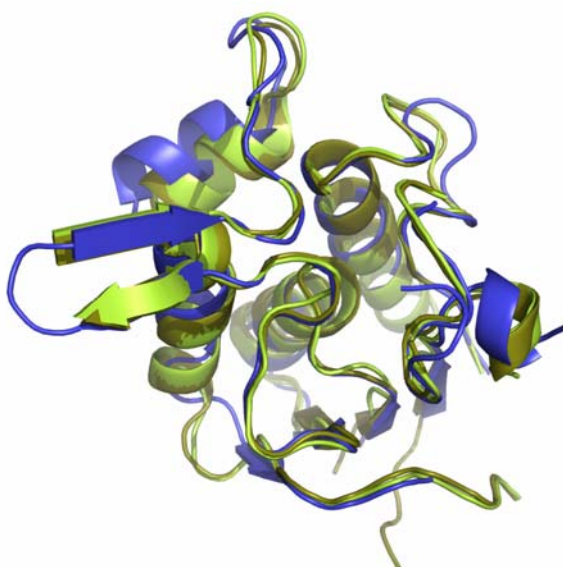


Abbildung 19: Überlagerung der aktiven Zentren von MAO A (braun), MAO B (hellgrün) und LSD1 (blau).

5.2 LSD1

LSD1 wurde 2004 von Shi *et al.* an der Harvard Medical School als das erste Protein beschrieben, welches eine enzymatische *N*-Demethylierung eines Proteins katalysiert.^[113] Durch eine Flavin-Adenin-Dinucleotid (FAD)-abhängige Oxidation demethyliert LSD1 selektiv *N*-Methyllysin der Positionen 4 und 9 des Histons H3. Nach dieser bahnbrechenden Entdeckung konnten in der Zwischenzeit bereits mehr als zehn weitere Lysindemethylasen identifiziert werden.

LSD1 besitzt das klassische katalytische Zentrum einer Aminoxidase, bestehend aus einer *N*-terminalen SWIRM-Domäne, die in die nukleosomale Erkennung involviert ist, und einer *N*-terminalen Verlängerung.^[113] Der Katalysezyklus von LSD1 entspricht dem anderer FAD-abhängiger Aminoxidasen, bei welchem in einem Schritt das Amin oxidiert und das Flavin reduziert wird. Sodann wird Flavin wieder durch molekularen Sauerstoff reoxidiert, wodurch die Reaktionsprodukte Wasserstoffperoxid und Formaldehyd gebildet werden. Dieser Kreislauf ist in Schema 15 dargestellt. Da Wasserstoffperoxid und Formaldehyd im Zellkern gebildet werden und somit über mutagenes Potential verfügen, muss es zugleich Entgiftungswege für die Zelle geben, die bisher jedoch noch nicht genau aufgeklärt sind.

Neuste Ergebnisse zeigen, dass LSD1-Hemmung einen vielversprechenden Ansatz zur Entwicklung neuartiger Antikrebsmittel darstellt.^[115] Deshalb wurden bereits Anstrengungen unternommen, geeignete niedermolekulare Inhibitoren dieses Enzyms zu identifizieren. So wurde bereits der MAO B-Inhibitor Tranylcypromin als LSD1-Inhibitor beschrieben, bei welchem jedoch die LSD1-Hemmung schwächer ausfällt als die entsprechende Inhibition von MAO B (Abbildung 20).^[116,117,118]

5. Spezieller Teil – Pyrone II

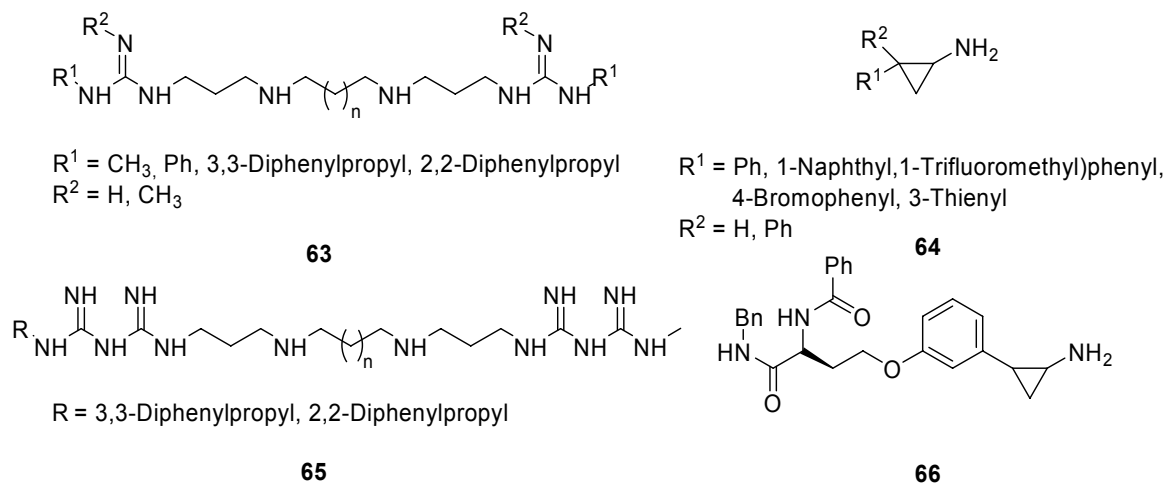


Abbildung 20: Bekannte nicht-peptidische LSD1 Inhibitoren.

Außerdem wurden einige Bisguanidin- (**63**) und Biguanid- (**65**) Polyamidanaloga als potentielle LSD1-Inhibitoren getestet (Abbildung 20). Diese Substanzen sind darüberhinaus in der Lage, durch epigenetische Mechanismen stillgelegte Tumorsuppressorgene zu reaktivieren, wodurch das therapeutische Potential der LSD1-Inhibitoren in der Krebstherapie hervorgehoben wird.^[115]

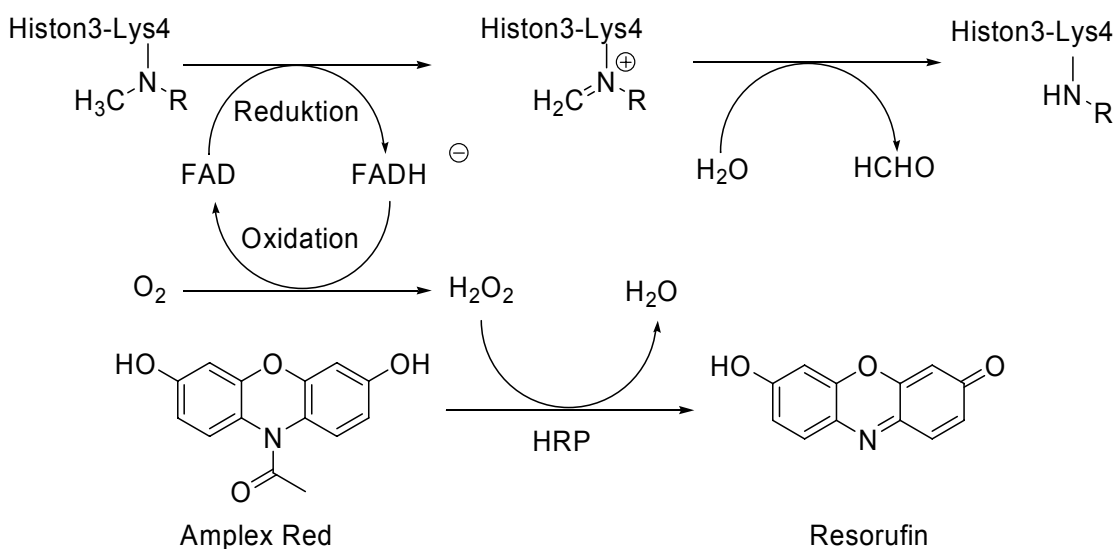
Im gleichen Jahr wurden auch *trans*-2-Arylcyclopropylamine (**64**) als LSD1-Inhibitoren identifiziert. Zuletzt wurden zwei selektive LSD1-Inhibitoren des Typs **66** mit IC_{50} -Werten im niedrigen μM Bereich von Ueda *et al.* publiziert.^[119]

All diese MAO A- und MAO B-Inhibitoren binden kovalent an den LSD1 FAD-Cofaktor. Bis zum jetzigen Zeitpunkt sind noch keine nicht-kovalenten Inhibitoren für LSD1 bekannt.

5.3 Untersuchung der Pyronbibliothek

Aufgrund der dreidimensionalen strukturellen Ähnlichkeit des aktiven Zentrum des LSD1-Proteins mit den Bindungszentren der beiden MAO-Isoformen wurde in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe um Prof. Dr. R. Büttner und Prof. Dr. R. Schüle die aus 500 Substanzen bestehende γ -Pyrone-Substanzbibliothek auf die Inhibition von LSD1 getestet. Ziel dieser Untersuchung bestand in der Identifikation von nicht-kovalenten LSD1 Inhibitoren.

Als Assay stand ein indirekter Fluoreszenzversuch zur Verfügung. Das Assay-Detektionsverfahren beruhte auf der katalytischen Umsetzung von Amplex Red und dem bei der Demethylierung entstehenden Wasserstoffperoxid zu Resorufin und Wasser. Als Katalysator fungierte hierbei die Meerrettichperoxidase, die hier nach der englischen Bezeichnung („Horseradish peroxidase“) mit HRP abgekürzt wird (Schema 15).



Schema 15: Prinzip des fluoreszenzbasierten HRP-LSD1-Aktivitätsversuchs.

Das Prinzip des indirekten LSD1-Aktivitätsversuchs beruht auf der katalytischen Umsetzung des bei der Deaminierung am Histon entstehenden Wasserstoffperoxids mit Amplex Red zu Resorufin (Schema 15). Die Veränderung des Resorufingehaltes

lässt sich fluoreszenzspektroskopisch verfolgen (Anregung bei 544 nm, Emission bei 590 nm). Um sicher zu gehen, dass sich die Menge des resultierenden Resorufins proportional zur Wasserstoffperoxid-Konzentration verhält, wurde von der Arbeitsgruppe um Prof. Dr. R. Büttner eine Verdünnungsreihe von 0.01 bis 20 μM Wasserstoffperoxid hergestellt. Die Lösung enthielt zudem 0.4 μM HRP sowie Amplex Red (100 μM) in 50 mM HEPES Puffer und wurde bei pH 7.5 inkubiert und vermessen. Es wurde festgestellt, dass ein linearer Bereich bei diesem Versuchsaufbau mindestens in dem Konzentrationsbereich von 0.05 und 1 μM liegt, verdeutlicht durch einen Korrelationskoeffizienten von $R^2 = 0.99$ (Abbildung 21).

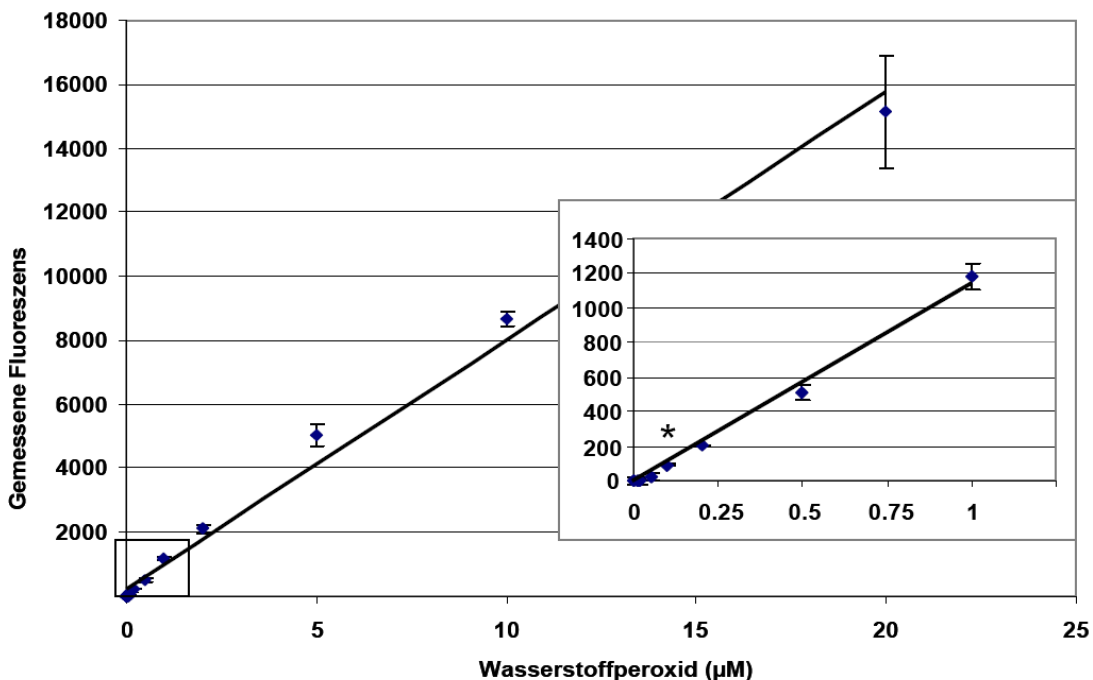


Abbildung 21: Linearität des Resorufins-Wasserstoffperoxid Verhältnisses.

Bei der Untersuchung von 80 Substanzen aus der γ -Pyrone-Bibliothek wurde von der Gruppe um Prof. Dr. R. Büttner festgestellt, dass einige getestete Substanzen vermutlich aufgrund unerwünschter Redoxeffekte Einfluss auf die Resorufin-Produktion haben. Diese Beobachtung sowie der große Aufwand eines indirekten Enzymassays, für den im Falle eines positiven Befundes zusätzliche Kontrollen, wie zum Beispiel einer Hemmung der HRP, durchgeführt werden müssen, legte nahe, einen direkten Enzymassay zur Bestimmung der LSD1-Hemmung zu etablieren.

Deshalb wurde versucht, nach dem Vorbild des oben beschriebenen MAO-Versuches einen LSD1-Messversuch mit typischen MAO-Substraten zu etablieren. So wurde versucht, die gängigen MAO Substrate Kynuramin, Benzylamin und Tyramin auch als LSD1-Substrate zu verwenden. In Übereinstimmung mit parallel in der Arbeitsgruppe um Prof. Dr. R. Schüle durchgeführten Versuchen gelang dies jedoch nicht. Da LSD1 zur Familie der Polyaminoxidasen gehört, wurden auch von anderen Gruppen verschiedene Polyamine als potentielle Substrate getestet.^[113] Jedoch erwiesen sich alle anderweitig bekannten Substrate dieser Proteinfamilie unter den verwendeten LSD1-Reaktionsbedingungen als nicht geeignet. Auch im Bereich kurzkettiger Peptide konnten keine Substrate gefunden werden, so dass aus praktischen Erwägungen mit dem beschriebenen HRP-gekoppelten Enzymassay weitergearbeitet wurde.

Unter Verwendung dieses Assays wurde anschliessend die komplette Substanzbibliothek durch die Arbeitsgruppe um Prof. Dr. R. Schüle getestet. Die Versuche wurden in 96er-Lochplatten bei einem Testvolumen von jeweils 40 µL durchgeführt. Die Messungen erfolgten bei 25 °C in Dreipunktmessungen. Als Kontrolle wurde getestet, ob die Testsubstanzen auch Inhibitoren der HRP darstellen. Alle in den Vorversuchen aktiven Verbindungen wurden in einem zweiten Enzymassay erneut evaluiert. Für alle weiterhin aktiven Substanzen wurden schließlich mittels Massenspektrometrie untersucht, ob in diesen Fällen eine „echte“ Inhibition des LSD1-Proteins vorlag. Unter Assay-Bedingungen wurde LSD1 mit dem zweifach-methylierten peptidischen Substrat H3K4me2 und 50 µM der potentiellen Inhibitoren für zwei Stunden inkubiert. Anschließend wurde massenspektrometrisch die Reaktionslösung untersucht. Lag keine Inhibition vor (Abbildung 22, Spur 1 und 8), ist nach zwei Stunden noch nicht-demethyliertes Startmaterial zu finden. Des Weiteren treten zwei weitere Peaks im Spektrum auf, die einfach und zweifach demethyliertes Substrat zeigen. Diese Peaks können nur beobachtet werden, wenn das H3K42me-Peptid von LSD1 demethyliert wurde.

5. Spezieller Teil – Pyrone II

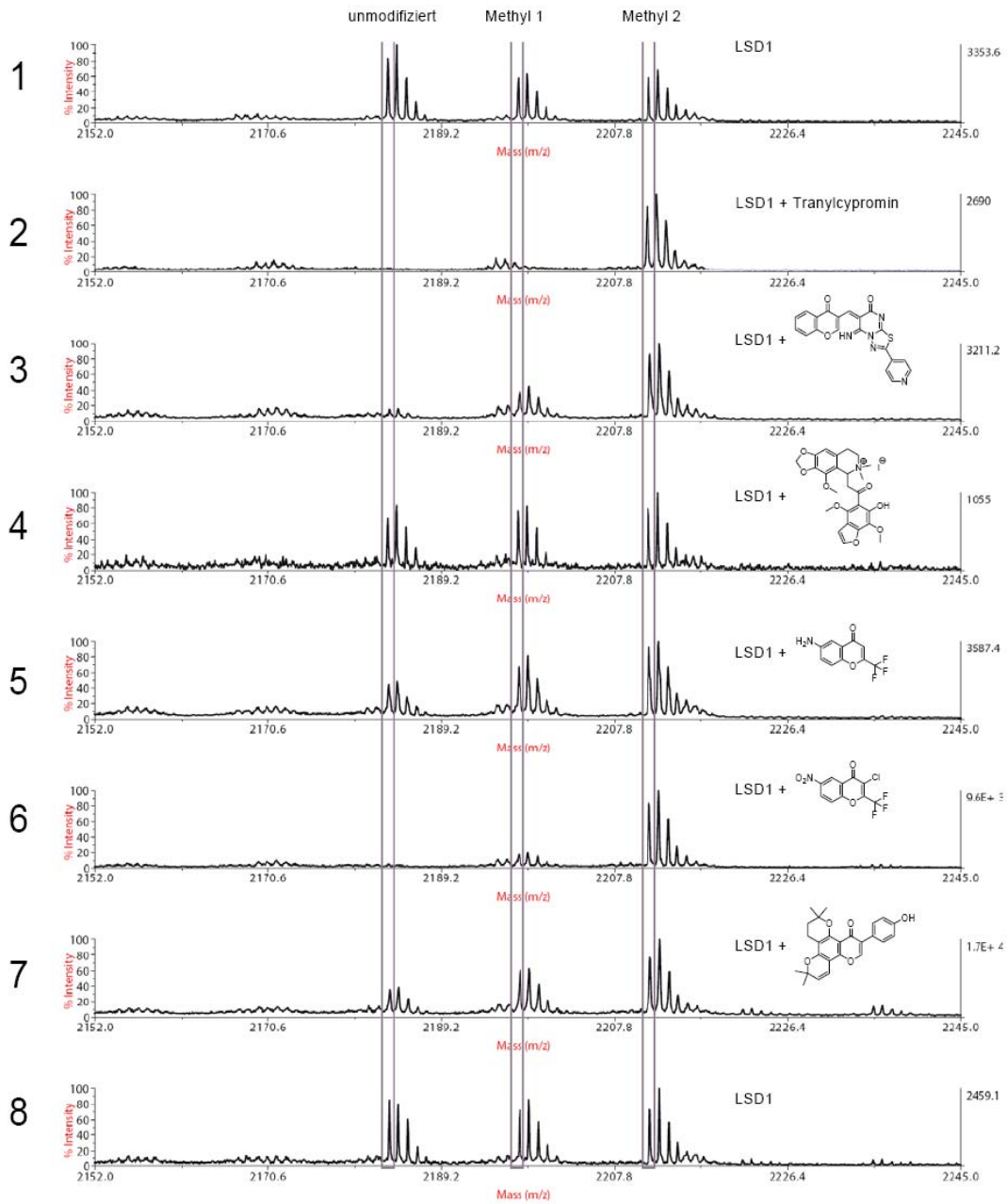


Abbildung 22: Massenspektrometrische Untersuchungen von Schüle *et al.* zur Hemmung der Demethylierung des H3K4me₂-Peptides durch Zugabe von 50 μ M der potentiellen Inhibitoren. Die Messung wurde bei einer LSD1-Konzentration von 0.5 μ g / 10 μ L und nach einer Inkubationszeit von 2 h durchgeführt. Es wird die massenspektrometrische Untersuchung ohne Zusatz von Inhibitor (Spur 1 und 8), bei Zusatz der Referenzverbindung Tranylcypromin (Spur 2), bei Zusatz der drei Inhibitoren **67** bis **69** (Spur 3, 6, 7) sowie bei Zugabe einer nicht bindenden Substanz (Spur 4) und eines Analogons zu Verbindung **68** (Spur 5) gezeigt.

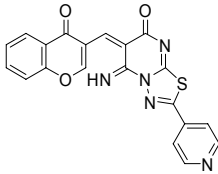
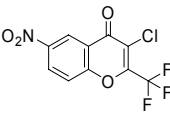
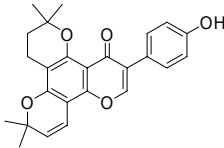
5. Spezieller Teil – Pyrone II

Als Referenz wurde der bekannte irreversible LSD1-Inhibitor Tranylcypromin verwendet (Abbildung 22, Spur 2). Deutlich ist nach zwei Stunden Inkubationszeit der Peak des zweifach methylierten H3K4me2-Peptides zu erkennen, wohingegen kaum das einfach- und gar nicht das zweifach-demethylierte Produkt im Massenspektrum zu erkennen ist, was für eine Hemmung der LSD1-Funktion spricht.

Analog zu der Referenzsubstanz wurden fünf weitere Verbindungen auf diese Art getestet, um die Daten des initialen Assays zu verifizieren. Spur 3 und Spur 6 zeigen hierbei zwei neue Inhibitoren aus der getesteten γ -Pyrone-Substanzkollektion, bei denen der inhibitorische Effekt mit dem von Tranylcypromin vergleichbar zu sein scheint. Zwei schwache LSD1-Inhibitoren sind auf den Spuren 5 und 7 gezeigt. Auch für diese beiden Substanzen sollten IC_{50} -Werte bestimmt werden. Zuletzt zeigt Spur 4 eine Vergleichssubstanz, die LSD1 nicht inhibiert. Deutlich ist wie bei den Beispielen ohne Inhibitor das einfach- und zweifach-demethylierte Substrat zu erkennen (Abbildung 22, Spur 1 und Spur 8).

In Folge wurden in Dreipunktmessungen konzentrationsabhängige IC_{50} -Werte bestimmt. Insbesondere Verbindungen **67**, **68** und **69** sind als potentielle LSD1-Inhibitoren interessant (Tabelle 14). Nachfolgende Tabelle zeigt die Strukturen dieser Inhibitoren zusammen mit den gemessenen IC_{50} -Werten für LSD1 und die beiden MAO-Isoformen.

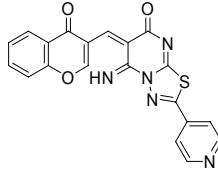
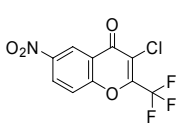
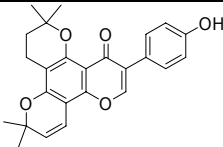
Tabelle 14: Identifizierte LSD1-Inhibitoren mit den gemessenen IC_{50} -Werten für MAO A, und MAO B sowie LSD1.

| |  |  |  |
|-----------------|---|--|---|
| | 67 | 68 | 69 |
| IC_{50} MAO A | > 50 μ M | 40 \pm 10 μ M | > 50 μ M |
| IC_{50} MAO B | > 50 μ M | > 50 μ M | > 50 μ M |
| IC_{50} LSD1 | 52 μ M | 42 μ M | 16 μ M |

5. Spezieller Teil – Pyrone II

In einem nächsten Schritt wurden die drei ausgewählten Verbindungen in Zusammenarbeit mit der Lead Discovery Center GmbH (LDC) und Dr. S. Wetzel weitergehend untersucht.

Tabelle 15: ALogP, molekulare Löslichkeit, berechnete molekulare polare Oberfläche, gemessene molekulare Löslichkeit und Caco-Versuchsdaten der ausgewählten Verbindungen.

| |  |  |  |
|---|---|--|---|
| | 67 | 68 | 69 |
| AlogP | 2.463 | 2.823 | 4.509 |
| Berechnete molekulare Löslichkeit | -4.05 | -5.65 | -6.12 |
| Berechnete molekulare polare Oberfläche [Å ²] | 133.37 | 72.12 | 64.99 |
| Gemessene molekulare Löslichkeit [µM] | Nicht gemessen | 455.0 | 77.5 |
| Caco-2 Papp A-B [10 ⁻⁶ cm/s] | Nicht gemessen | 24.7 | 2.7 |
| Caco-2 Papp B-A [10 ⁻⁶ cm/s] | Nicht gemessen | 51.9 | 1.4 |
| Caco-2 Verhältnis Papp BA/AB | Nicht gemessen | 2.1 | 0.53 |

Der berechnete ALogP, die berechnete molekulare Löslichkeit sowie die berechnete molekulare polare Oberfläche deuten günstige pharmakokinetische Eigenschaften für eine mögliche medizinische Anwendung an.

Nach der „Rule of Five“ liegen günstige ALogP Werte unter 5.^[53] Soll die Substanz Eigenschaften besitzen, wie sie für medizinische Leitstrukturen üblich sind, sollte der Wert kleiner als 3 bis 4 sein. Dies ist nötig, da in Folge weiterer Strukturoptimierung oft mehr lipophile Elemente hinzugefügt werden, so dass ein niedriger Wert mehr Spielraum lässt, die Verbindung hydrophil zu halten. Ein kleiner AlogP wurde sowohl für die Verbindung **67** als auch für die Substanz **68** berechnet.

Die berechnete molekulare Löslichkeit in Wasser erlaubt Vorhersagen zum oralen Absorptionsverhalten und zu einer möglichen Toxizität.^[120] Die Werte sind für alle

Verbindungen sehr gut, was durch die gemessene molekulare Löslichkeit untermauert wird. Hier fällt insbesondere die sehr gute Löslichkeit von Verbindung **68** auf.

Die molekulare polare Oberfläche ist als Oberflächensumme über alle polaren Atome sowie damit verbundene Wasserstoffatome definiert und dient als Größe zur Kennzeichnung der Zellpermeabilität.^[121] Ein günstiger Wert liegt hier unter 150 \AA^2 . Insbesondere die Verbindungen **68** und **69** liegen unter dieser Grenze. Diese berechneten Daten korrelieren sehr gut mit dem gemessenen Caco-2-Zell-Versuch.

Der Caco-2-Zell-Versuch ist ein Modell, um die Permeabilität einer Substanz durch den menschlichen Gastrointestinaltrakt zu simulieren.

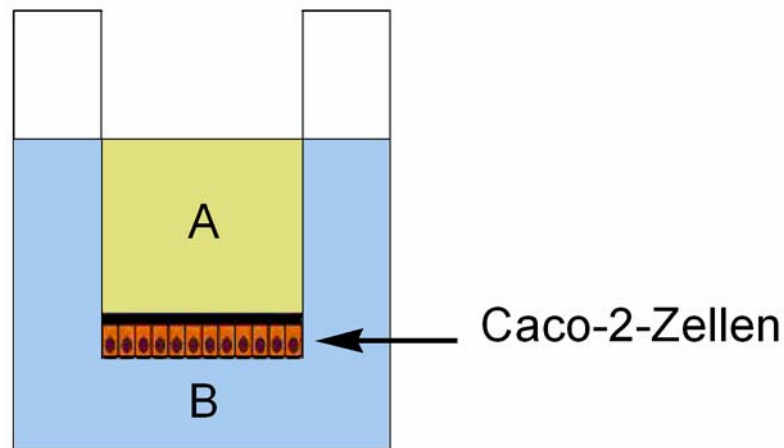


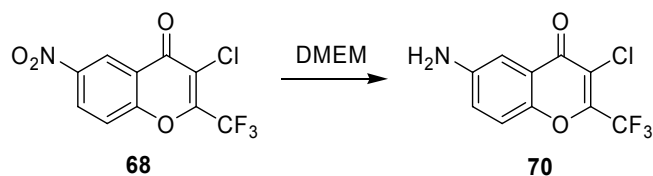
Abbildung 23: Schematische Darstellung des Caco2-Zell-Versuchs.

Die mit A gekennzeichnete Seite ist die apikale Zellseite, wobei die mit B gekennzeichnete Seite die basolaterale Seite darstellt. Wie auch bei den hier durchgeführten Messungen geschehen, wird bei diesen Versuchen die Absorption in A-B Richtung, der Absorption entsprechend sowie in B-A Richtung der Sekretion entsprechend, gemessen (Abbildung 23). Hierzu wird die Substanz auf eine Seite der Monozellschicht aufgetragen und die Substanzmenge nach 2 h Inkubationszeit auf jeder Seite der Zellschicht *via* HPLC oder LC/MS/MS gemessen. Die Permeabilität (Papp) wird schließlich aus den Werten für den Zelldurchtritt in A-B und B-A Richtung bestimmt. Das bestimmte Verhältnis von Sekretion zu Adsorption zeigt, dass Verbindung **68** zweimal schneller ausgeschieden als aufgenommen wird, wohingegen

dieses Verhältnis für Verbindung **69** umgekehrt war. Beide Werte sind jedoch für eine Leitstruktur sehr günstig. Insbesondere die hohe Penetrationsgeschwindigkeit von 10^{-6} cm/s ist hervorzuheben.

Zwar wies Verbindung **68** einen geringeren IC_{50} -Wert auf, jedoch besaß sie eine günstigere molekulare Löslichkeit, was insbesondere für geplante Zell- und Mausversuche eine große Rolle spielt. So wurden weitere Untersuchungen mit dieser Verbindung durchgeführt.

Es zeigte sich, dass die Nitroverbindung **68** in dem üblicherweise verwendeten Zell-Nährmedium Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) offensichtlich nicht dauerhaft stabil war, sondern nach drei Tagen zum entsprechenden Amin **70** reduziert wurde. Dies musste bei folgenden länger andauernden Messungen berücksichtigt werden.



Schema 16: Reduktion des LSD1-Inhibitors **68** mit einer Nitrogruppe zum Amin **70** unter den Messbedingungen.

5.4 Synthese und Aktivität von Chromenderivaten

Als einer der interessanten LSD1 Inhibitoren wurde das 3-Chloro-6-nitro-2-trifluoromethyl-chromen-4-on (**68**) identifiziert. Um zu versuchen, die Aktivität des Inhibitors zu steigern, wurden einige Analoga um das Chromengrundgerüst aufgebaut und strukturell ähnliche Derivate zugekauft. In Abbildung 24 sind die so erhaltenen Derivate von **68** dargestellt.

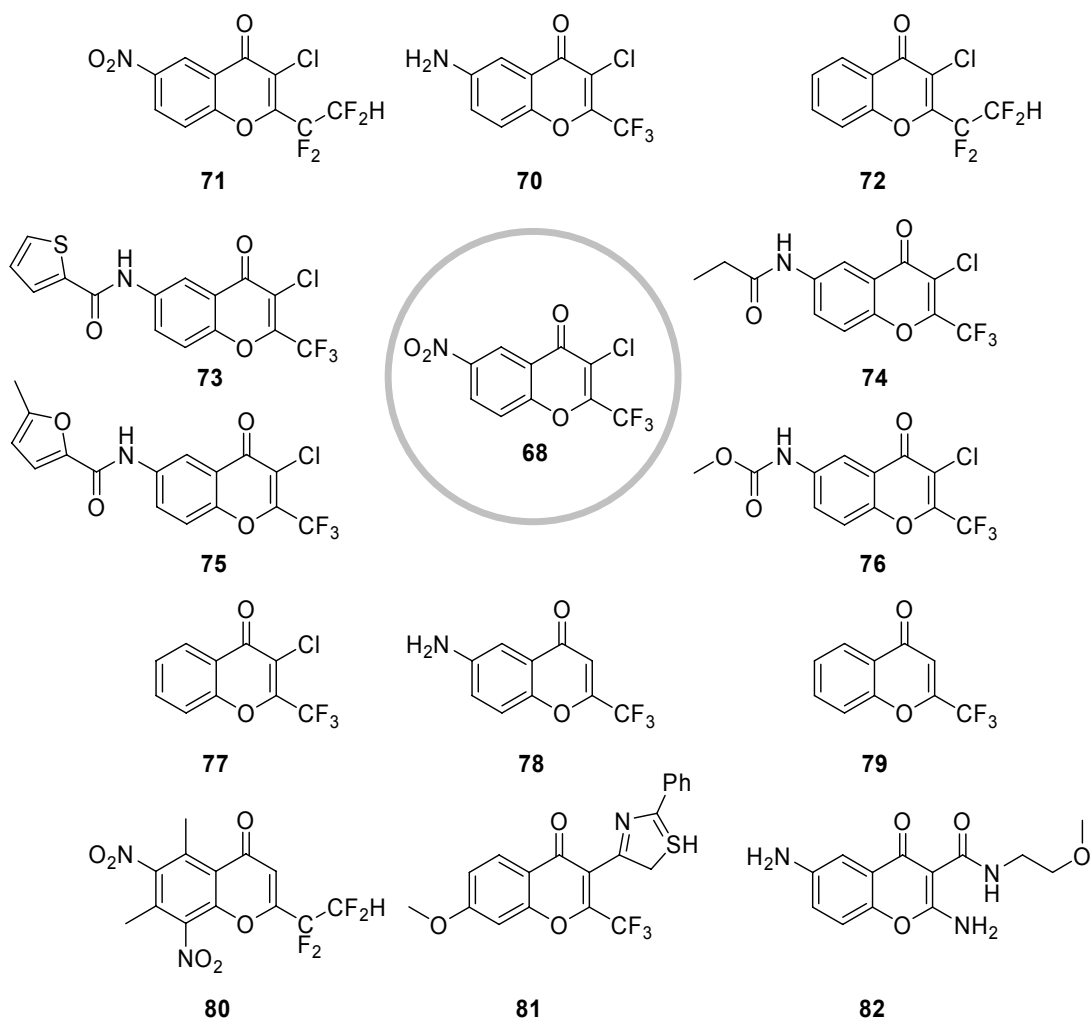
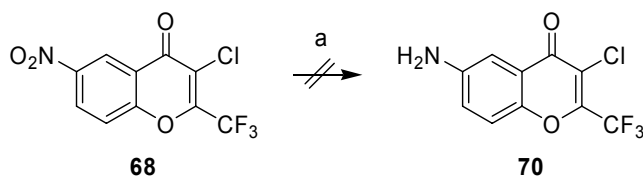


Abbildung 24: Untersucher chemischer Strukturraum um das Nitrochromen **68**.

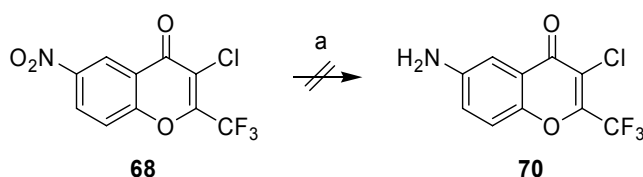
Zur Reduktion der Nitroverbindung **68** zum Amin **70** wurde in einem ersten Versuch zunächst **68** mit 5 Äquivalenten Natriumdithionit in einem THF/Wasser-Gemisch (1/1) umgesetzt (Schema 17).



Schema 17: Versuch der Reduktion der Nitroverbindung **68** zum Amin **70**: Natriumdithionit 5.0 Äq., THF/Wasser-Gemisch (1/1), RT, verschiedene Zeiten.

Jedoch trat bereits nach einer Reaktionszeit von 30 h nicht nur eine Reduktion der Nitrogruppe auf, sondern auch eine Dehalogenierung der Chlorgruppe. Eine Verminderung der Temperatur auf $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ und Verkürzung der Reaktionszeit führte zu einem Produktgemisch aus dem gewünschten Amin **70** und dem dehalogenierten Analogon.

Somit wurde das Reduktionsmittel gewechselt und Eisenpulver zusammen mit konzentrierter Salzsäure verwendet. Nach einer Reaktionszeit von 2 h bei $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ wurde ein Gemisch aus Zielprodukt **70** und Startmaterial **68** erhalten. Nach verlängerter Reaktionszeit trat wiederum Dehalogenierung ein.

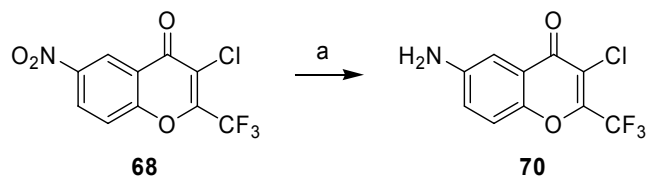


Schema 18: Versuch der Reduktion der Nitroverbindung **68** zum Amin **70**: Eisenpulver, konz. HCl, $65\text{ }^{\circ}\text{C}$, 2 h.

In einer weiteren Variante wurde als Reduktionsmittel ein Gemisch aus Eisensulfatheptahydrat und Zinkpulver jeweils in einem Verhältnis von drei Äquivalenten im Vergleich zum Reaktanden eingesetzt.

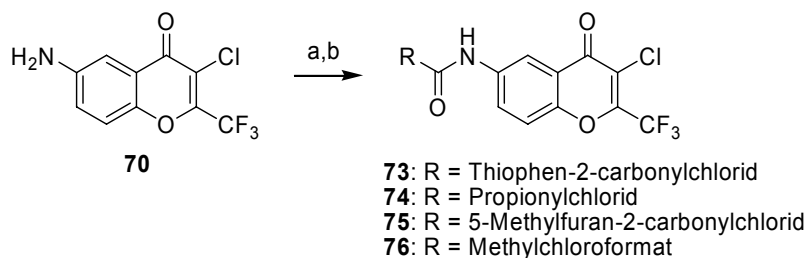
5. Spezieller Teil – Pyrone II

Nach dreistündigem Rühren konnte das Zielprodukt **70** nach Aufreinigung in einer Ausbeute von 41% isoliert werden (Schema 19).^[122]



Schema 19: Reduktion der Nitroverbindung **68** zum Amin **70**: Eisensulfatseptahydrat 3.0 Äq., 25%-ige NH₄Cl-Lösung Zinkpulver, 3.0 Äq., 50°C, 3 h.

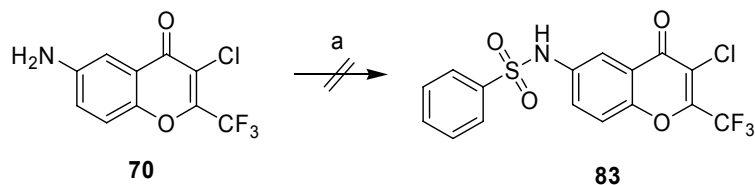
Das so erhaltene Amin sollte in weiteren Reaktionen modifiziert werden. Zunächst wurden verschiedene Amide in Anlehnung an die Vorschriften von Pflantz *et al.*^[123] und DeRuiter *et al.*^[124] hergestellt (Schema 20).



Schema 20: Amidierung des Amin **70**: a. Pyridin 2.5 Äq., DMF, RT, 15 min; b. Methyl chloroformat 1.2 Äq., 0 °C 2 h.

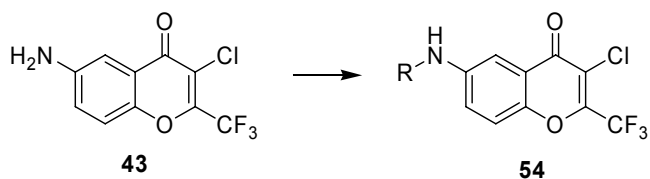
Als Chloride wurden Propionylchlorid, Methylchloroformat, 5-Methylfuran-2-carbonylchlorid und Thiophen-2-carbonylchlorid zur Bildung der Produkte (**73** bis **76**) eingesetzt. Nach Reaktionsaufarbeitung war es möglich, diese durch Umkristallisieren als Reinsubstanzen in einer Ausbeute von 39% bis 61% zu erhalten.

Als Nächstes wurde versucht, Sulfonamid-Derivate von **70** zu synthetisieren. Dies geschah unter anderem nach einer Vorschrift von Wydysch *et al.* (Schema 21).^[125]



Schema 21: Versuch der Sulfonamid-Bildung: a Benzylsulfonylchlorid, NaH, DMF, 0 °C

Hierzu wurde das Amin **70** in DMF gelöst und das Gemisch auf 0 °C gekühlt. Als Base wurde Natriumhydrid verwendet. Nach Zugabe des Benzylsulfonylchlorids wurde das Gemisch auf Raumtemperatur erwärmt. Jedoch konnte weder *via* GC-MS noch *via* LC-MS das Zielprodukt detektiert werden. Als Base wurde in einem neuen Versuch Pyridin verwendet. Jedoch konnte auch in diesem Fall weder bei Raumtemperatur noch nach Erwärmen auf 45 °C das Produkt **83** nachgewiesen werden, obwohl das Startmaterial vollständig konsumiert wurde.



Schema 22: Versuch der reduktiven Aminierung. Es wurden verschiedene Varianten getestet und beim Einsatz von α -Picolin-Boran konnte das gewünschte Produkt **84** identifiziert, aber nicht aufgereinigt werden.

Als letzte Derivatisierungsvariante wurde eine reduktive Aminierung an der Aminogruppe des Chromengerüsts versucht. Eine Variante der Reaktionsführung mit 3,4-Dimethoxybenzaldehyd oder 5-Methylfural in trockenem Methanol mit anschließender Zugabe von Natriumcyanoborhydrid führte jedoch nicht zum gewünschten Produkt. Der Versuch der Umsetzung des Amins **70** mit 4-Brombenzaldehyd in Ethanol mit anschließender Zugabe von Natriumcyanoborhydrid oder Natriumborhydrid führte leider auch nicht zur Bildung des Zielproduktes, obwohl das Startmaterial komplett umgesetzt wurde. In einer letzten Variante nach Sato *et al.* wurde 3,4-Dimethoxybenzaldehyd mit dem entsprechenden Amin **70** in Gegenwart von α -Picolin-Boran als Reduktionsmittel in Ethanol/Essigsäure (10/1) umgesetzt.^[126] Nach 3 h wurde die Reaktion aufgearbeitet. Das Zielprodukt konnte massenspektrometrisch nachgewiesen werden und auch das NMR des Rohproduktes legte nahe, dass das gewünschte Produkt entstanden war. Allerdings ließ sich das Zielprodukt weder durch Umkristallisieren noch durch Säulenchromatographie aufreinigen.

Mit den zur Verfügung stehenden Derivaten des identifizierten LSD1-Inhibitors wurden im Folgenden LSD1-Inhibitionsversuche durchgeführt. Diese biochemische Analyse ergab, dass bis auf das Amin **70** alle Substanzen **71** bis **82** einen IC_{50} -Wert von größer als 200 μ M aufwiesen und somit als inaktiv erachtet wurden. Das Amin **70** wies im LSD1 Test einen IC_{50} -Wert von 50 μ M auf. Sowohl in fluoreszenzbasierten MAO A- und -B-Inhibitionsversuchen mit Kynuramin als Substrat, als auch im indirekten HRP-MAO A- und MAO B-Test erwies sich das Amin **70** als inaktiv (IC_{50} -Wert > 200 μ M). Allerdings stellte sich in massenspektroskopischen Untersuchungen heraus, dass das Amin die Demethylierung des H3K4me2-Peptids nicht unterbinden konnte. So wurde die Nitroverbindung **68** auch für weiterführende Zell- und Mausversuche verwendet. Allerdings sind bei diesen Versuchen stets Kontrollen durchzuführen, die nachweisen, dass es sich bei den beobachteten Effekten um eine reine LSD1-spezifische Hemmung handelt und die Beobachtungen nicht auf die leichte MAO A-Hemmung zurückzuführen ist. Die geplanten Zell- und Mausversuche werden von den Arbeitsgruppen von Prof. Dr. R. Bütnner und Prof. Dr. Schüle durchgeführt.

5.5 Zusammenfassung und Ausblick zu den LSD1 Versuchen

Zur Identifikation neuer, nicht-kovalent-bindender Inhibitoren für die Lysin-spezifische Demethylase LSD1 wurde der „Protein Structure Similarity Clustering“ (PSSC)-Ansatz verwendet. Dr. S. Wetzel identifizierte LSD1 sowie MAO A und MAO B in einer Gruppe strukturell ähnlicher Proteine und führte die Überlagerungen der Bindungsstellen der drei Proteine durch. Es wurde festgestellt, dass die Zielproteine eine geringe Sequenz-Ähnlichkeit, dafür aber eine hohe Ähnlichkeit in der dreidimensionalen Struktur besitzen.

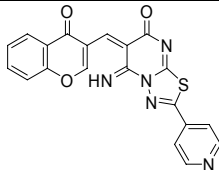
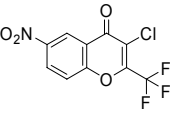
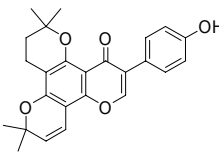
Gemäß dem PSSC-Ansatz sollten Inhibitoren der MAO A und B-Enzyme auch mit erhöhter Wahrscheinlichkeit Inhibitoren des LSD1-Proteins sein. Deshalb könnte eine Analyse der 500 γ -Pyrone umfassenden Substanzbibliothek, in welcher eine Vielzahl an MAO A und B-Inhibitoren enthalten sind, zu neuartigen, nicht-kovalenten LSD1-Inhibitoren führen.

In Zusammenarbeit mit den Arbeitsgruppen um Prof. Dr. R. Büttner und Prof. Dr. R. Schüle wurde die Substanzkollektion in einem HRP-basierten LSD1-Assay getestet. Ein anschließendes massenspektrometrisches Kontrollexperiment identifizierte drei der im vorigen Assay gefunden Hits als LSD1-Hemmer, für die IC_{50} -Werte zwischen 16 und 50 μ M bestimmt wurden (Tabelle 16). Dabei erwiesen sich Verbindung **67** und **69** als selektive LSD1-Inhibitoren, wohingegen die Verbindung **68** auch MAO A inhibierte. Im massenspektrometrischen Validierungsassay zeigte Verbindung **68** die stärkste Hemmung der LSD1-vermittelten Demethylierung des H3K4me2-Modellpeptides.

Somit konnte mittels eines orthogonalen Kontrollexperimentes die Identifizierung der drei ersten nicht-kovalenten LSD1-Inhibitoren bestätigt werden.

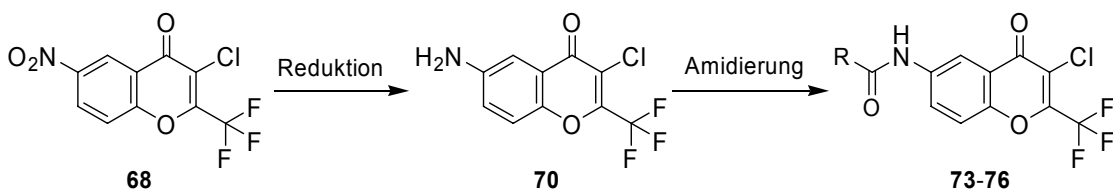
5. Spezieller Teil – Pyrone II

Tabelle 16: Validierte nicht-kovalente LSD1-Inhibitoren.

| Nr | IC ₅₀ LSD1 [μM] | IC ₅₀ MAO A [μM] | IC ₅₀ MAO B [μM] |
|--|-------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|
|  67 | 52 | > 50 | > 50 |
|  68 | 42 | 40 ± 10 | > 50 |
|  69 | 16 | > 50 | > 50 |

Weiterhin wurden die für einen Einsatz in Zell- und Mausversuchen wichtigen Eigenschaften wie molekulare Löslichkeit und Zellpermeabilität bestimmt. Dabei zeigte sich, dass auf Grund der gemessenen Parameter insbesondere die Verbindung **68** für einen weiteren Einsatz in *in vivo*-Experimenten geeignet erscheint.

Diese Verbindung **68** wurde weitergehend derivatisiert, um die Selektivität gegenüber den beiden MAO-Isoformen zu erhöhen.

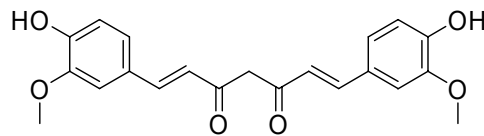


Schema 23: Derivatisierung von **68**.

Durch Zusammenstellen einer vierzehn Substanzen umfassenden fokussierten Substanzkollektion konnten allerdings keine potenteren oder selektiveren Verbindungen identifiziert werden. Das Substitutionmuster von Verbindung **68** (NO₂-, Cl- und -CF₃-Gruppe) scheint somit für die Inhibition von LSD1 unabdingbar zu sein.

Verbindung **68** wurde als neuer, nicht-kovalenter LSD1-Inhibitor für weiterführende Zell- und Mausversuche ausgewählt, die in Zukunft von den Arbeitsgruppen um Prof. Dr. R. Büttner und Prof. Dr. Schüle durchgeführt werden.

Ausblickend lässt sich festhalten, dass es sich für die weitergehende Suche nach neuen Leitstrukturen anbietet, bekannte MAO-Inhibitoren auf ihr LSD1-Hemmpotential zu untersuchen und diese dann in einen zweiten Schritt mit Hilfe von Kristallstrukturen und Computer-gestützten Verfahren für LSD1 zu optimieren. Erste Versuche haben so zum Beispiel gezeigt, dass der MAO A-Inhibitor Curcumin **85** einen erfolgversprechenden Startpunkt darstellen könnte (Abbildung 25).



Curcumin

85

$IC_{50}(\text{LSD1}) = 7 \mu\text{M}$

Abbildung 25: Curcumin **85** als mögliche neue Leitstrukturen zur Hemmung von LSD1.

6. Spezieller Teil – Macroline

6.1 Macroline als Inhibitoren der MptpB-Phosphatase des *Mycobacterium tuberculosis*

Das BIOS-Konzept wurde bislang mehrfach als Entscheidungshilfe zur Entwicklung fokussierter Substanzbibliotheken um biologisch prävalidierte Startpunkte verwendet. So wurden insbesondere aufbauend auf dem SCONP-Konzept zum Beispiel innerhalb einer [5.5]Spiroketal-Bibliothek Inhibitoren der dual-spezifischen Phosphatase VHR gefunden^[27], auch α,β -ungesättigte δ -Lactone erwiesen sich unter anderem als Modulatoren des Zellzyklus.^[28] Indomethacin-Derivate stellten eine neue Gruppe an Kinaseinhibitoren dar.^[33] Auf der Suche nach weiteren Beispielen für dieses neue Synthese-Konzept wurde in diesem Teil der Arbeit die Biologie-orientierte Synthese (BIOS) von Analoga der Indolalkaloide als Inhibitoren der MptpB-Phosphatase bearbeitet.^[15,127]

Hierzu wurde das BIOS-Konzept auf Macroline angewendet. Diese Substanzklasse umfasst mehr als 100 Indolalkaloide mit unterschiedlichsten biologischen Aktivitäten und zeichnet sich durch ein tetrazyklisches Cycloocta[b]indolgrundgerüst aus. Das Potential des BIOS-Konzepts kann sich in diesem Fall besonders zeigen, da von einer vergleichende Analyse der biologischen Aktivitäten von Derivaten basierend auf einem tetrazyklischen Cycloocta[b]indolmotiv noch nicht berichtet wurde.

Als Zielproteine wurden in diesem Fall Enzyme ausgewählt, die in der Bekämpfung der Krankheitserreger der Lungentuberkulose eine Rolle spielen. *Mycobacterium tuberculosis* sekretiert die beiden Proteintyrosinphosphatasen MptpA und MptpB. Beide Proteine dephosphorylieren selektiv Proteine der menschlichen Interferon- γ -Signalkaskade, wodurch eine Unterdrückung der Wirtsabwehr bewirkt wird.^[128,129,130] Ein neuartiger Ansatz zur Entwicklung selektiver Antibiotika gegen dieses schwerwiegende Pathogen könnte die Hemmung dieser Enzyme darstellen.^[131,132,133]

Insbesondere neu-aufgetretene Antibiotika-resistente Stämme des *Mycobacterium tuberculosis* verdeutlichen den Bedarf an neuartigen Chemotherapeutika.

Waldmann *et al.* publizierten 2006 die ersten Inhibitoren der MptpB-Phosphatase. Der hier exemplarisch gezeigte Inhibitor (**86**) wurde ebenfalls nach den Kriterien der Biologie-orientierten Synthese identifiziert und weist einen IC_{50} -Wert von $1.13 \pm 0.63 \mu\text{M}$ auf.^[15] Von den gleichen Autoren wurden in Zusammenarbeit mit Weide *et al.* etwa zur gleichen Zeit 3-substituierte Indolizin-1-carbonitrile als MptpB Inhibitoren erforscht (**87**), deren inhibitorische Wirkung etwa in der gleichen Größenordnung liegt ($IC_{50} = 7.5 \pm 1.9 \mu\text{M}$).^[134] Eine weitere Substanzklasse, die MptpB inhibiert, wurde von Beresford *et al.* untersucht (**88**), wobei der gemessene K_i dieser Verbindung bei $1.5 \mu\text{M}$ liegt.^[135]

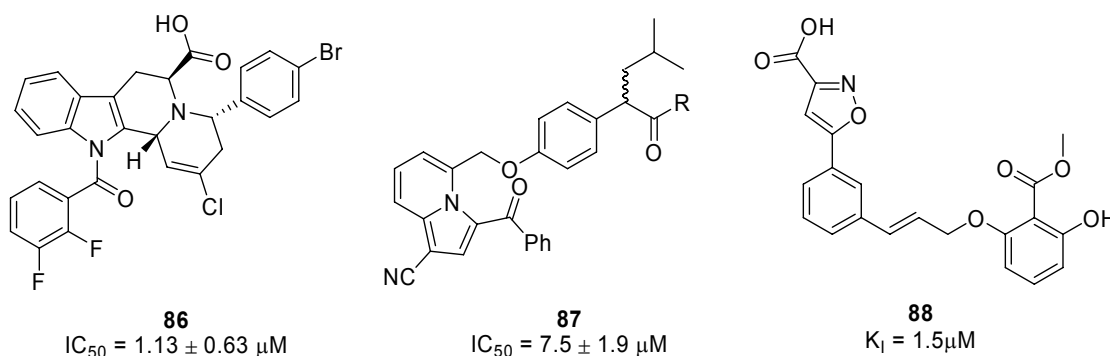
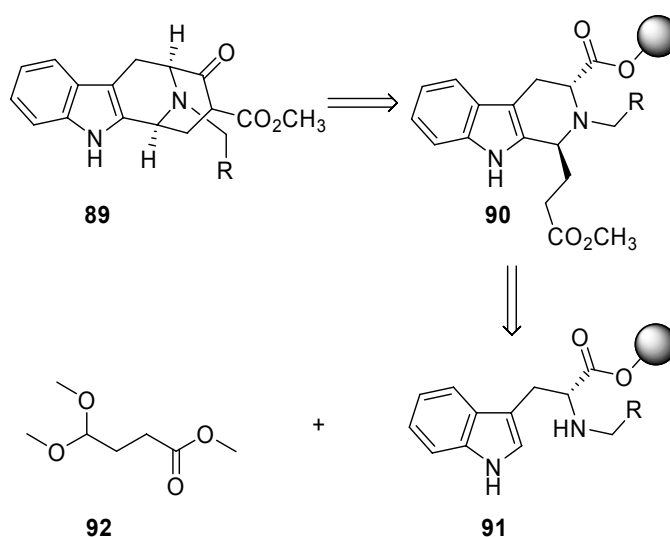


Abbildung 26: Inhibitoren der Proteintyrosinphosphatase MptpB.

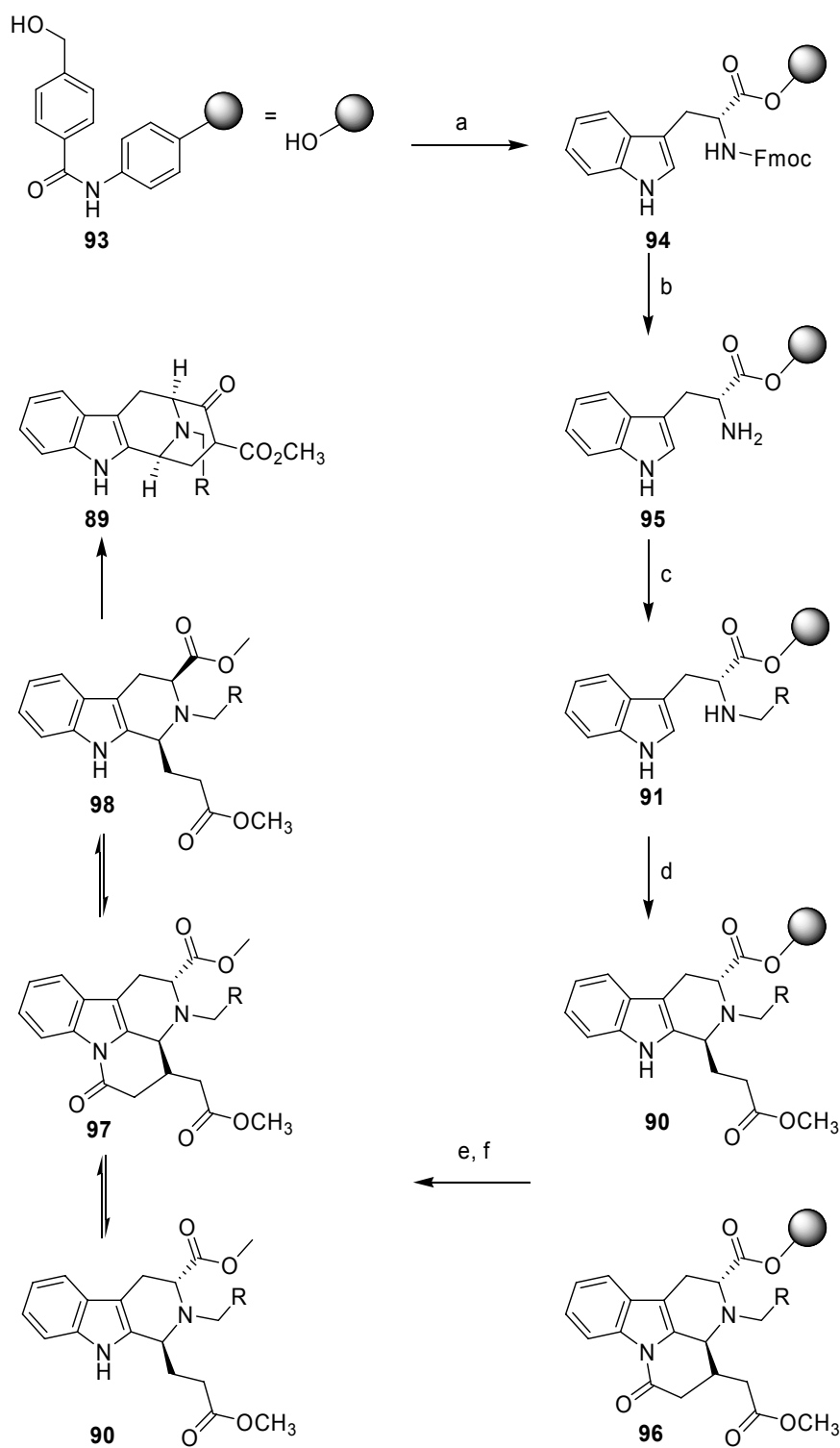
6.2 Synthese einer Macrolinbibliothek

Aufbauend auf den Arbeiten von Dr. A. Nören-Müller wurden weitere Untersuchungen an β -Ketoesterderivaten der Cycloocta[*b*]indole (**89**) vorgenommen. Diese Verbindungen können über *trans*-konfigurierte Diester **90** in einer Eintopfreaktion durch regioselektive Epimerisierung und Dieckmann-Zyklisierung hergestellt werden.^[136,137,138,139,140] Die erhaltenen Intermediate **90** können über eine asymmetrische Pictet-Spengler-Reaktion immobilisierter sekundärer Amine **91** synthetisiert werden, welche wiederum durch reduktive Aminierung zugänglich sind (Schema 24). Der Aufbau der Macroline beinhaltet somit zwei herausfordernde asymmetrische Transformationen während der Bibliothekssynthese.^[4,141,142]



Schema 24: Retrosynthese zur Bildung von β -Ketoesterderivaten der Cycloocta[*b*]indole (**89**).

Es wurde ein basenlabiler HMBA-(Hydroxymethylbenzoesäure)-Anker zur Festphasensynthese ausgewählt, da die enantioselektive Pictet-Spengler-Zyklisierung unter sauren Reaktionsbedingungen abläuft. Auch ermöglicht dieser Ansatz eine Abspaltung vom polymeren Träger zusammen mit der anschließenden Dieckmann-Zyklisierung in einer Eintopfreaktion. Analog zu den in Schema 24 gezeigten Derivaten, die ausgehend von (D)-Tryptophan hergestellt wurden, konnte die Synthese auch mit (L)-Tryptophan zu den entsprechenden Macrolin-Enantiomeren durchgeführt werden.



Schema 25: Festphasensynthese der Cycloocta[b]indole. a) 2,6-Dichlorobenzoylchlorid (8 Äq.), Pyridin (12 Äq.), (L)- or (D)-Tryptophan (4 Äq.); b) 20% Piperidin in DMF, RT, zweimal für 10 min; c) i) R-CHO (5 Äq.), HC(OMe)₃/DCM (1/1), rt, 12 h; ii) Na(CN)BH₃ (5 Äq.), 20% HOAc in THF, 0 °C, über Nacht; d) i) 15% TFA in DCM, RT, zweimal für 5 min; ii) Methyl-4,4-dimethoxybutanoat (**92**, 10 Äq.), 15% TFA in DCM, rt, 3 d; e) i) 15% TEA in DCM, RT, zweimal für 5 min; ii) 1 M NaOMe in MeOH/Dioxan (1/1), 50 °C, über Nacht; f) NaOMe (35 Äq.), MeOH/Toluol (1:9), Reflux, 3 d; 12-75% Ausbeute; g) NaBH₄ (2 Äq.) in EtOH, -60 °C bei RT, über Nacht, 71-92% Ausbeute; h) 15% TFA in H₂O/Acetonitril (1/1), RT, über Nacht, 75-81% Ausbeute.

So wurde das mit (D)- oder (L)-Tryptophan beladene HMBA-Harz **93** zunächst entschützt und dann in einer zweistufigen reduktiven Aminierung zu den sekundären Aminen **91** umgesetzt. Unter sauren Bedingungen wurde die anschließende Pictet-Spengler-Reaktion mit Methyl-4,4-dimethoxybutyrat (**92**) durchgeführt, sodass die gewünschten 1,3-*trans*-Isomere **90/96** entweder als β -Carboline oder als entsprechende δ -Lactame entstanden. Die gewünschten *cis*- β -Ketoester **89** konnten durch Abspaltung vom Trägerharz, regioselektive Epimerisierung über ein Lactam-Intermediat und anschließende Dieckmann-Zyklisierung mittels Natriummethylat erhalten werden. Die zugrunde liegende Lösungssynthese wurde bereits ausgiebig zum Beispiel von Yu *et al.* studiert, die Modelluntersuchungen durchführten und feststellten, dass eine Spiroindolenin-Zwischenstufe und eine intramolekulare Umlagerung als Ursache für die beobachtete Stereoselektivität in Frage kommen könnten.^[137] Um die Enantiomerenreinheit unserer Produkte zu prüfen, wurde in Zusammenarbeit mit Dr. A. Nören-Müller die Verbindung **89a** hergestellt. NMR-spektroskopische Untersuchungen und der Vergleich der optischen Rotation von **89a** mit Literaturwerten ($[\alpha]_D^{22} = -177^\circ$ ($c = 1 \text{ g dL}^{-1}$, CHCl_3), $[\alpha]_D^{22} = -177,4^\circ$) zeigte eine Übereinstimmung der Daten.^[137]

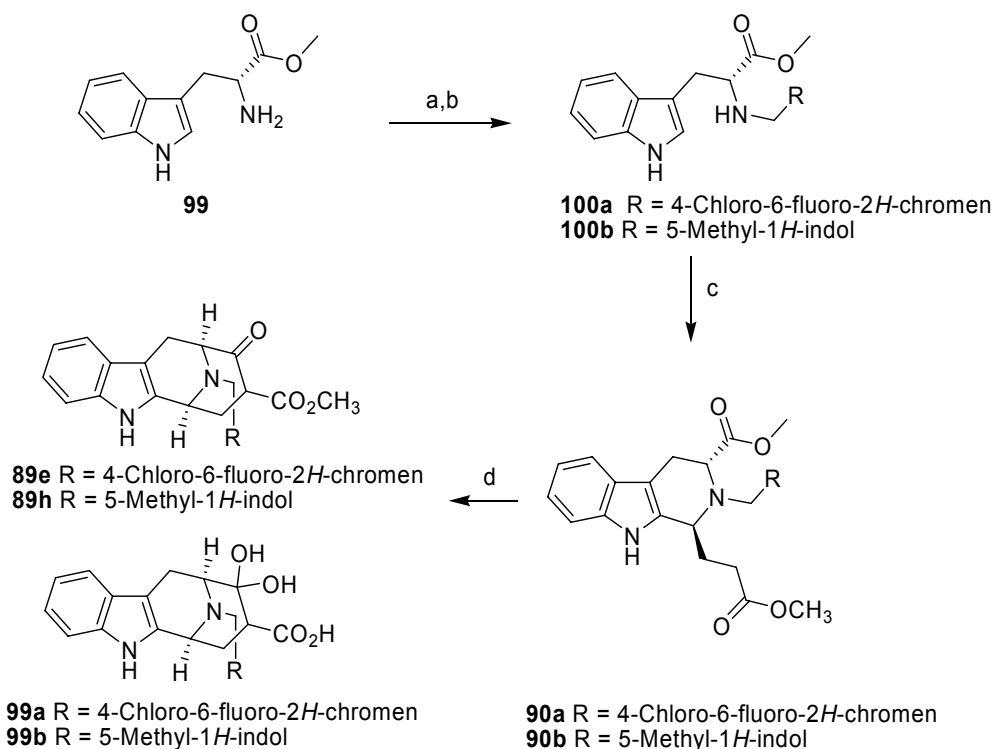
Die beschriebene 6-stufige Sequenz ermöglicht, wie schon von Dr. A. Nören-Müller gezeigt, die Synthese von β -Ketoester wie zum Beispiel **89a** in 12-61% Gesamtausbeute nach HPLC-Reinigung. Die Kombination von (D)- und (L)-Tryptophan mit unterschiedlich-substituierten aromatischen, heteroaromatischen und allylischen Aldehyden ermöglichte die Herstellung einer diversen isomerenreinen tetrazyklischen Alkaloid-abgeleiteten Substanzbibliothek in einer Reinheit >90% (HPLC). Tabelle 17 zeigt eine Übersicht von Verbindungen, die im Rahmen dieser Arbeit hergestellt wurden.^[35,36]

6. Spezieller Teil – Macroline

Tabelle 17: Ausbeuten ausgewählter Cycloocta[*b*]indole.

| Eintrag (Nr.) | Struktur | Ausbeute [%] | Eintrag (Nr.) | Struktur | Ausbeute [%] |
|-------------------|----------|-----------------|--------------------|----------|-----------------|
| 1 (89a) | | 56 | 6 (89f) | | 49 |
| 2 (89b) | | 61 | 7 (89g) | | 43 |
| 3 (89c) | | 54 | 8 (89h) | | 21 |
| 4 (89d) | | 55 | 9 (89k) | | 46 |
| 5 (89e) | | 30 | 10 (89l) | | 13 |

In einem weiteren Schritt sollte versucht werden, die Verbindung **89h** und ein Analogon (**89m**) der Verbindung **89l** in Lösung herzustellen. Die Verbindungen **89h** und **57l** konnten bei der durchgeführten Festphasensynthese nur in einer Ausbeute von 21% beziehungsweise 13% gewonnen werden. Deshalb sollte eine Lösungssynthese etabliert werden, um eine größere Menge der Verbindung (mindestens 100 mg) für weitergehende Studien zu erhalten. Es wurden die Vorschriften von Yu *et al.* befolgt, deren Synthese Grundlage zur Etablierung der Festphasensynthese war (Schema 26).^[137]



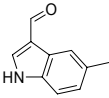
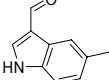
Schema 26: Versuch der Synthese der Verbindungen **89e** und **89h**: a) R-CHO, MeOH, 12 h; b) Na(CN)BH₃, 0 °C, über Nacht; c) Methyl-4,4-dimethoxybutanoat, 15% TFA in DCM, RT, 1 d; d) NaOMe MeOH/Toluol (1/9), Reflux, 1 d.

Das Startmaterial **99** wurde gewonnen, indem das entsprechende Hydrochlorid mit Triethylamin ausgeschüttelt wurde, um aus dem Salz das freie Amin und somit das bessere Nukleophil zu erhalten. Die Derivatisierung des Tryptophanmethylesterbausteins (**99**) erfolgte analog zur oben beschriebenen Festphasensynthese über eine reduktive Aminierung. Die Umsetzung mit 4-Chloro-6-fluoro-2*H*-chromen-3-carbaldehyd und 5-Methyl-1*H*-indol in Methanol führte zur intermediären Bildung eines Imins. Dieses konnte in Folge mit Natriumcyanoborhydrid zu den sekundären Aminen reduziert werden (**100a** und **100b**).

Allerdings zeigte sich, dass für die gewünschten Verbindungen nur geringe Ausbeuten erzielt werden konnten. Bei der Umsetzung mit 5-Methyl-1*H*-indol-3-carbaldehyd konnte das sekundäre Amin (**100b**) lediglich mit einer Ausbeute von 17% Ausbeute erhalten werden. Ein Vergleichsexperiment, bei dem das unbehandelte Tryptophanmethylesterhydrochlorid eingesetzt wurde, lieferte das Intermediat (**100b**)

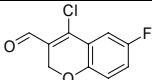
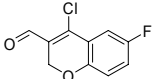
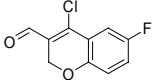
in 45% Ausbeute. Demzufolge ist der Verlust infolge der Extraktion so hoch, dass sich die Ausbeute dabei um mehr als die Hälfte verringert (Tabelle 18).

Tabelle 18: Vorbehandlung des Trp-Methylester-hydrochlorids.

| Aldehyd | Anteil Aldehyd | Trp-Methylester-hydrochlorid | Ausbeute |
|---|----------------|------------------------------|----------|
|  | 1.15 Äq. | keine Extraktion | 45% |
|  | 1.15 Äq. | Extraktion | 17% |

Auch Cook *et al* haben die Optimierung der reduktiven Aminierung untersucht und Synthesebeispiele veröffentlicht, bei denen Orthoameisensäuremethylester zugefügt wurde.^[136,137,138,139,140] Dieser hat die Funktion, mit bei der Reaktion entstehendem Wasser zu Ameisensäure und Methanol zu reagieren. Wasser wird somit der Reaktion entzogen, so dass das Reaktionsgleichgewicht der Reaktion zur Produktseite verschoben wird. Die Reaktion wurde mit 4-Chloro-6-fluoro-2*H*-chromen-3-carbaldehyd als Aldehyd optimiert. (Tabelle 19).

Tabelle 19: Optimierung des Orthoesteranteils.

| Aldehyd | Anteil Aldehyd | Anteil CH(OMe) ₃ | Ausbeute |
|---|----------------|-----------------------------|----------|
|  | 2.0 äq. | 0 äq. | 23% |
|  | 2.0 äq. | 1.0 äq. | 38% |
|  | 2.0 äq. | 4.0 äq. | 33% |

Der Tabelle 19 ist zu entnehmen, dass der Zusatz von einem Äquivalent Orthoameisensäuremethylester zu einer Ausbeutesteigerung von 15% für **100a** führt. Dennoch bleibt die Ausbeute mit 38% gering. Dies kann mit der sterischen Hinderung der beiden großen Reaktionspartner erklärt werden. In diesem Zusammenhang ist

anzumerken, dass sich Cook *et al.* bei der Etablierung der Synthese stets auf sterisch weniger anspruchsvolle Aldehyde konzentriert haben.^[136,137,138,139,140]

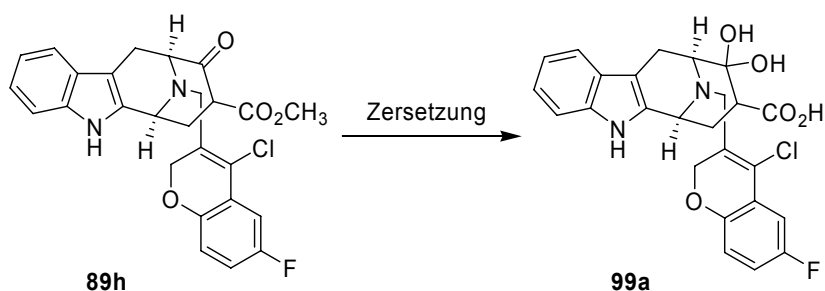
Zur Durchführung der Pictet-Spengler-Reaktion in Lösung wurden die Verbindungen **100a** und **100b** mit Methyl-4,4-dimethoxybutanoat in Dichlormethan umgesetzt. Das Acetal Methyl-4,4-dimethoxybutanoat **92** fungierte genauso wie bei der Festphasensynthese als Aldehyd-Analogon. Mechanistische Studien von Cook *et al* ergaben, dass ein TFA-Anteil von 15% zum thermodynamisch stabileren *trans*-Isomer führt.^[136,137,138,139,140] Das 1,2,3,4-Tetrahydro- β -carbolin **90a** konnte in einer Ausbeute von 97% gewonnen werden. Die Verbindung **90b** ließ sich unter gleichen Bedingungen nicht synthetisieren. Um eine Zersetzung des Produktes durch den hohen TFA-Anteil auszuschließen, wurde die Säure nur in einer Menge von 2.5 Äquivalenten eingesetzt. Unter diesen Bedingungen konnte die Verbindung **90b** zwar massenspektroskopisch identifiziert werden, allerdings konnten die geringen Anteile dieser Substanz nicht isoliert werden.

Mit der isolierten Verbindung **90a** wurde versucht, das Zielprodukt **89h** herzustellen. Analog zu den Versuchen von Cook *et al.* wurden das Startmaterial und Natriummethanolat in Methanol und Toluol (im Verhältnis 1/9) für einen Tag refluxiert.^[136,137,138,139,140] Die Reaktion wurde bei verschiedenen Temperaturen, Reaktionszeiten und unter Zusatz von Molsieb durchgeführt, ohne dass das Zielprodukt isoliert werden konnte.

Tabelle 20: Versuche zur Synthese von **89h** in Lösung.

| Temperatur | Reaktionszeit | Zusätze | Ergebnis |
|------------|---------------|-------------|----------------|
| 100 °C | 16 h | – | Produktgemisch |
| 80 °C | 16 h | – | Produktgemisch |
| 100 °C | 8 h | – | Produktgemisch |
| 100 °C | 16 h | Molsieb 4 Å | Produktgemisch |

Die massenspektrometrische Analyse ergab, dass eines der entstehenden Produkte eine um 4 g/mol erhöhte Molekülmasse aufwies (484 g/mol statt 480 g/mol). Ein hoch aufgelöstes Massenspektrum zeigte, dass diese Zunahme mit der Verseifung des Methylester zur korrespondierenden Säure (-14 g/mol) sowie der Addition von Wasser (+18 g/mol) an die Ketogruppe zu erklären ist.



Schema 27: *In situ* Zersetzung des Zielproduktes **89h**.

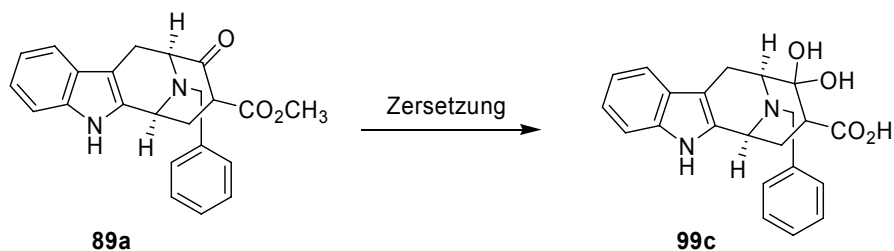
Dieser Zersetzungsprozess ließ sich nicht durch Ausschluss von Wasser durch Ausheizen der Apparatur, Argon-Atmosphäre, frisch getrocknete Lösungsmittel und frisch hergestelltes Natriummethanolat verhindern. Wurde mit den gleichen Materialien die Festphasensynthese durchgeführt, erbrachte dies das gewünschte Zielprodukt.

Beim Einsatz sterisch anspruchsvoller Aldehyde führt somit lediglich die Festphasensynthese zu dem gewünschten Produkt. Dies ist womöglich mit anderen Konzentrationen der Reaktanden bei Festphasensynthesen zu erklären.

Um die Lagerfähigkeit der Cycloocta[b]indole zu prüfen, wurde von der Verbindung **89a** eine 10 mM Lösung in DMSO hergestellt und für zwei Monate bei 4 °C gelagert – eine Lagerbedingung, die das Auf- und Abtauen von Substanzproben der Macroline simulieren soll. Es wurden zwischen ein und drei Monaten massenspektrometrische Untersuchungen durchgeführt, die ergaben, dass ab dem dritten Monat eine Zersetzung der Probe eintrat. Weitergehende Analysen ergaben, dass **89a** in Gegenwart von DMSO, Wasser und Luftsauerstoff zu der Verbindung **90** umgewandelt wird (Schema 27). Diese Umwandlung ist genauso wie beim Versuch der Lösungssynthese von **89h** massenspektrometrische durch die Zunahme der

6. Spezieller Teil – Macroline

Molekülmasse um 4 g/mol zu erkennen. Diese Zunahme entspricht der Verseifung des Methylresters zur korrespondierenden Säure (-14 g/mol) sowie der Addition von Wasser (+18 g/mol) an die Ketogruppe. Bei folgenden biochemischen Untersuchungen der Macrolin-Substanzbibliothek musste somit zuvor untersucht werden, ob die Verbindungen noch nicht degradiert waren.



Schema 28: Nach mehr als zwei Monaten Lagerung der Verbindung **89a** in DMSO bei 4 °C bemerkbarer Zersetzungsprozess zur hydrolysierten Verbindung **99c**.

6.3 Experimente zur Inhibition von Phosphatasen

Die zusammengestellte Cycloocta[*b*]indole Substanzbibliothek wurde in Zusammenarbeit mit der Arbeitseinheit um Dr. H. Prinz und Dr. A. Nören-Müller auf ihr Hemmpotential in Enzymassays mit den Tyrosinphosphatasen MptpA, MptpB, VE-PTP, PTP1B und TC-PTPN2 als auch der dual-spezifischen Phosphatase Cdc25A evaluiert. Hierbei wurden Verbindungen mit einem IC₅₀-Wert von < 10 µM als aktiv eingestuft. Die vom Autor nachsynthetisierten aktiven Verbindungen werden in Tabelle 17 aufgezeigt.^[35]

Es wurden mehrere potente Inhibitoren der Tyrosinphosphatase MptpB mit IC₅₀-Werten im unteren mikromolaren Bereich identifiziert (Tabelle 22).

Es fiel auf, dass die Verbindungen **89h** und **89j** MptpB selektiv mit IC₅₀-Werten von 7.04 ± 0.99 und 9.64 ± 0.93 µM inhibierten, ohne dabei andere Phosphatasen bis zu einer Konzentration von 100 µM zu hemmen (Tabelle 22). Eine vergleichbare Selektivität wurde bei der Verbindung **89i** beobachtet, die MptpB mit einem IC₅₀-Wert von 8.26 ± 4.57 µM inhibierte (Tabelle 22). Als der potenteste MptpB-Inhibitor in der Bibliothek wurde das Macrolinderivat **89e** mit einem IC₅₀-Wert von 4.71 ± 1.14 µM und einer mindestens 15-fachen Selektivität gegen PTP1B und VE-PTP und keinerlei Hemmung von MptpA, TC-PTPN2 sowie Cdc25A bis zu einer Konzentration von 100 µM identifiziert. Neben MptpB-Inhibitoren wurden auch noch zwei pharmazeutisch relevante nicht-saure Inhibitoren der PTP1B-Phosphatase mit IC₅₀-Werten von 8.90 ± 0.80 und 11.9 ± 1.9 µM (**89k** und **89g**, Tabelle 22) gefunden.^[143,144]

Zur Erstellung eines Struktur-Wirkungsprofils werden zusätzlich in Tabelle 21 von Dr. A. Nören-Müller synthetisierte und getestete exemplarische Verbindungen gezeigt. Eine Auswertung der Inhibitionsprofile aller Macrolinderivate legte nahe, dass die (*S*)-Konfiguration an den Positionen C-6 und C-10 essentiell für die Hemmung ist, da sämtliche von Dr. A. Nören-Müller hergestellten (*R*)-Enantiomere komplett inaktiv

6. Spezieller Teil – Macroline

waren. Ebenso hob eine Reduktion der β -Ketogruppe die biochemische Aktivität der MptpB-Hemmung vollständig auf.

Tabelle 21: Exemplarische von Dr. A. Nören-Müller synthetisierte biochemisch inaktive Macroline mit reduzierter β -Ketogruppe oder (*R*)-Konfiguration.^[35,145]

| Eintrag (Nr.) | Verbindung | IC ₅₀ [μ M] | | | | | |
|------------------|------------|-----------------------------|-------|-------|----------|--------|--------|
| | | MptpA | MptpB | PTP1B | TC-PTPN2 | VE-PTP | Cdc25A |
| 1 (89m) | | >100 | >100 | >100 | >100 | >100 | >100 |
| 2 (89n) | | >100 | >100 | >100 | >100 | >100 | >100 |
| 3 (89o) | | >100 | >100 | >100 | >100 | >100 | >100 |
| 4 (89p) | | >100 | >100 | >100 | >100 | >100 | >100 |

Der Einfluß der *N*-benzylischen Reste auf die MptpB-Hemmung lässt sich nur schwer quantifizieren. Aromatische Systeme, die ein Sauerstoffatom umfassen, scheinen bevorzugt zu sein. (89e-h und 89j, Tabelle 22). Auch Benzylreste mit einer *meta,para*-Disubstitution von elektronenziehenden Gruppen zeigen potente Inhibitionswerte. (89i,k, Tabelle 22) Die beschriebene Strukturwirkungsbeziehung der Macrolinderivate wird für die MptpB Hemmung in Abbildung 27 verdeutlicht.

S-Konfiguration in Position 6 und 10 essentiell

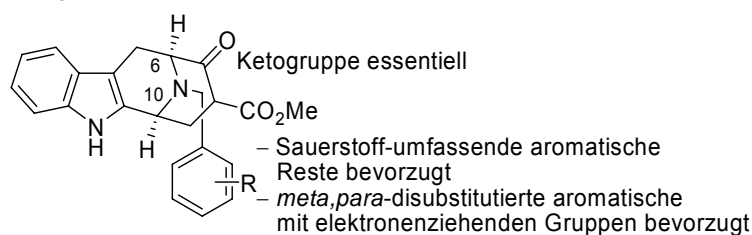
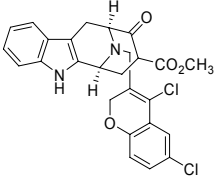
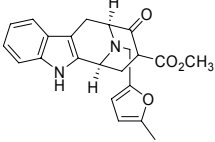
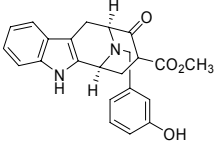
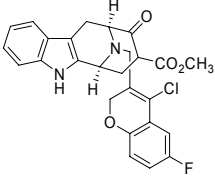
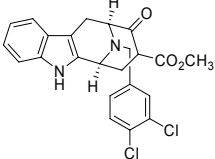
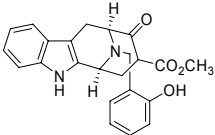
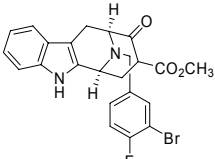
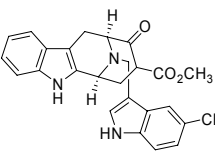


Abbildung 27: Strukturwirkungsbeziehung der Macrolinderivate für die MptpB-Hemmung.

6. Spezieller Teil – Macroline

Tabelle 22: Beispiele für durch biochemische Tests identifizierte MptpB-Inhibitoren.^[a]

| Eintrag (Nr.) | Verbindung | IC ₅₀ [µM] | | | | | |
|------------------|---|-----------------------|-------|-------|----------|--------|--------|
| | | MptpA | MptpB | PTP1B | TC-PTPN2 | VE-PTP | Cdc25A |
| 1 (89e) |  | >100 | 4.71 | 84.2 | >100 | 73.2 | >100 |
| | | | ± | ± | ± | ± | ± |
| 2 (89f) |  | >100 | 5.95 | 34.2 | >100 | 68.3 | >100 |
| | | | ± | ± | ± | ± | ± |
| 3 (89g) |  | >100 | 6.10 | 11.9 | 9.88 | 31.8 | 85.4 |
| | | | ± | ± | ± | ± | ± |
| 4 (89h) |  | >100 | 7.04 | >100 | >100 | >100 | >100 |
| | | | ± | ± | ± | ± | ± |
| 5 (89i) |  | >100 | 8.26 | >100 | >100 | >100 | 97.2 |
| | | | ± | ± | ± | ± | ± |
| 6 (89j) |  | >100 | 9.64 | >100 | >100 | >100 | >100 |
| | | | ± | ± | ± | ± | ± |
| 7 (89k) |  | >100 | 10.7 | 63.2 | >100 | 32.0 | >100 |
| | | | ± | ± | ± | ± | ± |
| 8 (89l) |  | >100 | 11.6 | 8.90 | 11.3 | 30.2 | >100 |
| | | | ± | ± | ± | ± | ± |

[a] Die Dephosphorylierung von pNPP wurde über die Änderung der Absorption bei 405 nm bestimmt. Angegeben wurde die Konzentration (µM) der Inhibitoren, bei welcher eine Enzymaktivitätsreduktion von 50% auftrat. Die Werte wurden aus mindestens drei unabhängigen Messungen bestimmt.

6.4 Lineweaver-Burk-Analyse

Zur Analyse des MptpB-Inhibitionsmodus wurde eine Lineweaver-Burk-Analyse mit Verbindung **89h** durchgeführt. Es bot sich an, diesen Phosphatase-Inhibitor auszuwählen, da es die potenteste selektiv MptpB inhibierende Substanz war.

Hierzu wurde zunächst der IC_{50} -Wert der Verbindung **89h** für die zur Verfügung stehende Proteincharge bestimmt. Der IC_{50} -Wert betrug $32.4 \mu\text{M}$ und wich somit innerhalb des üblichen Toleranzbereiches um den Faktor vier von dem zuvor bestimmten Inhibitionswert ab. Bei vier verschiedenen Inhibitorkonzentrationen (kein Inhibitor, zweifache IC_{50} -Konzentration, IC_{50} -Konzentration und halbe IC_{50} -Konzentration) wurden nun Kinetiken durch Variation der Substratmenge gemessen. Die so erhaltenen Werte wurden zunächst durch nicht-lineare Kurvenanpassung analysiert (Abbildung 28).

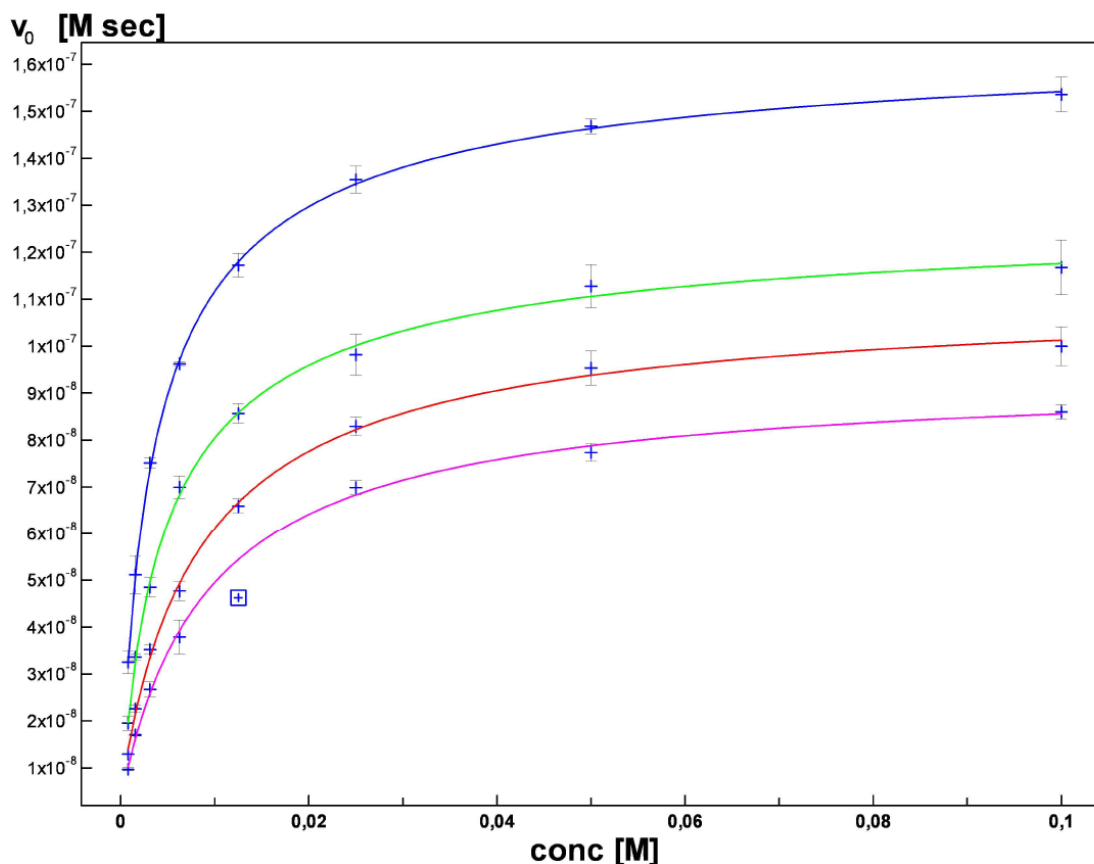


Abbildung 28: Nicht-lineare Kurvenanpassung der substratabhängigen Kinetikmessreihen.

Zur Analyse der Daten wurden zunächst Kurvenanpassungen mittels Microsoft Excel und IDBS Xlfit durchgeführt. Das verwendete Programm ermittelte für K_M und v_{max^*} bei den vier verschiedenen Inhibitor-Konzentrationen die in Tabelle 23 aufgeführten Parameter.

Tabelle 23: Parameter für K_M und v_{max^*} bei verschiedenen Konzentrationen und nicht-lineare Kurvenanpassung.

| Konzentration | K_M [mM] | v_{max^*} [M/sec] |
|---------------|------------|---------------------|
| kein I | 3.69 | $1.7 \cdot 10^{-7}$ |
| 1/2 IC_{50} | 4.80 | $1.3 \cdot 10^{-7}$ |
| IC_{50} | 8.62 | $1.1 \cdot 10^{-7}$ |
| 2 IC_{50} | 9.54 | $9.1 \cdot 10^{-8}$ |

Neben der nicht-linearen Kurvenanpassung wurde ein Linearisierungsverfahren zur graphischen Bestimmung der Michaelis-Menten-Kinetik-Parameter K_M und v_{max} angewandt. Die Lineweaver-Burk-Datenanalyse hat gerade in der Datenpräsentation Vorteile. Allerdings müssen die Daten mit nichtlinearen Kurvenanpassungen abgeglichen werden, da auch die doppelt-reziproke Lineweaver-Burk-Auftragung zu Abweichungen führen kann. Die reziproke Auftragung dieser Methode führt insbesondere bei kleinen Fehlern der Geschwindigkeit v und bei kleiner Substratkonzentration zu erheblichen Ungenauigkeiten. Abbildung 29 zeigt die Lineweaver-Burk- Auftragung für die vermessene Verbindung **89h**.

6. Spezieller Teil – Macroline

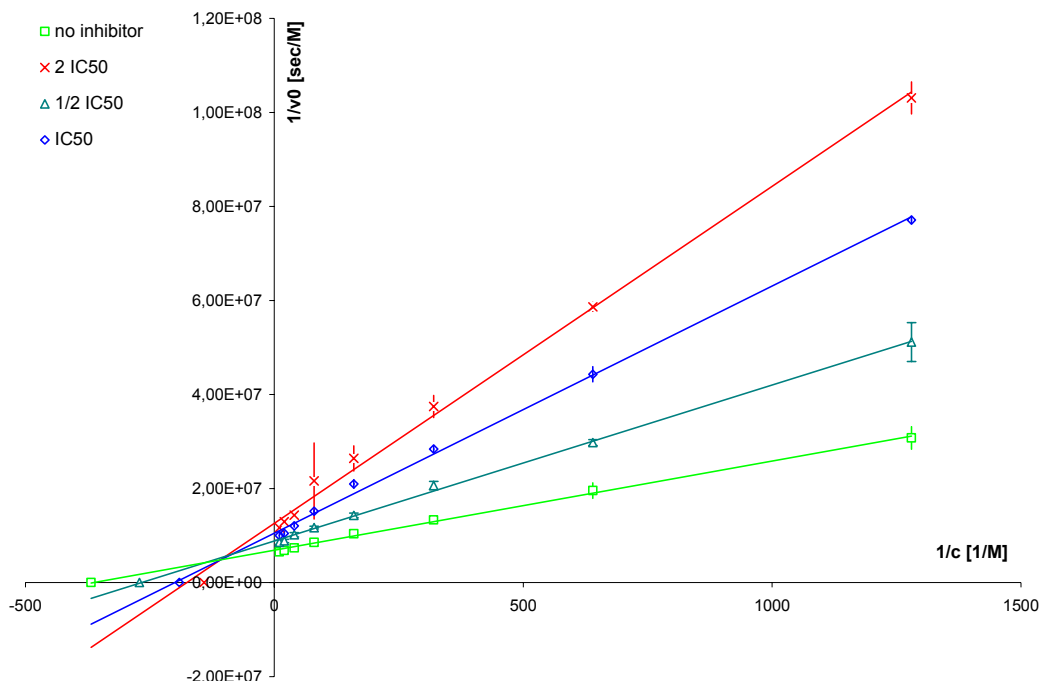


Abbildung 29: Lineweaver-Burk-Auftragung von **89h** bei vier unterschiedlichen Konzentrationen: □ kein Inhibitor, × 64.8 μM , \triangle 16.2 μM , \diamond 32.4 μM .

Auch für diese Auftragung wurden die Kinetik-Parameter K_M und v_{\max} bestimmt. Der Vergleich beider Datensätze zeigt, dass bei der Lineweaver-Burk-Auftragung gewisse Abweichungen von denen der nicht-linearen Kurvenanpassung auffallen. Zum Vergleich beider Analysewege werden in Tabelle 24 die jeweiligen Parameter gegenüber gestellt.

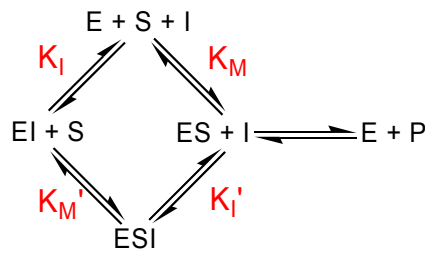
Tabelle 24: Parameter für K_M und v_{\max}^* bei den verschiedenen Konzentrationen und Lineweaver-Burk-Auftragung im Vergleich zu den ermittelten Werten der nicht-linearen Kurvenanpassung.

| Konzentration | K_M [mM] | K_M [mM] | v_{\max}^* [M/sec] | v_{\max}^* [M/sec] |
|----------------------|----------------------------|-------------------------------|----------------------------|-------------------------------|
| | Lineweaver-Burk-Auftragung | Nicht-lineare Kurvenanpassung | Lineweaver-Burk-Auftragung | Nicht-lineare Kurvenanpassung |
| kein Inhibitor | 2.76 | 3.69 | $1.5 \cdot 10^{-7}$ | $1.7 \cdot 10^{-7}$ |
| 1/2 IC ₅₀ | 3.75 | 4.80 | $1.1 \cdot 10^{-7}$ | $1.3 \cdot 10^{-7}$ |
| IC ₅₀ | 5.01 | 8.62 | $9.5 \cdot 10^{-8}$ | $1.1 \cdot 10^{-7}$ |
| 2 IC ₅₀ | 5.69 | 9.54 | $7.9 \cdot 10^{-8}$ | $9.1 \cdot 10^{-8}$ |

6. Spezieller Teil – Macroline

Beim Vergleich der K_M -Werte für beide Auswertungswege fällt auf, dass die Werte im Falle der nicht-linearen Kurvenanpassung etwa um den Faktor 1.5 größer sind als die ermittelten Parameter der Lineweaver-Burk-Auftragung. Im Falle von v_{max} unterscheiden sich beide Werte um den Faktor 1.1-1.2. Da auch der grundlegende Trend der Werte derselbe ist, wurde mit dem Datensatz der Lineweaver-Burk-Analyse weiter gerechnet.

Für die Inhibition von MptpB durch den Inhibitor **89h** kann anhand der ermittelten kinetischen Daten eine Mischhemmung aus kompetitiven und nicht-kompetitiven Bindungsmodi bestimmt werden. Für den Fall einer kompetitiven-/nicht-kompetitiven-Mischinhibition kann das in Schema 29 gezeigte Gleichgewicht zur Beschreibung der ablaufenden Reaktionen zur Hilfe gezogen werden.^[146]



Schema 29: Reaktionsgleichgewicht bei nicht-kompetitiver Enzym-Ligandenbindung.

Im Folgenden soll die Ermittlung aller Gleichgewichtskonstanten für das vorliegende Beispiel der Mischinhibition beschrieben werden. Zunächst kann der K_M -Wert der Lineweaver-Burk Auftragung entnommen werden. Formel 1 zeigt K_M als y-Achsenabschnitt

$$K_M = \frac{y(0)}{m}$$

Formel 1: Darstellung von K_M als y-Achsenabschnitt.

Zur Ermittlung von K_M' muss der Schnittpunkt aller Geraden bestimmt werden. So kann in der Lineweaver-Burk-Auftragung der $-x$ -Wert des Schnittpunktes der Geraden als Wert für K_M' abgelesen werden (Formel 2).

$$\frac{1}{[S]} = -\frac{1}{K_M'}$$

Formel 2: K_M' zu ermitteln aus dem Schnittpunkt der Geraden.

Sind diese beiden Werte ermittelt, lässt sich die dritte Konstante K_I mittels Formel 3 ermitteln.

$$v_{\max, I}^* = \frac{v_{\max}}{1 + \frac{K_M}{[S]} + \frac{[I]}{K_I} \cdot \left(\frac{K_M}{[S]} + \frac{K_M}{K_M'} \right)}$$

$$\Leftrightarrow v_{\max, I}^* = \frac{v_{\max}}{1 + \frac{[I]}{K_I} \cdot \frac{K_M}{K_M'}} \quad \text{Es gilt die Annahme: } \left(\frac{K_M}{[S]} \xrightarrow{[S] \rightarrow \infty} 0 \right)$$

$$\Leftrightarrow K_I = \frac{[I] \cdot K_M}{K_M' \cdot \left(\frac{v_{\max}}{v_{\max, I}^*} - 1 \right)}$$

Formel 3: Formeltransformationen zur Bestimmung von K_I .

Aus der unter Formel 4 gezeigten Gleichgewichtsbeziehung lässt sich aus den drei bekannten Werten die vierte Konstante K_I' berechnen.

$$K_I' \cdot K_M = K_I \cdot K_M' \quad \text{daraus folgt: } K_I' = \frac{K_I \cdot K_M'}{K_M}$$

Formel 4: Ermittlung von K_I' .

Tabelle 25 bietet eine Übersicht der ermittelten vier Konstanten. Es wurde also basierend auf der Mischhemmung aus kompetitiven und nicht-kompetitiven Bindungsmodi ein K_I -Wert von $1.34 \pm 0.32 \mu\text{M}$ für **89h** berechnet, wodurch das starke inhibitorische Potential dieser Substanzklasse bewiesen ist. Dies wird auch im Vergleich des Inhibitorpotentials der Macroline mit literaturbekannten Hemmern deutlich. So liegen der K_I -Wert und auch die bestimmten IC_{50} -Werte in einer Größenordnung zum Beispiel mit den als MptpB-Inhibitoren bekannten Indolochinolizidinen.^[15]

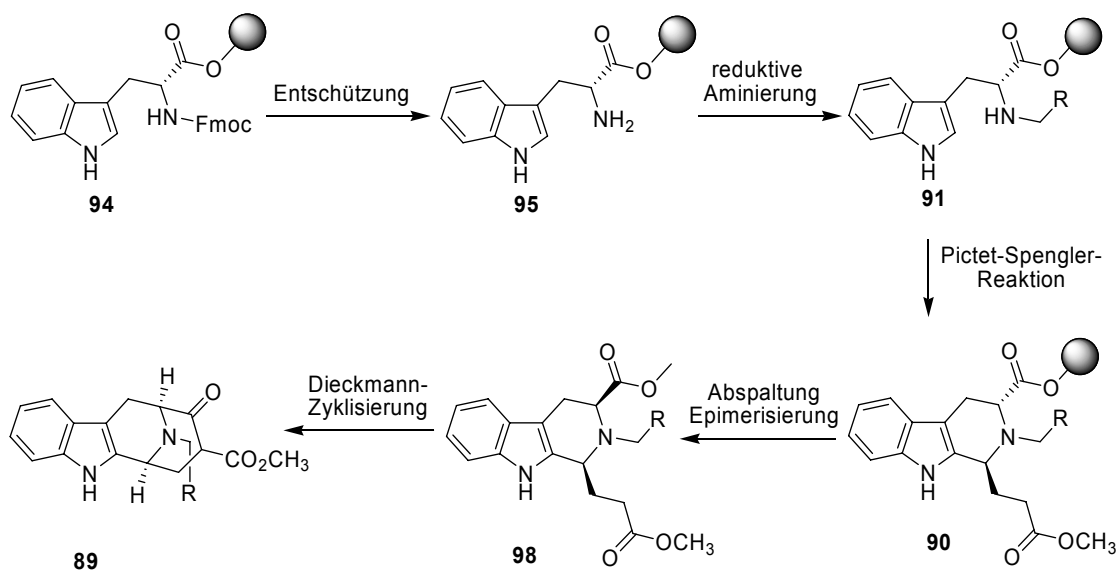
Tabelle 25: Übersicht über die ermittelten kinetischen Gleichgewichtskonstanten.

| | K_M [mM] | K_M' [mM] | K_I [μM] | K_I' [μM] |
|----------------------|------------|------------------|-------------------------|--------------------------|
| kein Inhibitor | 2.76 | - | - | - |
| 1/2 IC_{50} | 3.75 | 138.2 | 1.04 | - |
| IC_{50} | 5.01 | 107.9 | 1.31 | - |
| 2 IC_{50} | 5.69 | 108.6 | 1.68 | - |
| Durchschnittswert | - | 118.2 ± 17.3 | 1.34 ± 0.32 | 57.39 |

6.5 Zusammenfassung

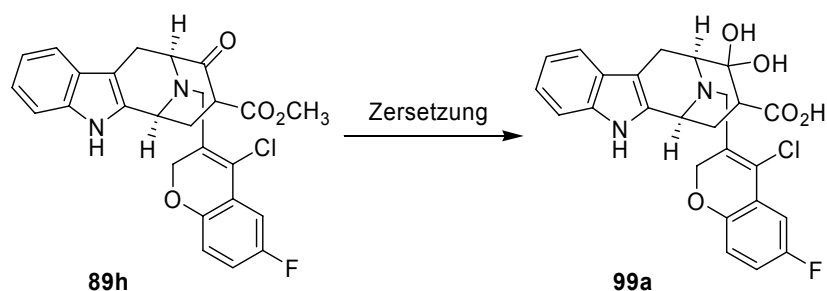
Das Auffinden neuer niedermolekularer Protein-Liganden ist eine zentrale Aufgabenstellung der chemischen Biologie. Um diesen Prozess zu vereinfachen, haben Waldmann *et al.* die Biologie-orientierte Synthese entwickelt. Innerhalb dieses Lösungsansatzes ist das SCONP-Konzept bekannt, das wie in Kapitel 2.3 beschrieben biologisch-prävalidierte Strukturgerüste aufzeigt. Um ein weiteres Beispiel für das Potential dieses Ansatzes zu finden, wurde eine Biologie-orientierte Synthese zur Erstellung einer Macrolin-Bibliothek durchgeführt.

Aufbauend auf der Dissertation von Dr. A. Nören-Müller wurde eine stereoselektive Festphasensynthese von Macrolinderivaten angewandt, um Naturstoffanaloge in paralleler Reaktionsführung zu synthetisieren.^[145] Eine Übersicht zu der durchgeführten Festphasensynthese bietet Schema 31. Es wurde HMBA-Harz **93** mit (D)-Tryptophan beladen, entschützt und dann in einer zweistufigen reduktiven Aminierung zu den sekundären Aminen **91** umgesetzt. Anschließend wurde unter sauren Bedingungen eine Pictet-Spengler-Reaktion mit Methyl-4,4-dimethoxybutyrat (**92**) durchgeführt, sodass die 1,3-*trans*-Isomere **90** entstanden. Die gewünschten *cis*- β -Ketoester **89** konnten durch Abspaltung vom Trägerharz, regioselektive Epimerisierung über ein Lactam-Intermediat und anschließende Dieckmann-Zyklisierung mittels Natriummethylat erhalten werden (Schema 31). Die Macrolin-Analoga wurden in einer Gesamtausbeute von 12-61% nach HPLC-Reinigung isoliert.



Schema 31: Überblick zur Festphasensynthese von *cis*- β -Ketoestern **89**.

Für jene *cis*- β -Ketoester **89** mit sterisch anspruchsvollen *N*-benzylicischen Resten, die *via* Festphasensynthese nur in geringen Ausbeuten erhalten werden konnten, wurde versucht, eine Lösungssynthese durchzuführen. Ziel war es, größere Mengen der jeweiligen Verbindungen herstellen zu können. Während die reduktive Aminierung sowie die Pictet-Spengler-Reaktion mit dem 4-Chloro-6-fluoro-2*H*-chromen-3-carbaldehyd in Lösung zu den gewünschten Produkten führten, fand bei der anschließenden Dieckmann-Zyklisierung eine Zersetzung des Zielproduktes statt (Schema 32).



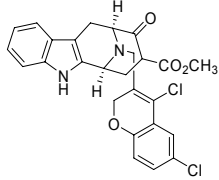
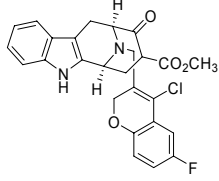
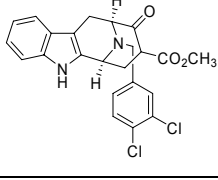
Schema 32: *In situ* Zersetzung des Zielproduktes **89h**.

Beim Einsatz sterisch anspruchsvoller Aldehyde führt somit lediglich die Festphasensynthese zu dem gewünschten Produkt. Dies ist womöglich mit anderen Konzentrationen der Reaktanden an der Oberfläche des Harzes zu erklären.

6. Spezieller Teil – Macroline

Die synthetisierte Substanzkollektion wurde anschließend von der Arbeitseinheit um Dr. H. Prinz in enzymatischen Inhibitionsexperimenten hinsichtlich ihres Potentials untersucht, eine Auswahl verschiedener Phosphatasen zu hemmen. Diese Tests zeigten, dass Macroline eine neue Klasse von potenten und selektiven MptpB-Inhibitoren darstellen. Als potentester Inhibitor wurde **89e** identifiziert. Diese Verbindung hemmt MptpB mit einem IC_{50} -Wert von $4.71 \pm 1.14 \mu\text{M}$ und einer mindestens 15-fachen Selektivität gegen PTP1B and VE-PTP. Zugleich konnte für **89e** keine Inhibition der Phosphahtasen MptpA, TC-PTPN2 und Cdc25A bis zu einer Konzentration von $100 \mu\text{M}$ beobachtet werden. Als selektivste MptpB-Hemmer wurden die Substanzen **89h** und **89i** identifiziert, die MptpB mit IC_{50} -Werten von 7.04 ± 0.99 beziehungsweise $9.64 \pm 0.93 \mu\text{M}$ inhibierten, ohne dabei andere Phosphatasen bis zu einer Konzentration von $100 \mu\text{M}$ zu hemmen (Tabelle 26).

Tabelle 26: Beispiele für potente und selektive MptpB-Inhibitoren.^[a]

| Eintrag (Nr.) | Verbindung | IC_{50} [μM] | | | | | |
|-------------------|---|-----------------------------|-----------------------|-----------------------|----------|----------------------|----------------------|
| | | MptpA | MptpB | PTP1B | TC-PTPN2 | VE-PTP | Cdc25A |
| 1 (89e) |  | >100 | 4.71 \pm 1.14 | 84.2 \pm 21.0 | >100 | 73.2 \pm 6.0 | >100 |
| 2 (89h) |  | >100 | 7.04 \pm 0.99 | >100 | >100 | >100 | >100 |
| 3 (89i) |  | >100 | 8.26 \pm 4.57 | >100 | >100 | >100 | 97.2 \pm 7.1 |

[a] Die Dephosphorylierung von pNPP wurde über die Änderung der Absorption bei 405 nm bestimmt. Angegeben wurde die Konzentration (μM) der Inhibitoren, bei welcher eine Enzymaktivitätsreduktion von 50% auftrat. Die Werte wurden aus mindestens drei unabhängigen Messungen bestimmt.

Zur Erstellung eines Struktur-Wirkungsprofils wurden zusätzlich die von Dr. A. Nören-Müller synthetisierten und getesteten Verbindungen zur Hilfe gezogen. Die Auswertung aller Inhibitionsprofile zeigt, dass die (S)-Konfiguration an den Positionen C-6 und C-10 essentiell für die Hemmung ist, da sämtliche von Dr. A. Nören-Müller hergestellten (R)-Enantiomere inaktiv waren. Es wird zudem deutlich, dass die β -Ketogruppe für die Inhibition relevant ist, da die Reduktion dieser Funktion die biochemische Aktivität der MptpB-Hemmung vollständig aufhebt (Abbildung 30).

Der Einfluß der *N*-benzyllischen Reste auf die MptpB-Hemmung hingegen ist nur schwer zu quantifizieren, wobei Sauerstoffatome umfassende aromatische Systeme bevorzugt zu sein scheinen. Ebenso zeigen Benzylreste mit einer *meta,para*-Disubstitution von elektronenziehenden Gruppen potente Inhibitionswerte (Tabelle 26).

S-Konfiguration in Position 6 und 10 essentiell

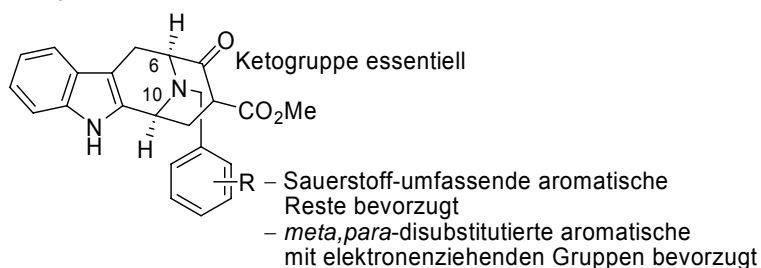


Abbildung 30: Strukturwirkungsbeziehung der Macrolinderivate für die MptpB-Hemmung.

Mittels kinetischer Untersuchungen des selektiven MptpB-Inhibitors **89h** konnte in einer Lineweaver-Burk-Auftragung festgestellt werden, dass die Verbindungen die Phosphatase MptpB mittels einer Mischhemmung aus kompetitiven und nicht-kompetitiven Bindungsmodi inhibieren.

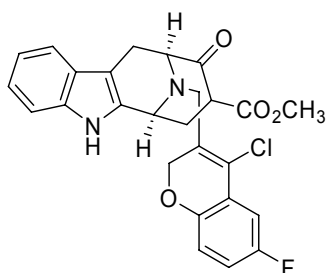


Abbildung 31: Selektiver MptpB-Inhibitor **89h** zur Untersuchung des Bindungsmodus.

Für die Verbindung **89h** wurde ein K_I -Wert von $1.34 \pm 0.32 \mu\text{M}$ berechnet, wodurch das starke inhibitorische Potential dieser Substanzklasse bewiesen wurde. Der Stellenwert der identifizierten MtpB-Inhibitoren wird auch im Vergleich der Macrolin-Analoga mit literaturbekannten Hemmern deutlich. So sind der K_I -Wert und auch die bestimmten IC_{50} -Werte in einer Größenordnung zum Beispiel mit den als MtpB-Inhibitoren bekannten Indolochinolizidinen.

Die auf den Arbeiten von Dr. A. Nören-Müller aufbauenden Untersuchungen zeigen somit, dass das Cycloocta[*b*]indolsystem ein vielversprechendes Strukturgerüst zur Entwicklung neuer Antibiotika gegen *Mycobacterium tuberculosis* darstellt. Es würde sich somit lohnen, diese Verbindungsklasse in weitergehenden infektionsbiologischen Studien auf eine mögliche humantherapeutische Anwendung zu untersuchen.

7. Zusammenfassung

Ein Aspekt der chemischen Biologie ist die Identifikation von neuen potenten Protein-Liganden. Insbesondere in der pharmazeutischen Industrie wurden zu diesem Zweck Substanzkollektionen zusammengestellt, die mehrere Millionen Substanzen umfassen können. Allerdings ging trotz dieser mit großem Aufwand erstellten Substanzkollektionen die Zahl an neuen Medikamenten in den letzten Jahren merklich zurück.^[147]

In vorherigen Arbeiten haben Waldmann *et al.* das Konzept der Biologie-orientierten Synthese (BIOS) entwickelt, welches helfen soll, den Syntheseaufwand möglichst auf solche Strukturen zu beschränken, welche mit möglichst großer Wahrscheinlichkeit biologisch aktiv sind. Hierzu wurden cheminformatische Verfahren zur Auffindung biologisch prävalidierter Startpunkte zur anschließenden Bibliothekssynthese entwickelt. Parallel und ergänzend hierzu wurden cheminformatische Lösungswege zur Identifikation geeigneter Zielproteine, welche eine niedermolekulare Verbindung binden, entworfen. In der hier vorliegenden Arbeit hat sich der Autor insbesondere mit drei Aspekten der Biologie-orientierten Synthese beschäftigt.

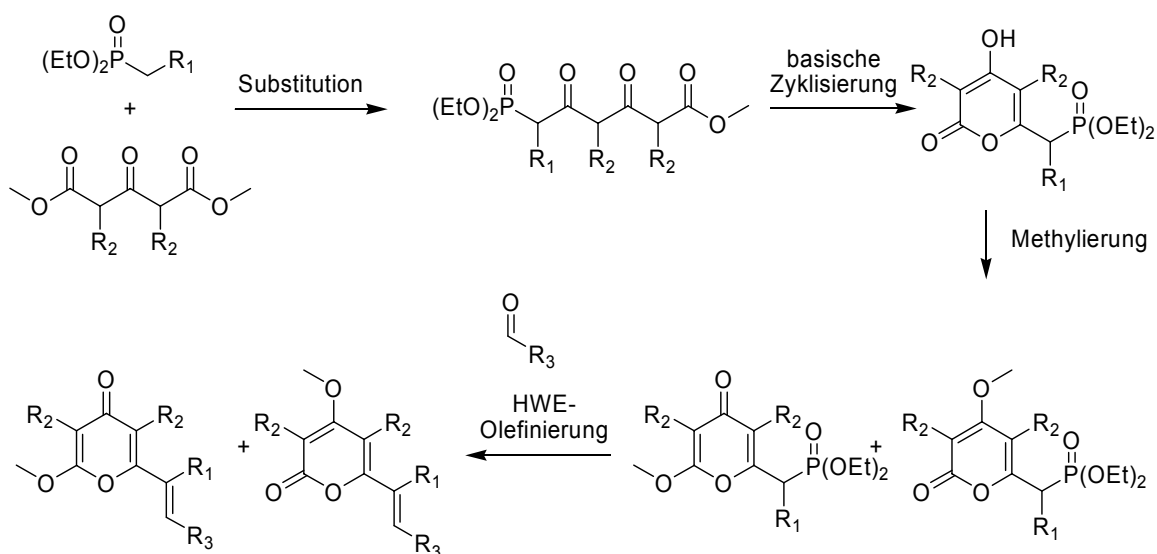
In dem ersten Teil der Arbeit wurden Ansätze zur Schließung der Informationslücke zwischen einer Substanzkollektion kleiner Moleküle und den dazu passenden Zielproteinen erarbeitet. Hierzu wurden in Zusammenarbeit mit Dr. S. Wetzel Versuche zur Evaluierung der Überlagerung zweier Strukturgerüstbäume durchgeführt. Es sollte gezeigt werden, dass die Überlagerung eines ersten Baumes, bei dem die Moleküle bereits als biochemisch aktiv bekannt waren, mit einem zweiten Baum, für dessen Verbindungen bisher keine Informationen zu Protein-Ligand-Wechselwirkungen vorhanden waren, ein geeignetes Verfahren zur Annotierung von Bioaktivitäten darstellt.

Zur Evaluation der Methode der Strukturbaumüberlagerung wurden 500 γ -Pyrone in MAO-, STAT- und Sphingomyelinase-Assays getestet. Moleküle höherer Ebenen des

7. Zusammenfassung

Strukturgerüstbaumes wurden käuflich erworben, wohingegen die γ -Pyrone in einer vierstufigen Scavenger-Synthese hergestellt wurden (Schema 33).

Diese Synthesestrategie verringerte Aufreinigungsschritte, so dass die erste säulenchromatische Trennung nach der Methylierung durchgeführt wurde. Die anschließende Horner-Wadsworth-Emmons-Olefinierung lieferte ein breites Spektrum an α - und γ -Pyrone, die nach Aufreinigung in einer Ausbeute von 28-82% isoliert werden konnten.

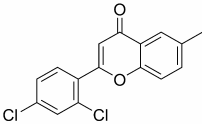
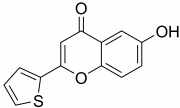
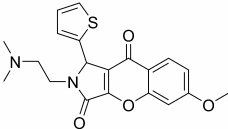
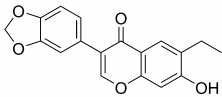


Schema 33: Vierstufige Synthese der α - und γ -Pyrone.

Die Substanzbibliothek wurde hinsichtlich der Inhibition dreier Proteinklassen getestet. Für die beiden MAO-Isoformen wurden dabei 95 Inhibitoren identifiziert, die IC_{50} -Werte vom hohen nanomolaren bis niedrigen mikromolaren Bereich aufwiesen. Sieben dieser Verbindungen stellten selektive MAO A-Inhibitoren dar, wohingegen sechs Moleküle selektive MAO B-Hemmstoffe waren (Tabelle 27). Die Aktivität der potentesten MAO A-Inhibitoren war mit der von literaturbekannten Verbindungen vergleichbar, wobei bereits veröffentlichte MAO B-Inhibitoren etwas aktiver waren als die hier gezeigten Verbindungen. Strukturell gehören diese MAO-Inhibitoren zu der Gruppe der γ -Pyrone, Benzopyrone, Flavone, Isoflavone und Xanthone. Dieser Befund zeigte, dass der gesamte γ -Pyrone-Ast geeignete Strukturen zur Hemmung der MAO-Enzyme enthielt.

7. Zusammenfassung

Tabelle 27: Ausgewählte MAO-Isoformen-selektive Inhibitoren.

| Eintrag | Struktur | IC ₅₀ [μM] | |
|---------|---|-----------------------|-------------|
| | | MAO A | MAO B |
| 1 |  | 0.95 ± 0.07 | > 50 |
| 2 |  | 0.94 ± 0.03 | > 50 |
| 3 |  | > 50 | 0.34 ± 0.17 |
| 4 |  | > 50 | 0.31 ± 0.03 |

Die Erstellung einer Struktur-Wirkungsbeziehung war für die Xanثone möglich, unter denen eine hohe Zahl an MAO-Hemmern gefunden werden konnte. Als ungünstig für die Inhibition der Proteine erwiesen sich jedoch Substitutionen an der Position zwei und vier, wohingegen eine Substitution an Position drei lediglich die Hemmung von MAO A veränderte (Abbildung 32).

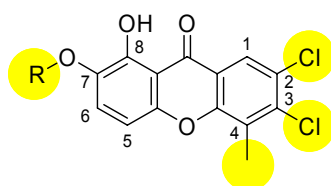
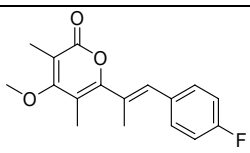
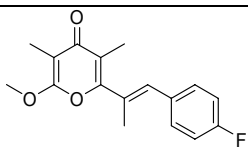


Abbildung 32: Struktur-Wirkungsbeziehung der MAO A- und B-Hemmung durch Xanthon-Derivate.

Der Test der α-Pyron-Substanzbibliothek führte zu neuen Inhibitoren der MAO-Isoformen. Insbesondere fiel auf, dass bei gleichbleibendem Substitutionsmuster die Aktivität und Selektivität zwischen α- und γ-Pyron kaum variierte (Tabelle 28).

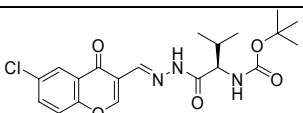
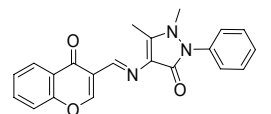
7. Zusammenfassung

Tabelle 28: Vergleich der MAO-Inhibition zwischen α - und γ -Pyrone.

| α -Pyrone | MAO A IC ₅₀ [μ M] | MAO B IC ₅₀ [μ M] | γ -Pyrone | MAO A IC ₅₀ [μ M] | MAO B IC ₅₀ [μ M] |
|---|--------------------------------------|--------------------------------------|--|--------------------------------------|--------------------------------------|
|  | 13.71 \pm 0.94 | > 100 |  | 18.10 \pm 1.53 | > 100 |

Für die „Signal Transducers and Activators of Transcription“ (STAT)-Proteine wurden in Zusammenarbeit mit Berg *et al.* drei Inhibitoren gefunden, deren IC₅₀-Werte (14 - 70 μ M) in derselben Größenordnung mit den literaturbekannten Inhibitoren dieser Enzyme liegen. Besonders hervorzuheben ist, dass einer dieser Inhibitoren zu den ersten STAT1-Liganden gehört, und die Aktivität von zwei der gefundenen Inhibitoren auch erfolgreich in Burkitt-Lymphom-Zelllinien nachgewiesen werden konnte (Tabelle 29).

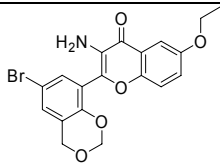
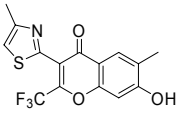
Tabelle 29: *In vitro* Aktivitäten der getesteten γ -Pyrone in biochemischen Versuchen zur STAT- Inhibition in fluoreszenzbasierten Tests.

| Eintrag | Struktur | IC ₅₀ [μ M] STAT5b | IC ₅₀ [μ M] STAT3 | IC ₅₀ [μ M] STAT1 |
|---------|---|---------------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|
| 1 |  | 29 \pm 1 | 30.5 \pm 0.4 | 38 \pm 2 |
| 2 |  | 39 \pm 1 | 22 \pm 1 | 14 \pm 1 |

Zuletzt wurde die γ -Pyrone-Substanzbibliothek hinsichtlich ihres Inhibitionspotentials in einem sauren Sphingomyelinase Assay getestet. Dabei wurden drei Benzopyran-Strukturen gefunden, die das Protein selektiv gegenüber der neutralen Sphingomyelinase inhibieren. Somit konnte die Strukturklasse der Benzopyrane zum ersten Mal als Inhibitor dieses Proteins beschrieben werden (Tabelle 30). Darüber hinaus fällt auf, dass die Aktivität der gefundenen Hemmer (14 -70 μ M) sehr viel höher war als jene der literaturbekannten Xanthone.

7. Zusammenfassung

Tabelle 30: Exemplarische saure Sphingomyelinase-Inhibitoren.

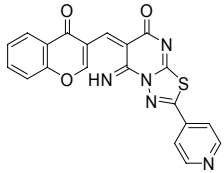
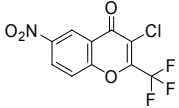
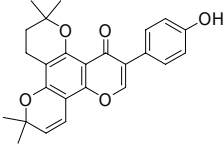
| Eintrag | Struktur | IC ₅₀ / K _i [μM] | |
|---------|---|---|---------------|
| | | Saure Form | Neutrale Form |
| 1 |  | 3.1 ± 2.1 | > 50 |
| 2 |  | 9.5 ± 2.8 | > 50 |

Ein weiterer bearbeiteter Aspekt im Kontext der Biologie-orientierten Synthese basiert auf dem Protein Structure Similarity Clustering (PSSC)-Konzept, das Proteine nach ihrer dreidimensionalen Ähnlichkeit der Bindungsstelle gruppiert. Innerhalb einer solchen Gruppe kann mit erhöhter Wahrscheinlichkeit ein Inhibitor des einen Proteins auch als Ligand eines anderen Enzyms des gleichen Clusters fungieren. Mittels dieses Ansatzes sollten basierend auf einer Substanzkollektion bekannter MAO-Inhibitoren neue Inhibitoren des pharmazeutisch relevanten LSD1-Proteins gefunden werden.

Durch Anwendung des PSSC-Konzeptes konnte eine Analogie zwischen den dreidimensionalen Zentren der Monoaminoxidasen und der Lysin-spezifischen Demethylase LSD1 gezeigt werden. Aufgrund der hohen Trefferquote von MAO-Inhibitoren in der γ -Pyron-Substanzkollektion wurden 500 Strukturen dieser Bibliothek in Zusammenarbeit mit Schüle *et al.* und Büttner *et al.* in einem HRP-basierten LSD1-Assay getestet. So konnten drei strukturell neue Inhibitoren für dieses neue pharmazeutisch relevante Target gefunden werden (Tabelle 31).

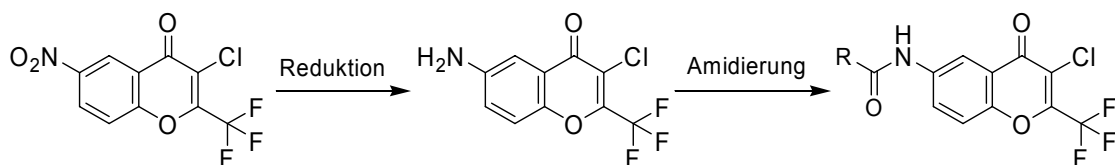
7. Zusammenfassung

Tabelle 31: Validierte nicht-kovalente LSD1-Inhibitoren.

| Nr | IC ₅₀ LSD1 [μM] | IC ₅₀ MAO A [μM] | IC ₅₀ MAO B [μM] |
|--|-------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|
|  | 52 | > 50 | > 50 |
|  68 | 42 | 40 ± 10 | > 50 |
|  | 16 | > 50 | > 50 |

Die identifizierten Strukturen unterscheiden sich deutlich von den literaturbekannten Mechanismus-basierten kovalenten Inhibitoren. Darauf folgende massenspektrometrische Kontrollen bewiesen die LSD1-Hemmung und zeigten, dass Verbindung **68** am stärksten die Demethylierung des H3K4me2-Peptides durch LSD1 inhibierte. Auch die bioinformatisch-bestimmten, pharmakokinetischen Parameter identifizierten insbesondere die Verbindung **68** als besonders günstig für die Anwendung in Zell- und Mausversuchen, sodass diese Verbindung für weitergehende Studien ausgewählt wurde.

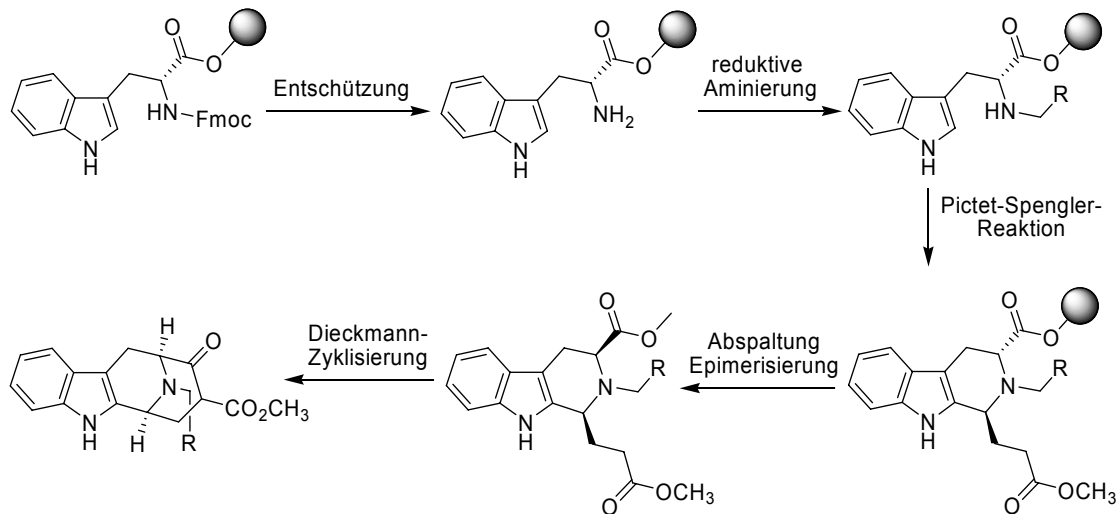
Zur Evaluation des chemischen Strukturraumes um diese Verbindung wurde **68** weitergehend derivatisiert, um die Selektivität gegenüber den beiden MAO-Isoformen zu erhöhen.



Schema 34: Derivatisierung von der Nitroverbindung.

Durch Zusammenstellen einer vierzehn Substanzen umfassenden Substanzkollektion konnten allerdings keine potenteren oder selektiveren Verbindungen identifiziert werden. Das Substitutionmuster von der Nitroverbindung scheint somit für die Inhibition von LSD1 unabdingbar zu sein. Der neuartige Inhibitor **68** wurde ausgewählt, um in zukünftigen Zell- und Mausversuchen von den Arbeitsgruppen um Prof. Dr. R. Büttner und Prof. Dr. Schüle analysiert zu werden.

In einem dritten Projekt zur Biologie-orientierten Synthese wurden aufbauend auf der Arbeit von Dr. A. Nören-Müller Macrolin-Analoga auf ihr inhibitorisches Potential in Phosphatase-Assays getestet. Das Macrolin-Strukturgerüst wurde nach dem „Structural Classification of Natural Products“ (SCONP)-Konzept ausgesucht, welches hilft, biologisch präevaluierte Strukturgerüste aus Substanzdatenbanken wie dem Natural Product Dictionary abzuleiten. Nach der von Dr. A. Nören-Müller entwickelten Festphasensynthese wurde eine Substanzkollektion synthetisiert (Schema 35).

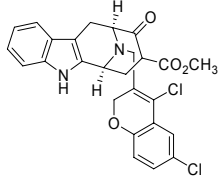
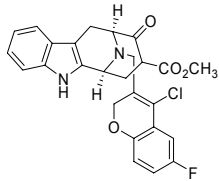


Schema 35: Überblick zur Festphasensynthese von *cis*- β -Ketoestern.

Diese Strukturen sowie die von Dr. A. Nören-Müller hergestellten Verbindungen wurden von der Gruppe um Dr. H. Prinz getestet. Es stellte sich heraus, dass innerhalb dieser Substanzbibliothek vor allem acht interessante Verbindungen identifiziert werden konnten, die insbesondere selektiv die MptpB-Phosphatase inhibieren (Tabelle 32).

7. Zusammenfassung

Tabelle 32: Beispiele für potente und selektive MptpB-Inhibitoren.

| Eintrag | Verbindung | IC ₅₀ [μM] | | | | | |
|---------|---|-----------------------|-------------------|-------------------|----------|----------|--------|
| | | MptpA | MptpB | PTP1B | TC-PTPN2 | VE-PTP | Cdc25A |
| 1 |  | n.a. | 4.71 ± 1.14 | 84.2 ± 21.0 | n.a. | ± 6.0 | n.a. |
| 2 |  89h | n.a. | 7.04 ± 0.99 | n.a. | n.a. | n.a. | n.a. |

Durch Einbeziehung der von Dr. A. Nören-Müller hergestellten Verbindungen konnte ein Struktur-Wirkungsprofil erstellt werden. Es stellte sich heraus, dass die (*S*)-Konfiguration an den Positionen C-6 und C-10 essentiell für die MptpB-Hemmung ist, da alle von Dr. A. Nören-Müller hergestellten (*R*)-Enantiomere inaktiv waren. Auch ließ sich erkennen, dass die β -Ketogruppe für die Inhibition bedeutend ist, da die Reduktion dieser Funktion die biochemische Aktivität der MptpB-Hemmung vollständig aufhob (Abbildung 33). Hingegen ließ sich die Bedeutung der *N*-benzylischen Reste für die MptpB-Hemmung nur schwer quantifizieren, wobei sowohl Sauerstoffatome enthaltende aromatische Systeme wie auch *meta,para*-disubstituierte Benzylreste bevorzugt zu sein schienen.

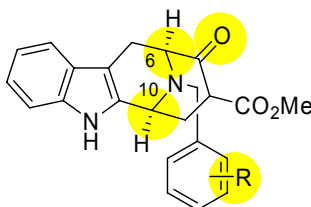


Abbildung 33: Strukturwirkungsbeziehung der Macrolinderivate für die MptpB-Hemmung.

Zuletzt wurde eine kinetische Analyse des selektiven MptpB-Inhibitors **89h** (Tabelle 32, Eintrag 2) mit anschließender Lineweaver-Burk-Auftragung der Ergebnisse durchgeführt. Diese zeigte, dass die Verbindung **89h** die Phosphatase MptpB mittels

einer Mischhemmung aus kompetitiven und nicht-kompetitiven Bindungsmodi inhibieren. Für die untersuchte Substanz **89h** wurde ein K_I -Wert von $1.34 \pm 0.32 \mu\text{M}$ berechnet, der das starke inhibitorische Potential dieser Substanzklasse belegt und den Stellenwert der identifizierten MptpB-Inhibitoren auch im Vergleich mit literaturbekannten Hemmern verdeutlichte. So liegen der K_I -Wert und auch die bestimmten IC_{50} -Werte in derselben Größenordnung wie die als MptpB-Inhibitoren bekannten Indolochinolizidinen.

Im Rahmen aller drei Projekte wurden strukturell neue Inhibitoren synthetisiert und identifiziert, die entweder aktiver und/oder selektiver als literaturbekannte Inhibitoren waren oder deren Aktivität und Selektivität zumindestens mit den veröffentlichten Werten vergleichbar waren. Die durchgeführten Arbeiten verdeutlichen die Bedeutung und das Potential der Biologie-orientierten Synthese. Da die gefundenen Inhibitoren hinsichtlich der eigentlichen Protein-Bindung noch nicht mittels einer gezielten Derivatisierung optimiert wurden, stellen die Verbindungen interessante Startpunkte für weitere Studien zur jeweiligen Protein-Inhibition dar. Insbesondere der gefundene LSD1-Inhibitor (**68**) hat dabei das Potential, in präklinischen Studien weiter evaluiert zu werden.

Vom cheminformatischen Standpunkt aus betrachtet liefert die Arbeit Beispiele für die Validität des SCONP-Ansatzes sowie des PSSC-Konzeptes. Die in Kooperation mit Dr. S. Wetzel durchgeführte Evaluation der Strukturgerüstbaum-Überlagerung half, das BIOS-Konzept um einen weiteren Aspekt zu bereichern. Ein möglicher weiterer Schritt zur Weiterentwicklung der Biologie-orientierten Synthese könnte eine Ausweitung des gefundenen Konzeptes jenseits der Naturstoffe hin zu allgemein sämtlichen biologisch aktiven Verbindungen sein. Dies würde eine Überlagerung alternativer Strukturgerüstbäume ermöglichen, was zu neuen, interessanten Ergebnissen führen könnte.^[54]

8. Experimenteller Teil

8.1 Messgeräte und Hilfsmittel

NMR-Spektren wurden mit einem Varian Mercury-VX 400, einem Bruker Avance DRX 500 und einem Varian Unity Inova 600 aufgenommen. Die in ppm angegebenen chemischen Verschiebungen beziehen sich auf das jeweilige Restsignal des nicht deuterierten Lösungsmittels. Signalmultiplizitäten sind wie folgt abgekürzt: s = Singulett, d = Dublett, t = Triplett, q = Quartett, br.s = breites Singulett, m = Multiplett.

Optische Drehungen wurden auf einem Schmidt & Hänsch Polartronic HHP Polarimeter ermittelt und sind auf die Wellenlänge der Natrium-D-Linie (589 nm) bezogen. Die Konzentration c in g/100 ml und das verwendete Lösungsmittel sind bei den jeweiligen Substanzen angegeben.

Hochaufgelöste Massenspektren wurden mit einem Jeol SX102A Spektrometer gemessen. Als Ionisierungsmethode wurde Fast Atom Bombardment (FAB) mit *m*-Nitrobenzylalkohol als Matrix verwendet.

MALDI-TOF Massenspektren wurden an einem Voyager DETM Pro Biospectrometry Workstation Spektrometer der Firma PerSeptive Biosystems gemessen, als Matrix wurde 2,5-Dihydroxybenzoesäure (DHB) eingesetzt.

Gekoppelte Liquid Chromatography-Massenspektrometrie (LC-MS) wurde an einem Agilent Series 1100-System der Firma Hewlett Packard mit einer CC 250/4 Nucleosil 120-5 C4 oder einer C18 Gravity-Säule der Firma Macherey-Nagel durchgeführt. Das ESI-Massenspektrometer war ein LCQ Advantage MAX der Firma Finnigan.

8. Experimenteller Teil

Sofern nicht anders angegeben, wurde folgender Gradient auf der C18-Säule verwendet:

C18grav_split4pos: Laufmittel A: 0.1 % HCOOH in H₂O; Laufmittel B: 0.1 % HCOOH in Acetonitril; Flussrate 1 ml/min, 1 min 10 % B, dann linearer Anstieg auf 100 B in 9 min, 2 min 100 % B.

Gekoppelte Gaschromatographie-Massenspektrometrie (GC-MS) wurde mit einem Gaschromatographen 6890 und einem Massendetektor 5973 der Firma Hewlett Packard durchgeführt. Es wurde eine Kapillarsäule HP-5MS, 25 m × 0.2 mm; 0.33 µm der Firma Agilent mit Helium als Trägergas verwendet.

Es wurden zwei Temperaturprogramme verwendet:

DB_50_S: 50 °C (2 min halten), dann 40 °C/min auf 300 °C (5.75 min halten)

DB_100_S: 100 °C (1 min halten), dann 40 °C/min auf 300 °C (5.0 min halten)

Für die **analytische chirale HPLC** wurde ein Agilent Serie 1100-System mit einer Chiralpak AD-H Säule (Daicel Chemical Industries) eingesetzt.

Für die **MS-gekoppelte, präparative HPLC** wurde folgendes System verwendet: Agilent Series 1100/LC/MSD VL (ESI); Vorsäule: VP50/21 Nucleodur C18 Gravity 5 µm, Hauptsäule: VP125/21 Nucleodur C18 Gravity 5 µm, (beide Macherey&Nagel); Detektion: 210 und 254 nm; Flussrate: 25 ml/min; Wasser für HPLC-Trennungen wurde durch ein Milli-Q-System mit Q-Gard 2-Kartuschen der Firma Millipore gereinigt.

Eluent A: Acetonitril + 0.1 % TFA; Eluent B: Wasser + 0.1 % TFA. Als Lösungsmittel für die Ionisierung wurde Wasser/Acetonitril 1:1 + 0.1 % Ameisensäure verwendet.

Es wurde folgender Gradient verwendet:

TL321_STD210MM_MS_ON.M: 0 min 10 % A → 1 min 10 % A → 12 min 100 % A → 15 min 100 % A.

Zum Einengen der Substanzen nach der präparativen HPLC-Trennung wurde ein alpha 2-4 Gefriertrockner der Firma Christ verwendet.

Für die **Dünnschichtchromatographie (DC)** wurden mit Kieselgel 60 F₂₅₄ beschichtete Aluminiumplatten der Firma Merck verwendet. Laufmittel und R_F-Werte sind bei den jeweiligen Substanzen angegeben.

Zur Detektion wurden UV-Licht ($\lambda = 254 \text{ nm}$) und folgende Anfärbereagenzien verwendet:

Reagenz A: 2.5 g Molybdätophosphorsäure, 1 g Cer(IV)-sulfat und 6 ml konz. Schwefelsäure in 94 ml Wasser,

Reagenz B: 0.5%ige Lösung von Kaliumpermanganat in Wasser.

Für die **präparative Säulenchromatographie** wurde Kieselgel der Firma Acros mit der Korngröße 35-70 μm verwendet.

UV-spektroskopische Messungen wurden an einem Cary 100 der Firma Varian gemessen.

FT-IR-Spektren wurden an einem Vector 22-Spektrometer der Firma Bruker aufgenommen. Die Bandenintensitäten sind wie folgt abgekürzt: s = stark, m = mittel, w = schwach, br = breites Signal.

Schmelzpunkte wurden an einer Schmelzpunktapparatur 540 der Firma Büchi gemessen und sind unkorrigiert.

Alle **Reaktionen** fanden unter einer Inert-Atmosphäre aus Argon statt. Glasgeräte wurden vor dem Einsatz im Hochvakuum ausgeheizt und nach Abkühlen mit Argon gespült. Lösungsmittel wurden in wasserfreier Form eingesetzt:

8. Experimenteller Teil

Diethylether, Tetrahydrofuran und Methanol wurden in getrockneter Form über Molsieb von der Firma Fluka bezogen.

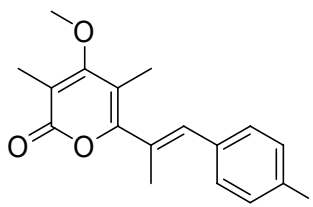
Dichlormethan und Acetonitril wurden über Calciumhydrid getrocknet und vor Gebrauch destilliert.

Pentan wurde über basischem Aluminiumoxid vorgetrocknet und von Natrium-Ketyl destilliert.

Die Harze für die Synthese an der festen Phase wurden von den Firmen Novabiochem oder Rapp Polymere bezogen. Alle übrigen Chemikalien wurden von den Firmen SIGMA-ALDRICH, ACROS, Fluka oder ABCR erworben und ohne weitere Aufreinigung eingesetzt.

8.2 Versuche zu Kapitel 4.4 – α -Pyrone

6-((*E*)-1-(4-Iodophenyl)prop-1-en-2-yl)-4-methoxy-3,5-dimethyl-2*H*-pyran-2-on (26a)



Ein Gemisch von Phosphonat **23a** (50.0 mg, 0.16 mmol, 1.0 Äq.), LHMDS (0.19 mL, 1 M, 0.19 mmol, 1.2 Äq.) und 4-Iodobenzaldehyd (46 mg in 2 mL trockenem THF, 0.19 mmol, 1.2 Äq.) wurde für 1.5 h in 2 mL trockenem THF refluxiert. Das Gemisch wurde auf Raumtemperatur abgekühlt und die Lösungsmittel *in vacuo* entfernt. Das Produkt wurde nach säulenchromatographischer Aufreinigung (Silikagel, Cyclohexan/Dichlormethan = 1/9 zu Ethylacetat/ Dichlormethan = 1/19) isoliert.

Ausbeute: 38 mg, 0.10 mmol, 61%.

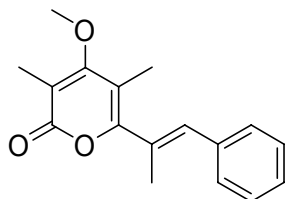
GC-MS (DB_50_S): $R_t = 9.2$ min; $m/z = 396$ $[M]^+$ (100%).

$^1\text{H-NMR}$ (400MHz, CDCl_3): 2.07 (3 H, s), 2.08 (3 H, s), 2.13 (3 H, d, $J = 1.5$ Hz), 3.85 (3 H, s), 6.58 (1 H, s), 7.08 (2 H, d, $J = 8.1$ Hz), 7.71 (2 H, d, $J = 8.4$ Hz) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (100MHz, CDCl_3): 10.4, 12.0, 16.7, 60.3, 93.3, 109.6, 110.6, 130.5, 130.8, 133.4, 135.5, 137.5, 158.3, 165.3, 168.4 ppm.

HRMS (GCMS-EI): $\text{C}_{17}\text{H}_{17}\text{IO}_3$: berechnet: 396.0222, gefunden: 396.0216.

4-Methoxy-3,5-dimethyl-6-((E)-1-phenylprop-1-en-2-yl)-2H-pyran-2-on (26c)



Ein Gemisch von Phosphonat **14a** (50.0 mg, 0.16 mmol, 1.0 Äq.), LHMDS (0.19 mL, 1 M, 0.19 mmol, 1.2 Äq.) und Benzaldehyd (21 μ L, 0.21 mmol, 1.2 Äq.) wurde für 1.5 h in 2 mL trockenem THF refluxiert. Das Gemisch wurde auf Raumtemperatur abgekühlt und die Lösungsmittel *in vacuo* entfernt. Aufreinigung *via* Säulenchromatographie (Silikagel, Ethylacetat/Cyclohexan = 1/4) lieferte das Produkt.

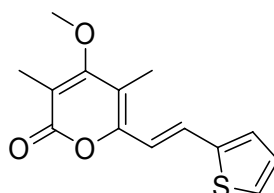
Ausbeute: 33 mg, 0.12 mmol, 78%.

GC-MS (DB_50_S): $R_t = 7.5$ min; $m/z = 270$ [M]⁺ (100%).

¹H-NMR (400MHz, CDCl₃): 2.08 (3 H, s), 2.09 (3 H, s), 2.16 (3 H, d, $J = 1.5$ Hz), 3.86 (3 H, s), 6.67 (1 H, s), 7.27-7.41 (5H, m) ppm.

¹³C-NMR (100MHz, CDCl₃): 10.3, 12.0, 16.6, 60.3, 109.4, 110.4, 127.6, 128.4, 129.1, 129.6, 134.6, 136.1, 158.8, 165.4, 168.5 ppm.

HRMS (GCMS-EI): C₁₇H₁₈O₃: berechnet: 270.1256, gefunden: 270.1250.

4-methoxy-3,5-dimethyl-6-((E)-2-(thiophen-2-yl)vinyl)-2H-pyran-2-on (26d)

Zu einer Lösung von **23b** (50 mg, 0.18 mmol, 1.0 Äq.) in trockenem THF (4 mL) wurde bei Raumtemperatur LHMDS (0.22 mL, 1 M, 0.22 mmol, 1.2 Äq.) und 2-Thiophencarboxaldehyd (21 μ L, 0.22 mmol, 1.2 Äq.) gegeben. Das Gemisch wurde 2.5 h refluxiert, abgekühlt und das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt. Das erhaltene Produkt wurde säulenchromatographisch aufgereinigt (Silikagel, Ethylacetat/Cyclohexan 3/7).

Ausbeute: 31 g, 0.12 mmol, 65%.

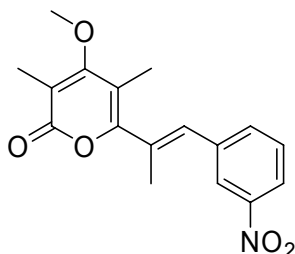
GC-MS (DB_50_S): $R_t = 7.8$ min; $m/z = 262$ $[M]^+$ (100%).

$^1\text{H-NMR}$ (400MHz, CDCl_3): 2.07 (3 H, s), 2.08 (3 H, s), 3.82 (3 H, s), 6.66 (1 H, d, $J = 15.5$ Hz), 7.03 (1 H, ddd, $J = 5.0, 3.6, 0.7$ Hz), 7.16 (1 H, d, $J = 3.5$ Hz), 7.29 (1 H, d, $J = 5.1$ Hz), 7.59 (1 H, d, $J = 15.5$ Hz) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (100MHz, CDCl_3): 9.8, 10.5, 60.3, 110.5, 111.3, 115.3, 126.5, 127.3, 128.1, 129.0, 141.5, 152.4, 164.8, 168.1 ppm.

HRMS (GCMS-EI): $\text{C}_{14}\text{H}_{14}\text{O}_3\text{S}$: berechnet: 262.0664, gefunden: 262.0666.

**4-Methoxy-3,5-dimethyl-6-((E)-1-(3-nitrophenyl)prop-1-en-2-yl)-2H-pyran-2-on
(26e)**



Ein Gemisch von Phosphonat **23a** (50.0 mg, 0.16 mmol, 1.0 Äq.), LHMDS (0.19 mL, 1 M, 0.19 mmol, 1.2 Äq.) und 3-Nitrobenzaldehyd (29 mg in 2 mL trockenem THF, 0.19 mmol, 1.2 Äq.) wurde für 1.5 h in 2 mL trockenem THF refluxiert. Das Gemisch wurde auf Raumtemperatur abgekühlt und das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt. Aufreinigung *via* Säulenchromatographie (Silikagel, Ethylacetat/Cyclohexan = 1/1) lieferte das Produkt in einer Ausbeute von 31 mg (63%).

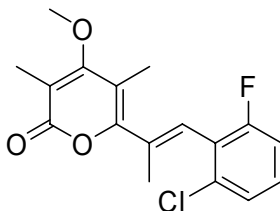
Ausbeute: 31 mg, 0.10 mmol, 63%.

GC-MS (DB_50_S): $R_t = 9.1$ min; $m/z = 315$ $[M]^+$ (83%).

$^1\text{H-NMR}$ (400MHz, CDCl_3): 2.09 (3 H, s), 2.10 (3 H, s), 2.18 (3 H, d, $J = 1.5$ Hz), 3.88 (3 H, s), 6.71 (1 H, s), 7.57 (1 H, t, $J = 7.9$ Hz), 7.66 (1 H, d, $J = 7.7$ Hz), 8.16 (1 H, ddd, $J = 8.2, 2.2, 1.1$ Hz), 8.21 (1 H, t, $J = 1.9$ Hz) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (100MHz, CDCl_3): 10.4, 12.0, 16.7, 60.4, 110.0, 110.9, 122.4, 123.7, 129.4, 131.9, 132.6, 134.9, 137.7, 148.3, 157.4, 165.1, 168.2 ppm.

HRMS (GC-MS-EI): $\text{C}_{17}\text{H}_{17}\text{NO}_5$: berechnet: 315.1107, gefunden 315.1102.

6-((E)-1-(2-chloro-6-fluorophenyl)prop-1-en-2-yl)-4-methoxy-3,5-dimethyl-2H-pyran-2-on (26f)

Ein Gemisch von Phosphonat **23a** (50.0 mg, 0.16 mmol, 1.0 Äq.), LHMDs (0.19 mL, 1 M, 0.19 mmol, 1.2 Äq.) und 2-Chloro-6-fluorobenzaldehyd (32 mg in 2 mL trockenem THF, 0.19 mmol, 1.2 Äq.) wurde für 1.5 h in 2 mL trockenem THF refluxiert. Das Gemisch wurde auf Raumtemperatur abgekühlt und die Lösungsmittel *in vacuo* entfernt. Das Produkt wurde nach säulenchromatographischer Aufreinigung (Silikagel, Cyclohexan/Dichlormethan = 1/9 zu Ethylacetat/ Dichlormethan = 1/19) erhalten.

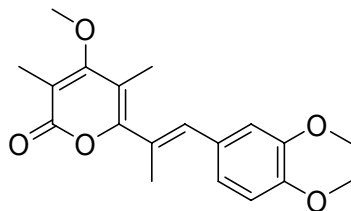
Ausbeute: 37 mg, 0.12 mmol, 73%.

GC-MS (DB_50_S): $R_t = 7.8$ min; $m/z = 322$ $[M]^+$ (100%).

$^1\text{H-NMR}$ (400MHz, CDCl_3): 1.89 (3 H, dd, $J = 2.4, 1.4$ Hz), 2.09 (3 H, s), 2.16 (3 H, s), 3.86 (3 H, s), 6.40 (1 H, s), 7.02-7.07 (1H, m), 7.23-7.27 (2H, m) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (100MHz, CDCl_3): 10.4, 12.0, 17.0, 60.3, 110.2, 111.0, 114.1, 114.3, 123.3, 123.5, 125.0, 125.1, 125.2, 129.5, 129.6, 134.8, 134.9, 157.3, 158.5, 161.0, 165.2, 168.3 ppm.

HRMS (GCMS-EI): $\text{C}_{17}\text{H}_{16}\text{ClFO}_3$: berechnet: 322.0772, gefunden: 322.0767.

4-Methoxy-6-((E)-1-(3,4-dimethoxyphenyl)prop-1-en-2-yl)-3,5-dimethyl-2H-pyran-2-on (26g)

Ein Gemisch von Phosphonat **23a** (50.0 mg, 0.16 mmol, 1.0 Äq.), LHMDS (0.19 mL, 1 M, 0.19 mmol, 1.2 Äq.) und 3,4-Dimethoxybenzaldehyd (32 mg in 2 mL trockenem THF, 0.19 mmol, 1.2 Äq.) wurde für 1.5 h in 2 mL trockenem THF refluxiert. Das Gemisch wurde auf Raumtemperatur abgekühlt und die Lösungsmittel *in vacuo* entfernt. Das Produkt wurde nach säulenchromatographischer Aufreinigung (Silikagel, Dichlormethan zu Ethylacetat/Dichlormethan = 1/19) isoliert.

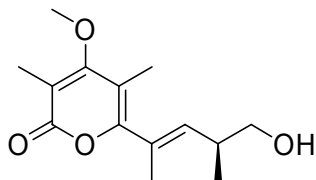
Ausbeute: 38 mg, 0.12 mmol, 73%.

GC-MS (DB_50_S): $R_t = 9.1$ min; $m/z = 330$ [M]⁺ (100%).

¹H-NMR (400MHz, CDCl₃): 2.07 (3 H, s), 2.08 (3 H, s), 2.17 (3 H, d, $J = 1.4$ Hz), 3.85 (3 H, s), 3.89 (3 H, s), 3.90 (3 H, s), 6.61 (1 H, s), 6.87 (1 H, s), 6.88 (1 H, d, $J = 6.0$ Hz), 6.95 (1 H, dd, $J = 8.5, 1.9$ Hz) ppm.

¹³C-NMR (100MHz, CDCl₃): 10.3, 12.0, 16.8, 55.89, 55.90, 60.2, 109.2, 110.2, 111.0, 112.4, 122.1, 128.0, 129.0, 134.4, 148.67, 148.69, 159.1, 165.5, 168.5 ppm.

HRMS (GCMS-EI): C₁₉H₂₂O₅: berechnet: 330.1467, gefunden: 330.1465.

6-((*S,E*)-5-Hydroxy-4-methylpent-2-en-2-yl)-4-methoxy-3,5-dimethyl-2*H*-pyran-2-on (26h)

Zu dem Phosphonat **23a** (41 mg, 0.13 mmol, 1.2 Äq.) in 3 mL trockenem THF wurde LHMDS (0.12 mL, 1 M, 0.12 mmol, 1.1 Äq.) zugegeben. Nach 5 min wurde TBS-geschütztes (*R*)-3-Hydroxy-2-methylpropanal (35 mg, 0.108 mmol, 1.0 Äq.) in 2 mL trockenem THF addiert. Nach 20 min war nach DC-Kontrolle kein Startmaterial übrig (Ethylacetat/Cyclohexan = 3/17). Das Lösungsmittel wurde *in vacuo* entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch aufgereinigt (Silikagel, Ethylacetat/Cyclohexan = 1/9).

Ausbeute: 17 mg, 34.6 μ mol, 32%.

Zu einer Lösung des TBS-geschützten α -Pyrons (17 mg, 34.6 μ mol, 1.0 Äq.) in 2 mL trockenem THF wurde TBAF (41.5 μ L, 1 M, 41.5 μ mol, 1.2 Äq.) bei Raumtemperatur hinzugegeben. Nach 1.5 h war nach DC-Kontrolle kein Startmaterial übrig (Ethylacetat/Cyclohexan = 3/7). Nach Verdünnen mit Diethylether wurden die organischen Phasen mit einer gesättigten NH_4Cl - und einer gesättigten NaCl -Lösung gewaschen und über MgSO_4 getrocknet. Die Lösungsmittel wurden *in vacuo* entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch aufgereinigt (Silikagel, Ethylacetat/Cyclohexan = 1/1).

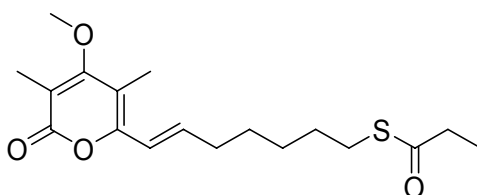
Ausbeute: 6 mg, 23.9 μ mol mmol, 69%.

8. Experimenteller Teil

$^1\text{H-NMR}$ (400MHz, CDCl_3): 1.04 (3 H, d, $J = 6.7$ Hz), 1.94 (3 H, d, $J = 1.5$ Hz), 1.98 (3 H, s), 2.05 (3 H, s), 2.72-2.83 (1 H, m), 3.50 (1 H, dd, $J = 10.5, 7.3$ Hz), 3.57 (1 H, dd, $J = 10.5, 6.0$ Hz), 3.82 (3 H, s), 5.49 (1 H, dq, $J = 9.8, 1.5$ Hz) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (100MHz, CDCl_3): 10.2, 11.9, 15.2, 16.4, 35.9, 60.2, 67.3, 109.0, 110.1, 129.1, 138.6, 158.6, 165.5, 168.5 ppm.

HRMS (LCMS-ESI): $\text{C}_{14}\text{H}_{21}\text{O}_4$: berechnet: 253.1434, gefunden: 253.1435.

**S-(6E)-7-(4-Methoxy-3,5-dimethyl-6-oxo-6H-pyran-2-yl)hept-6-enyl propanthioat
(26j)**

Ein Gemisch von Phosphonat **23b** (50.0 mg, 0.18 mmol, 1.2 Äq.) und LHMSD (0.17 mL, 1 M in THF, 0.17 mmol, 1.1 Äq.) wurde in 4 mL trockenem THF gerührt. Nach 1 min wurde S-5-Formylpentylpropanthioat (27.5 mg, 0.15 mmol, 1.0 Äq.) in 2 mL trockenem THF hinzugegeben. Nach 5 min war nach DC-Kontrolle das Startmaterial verbraucht (Ethylacetat/Cyclohexan = 2/3). Das Lösungsmittel wurde unter reduziertem Druck entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch aufgereinigt (Silikagel, Ethylacetat/Cyclohexan = 1/3).

Ausbeute: 34 mg, 0.12 mmol, 69%.

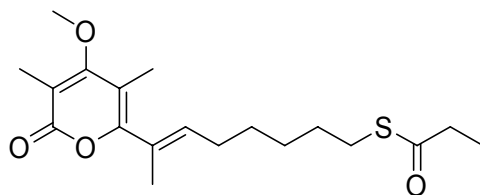
GC-MS (DB_50_S): $R_t = 9.3$ min; $m/z = 338$ $[M]^+$ (32%).

$^1\text{H-NMR}$ (400MHz, CDCl_3): 1.15 (3 H, t, $J = 7.5$ Hz), 1.36-1.51 (4 H, m), 1.53-1.61 (2 H, m), 1.97 (3 H, s), 2.03 (3 H, s), 2.22 (2 H, dq, $J = 7.5, 1.2$ Hz), 2.55 (2 H, q, $J = 7.5$ Hz), 2.85 (2 H, dd, $J = 7.4, 7.2$ Hz), 3.77 (3 H, s), 6.20 (1 H, dt, $J = 15.4, 1.5$ Hz), 6.62 (1 H, dt, $J = 15.4, 7.2$ Hz) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (100MHz, CDCl_3): 9.5, 9.7, 10.3, 28.3, 28.5, 29.4, 32.9, 37.4, 60.2, 108.8, 110.7, 118.9, 138.2, 152.5, 165.1, 168.2, 200.3 ppm.

HRMS (GCMS-EI): $\text{C}_{18}\text{H}_{26}\text{O}_4\text{S}$: berechnet: 338.1552, gefunden: 338.1545.

**S-(6E)-7-(4-Methoxy-3,5-dimethyl-6-oxo-6H-pyran-2-yl)oct-6-enyl propanthioat
(26i)**



Zu einer Lösung des Phosphonats **23a** (57 mg, 0.18 mmol, 1.2 Äq.) in 4 mL trockenem THF wurde LHMDS (0.17 mL, 1 M in THF, 0.17 mmol, 1.1 Äq.) hinzugegeben. Nach 1 min wurde S-5-Formylpentylpropanthioat (27.5 mg, 0.15 mmol, 1.0 Äq.) in 2 mL trockenem THF hinzugefügt. Nach 5 min war nach DC-Kontrolle das Startmaterial verbraucht (Ethylacetat/Cyclohexan = 2/3). Das Lösungsmittel wurde unter reduziertem Druck entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch aufgereinigt (Silikagel, Ethylacetat/Cyclohexan = 1/3).

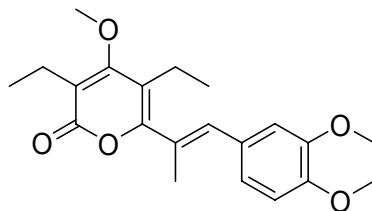
Ausbeute: 21 mg, 0.07 mmol, 41%.

GC-MS (DB_50_S): $R_t = 9.2$ min; $m/z = 352$ [M]⁺ (56%).

¹H-NMR (400MHz, CDCl₃): 1.16 (3 H, t, $J = 7.5$ Hz), 1.36-1.47 (4 H, m), 1.54-1.63 (2 H, m), 1.87 (3 H, d, $J = 1.1$ Hz), 1.96 (3 H, s), 2.03 (3 H, s), 2.17 (2 H, q, $J = 7.0$ Hz), 2.56 (2 H, q, $J = 7.5$ Hz), 2.86 (2 H, dd, $J = 7.3, 7.2$ Hz), 3.81 (3 H, s), 5.64 (1 H, tq, $J = 7.5, 1.6$ Hz) ppm.

¹³C-NMR (100MHz, CDCl₃): 9.7, 10.2, 11.9, 14.8, 28.0, 28.42, 28.43, 28.6, 29.4, 37.4, 60.2, 108.7, 109.9, 128.0, 136.3, 159.1, 165.6, 168.6, 200.3 ppm.

HRMS (GCMS-EI): C₁₉H₂₈O₄S: berechnet: 352.1708, gefunden: 352.1705.

3,5-Diethyl-4-methoxy-6-((E)-1-(3,4-dimethoxyphenyl)prop-1-en-2-yl)-2H-pyran-2-on (26k)

Ein Gemisch von Phosphonat **23c** (60.0 mg, 0.17 mmol, 1.0 Äq.), LHMDS (0.21 mL, 1 M in THF, 0.21 mmol, 1.2 Äq.) und 3,4-Dimethoxybenzaldehyd (35 mg in 2 mL trockenem THF, 0.21 mmol, 1.2 Äq.) wurde in 2 mL trockenem THF refluxiert. Das Gemisch wurde auf Raumtemperatur abgekühlt und das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt. Nach präparativer HPLC wurde das Produkt erhalten.

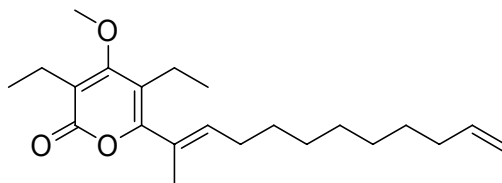
Ausbeute: 31 mg, 0.09 mmol, 51%.

GC-MS (DB_50_S): $R_t = 9.3$ min; $m/z = 358$ $[M]^+$ (100%).

$^1\text{H-NMR}$ (400MHz, CDCl_3): 1.14 (3 H, t, $J = 7.4$ Hz), 1.20 (3 H, t, $J = 7.4$ Hz), 2.16 (3 H, d, $J = 1.5$ Hz), 2.47 (2 H, q, $J = 7.4$ Hz), 2.54 (2 H, q, $J = 7.4$ Hz), 3.88 (3 H, s), 3.89 (3 H, s), 3.90 (3 H, s), 6.63 (1 H, s), 6.93 (1 H, dd, $J = 8.3, 1.9$ Hz), 6.86 (1 H, dd, $J = 2.1, 1.9$ Hz), 6.93 (1 H, dd, $J = 8.3, 1.9$ Hz) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (100MHz, CDCl_3): 13.0, 15.1, 17.1, 18.4, 19.5, 55.88, 55.89, 61.5, 111.0, 112.4, 115.5, 116.4, 122.0, 128.1, 129.0, 133.1, 148.6, 148.7, 159.5, 165.0, 168.4 ppm.

HRMS (GCMS-EI): $\text{C}_{21}\text{H}_{26}\text{O}_5$: berechnet: 358.1780, gefunden: 358.1769.

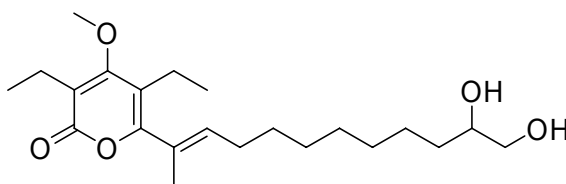
6-((E)-Dodeca-2,11-dien-2-yl)-3,5-diethyl-4-methoxy-2H-pyran-2-on (26I)

Ein Gemisch von Phosphonat **23c** (56 mg, 0.16 mmol, 1.2 Äq.), LHMDS (0.14 mL, 1 M in THF, 0.14 mmol, 1.1 Äq.) und Dec-9-enal (21 mg, 0.13 mmol, 1.0 Äq.) wurde in 2 mL trockenem THF refluxiert. Das Gemisch wurde auf Raumtemperatur abgekühlt und das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt. Das Produkt wurde nach säulenchromatographischer Aufreinigung (Silikagel, Ethylacetat/Cyclohexan = 1/9) isoliert.

Ausbeute: 27 mg, 0.09 mmol, 57%.

¹H-NMR (400MHz, CDCl₃): 1.08 (3 H, t, *J* = 7.4 Hz), 1.18 (3 H, t, *J* = 7.4 Hz), 1.28-1.45 (10 H, m), 1.87 (3 H, d, *J* = 0.9 Hz), 2.04 (2 H, dd, *J* = 14.0, 7.1 Hz), 2.15 (2 H, q, *J* = 7.3 Hz), 2.37 (2 H, q, *J* = 7.4 Hz), 2.52 (2 H, q, *J* = 7.5 Hz), 3.87 (3 H, s), 4.93 (1 H, tdd, *J* = 10.1, 2.2, 1.2 Hz), 4.99 (1 H, ddd, *J* = 17.1, 3.5, 1.8 Hz), 5.67 (1 H, tq, *J* = 7.3, 1.4 Hz), 5.81 (1 H, tdd, *J* = 16.9, 10.2, 6.7 Hz).

¹³C-NMR (100MHz, CDCl₃): 13.0, 15.1, 15.3, 18.4, 19.4, 28.1, 28.87, 28.95, 29.04, 29.22, 29.30, 33.8, 61.5, 114.2, 115.0, 116.1, 127.8, 135.3, 139.1, 159.8, 165.2, 168.5.

3,5-Diethyl-6-((E)-11,12-dihydroxydodec-2-en-2-yl)-4-methoxy-2H-pyran-2-on (27)

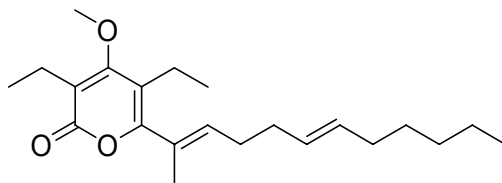
Zu einer Lösung des α -Pyrons **18I** (21 mg, 60.61 μmol , 1.0 Äq.) in 4 mL eines Aceton/Wasser-Gemisches (3/1) wurde NMO (9 mg, 72.3 μmol , 1.2 Äq.) hinzugefügt. Es wurde OsO_4 hinzugegeben (3.9 μL , 4%-ige Lösung in Wasser, 0.61 μmol , 0.01 Äq.). Nach 40 h rühren bei Raumtemperatur wurden die Lösungsmittel *in vacuo* entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch (Silikagel, Ethylacetat/Cyclohexan = 9/1) aufgereinigt.

Ausbeute: 16 mg, 42.43 μmol , 70%.

$^1\text{H-NMR}$ (400MHz, CDCl_3): 1.08 (3 H, t, $J = 7.4$ Hz), 1.18 (3 H, t, $J = 7.4$ Hz), 1.28-1.35 (6 H, m), 1.38-1.48 (6 H, m), 1.87 (3 H, d, $J = 1.4$ Hz), 2.15 (2 H, q, $J = 7.2$ Hz), 2.36 (2 H, q, $J = 7.4$ Hz), 2.51 (2 H, q, $J = 7.5$ Hz), 3.43 (1 H, dd, $J = 10.9, 7.6$ Hz), 3.66 (1 H, dd, $J = 10.9, 3.1$ Hz), 3.68-3.74 (1 H, m), 3.87 (3 H, s), 5.66 (1 H, tq, $J = 7.3, 1.4$ Hz) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (100MHz, CDCl_3): 13.0, 15.1, 15.3, 18.4, 19.4, 25.3, 28.0, 28.8, 28.9, 29.2, 29.4, 33.1, 61.5, 66.8, 72.2, 115.1, 116.1, 127.8, 135.3, 159.8, 165.4, 168.6 ppm.

HRMS (LCMS-ESI): $\text{C}_{22}\text{H}_{37}\text{O}_5$: berechnet: 381.2641, gefunden: 381.2632.

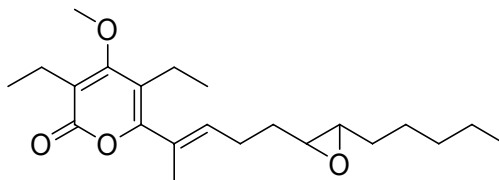
6-((2E,6E)-Dodeca-2,6-dien-2-yl)-3,5-diethyl-4-methoxy-2H-pyran-2-on (26m)

Ein Gemisch von Phosphonat **23c** (80 mg, 0.23 mmol, 1.2 Äq.), LHMDS (0.21 mL, 1 M in THF, 0.21 mmol, 1.1 Äq.) und (*E*)-dec-4-enal (30 mg in 1 mL trockenem THF, 0.19 mmol, 1.0 Äq.) wurde in 2 mL trockenem THF refluxiert. Das Gemisch wurde auf Raumtemperatur abgekühlt und das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt. Das Produkt wurde nach säulenchromatographischer Aufreinigung (Silikagel, Ethylacetat/Cyclohexan = 1/9) isoliert.

Ausbeute: 43 mg, 0.15 mmol, 64%.

¹H-NMR (400MHz, CDCl₃): 0.88 (3 H, t, *J* = 6.9 Hz), 1.08 (3 H, t, *J* = 7.4 Hz), 1.18 (3 H, t, *J* = 7.4 Hz), 1.25-1.38 (6 H, M), 1.89 (3 H, d, *J* = 1.1 Hz), 2.02 (2 H, q, *J* = 6.8 Hz), 2.13-2.25 (4 h, M), 2.36 (2 H, q, *J* = 7.4 Hz), 2.52 (2 H, q, *J* = 7.5 Hz), 3.87 (3 H, s), 5.31-5.45 (1 H, m), 5.68 (1 H, tq, *J* = 7.1, 1.5 Hz) ppm.

¹³C-NMR (100MHz, CDCl₃): 14.0, 15.2, 15.3, 18.4, 19.4, 22.6, 26.6, 27.3, 28.3, 29.3, 31.5, 61.5, 115.1, 116.2, 128.2, 128.4, 131.1, 134.6, 159.6, 165.1, 168.5 ppm.

**3,5-Diethyl-4-methoxy-6-((E)-5-(3-pentylloxiran-2-yl)pent-2-en-2-yl)-2H-pyran-2-on
(28)**

Zu einer Lösung des α -Pyrons **26m** (15 mg, 43.3 μmol , 1.0 Äq.) in 2 mL Dichlormethan wurde mCPBA (14 mg, 77%, 65 μmol , 1.5 Äq.) hinzugefügt. Nach einer Stunde wurde die Reaktion durch Hinzufügen eines Tropfens Me_2S gestoppt. Das Lösungsmittel wurde unter reduziertem Druck entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch aufgereinigt (Silikagel, Ethylacetat/Cyclohexan = 1/4).

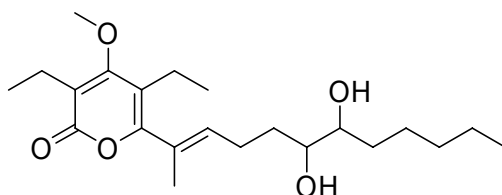
Ausbeute: 12 mg, 32.9 μmol , 76%.

GC-MS (DB_50_S): $R_t = 8.7$ min; $m/z = 362$ $[\text{M}]^+$ (14%).

$^1\text{H-NMR}$ (400MHz, CDCl_3): 0.90 (3 H, t, $J = 7.1$ Hz), 1.08 (3 H, t, $J = 7.4$ Hz), 1.18 (3 H, t, $J = 7.4$ Hz), 1.30-1.37 (4 H, m), 1.47-1.72 (6 H, m), 1.91 (3 H, s), 2.35 (2 H, q, $J = 7.4$ Hz), 2.37 (2 H, q, $J = 7.4$ Hz), 2.52 (2 H, q, $J = 7.5$ Hz), 2.91-2.96 (2 H, m), 3.87 (3 H, s), 5.72 (1 H, tq, $J = 7.6, 1.6$ Hz) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (100MHz, CDCl_3): 13.0, 14.0, 15.1, 15.4, 18.4, 19.4, 22.6, 25.4, 26.2, 27.4, 27.8, 31.7, 56.5, 57.3, 61.5, 115.2, 116.3, 128.9, 133.6, 159.2, 165.1, 168.4 ppm.

HRMS (GCMS-EI): $\text{C}_{22}\text{H}_{34}\text{O}_4$: berechnet: 362.2457, gefunden: 362.2443.

3,5-Diethyl-6-((E)-6,7-dihydroxydodec-2-en-2-yl)-4-methoxy-2H-pyran-2-on (28)

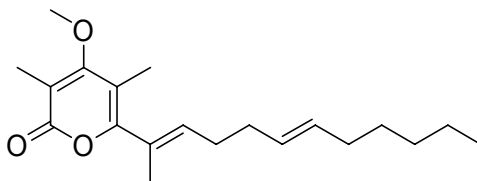
Zu einer Lösung des α -Pyrons **26m** (14 mg, 40.40 μmol , 1.0 Äq.) in 2 mL eines Aceton/Wasser-Gemisches (3:1) wurde NMO (6 mg, 48.5 μmol , 1.2 Äq.) hinzugefügt. Schließlich wurde OsO_4 hinzugegeben (1.3 μL , 4%-ige Lösung in Wasser, 0.2 μmol , 0.005 Äq.). Nach 3 h wurde weiteres OsO_4 (2.6 μL , 4%-ige Lösung in Wasser, 0.4 μmol , 0.01 Äq.). Nach 20 Stunden wurde das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch aufgereinigt (Silikagel, Ethylacetat/Cyclohexan = 1/1).

Ausbeute: 11 g, 29.09 μmol , 72%.

$^1\text{H-NMR}$ (400MHz, CDCl_3): 0.87 (3 H, t, $J = 6.3$ Hz), 1.05 (3 H, t, $J = 7.4$ Hz), 1.16 (3 H, t, $J = 7.4$ Hz), 1.23-1.34 (4 H, m), 1.37-1.60 (6 H, m), 1.89 (6 H, s), 2.26 (2 H, sept, $J = 7.5$ Hz), 2.34 (2 H, q, $J = 7.3$ Hz), 2.49 (2 H, q, $J = 7.5$ Hz), 3.56-3.63 (2 H, m), 3.85 (3 H, s), 5.67 (1 H, t, $J = 7.2$ Hz) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (100MHz, CDCl_3): 13.0, 14.0, 15.2, 15.4, 18.4, 19.4, 22.6, 24.7, 25.7, 30.2, 31.4, 31.8, 61.5, 73.9, 74.7, 115.2, 116.2, 128.6, 134.4, 159.4, 165.2, 168.5 ppm.

HRMS (LCMS-ESI): $\text{C}_{22}\text{H}_{37}\text{O}_5$: berechnet: 381.2641, gefunden: 381.2637.

6-((2E,6E)-Dodeca-2,6-dien-2-yl)-4-methoxy-3,5-dimethyl-2H-pyran-2-on (26n)

Ein Gemisch von Phosphonat **23a** (71 mg, 0.23 mmol, 1.2 Äq.), LHMDs (0.21 mL, 1 M, 0.21 mmol, 1.1 Äq.) und (*E*)-Dec-4-enal (30 mg in 1 mL trockenem THF, 0.19 mmol, 1.0 Äq.) wurde für 1.5 h in 2 mL trockenem THF refluxiert. Das Gemisch wurde auf Raumtemperatur abgekühlt und das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt. Das Zielprodukt wurde nach säulenchromatographischer Aufreinigung (Silikagel, Ethylacetat/Cyclohexan = 3/17) isoliert.

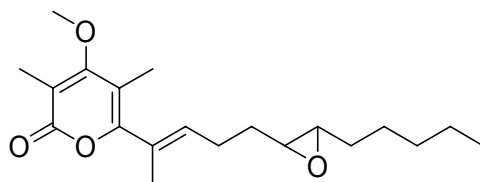
Ausbeute: 41 mg, 0.15 mmol, 66%.

GC-MS (DB_50_S): $R_t = 7.8$ min; $m/z = 318$ $[M]^+$ (20%).

$^1\text{H-NMR}$ (400MHz, CDCl_3): 0.87 (3 H, t, $J = 6.9$ Hz), 1.24-1.38 (6 H, m), 1.89 (3 H, td, $J = 1.6, 0.9$ Hz), 1.97 (3 H, s), 1.98-2.04 (2 H, m), 2.04 (3 H, s), 2.14-2.27 (4 H, m), 3.81 (3 H, s), 5.32-5.45 (2 H, m), 5.67 (1 H, tq, $J = 7.2, 1.4$ Hz) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (100MHz, CDCl_3): 10.2, 11.9, 14.0, 14.9, 22.5, 26.6, 27.2, 28.4, 29.3, 31.5, 60.1, 108.7, 109.9, 128.1, 128.3, 131.1, 136.0, 159.0, 165.6, 168.6 ppm.

HRMS (GCMS-EI): $\text{C}_{20}\text{H}_{30}\text{O}_3$: berechnet: 318.2195, gefunden: 318.2184.

4-Methoxy-3,5-dimethyl-6-((E)-5-(3-pentyloxiran-2-yl)pent-2-en-2-yl)-2H-pyran-2-on (30a)

Zu einer Lösung von **26n** (29 mg, 0.09 mmol, 1.0 Äq.) in 4 mL Dichlormethan wurde mCPBA (31 mg, 77%, 0.14 mmol, 1.5 Äq.) bei Raumtemperatur hinzugefügt. Nach einer Stunde war kein Startmaterial mehr *via* DC zu detektieren (Ethylacetat/Cyclohexan = 3/7). Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch aufgereinigt (Silikagel, Ethylacetat/Cyclohexan = 1/3).

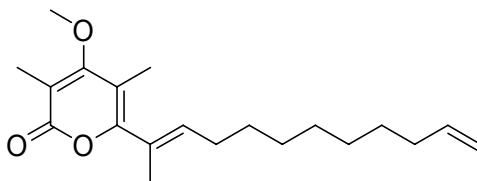
Ausbeute: 22 mg, 0.06 mmol, 72%.

GC-MS (DB_50_S): $R_t = 8.6$ min; $m/z = 334$ $[M]^+$ (17%).

$^1\text{H-NMR}$ (400MHz, CDCl_3): 0.90 (3 H, t, $J = 7.1$ Hz), 1.30-1.36 (4 H, m), 1.48-1.73 (6 H, m), 1.92 (3 H, td, $J = 1.5, 0.8$ Hz), 1.98 (3 H, s), 2.04 (3 H, s), 2.37 (2 H, q, $J = 8.3, 8.0$ Hz), 2.91-2.96 (2 H, m), 3.82 (3 H, s), 5.72 (1 H, tq, $J = 7.3, 1.4$ Hz) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (100MHz, CDCl_3): 10.2, 11.8, 14.0, 14.9, 22.6, 25.5, 26.2, 27.3, 27.8, 31.7, 56.5, 57.3, 60.2, 108.9, 110.1, 128.8, 135.0, 158.7, 165.5, 168.5 ppm.

HRMS (GCMS-EI): $\text{C}_{20}\text{H}_{30}\text{O}_4$: berechnet: 334.2144, gefunden: 334.2134.

6-((E)-Dodeca-2,11-dien-2-yl)-4-methoxy-3,5-dimethyl-2H-pyran-2-on (26o)

Ein Gemisch von Phosphonat **23a** (50 mg, 0.16 mmol, 1.2 Äq.), LHMDs (0.14 mL, 1 M, 0.14 mmol, 1.1 Äq.) und Dec-9-enal (21 mg, 0.13 mmol, 1.0 Äq.) wurde für 1.5 h in 2 mL trockenem THF refluxiert. Das Gemisch wurde auf Raumtemperatur abgekühlt und das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt. Das Produkt wurde nach säulenchromatographischer Aufreinigung (Silikagel, Ethylacetat/Cyclohexan = 3/17) isoliert.

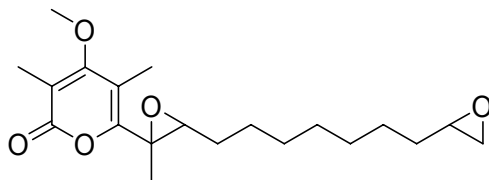
Ausbeute: 28 mg, 0.10 mmol, 65%.

GC-MS (DB_50_S): $R_t = 7.9$ min; $m/z = 318$ $[M]^+$ (9%).

$^1\text{H-NMR}$ (400MHz, CDCl_3): 1.27-1.46 (10 H, m), 1.88 (3 H, td, $J = 1.7, 0.9$ Hz), 1.97 (3 H, s), 2.02-2.06 (2 H, m), 2.04 (3 H, s), 2.16 (2 H, q, $J = 7.2$ Hz), 3.81 (3 H, s), 4.93 (1 H, tdd, $J = 10.2, 2.3, 1.2$ Hz), 4.99 (1 H, ddd, $J = 17.1, 3.7, 1.6$ Hz) 5.66 (1 H, tq, $J = 7.4, 1.3$ Hz), 5.81 (1 H, tdd, $J = 16.9, 10.2, 6.7$ Hz) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (100MHz, CDCl_3): 10.2, 11.9, 14.8, 28.2, 28.87, 28.94, 29.0, 29.27, 29.30, 33.7, 60.1, 108.7, 109.9, 114.2, 127.7, 136.8, 139.1, 159.2, 165.6, 168.6 ppm.

HRMS (GCMS-EI): $\text{C}_{20}\text{H}_{30}\text{O}_3$: berechnet: 318.2195, gefunden: 318.2174.

4-Methoxy-3,5-dimethyl-6-(2-methyl-3-(7-(oxiran-2-yl)heptyl)oxiran-2-yl)-2H-pyran-2-on (29)

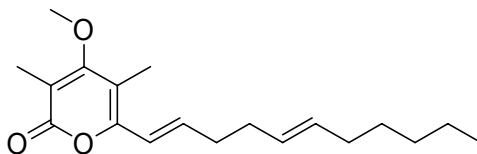
Eine Lösung des α -Pyrons **26o** (20 mg, 62.80 μmol , 1.0 Äq.) wurde bei 0 °C mit mCPBA (48 mg (77%), 205.08 μmol , 3.3 Äq.) in 2 mL trockenem Dichlormethan gerührt. Nach 6 h wurde das Lösungsmittel unter reduziertem Druck entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch aufgereinigt (Silikagel, Ethylacetat/Cyclohexan = 1/3).

Ausbeute: 9 mg, 0.03 mmol, 41%.

$^1\text{H-NMR}$ (400MHz, CDCl_3): 1.32-1.57 (14 H, m), 1.52 (3 H, s), 2.01 (3 H, s), 2.03 (3 H, s), 2.46 (1 H, dd, $J = 5.0, 2.8$ Hz), 2.74 (1 H, dd, $J = 5.0, 4.0$ Hz), 2.88-2.93 (1 H, m), 3.03 (1 H, dd, $J = 6.5, 4.8$ Hz), 3.81 (3 H, s) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (100MHz, CDCl_3): 9.2, 10.3, 16.5, 25.9, 26.3, 28.1, 29.3, 29.4, 30.9, 32.5, 47.1, 52.3, 58.7, 60.3, 62.5, 110.2, 110.9, 156.7, 165.1, 168.0 ppm.

HRMS (LCMS-ESI): $\text{C}_{20}\text{H}_{31}\text{O}_5$: berechnet: 351.2166, gefunden: 351.2169.

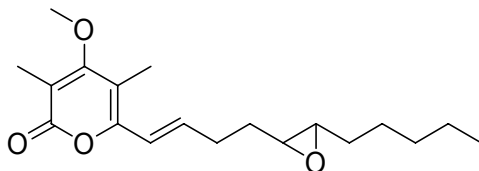
4-Methoxy-3,5-dimethyl-6-((1E,5E)-undeca-1,5-dienyl)-2H-pyran-2-on (26q)

Ein Gemisch von Phosphonat **23b** (64 mg, 0.23 mmol, 1.0 Äq.), LHMDS (0.21 mL, 1 M, 0.21 mmol, 1.1 Äq.) und (*E*)-dec-4-enal (30 mg in 1 mL trockenem THF, 0.19 mmol, 1.0 Äq.) wurde für 1.5 h in 2 mL trockenem THF refluxiert. Das Gemisch wurde auf Raumtemperatur abgekühlt und das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt. Das Produkt wurde nach säulenchromatographischer Aufreinigung (Silikagel, Ethylacetat/Cyclohexan = 3/17) isoliert.

Ausbeute: 47 mg, 0.18 mmol, 79%.

¹H-NMR (400MHz, CDCl₃): 0.87 (3 H, t, *J* = 6.9 Hz), 1.24-1.37 (6 H, m), 1.98 (3 H, s), 1.99-2.05 (2 H, m), 2.04 (3 H, s), 2.16-2.32 (4 H, m), 3.78 (3 H, s), 5.31-5.45 (2 H, m), 6.23 (1 H, dt, *J* = 15.3, 1.4 Hz), 6.66 (1 H, dt, *J* = 15.3, 6.9 Hz) ppm.

¹³C-NMR (100MHz, CDCl₃): 9.5, 10.3, 14.0, 22.5, 26.6, 27.2, 29.3, 31.5, 33.3, 60.2, 108.8, 110.8, 119.0, 128.1, 131.1, 138.0, 152.5, 165.1, 168.2 ppm.

**4-Methoxy-3,5-dimethyl-6-((E)-4-(3-pentyloxiran-2-yl)but-1-enyl)-2H-pyran-2-on
(30b)**

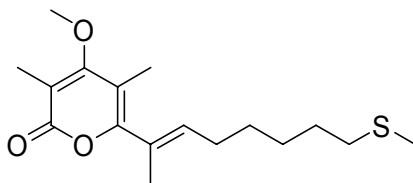
Zu einer Lösung des α -Pyrons **26q** (15 mg, 47.1 μmol , 1.0 Äq.) in 2 mL Dichlormethan wurde mCPBA (15 mg, 77%, 70.7 μmol , 1.5 Äq.) hinzugefügt. Nach 1 h wurde die Reaktion durch hinzufügen eines Tropfens Me_2S gestoppt. Das Lösungsmittel wurde unter reduziertem Druck entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch aufgereinigt (Silikagel, Ethylacetat/Cyclohexan = 1/3).

Ausbeute: 8 mg, 24.0 μmol , 51%.

$^1\text{H-NMR}$ (400MHz, CDCl_3): 0.90 (3 H, t, $J = 7.1$ Hz), 1.29-1.37 (4 H, m), 1.45-1.77 (6 H, m), 1.99 (3 H, s), 2.05 (3 H, s), 2.33-2.50 (2 H, m), 2.91-2.97 (2 H, m), 3.79 (3 H, s), 6.29 (1 H, dt, $J = 15.4, 1.5$ Hz), 6.67 (1 H, dt, $J = 15.1, 7.3$ Hz) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (100MHz, CDCl_3): 9.5, 10.3, 14.0, 22.6, 26.2, 27.4, 27.8, 30.2, 31.7, 56.4, 57.4, 60.2, 109.2, 111.0, 119.5, 136.9, 152.2, 165.0, 168.2 ppm.

HRMS (LCMS-ESI): $\text{C}_{19}\text{H}_{29}\text{O}_4$: berechnet: 320.2066, gefunden: 321.2062.

4-Methoxy-3,5-dimethyl-6-((E)-8-(methylthio)oct-2-en-2-yl)-2H-pyran-2-on (26s)

Zu einer Lösung 6-(Methylthio)hexanal (77 mg, 0.53 mmol, 1.0 Äq.) in 4 mL trockenem THF wurde das Phosphonats **23a** (202 mg, 0.64 mmol, 1.2 Äq.) und LHMDS (0.58 mL, 1 M in THF, 0.58 mmol, 1.1 Äq.) in 8 mL trockenem THF gegeben. Nach 5 min war nach DC-Kontrolle das Startmaterial verbraucht (Ethylacetat/Cyclohexan = 2/3). Das Lösungsmittel wurde unter reduziertem Druck entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch aufgereinigt (Silikagel, Ethylacetat/Cyclohexan = 1/3).

Ausbeute: 51 mg, 0.20 mmol, 31%.

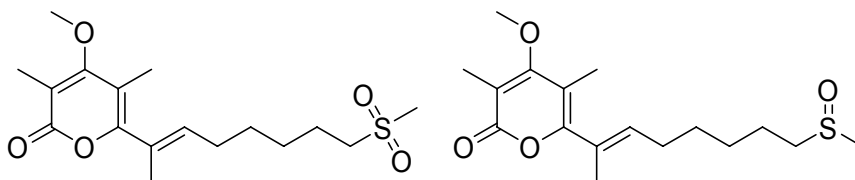
GC-MS (DB_50_S): $R_t = 8.2$ min; $m/z = 310$ $[M]^+$ (50%).

$^1\text{H-NMR}$ (400MHz, CDCl_3): 1.37-1.46 (4 H, m), 1.55-1.63 (2 H, m), 1.86 (3 H, s), 1.95 (3 H, s), 2.02 (3 H, s), 2.07 (3 H, s), 2.16 (2 H, q, $J = 6.3$ Hz), 2.47 (2 H, t, $J = 7.3$ Hz), 3.79 (3 H, s), 5.64 (1 H, t, $J = 7.1$ Hz) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (100MHz, CDCl_3): 10.2, 11.9, 14.8, 15.6, 28.1, 28.4, 28.6, 28.9, 34.2, 60.2, 108.7, 109.9, 127.9, 136.4, 159.1, 165.6, 168.6 ppm.

HRMS (GCMS-EI): $\text{C}_{17}\text{H}_{26}\text{O}_3\text{S}$: berechnet: 310.1603, gefunden: 310.1604.

4-Methoxy-3,5-dimethyl-6-((E)-8-(methylsulfonyl)oct-2-en-2-yl)-2H-pyran-2-on (31a) / 4-Methoxy-3,5-dimethyl-6-((E)-8-(methylsulfinyl)oct-2-en-2-yl)-2H-pyran-2-on (32a)



Zu einer Lösung des Sulfids **26s** (31 mg, 0.1 mmol, 1.0 Äq.) in 2 mL Dichlormethan wurde mCPBA (35 mg, 70%, 0.14 mmol, 1.4 Äq.) zugegeben. Nach 5 min. war nach DC-Kontrolle das Startmaterial verbraucht (Ethylacetat/Cyclohexan = 3/7). Das Lösungsmittel wurde unter reduziertem Druck entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch aufgereinigt. Zunächst wurde **31a** abgetrennt (Silikagel, Methanol/Ethylacetat/Cyclohexan = 1/11/13). Dann wurde **32a** aufgereinigt (Silikagel, Methanol/Ethylacetat = 1/4).

4-Methoxy-3,5-dimethyl-6-((E)-8-(methylsulfonyl)oct-2-en-2-yl)-2H-pyran-2-on (**31a**):

Ausbeute: 11 mg, 0.03 mmol, 29%.

¹H-NMR (400MHz, CDCl₃): 1.47-1.52 (4 H, m), 1.84-1.92 (2 H, m), 1.88 (3 H, s), 1.96 (3 H, s), 2.04 (3 H, s), 2.20 (2 H, q, *J* = 7.0 Hz), 2.90 (3 H, s), 2.98-3.03 (2 H, m), 3.82 (3 H, s), 5.64 (1 H, tq, *J* = 7.4, 1.4 Hz) ppm.

¹³C-NMR (100MHz, CDCl₃): 10.2, 11.8, 14.9, 22.3, 27.8, 28.1, 28.4, 40.6, 54.7, 60.2, 108.8, 110.0, 128.5, 135.6, 158.8, 165.6, 168.5 ppm.

HRMS (LCMS-ESI): C₁₇H₂₇O₅S: berechnet: 342.1571, gefunden: 342.1575.

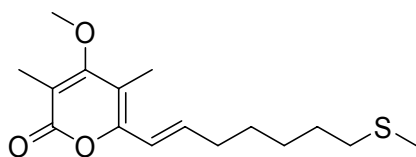
4-Methoxy-3,5-dimethyl-6-((*E*)-8-(methylsulfinyl)oct-2-en-2-yl)-2*H*-pyran-2-on (**32a**):

Ausbeute: 13 g, 0.04 mmol, 40%.

¹H-NMR (400MHz, CDCl₃): 1.42-1.52 (4 H, m), 1.73-1.82 (2 H, m), 1.85 (3 H, s), 1.94 (3 H, s), 2.02 (3 H, s), 2.18 (2 H, q, *J* = 6.3 Hz), 2.55 (3 H, s), 2.59-2.76 (2 H, m), 3.80 (3 H, s), 5.62 (1 H, t, *J* = 7.0 Hz) ppm.

¹³C-NMR (100MHz, CDCl₃): 10.2, 11.9, 14.9, 22.5, 27.9, 28.4, 28.6, 38.6, 54.5, 60.2, 108.8, 110.0, 128.2, 135.9, 158.9, 165.6, 168.6 ppm.

HRMS (LCMS-ESI): C₁₇H₂₇O₄S: berechnet: 326.1622, gefunden: 326. 1626.

4-Methoxy-3,5-dimethyl-6-((E)-7-(methylthio)hept-1-enyl)-2H-pyran-2-on (26t)

Zu einer Lösung 6-(Methylthio)hexanal (77 mg, 0.53 mmol, 1.0 Äq.) in 4 mL trockenem THF wurde das Phosphonat **23b** (177 mg, 0.64 mmol, 1.2 Äq.) und LHMDS (0.58 mL, 1 M in THF, 0.58 mmol, 1.1 Äq.) in 8 mL trockenem THF gegeben. Nach 5 min war nach DC-Kontrolle das Startmaterial verbraucht (Ethylacetat/Cyclohexan = 2/3). Das Lösungsmittel wurde unter reduziertem Druck entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch aufgereinigt (Silikagel, Ethylacetat/Cyclohexan = 1/4).

Ausbeute: 69 g, 0.28 mmol, 44%.

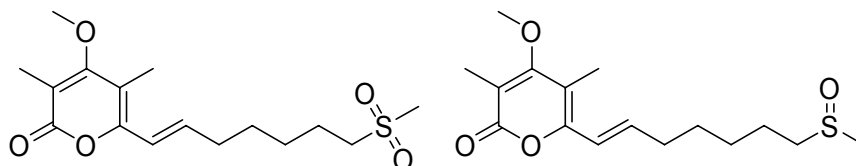
GC-MS (DB_50_S): $R_t = 8.2$ min; $m/z = 296$ $[M]^+$ (53%).

$^1\text{H-NMR}$ (400MHz, CDCl_3): 1.36-1.50 (4 H, m), 1.54-1.63 (2 H, m), 1.96 (3 H, s), 2.02 (3 H, s), 2.07 (3 H, s), 2.22 (2 H, q, $J = 7.0$ Hz), 2.47 (2 H, t, $J = 7.3$ Hz), 3.76 (3 H, s), 6.20 (1 H, d, $J = 15.4$ Hz), 6.63 (1 H, dt, $J = 15.4, 7.3$ Hz) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (100MHz, CDCl_3): 9.5, 10.3, 15.6, 28.3, 28.5, 28.9, 33.0, 34.1, 60.2, 108.8, 110.7, 118.8, 138.4, 152.5, 165.2, 168.3 ppm.

HRMS (GCMS-EI): $\text{C}_{16}\text{H}_{24}\text{O}_3\text{S}$: berechnet: 296.1446, gefunden: 296.1439.

4-Methoxy-3,5-dimethyl-6-((E)-7-(methylsulfonyl)hept-1-enyl)-2H-pyran-2-on (31b) / 4-Methoxy-3,5-dimethyl-6-((E)-7-(methylsulfinyl)hept-1-enyl)-2H-pyran-2-on (32b)



Zu einer Lösung des Sulfids **26t** (39 mg, 0.13 mmol, 1.0 Äq.) in 2 mL Dichlormethan wurde mCPBA (45 mg, 70%, 0.18 mmol, 1.4 Äq.) zugegeben. Nach 5 min. war nach DC-Kontrolle das Startmaterial verbraucht (Ethylacetat/Cyclohexan = 3/7). Das Lösungsmittel wurde unter reduziertem Druck entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch aufgereinigt. Zunächst wurde **31b** abgetrennt (Silikagel, Methanol/Ethylacetat/Cyclohexan = 1/11/13). Dann wurde **32b** aufgereinigt (Silikagel, Methanol/Ethylacetat = 1/4).

4-Methoxy-3,5-dimethyl-6-((E)-7-(methylsulfonyl)hept-1-enyl)-2H-pyran-2-on (**31b**):

Ausbeute: 14 mg, 0.04 mmol, 32%.

¹H-NMR (400MHz, CDCl₃): 1.49-1.55 (4 H, m), 1.83-1.92 (2 H, m), 1.98 (3 H, s), 2.05 (3 H, s), 2.26 (2 H, q, *J* = 6.9 Hz), 2.90 (3 H, s), 2.98-3.03 (2 H, m), 3.79 (3 H, s), 6.23 (1 H, dt, *J* = 15.4, 1.5 Hz), 6.62 (1 H, dt, *J* = 15.4, 7.2 Hz) ppm.

¹³C-NMR (100MHz, CDCl₃): 9.5, 10.3, 22.2, 27.9, 28.3, 32.6, 40.5, 54.7, 60.2, 109.1, 110.9, 119.3, 137.5, 152.3, 165.1, 168.2 ppm.

HRMS (LCMS-ESI): C₁₆H₂₅O₅S: 329.1414, found: 329.1418.

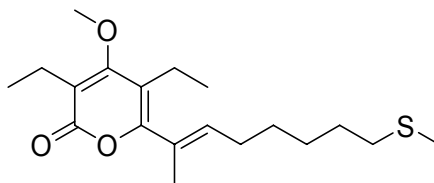
4-Methoxy-3,5-dimethyl-6-((*E*)-7-(methylsulfinyl)hept-1-enyl)-2*H*-pyran-2-on (**32b**):

Ausbeute: 15 mg, 0.05 mmol, 38%.

¹H-NMR (400MHz, CDCl₃): 1.41-1.54 (4 H, m), 1.71-1.81 (2 H, m), 1.95 (3 H, s), 2.01 (3 H, s), 2.23 (2 H, q, *J* = 6.2 Hz), 2.54 (3 H, s), 2.58-2.75 (2 H, m), 3.76 (3 H, s), 6.20 (1 H, d, *J* = 15.4 Hz), 6.60 (1 H, dt, *J* = 15.4, 7.2 Hz) ppm.

¹³C-NMR (100MHz, CDCl₃): 9.5, 10.3, 22.4, 28.2, 28.4, 32.7, 38.6, 54.5, 60.2, 109.0, 110.8, 119.1, 137.8, 152.3, 165.1, 168.2 ppm.

HRMS (LCMS-ESI): C₁₆H₂₅O₄S: berechnet: 313.1465, gefunden: 313.1469.

3,5-Diethyl-4-methoxy-6-((E)-8-(methylthio)oct-2-en-2-yl)-2H-pyran-2-on (26u)

Zu einer Lösung 6-(Methylthio)hexanal (77 mg, 0.53 mmol, 1.0 Äq.) in 4 mL trockenem THF wurde das Phosphonat **23c** (221 mg, 0.64 mmol, 1.2 Äq.) und LHMDS (0.58 mL, 1 M in THF, 0.58 mmol, 1.1 Äq.) in 8 mL trockenem THF gegeben. Nach 5 min war nach DC-Kontrolle das Startmaterial verbraucht (Ethylacetat/Cyclohexan = 2/3). Das Lösungsmittel wurde unter reduziertem Druck entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch aufgereinigt (Silikagel, Ethylacetat/Cyclohexan = 1/4).

Ausbeute: 60 mg, 0.22 mmol, 34%.

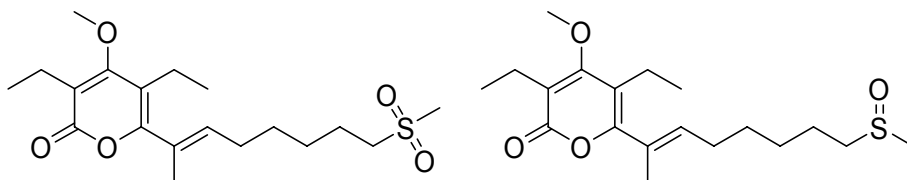
GC-MS (DB_50_S): $R_t = 8.4$ min; $m/z = 338$ [M]⁺ (45%).

¹H-NMR (400MHz, CDCl₃): 1.06 (3 H, t, $J = 7.4$ Hz), 1.16 (3 H, t, $J = 7.4$ Hz), 1.37-1.44 (4 H, m), 1.55-1.63 (2 H, m), 1.85 (3 H, s), 2.07 (3 H, s), 2.14 (2 H, q, $J = 6.7$ Hz), 2.34 (2 H, q, $J = 7.3$ Hz), 2.44-2.52 (4 H, m), 3.85 (3 H, s), 5.64 (1 H, t, $J = 7.3$ Hz) ppm.

¹³C-NMR (100MHz, CDCl₃): 13.0, 15.2, 15.3, 15.6, 18.4, 19.4, 28.0, 28.4, 28.6, 29.0, 34.2, 61.5, 115.1, 116.1, 128.0, 134.9, 159.6, 165.2, 168.5 ppm.

HRMS (GCMS-EI): C₁₉H₃₀O₃S: berechnet: 338.1916, gefunden: 338.1912.

3,5-Diethyl-4-methoxy-6-((E)-8-(methylsulfonyl)oct-2-en-2-yl)-2H-pyran-2-on (31c) / 3,5-Diethyl-4-methoxy-6-((E)-8-(methylsulfinyl)oct-2-en-2-yl)-2H-pyran-2-on (32c)



Zu einer Lösung des Sulfids **23u** (15 mg, 44.3 μmol , 1.0 Äq.) in 1 mL Dichlormethan wurde mCPBA (13 mg, 70%, 61.4 μmol , 1.4 Äq.) zugegeben. Nach 5 min. war nach DC-Kontrolle das Startmaterial verbraucht (Ethylacetat/Cyclohexan = 3/7). Das Lösungsmittel wurde unter reduziertem Druck entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch aufgereinigt. Zunächst wurde **31c** abgetrennt (Silikagel, Methanol/Ethylacetat/Cyclohexan = 1/9/15). Dann wurde **32c** aufgereinigt (Silikagel, Methanol/Ethylacetat/Cyclohexan = 1/13/6).

3,5-Diethyl-4-methoxy-6-((E)-8-(methylsulfonyl)oct-2-en-2-yl)-2H-pyran-2-on (**31c**):

Ausbeute: 5 mg, 14.18 μmol , 32%.

$^1\text{H-NMR}$ (ppm): 1.08 (3 H, t, $J = 7.4$ Hz), 1.18 (3 H, t, $J = 7.4$ Hz), 1.47-1.53 (4 H, m), 1.84-1.93 (2 H, m), 1.88 (3 H, s), 2.19 (2 H, q, $J = 6.5$ Hz), 2.36 (2 H, q, $J = 7.4$ Hz), 2.52 (2 H, q, $J = 7.4$ Hz), 2.90 (3 H, s), 2.98-3.04 (2 H, m), 3.88 (3 H, s), 5.65 (1 H, tq, $J = 7.5, 1.6$ Hz).

$^{13}\text{C-NMR}$ (ppm): 13.0, 15.2, 15.4, 18.4, 19.4, 22.3, 27.7, 28.0, 28.5, 40.6, 54.7, 61.5, 115.1, 116.2, 128.6, 134.2, 159.4, 165.1, 168.4.

HRMS (LCMS-ESI): $\text{C}_{19}\text{H}_{31}\text{O}_5\text{S}$: berechnet: 371.1887, gefunden: 371.1884.

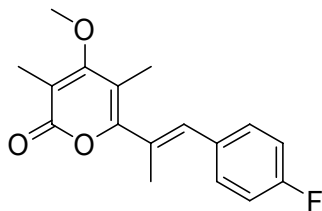
3,5-Diethyl-4-methoxy-6-((*E*)-8-(methylsulfinyl)oct-2-en-2-yl)-2*H*-pyran-2-on (**32c**):

Ausbeute: 6 mg, 17.23 μmol , 39%.

$^1\text{H-NMR}$ (ppm): 1.08 (3 H, t, $J = 7.4$ Hz), 1.18 (3 H, t, $J = 7.4$ Hz), 1.46-1.53 (4 H, m), 1.75-1.84 (2 H, m), 1.88 (3 H, s), 2.19 (2 H, q, $J = 7.0$ Hz), 2.36 (2 H, q, $J = 7.4$ Hz), 2.52 (2 H, q, $J = 7.5$ Hz), 2.57 (3 H, s), 2.62-2.79 (2 H, m), 3.87 (3 H, s), 5.65 (1 H, tq, $J = 7.3, 1.4$ Hz).

$^{13}\text{C-NMR}$ (ppm): 13.0, 15.2, 15.4, 18.4, 19.4, 22.5, 27.8, 28.4, 28.6, 38.6, 54.6, 61.5, 115.1, 116.2, 128.4, 134.5, 159.5, 165.2, 168.5.

HRMS (LCMS-ESI): $\text{C}_{19}\text{H}_{31}\text{O}_4\text{S}$: berechnet: 355.1935, gefunden: 355.1941.

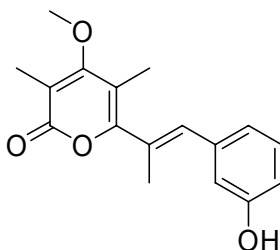
**6-((E)-1-(4-Fluorophenyl)prop-1-en-2-yl)-4-methoxy-3,5-dimethyl-2H-pyran-2-on
(26v)**

Ein Gemisch von Phosphonat **23a** (50.0 mg, 0.16 mmol, 1.0 Äq.), LHMDS (0.19 mL, 1 M, 0.19 mmol, 1.2 Äq.) und 4-Fluorobenzaldehyd (23.3 mg in 2 mL trockenem THF, 0.19 mmol, 1.2 Äq.) wurde für 1.5 h in 2 mL trockenem THF refluxiert. Das Gemisch wurde auf Raumtemperatur abgekühlt und die Lösungsmittel *in vacuo* entfernt. Das Produkt wurde nach präparativer HPLC isoliert.

Ausbeute: 18 mg, 0.06 mmol, 40%.

GC-MS (DB_50_S): $R_t = 7.3$ min; $m/z = 288$ $[M]^+$, (100%).

$^1\text{H-NMR}$ (400MHz, CDCl_3): 1.89 (3 H, s), 2.10 (3 H, t, $J = 1.3$ Hz), 2.11 (3 H, s), 3.99 (3 H, s), 6.75 (1 H, s), 7.11 (1 H, ddd, $J = 9.5, 8.4, 0.9$ Hz), 7.18 (1 H, td, $J = 7.5, 0.8$ Hz), 7.29-7.34 (1 H, m), 7.38 (1 H, td, $J = 7.5, 1.3$ Hz) ppm.

6-((E)-1-(3-Hydroxyphenyl)prop-1-en-2-yl)-4-methoxy-3,5-dimethyl-2H-pyran-2-on (26w)

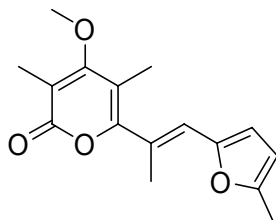
Ein Gemisch von Phosponat **23a** (50.0 mg, 0.16 mmol, 1.0 Äq.), LHMDS (0.19 mL, 1 M, 0.19 mmol, 1.2 Äq.) und 3-Hydroxybenzaldehyd (23.2 mg in 2 mL trockenem THF, 0.19 mmol, 1.2 Äq.) wurde für 1.5 h in 2 mL trockenem THF refluxiert. Das Gemisch wurde auf Raumtemperatur abgekühlt und die Lösungsmittel *in vacuo* entfernt. Das Produkt wurde nach präparativer HPLC isoliert.

Ausbeute: 10 mg, 0.03 mmol, 21%.

¹H-NMR (400MHz, CDCl₃): 2.08 (3 H, s), 2.09 (3 H, s), 2.12 (3 H, d, *J* = 1.4 Hz), 3.87 (3 H, s), 5.94 (1 H, br), 6.60 (1 H, s), 6.80 (1 H, dd, *J* = 8.0, 1.7 Hz), 6.87-6.90 (2 H, m), 7.24 (1 H, t, *J* = 7.8 Hz) ppm.

HRMS (LCMS-ESI): C₁₇H₁₉O₄ [M+H]⁺: berechnet: 287,1278, gefunden 287.1273.

4-Methoxy-3,5-dimethyl-6-((E)-1-(5-methylfuran-2-yl)prop-1-en-2-yl)-2H-pyran-2-on (26x)



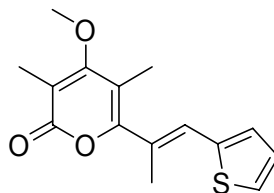
Ein Gemisch von Phosphonat **23a** (50.0 mg, 0.16 mmol, 1.0 Äq.), LHMDs (0.19 mL, 1 M, 0.19 mmol, 1.2 Äq.) und 5-Methylfuran-2-carbaldehyd (20.9 mg in 2 mL trockenem THF, 0.19 mmol, 1.2 Äq.) wurde für 1.5 h in 2 mL trockenem THF refluxiert. Das Gemisch wurde auf Raumtemperatur abgekühlt und die Lösungsmittel *in vacuo* entfernt. Das Produkt wurde nach präparativer HPLC isoliert.

Ausbeute: 16 mg, 0.06 mmol, 38%.

GC-MS (DB_50_S): $R_t = 6.9$ min; $m/z = 274$ $[M]^+$ (100%).

$^1\text{H-NMR}$ (400MHz, CDCl_3): 2.07 (6 H, s), 2.24 (3 H, s), 2.35 (3 H, s), 3.84 (3 H, s), 6.08 (1 H, d, $J = 2.6$ Hz), 6.37 (1 H, d, $J = 3.2$ Hz), 6.44 (1 H, s) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (100MHz, CDCl_3): 10.3, 12.2, 13.8, 17.1, 60.3, 108.1, 109.6, 110.2, 113.4, 122.6, 150.4, 153.1, 158.8, 168.6 ppm.

**4-Methoxy-3,5-dimethyl-6-((E)-1-(thiophen-2-yl)prop-1-en-2-yl)-2H-pyran-2-on
(26aa)**

Ein Gemisch von Phosphonat **23a** (50.0 mg, 0.16 mmol, 1.0 Äq.), LHMDS (0.19 mL, 1 M, 0.19 mmol, 1.2 Äq.) und 2-Thiophencarboxaldehyd (18 µL, 0.19 mmol, 1.2 Äq.) wurde für 1.5 h in 2 mL trockenem THF refluxiert. Das Gemisch wurde auf Raumtemperatur abgekühlt und das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt. Das Produkt wurde nach Aufreinigung *via* Säulenchromatographie (Silikagel, Cyclohexan/Dichlormethan = 1/9 zu Ethylacetat/ Dichlormethan = 1/19) isoliert.

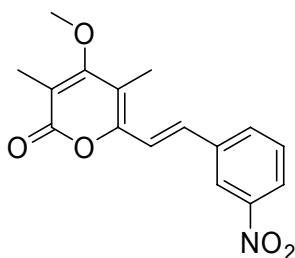
Ausbeute: 33 mg, 0.12 mmol, 76%.

GC-MS (DB_50_S): $R_t = 7.7$ min; $m/z = 276$ [M]⁺ (100%).

¹H-NMR (400MHz, CDCl₃): 2.07 (3 H, s), 2.07 (3 H, s), 2.26 (3 H, d, $J = 1.3$ Hz), 3.85 (3 H, s), 6.86 (1 H, s), 7.09 (1 H, dd, $J = 5.1, 3.6$ Hz), 7.14 (1 H, d, $J = 3.6$ Hz), 7.41 (1 H, d, $J = 5.1$ Hz) ppm.

¹³C-NMR (100MHz, CDCl₃): 10.3, 12.1, 17.4, 60.3, 109.4, 110.4, 126.6, 127.1, 127.3, 127.7, 129.5, 139.3, 158.5, 165.4, 168.5 ppm.

HRMS (GCMS-EI): C₁₅H₁₆O₃S: berechnet: 276.0820, gefunden: 276.0815.

6-(3-nitrostyryl)-4-methoxy-3,5-dimethyl-2H-pyran-2-one (26ac)

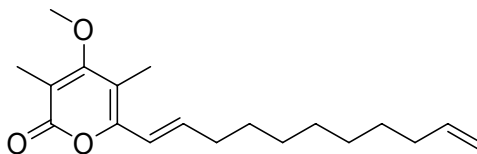
Ein Gemisch von Phosphonat **23b** (50.0 mg, 0.18 mmol, 1.0 Äq.), LHMDS (0.22 mL, 1 M, 0.22 mmol, 1.2 Äq.) und 3-Nitrobenzaldehyd (34 mg in 2 mL trockenem THF, 0.22 mmol, 1.2 Äq.) wurde für 1.5 h refluxiert. Das Gemisch wurde auf Raumtemperatur abgekühlt und das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt. Das Produkt wurde nach säulenchromatographischer Aufreinigung (Silikagel, Ethylacetat/Cyclohexan = 1/1) erhalten.

Ausbeute: 25 mg, 0.08 mmol, 46%.

GC-MS (DB_50_S): $R_t = 9.6$ min; $m/z = 301$ [M]⁺ (100%).

¹H-NMR (400MHz, CDCl₃): 2.09 (3 H, s), 2.13 (3 H, s), 3.83 (3 H, s), 7.00 (1 H, d, $J = 15.8$ Hz), 7.48 (1 H, d, $J = 15.8$ Hz), 7.54 (1 H, t, $J = 8.0$ Hz), 7.75 (1 H, d, $J = 7.7$ Hz), 8.14 (1 H, d, $J = 8.0$ Hz), 8.38 (1 H, s) ppm.

HRMS (GCMS-EI): C₁₆H₁₅NO₅: berechnet: 301.0950, gefunden: 301.0946.

4-Methoxy-3,5-dimethyl-6-((E)-undeca-1,10-dienyl)-2H-pyran-2-on (26ad)

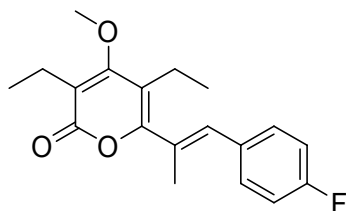
Ein Gemisch von Phosphonat **23b** (45 mg, 0.16 mmol, 1.0 Äq.), LHMDS (0.14 mL, 1 M, 0.14 mmol, 1.1 Äq.) und Dec-9-enal (21 mg in 1 mL trockenem THF, 0.13 mmol, 1.0 Äq.) wurde für 1.5 h in 2 mL trockenem THF refluxiert. Das Gemisch wurde auf Raumtemperatur abgekühlt und das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt. Das Produkt wurde nach säulenchromatographischer Aufreinigung (Silikagel, Ethylacetat/Cyclohexan = 3/17) isoliert.

Ausbeute: 34 mg, 0.13 mmol, 82%.

¹H-NMR (400MHz, CDCl₃): 1.27-1.49 (10 H, m), 1.98 (3 H, s), 2.00-2.07 (2 H, m), 2.04 (3 H, s), 2.22 (2 H, dq, *J* = 7.6, 1.2 Hz), 3.78 (3 H, s), 4.92 (1 H, tdd, *J* = 10.2, 2.3, 1.2 Hz), 4.99 (1 H, ddd, *J* = 17.1, 3.7, 1.6 Hz), 5.80 (1 H, tdd, *J* = 16.9, 10.2, 6.7 Hz), 6.21 (1 H, dt, *J* = 15.4, 1.5 Hz), 6.66 (1 H, dt, *J* = 15.2, 7.2 Hz) ppm.

¹³C-NMR (100MHz, CDCl₃): 9.5, 10.3, 28.8, 28.9, 29.0, 29.1, 29.3, 33.1, 33.8, 60.2, 108.7, 110.6, 114.1, 118.6, 138.8, 139.1, 152.7, 165.2, 168.3 ppm.

**3,5-Diethyl-6-((E)-1-(4-fluorophenyl)prop-1-en-2-yl)-4-methoxy-2H-pyran-2-on
(26ae)**



Zu einer Lösung des Pyrons **23c** (60 mg, 0.17 mmol, 1.0 Äq.) in trockenem THF (4 mL) wurde LHMDs (0.21 mL, 1 M in THF, 0.21 mmol, 1.2 Äq.) bei Raumtemperatur hinzugefügt. Dann wurde 4-Fluorobenzaldehyd zugetropft (23 μ L, 0.21 mmol, 1.2 Äq.) und die erhaltene Lösung für 2 h refluxiert. Die Lösungsmittel wurden unter vermindertem Druck entfernt und das Produkt *via* präparativer HPLC aufgereinigt.

Ausbeute: 22 mg, 0.07 mmol, 40%.

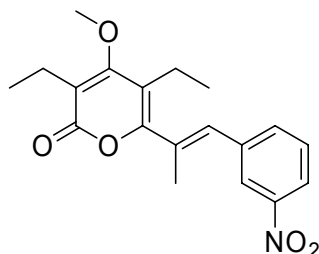
GC-MS (DB_50_S): $R_t = 7.6$ min; $m/z = 316$ $[M]^+$ (82%).

$^1\text{H-NMR}$ (400MHz, CDCl_3): 1.16 (3 H, t, $J = 7.4$ Hz), 1.21 (3 H, t, $J = 7.4$ Hz), 2.12 (3 H, d, $J = 1.5$ Hz), 2.47 (2 H, q, $J = 7.4$ Hz), 2.55 (2 H, q, $J = 7.4$ Hz), 3.91 (3 H, s), 6.65 (1 H, s), 7.06 (1 H, d, $J = 8.7$ Hz), 7.08 (1 H, d, $J = 8.7$ Hz), 7.30 (1 H, d, $J = 5.4$ Hz), 7.32 (1 H, d, $J = 5.4$ Hz) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (100MHz, CDCl_3): 13.0, 15.1, 17.0, 18.5, 19.5, 61.6, 115.3, 115.5, 115.7, 116.3, 129.7, 130.7, 130.8, 132.2, 159.1, 160.8, 163.2, 164.9, 168.3 ppm.

HRMS (GCMS-EI): $\text{C}_{19}\text{H}_{21}\text{FO}_3$: berechnet 316.1475, gefunden: 316.1471.

3,5-diethyl-4-methoxy-6-((E)-1-(3-nitrophenyl)prop-1-en-2-yl)-2H-pyran-2-on
(26af)



Ein Gemisch von Phosphonat **23c** (60.0 mg, 0.17 mmol, 1.0 Äq.), LHMDS (0.21 mL, 1 M in THF, 0.21 mmol, 1.2 Äq.) und 3-Nitrobenzaldehyd (35 mg in 2 mL trockenem THF, 0.21 mmol, 1.2 Äq.) wurde in 2 mL trockenem THF refluxiert. Das Gemisch wurde auf Raumtemperatur abgekühlt und das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt. Das Produkt wurde nach präparativer HPLC erhalten.

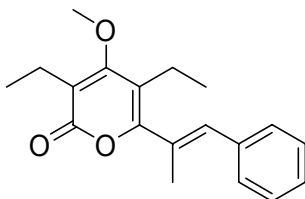
Ausbeute: 25 mg, 0.07 mmol, 43%.

GC-MS (DB_50_S): $R_t = 9.3$ min; $m/z = 343$ $[M+]^+$ (71%).

$^1\text{H-NMR}$ (400MHz, CDCl_3): 1.10 (3 H, t, $J = 7.4$ Hz), 1.15 (3 H, t, $J = 7.4$ Hz), 2.10 (3 H, d, $J = 1.5$ Hz), 2.42 (2 H, q, $J = 7.4$ Hz), 2.50 (2 H, q, $J = 7.4$ Hz), 3.86 (3 H, s), 6.66 (1 H, s), 7.50 (1 H, t, $J = 7.9$ Hz), 7.58 (1 H, dt, $J = 7.7, 1.6$ Hz), 8.09 (1 H, ddd, $J = 8.1, 2.0, 1.1$ Hz), 8.12 (1 H, t, $J = 2.0$ Hz) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (100MHz, CDCl_3): 13.0, 15.2, 17.1, 18.6, 19.5, 61.7, 116.1, 117.0, 122.3, 123.7, 129.4, 130.8, 132.8, 135.0, 137.7, 148.3, 157.9, 164.7, 168.1 ppm.

HRMS (GCMS-EI): $\text{C}_{19}\text{H}_{21}\text{NO}_5$: berechnet: 343.1420, gefunden: 343.1427.

3,5-Diethyl-4-methoxy-6-((E)-1-phenylprop-1-en-2-yl)-2H-pyran-2-on (26ag)

Ein Gemisch von Phosphonat **23c** (60.0 mg, 0.17 mmol, 1.0 Äq.), LHMDS (0.21 mL, 1 M in THF, 0.21 mmol, 1.2 Äq.) und Benzaldehyd (21 μ L, 0.21 mmol, 1.2 Äq.) wurde in 2 mL trockenem THF refluxiert. Das Gemisch wurde auf Raumtemperatur abgekühlt und das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt. Das Produkt wurde nach präparativer HPLC isoliert.

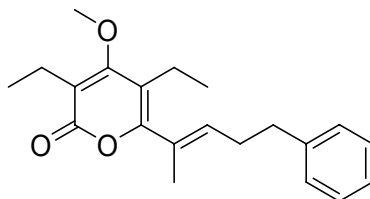
Ausbeute: 23 mg, 0.07 mmol, 44%.

GC-MS (DB_50_S): $R_t = 7.6$ min; $m/z = 298$ $[M]^+$ (81%).

$^1\text{H-NMR}$ (400MHz, CDCl_3): 1.15 (3 H, t, $J = 7.4$ Hz), 1.21 (3 H, t, $J = 7.4$ Hz), 2.15 (3 H, d, $J = 1.5$ Hz), 2.49 (2 H, q, $J = 7.4$ Hz), 2.55 (2 H, q, $J = 7.4$ Hz), 3.91 (3 H, s), 6.69 (1 H, s), 7.27-7.41 (5 H, m) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (100MHz, CDCl_3): 13.0, 15.1, 17.0, 18.5, 19.5, 61.6, 115.6, 116.6, 127.5, 128.3, 129.1, 129.7, 133.3, 136.1, 159.3, 165.0, 168.4 ppm.

HRMS (GCMS-EI): $\text{C}_{19}\text{H}_{22}\text{O}_3$: berechnet: 298.1569, gefunden: 298.1557.

3,5-Diethyl-4-methoxy-6-((E)-5-phenylpent-2-en-2-yl)-2H-pyran-2-on (26ah)

Ein Gemisch von Phosphonat **23c** (60.0 mg, 0.17 mmol, 1.0 Äq.), LHMDs (0.21 mL, 1 M in THF, 0.21 mmol, 1.2 Äq.) und 3-Phenylpropionaldehyd (28 μ L, 0.21 mmol, 1.2 Äq.) wurde in 2 mL trockenem THF refluxiert. Das Gemisch wurde auf Raumtemperatur abgekühlt und das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt. Das Produkt wurde nach präparativer HPLC isoliert.

Ausbeute: 27 mg, 0.08 mmol, 48%.

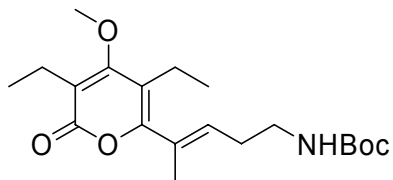
GC-MS (DB_50_S): $R_t = 8.1$ min; $m/z = 326$ $[M]^+$ (68%).

$^1\text{H-NMR}$ (400MHz, CDCl_3): 1.00 (3 H, t, $J = 7.4$ Hz), 1.18 (3 H, t, $J = 7.4$ Hz), 1.84 (3 H, d, $J = 1.4$ Hz), 2.26 (2 H, q, $J = 7.4$ Hz), 2.51 (4 H, q, $J = 7.4$ Hz), 2.75 (2 H, dd, $J = 7.5, 7.4$ Hz), 3.86 (3 H, s), 5.68 (1 H, ddd, $J = 8.7, 5.8, 1.4$ Hz), 7.18-7.22 (3 H, m), 7.27-7.31 (2 H, m) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (100MHz, CDCl_3): 13.0, 15.1, 15.3, 18.4, 19.3, 29.7, 35.0, 61.5, 115.1, 116.2, 126.0, 128.3, 128.4, 128.6, 133.9, 141.2, 159.4, 165.1, 168.5 ppm.

HRMS (GCMS-EI): $\text{C}_{21}\text{H}_{26}\text{O}_3$: berechnet 326.1882, gefunden: 326.1870.

***tert*-Butyl (3*E*)-4-(3,5-diethyl-4-methoxy-6-oxo-6*H*-pyran-2-yl)pent-3-enylcarbammat (26ai)**



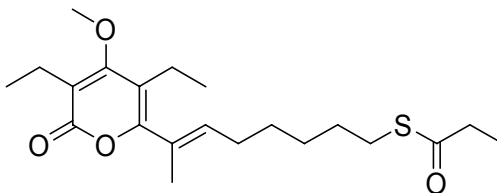
Ein Gemisch von Phosphonat **23c** (104 mg, 0.3 mmol, 1.2 Äq.), LHMDS (0.28 mL, 1 M, 0.28 mmol, 1.1 Äq.) und *tert*-Butyl 2-formylethylcarbammat (43 mg, 0.25 mmol, 1.0 Äq.) wurde in 2 mL trockenem THF refluxiert. Das Gemisch wurde auf Raumtemperatur abgekühlt und das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt. Das Produkt wurde nach säulenchromatographischer Aufreinigung (Silikagel, Ethylacetat/Cyclohexan = 3/7) isoliert.

Ausbeute: 19 mg, 0.06 mmol, 21%.

¹H-NMR (400MHz, CDCl₃): 1.01 (3 H, t, *J* = 7.4 Hz), 1.12 (3 H, t, *J* = 7.4 Hz), 1.38 (9 H, s), 1.84 (3 H, d, *J* = 1.4 Hz), 2.29 (2 H, q, *J* = 7.4 Hz), 2.31 (2 H, q, *J* = 7.1 Hz), 2.45 (2 H, q, *J* = 7.5 Hz), 3.15 (2 H, dd, *J* = 12.3, 5.8 Hz), 3.81 (3 H, s), 4.53 (1 H, br), 5.58 (1 H, tq, *J* = 7.3, 1.4 Hz) ppm.

¹³C-NMR (100MHz, CDCl₃): 13.0, 15.1, 15.5, 18.4, 19.4, 28.4, 28.8, 39.8, 61.5, 115.3, 116.3, 130.4, 131.2, 155.8, 159.0, 165.0, 168.4 ppm.

**S-(6E)-7-(3,5-Diethyl-4-methoxy-6-oxo-6H-pyran-2-yl)oct-6-enyl propanthioat
(26aj)**



Zu dem Phosphonat **23c** (62 mg, 0.18 mmol, 1.2 Äq.) in 4 mL trockenem THF wurde LHMDS (0.17 mL, 1 M in THF, 0.17 mmol, 1.1 Äq.) hinzugefügt. Nach 1 min wurde S-5-Formylpentylpropanthioat (27.5 mg, 0.15 mmol, 1.0 Äq.) in 2 mL trockenem THF hinzugegeben. Nach 5 min war nach DC-Kontrolle das Startmaterial verbraucht (Ethylacetat/Cyclohexan = 2/3). Das Lösungsmittel wurde unter reduziertem Druck entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch aufgereinigt (Silikagel, Ethylacetat/Cyclohexan = 1/4).

Ausbeute: 22 mg, 0.07 mmol, 40%.

GC-MS (DB_50_S): $R_t = 9.4$ min; $m/z = 380$ $[M]^+$ (69%).

$^1\text{H-NMR}$ (400MHz, CDCl_3): 1.05 (1 H, t, $J = 7.3$ Hz), 1.1-1.19 (6 H, m), 1.33-1.44 (4 H, m), 1.51-1.61 (2 H, m), 1.85 (3 H, s), 2.13 (2 H, q, $J = 6.8$ Hz), 2.33 (2 H, q, $J = 7.3$ Hz), 2.49 (2 H, q, $J = 7.4$ Hz), 2.54 (2 H, q, $J = 7.4$ Hz), 2.84 (2 H, t, $J = 7.3$ Hz), 3.85 (3 H, s), 5.62 (1 H, t, $J = 7.0$ Hz) ppm.

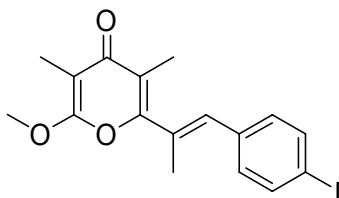
$^{13}\text{C-NMR}$ (100MHz, CDCl_3): 9.7, 13.0, 15.2, 15.3, 18.4, 19.4, 27.9, 28.41, 28.45, 28.6, 29.5, 37.4, 61.5, 115.1, 116.1, 128.0, 134.8, 159.6, 165.2, 168.5, 200.4 ppm.

HRMS (GCMS-EI): $\text{C}_{21}\text{H}_{32}\text{O}_4\text{S}$: berechnet: 380.2121, gefunden: 380.2013.

8.3 Versuche zu Kapitel 4.4 – γ -Pyrone

2-((*E*)-1-(4-Iodophenyl)prop-1-en-2-yl)-6-methoxy-3,5-dimethyl-4*H*-pyran-4-on

(25a)



Ein Gemisch von Phosphonats **22a** (60.0 mg, 0.18 mmol, 1.0 Äq.), LHMDS (0.19 mL, 1 M, 0.19 mmol, 1.1 Äq.) und 4-Iodobenzaldehyd (46 mg, 0.19 mmol, 1.1 Äq.) wurde für 1.5 h in 5 mL trockenem THF refluxiert. Das Gemisch wurde abgekühlt und die Lösungsmittel *in vacuo* entfernt. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch aufgereinigt (Silikagel, Ethylacetat/Cyclohexan = 1/1).

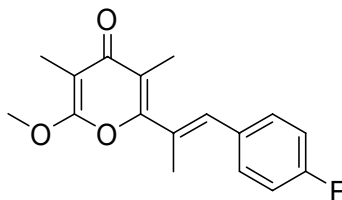
Ausbeute: 22 mg, 0.06 mmol, 35%.

GC-MS (DB_50_S): $R_t = 8.9$ min; $m/z = 396$ [M]⁺ (100%).

¹H-NMR (400MHz, CDCl₃): 1.88 (3 H, s), 2.08 (3 H, s), 2.15 (3 H, d, $J = 1.5$ Hz), 3.98 (3 H, s), 6.64 (1 H, s), 7.10 (2 H, d, $J = 8.3$ Hz), 7.73 (2 H, d, $J = 8.3$ Hz) ppm.

¹³C-NMR (100MHz, CDCl₃): 6.9, 11.9, 16.3, 55.3, 56.2, 88.5, 93.5, 99.6, 118.4, 130.8, 134.1, 137.6, 157.8, 161.9, 181.2 ppm.

HRMS (GCMS-EI): C₁₇H₁₇IO₃: berechnet: 396.0222, gefunden: 396.0217.

**2-((E)-1-(4-Fluorophenyl)prop-1-en-2-yl)-6-methoxy-3,5-dimethyl-4H-pyran-4-on
(25b)**

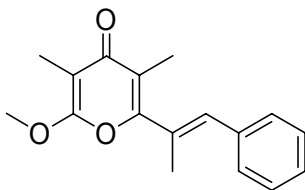
Ein Gemisch von Phosphonat **22a** (50.0 mg, 0.16 mmol, 1.0 Äq.), LHMDS (0.19 mL, 1 M, 0.19 mmol, 1.2 Äq.) und 4-Fluorobenzaldehyd (23.6 mg in 2 mL trockenem THF, 0.19 mmol, 1.2 Äq.) wurde für 1.5 h in 5 mL trockenem THF refluxiert. Das Gemisch wurde abgekühlt und die Lösungsmittel *in vacuo* entfernt. Das Produkt wurde nach präparativer HPLC isoliert.

Ausbeute: 15 mg, 0.05 mmol, 28%.

¹H-NMR (400MHz, CDCl₃): 2.09 (6 H, s), 2.12 (3 H, s), 3.87 (3 H, s), 6.67 (1 H, s), 7.10 (1 H, t, *J* = 9.2 Hz), 7.17 (1 H, t, *J* = 7.2 Hz), 7.27-7.33 (1 H, m), 7.36 (1 H, t, *J* = 7.0 Hz) ppm.

¹³C-NMR (100MHz, CDCl₃): 10.3, 12.0, 16.6, 60.3, 109.8, 110.7, 115.5, 115.7, 123.8, 127.3, 129.4, 129.5, 130.3, 130.4, 158.2, 161.2, 168.4 ppm.

HRMS (LCMS-ESI): C₁₇H₁₈O₃F: berechnet: 289.1162, gefunden: 289.1229.

2-Methoxy-3,5-dimethyl-6-((E)-1-phenylprop-1-en-2-yl)-4H-pyran-4-on (25c)

Ein Gemisch von Phosphonat **22a** (50.0 mg, 0.16 mmol, 1.0 Äq.), LHMDS (0.19 mL, 1 M, 0.19 mmol, 1.2 Äq.) und Benzaldehyd (19 μ L, 0.19 mmol, 1.2 Äq.) wurde für 1.5 h in 5 mL trockenem THF refluxiert. Das Gemisch wurde abgekühlt und das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch aufgereinigt (Silikagel, Ethylacetat/Cyclohexan = 3/7).

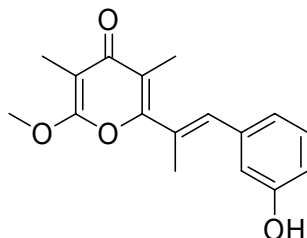
Ausbeute: 21 mg, 0.08mmol, 50%.

GC-MS (DB_50_S): $R_t = 7.4$ min; $m/z = 270$ [M]⁺ (91%).

¹H-NMR (400MHz, CDCl₃): 1.89 (1 H, s), 2.10 (1 H, s), 2.18 (1 H, d, $J=1.5$ Hz), 3.98 (1 H, s), 6.74 (1 H, d, $J=1.2$ Hz), 7.29-7.43 (6 H, m) ppm.

¹³C-NMR (100MHz, CDCl₃): 6.9, 11.9, 16.2, 55.3, 88.4, 99.5, 118.3, 127.8, 128.4, 129.1, 135.2, 135.9, 158.2, 161.9, 181.4 ppm.

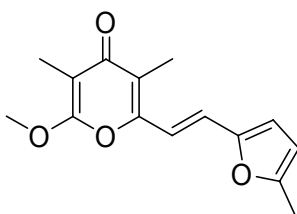
HRMS (GCMS-EI): C₁₇H₁₈O₃:berechnet: 270.1256, gefunden: 270.1250.

2-((E)-1-(3-Hydroxyphenyl)prop-1-en-2-yl)-6-methoxy-3,5-dimethyl-4H-pyran-4-on (25d)

Ein Gemisch von Phosponat **22a** (50.0 mg, 0.16 mmol, 1.0 Äq.), LHMDS (0.19 mL, 1 M, 0.19 mmol, 1.2 Äq.) und 3-Hydroxybenzaldehyd (23.4 mg in 2 mL trockenem THF, 0.19 mmol, 1.2 Äq.) wurde für 1.5 h in 5 mL trockenem THF refluxiert. Das Gemisch wurde abgekühlt und die Lösungsmittel *in vacuo* entfernt. Das Produkt wurde nach präparativer HPLC isoliert.

Ausbeute: 21 mg, 0.07 mmol, 46%.

¹H-NMR (400MHz, CDCl₃): 1.90 (3 H, s), 2.10 (3 H, s), 2.18 (3 H, d, *J* = 1.4 Hz), 3.99 (3 H, s), 5.29 (1 H, s), 6.67 (1 H, s), 6.81 (1 H, dd, *J* = 8.2, 2.1 Hz), 6.87 (1 H, s), 6.95 (1 H, d, *J* = 7.6 Hz).

2-Methoxy-3,5-dimethyl-6-((E)-2-(5-methylfuran-2-yl)vinyl)-4H-pyran-4-on (25d)

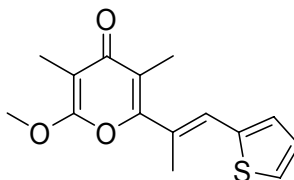
Ein Gemisch von Phosponats **22b** (50.0 mg, 0.16 mmol, 1.0 Äq.), LHMDS (0.19 mL, 1 M, 0.19 mmol, 1.2 Äq.) und 5-Methylfuran-2-carbaldehyd (20.9 mg, 0.19 mmol, 1.2 Äq.) wurde für 1.5 h in 5 mL trockenem THF refluxiert. Das Gemisch wurde abgekühlt und das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt. Das Produkt wurde nach präparativer HPLC isoliert.

Ausbeute: 29 mg, 0.11 mmol, 68%.

¹H-NMR (400MHz, CDCl₃): 1.87 (3 H, s), 2.10 (3 H, s), 2.37 (3 H, s), 4.06 (3 H, s), 6.06 (1 H, d, *J* = 3.2 Hz), 6.39 (1 H, d, *J* = 3.2 Hz), 6.84 (1 H, d, *J* = 15.7 Hz), 6.89 (1 H, d, *J* = 15.7 Hz) ppm.

¹³C-NMR (100MHz, CDCl₃): 7.0, 9.7, 13.9, 55.4, 99.5, 108.6, 113.7, 113.9, 118.6, 120.2, 150.4, 152.3, 154.4, 161.5, 180.9 ppm.

HRMS (LCMS-ESI): C₁₅H₁₇O₄: berechnet: 261.1121, gefunden: 261.1115.

**2-Methoxy-3,5-dimethyl-6-((E)-1-(thiophen-2-yl)prop-1-en-2-yl)-4H-pyran-4-on
(25e)**

Ein Gemisch von Phosphonat **22a** (60.0 mg, 0.18 mmol, 1.0 Äq.), LHMDS (0.19 mL, 1 M, 0.19 mmol, 1.1 Äq.) und Thiophen-2-carbaldehyd (18 μ L, 0.19 mmol, 1.1 Äq.) wurde für 1.5 h in 5 mL trockenem THF refluxiert. Das Gemisch wurde abgekühlt und die Lösungsmittel *in vacuo* entfernt. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch aufgereinigt (Silikagel, Ethylacetat/Cyclohexan = 3/7).

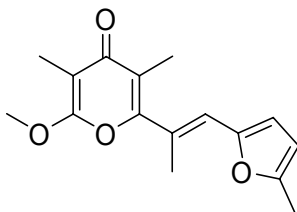
Ausbeute: 12 mg, 0.05 mmol, 28%.

GC-MS (DB_50_S): $R_t = 7.5$ min; $m/z = 276$ $[M]^+$, (81%).

$^1\text{H-NMR}$ (400MHz, CDCl_3): 1.82 (3 H, s), 2.01 (3 H, s), 2.22 (3 H, d, $J = 1.3$ Hz), 3.91 (3 H, s), 6.82 (1 H, s), 7.04 (1 H, dd, $J = 5.1, 3.6$ Hz), 7.10 (1 H, d, $J = 3.5$ Hz), 7.37 (1 H, d, $J = 5.1$ Hz) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (100MHz, CDCl_3): 6.9, 12.0, 17.0, 55.3, 88.3, 99.4, 118.2, 126.0, 127.2, 127.5, 128.1, 129.8, 139.0, 158.1, 181.3 ppm.

HRMS (GCMS-EI): $\text{C}_{15}\text{H}_{16}\text{O}_3\text{S}$: berechnet: 276.0820, gefunden: 276.0815.

2-Methoxy-3,5-dimethyl-6-((E)-1-(5-methylfuran-2-yl)prop-1-en-2-yl)-4H-pyran-4-on (25f)

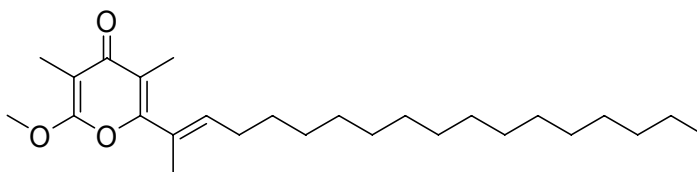
Ein Gemisch von Phosphonat **22a** (50.0 mg, 0.16 mmol, 1.0 Äq.), LHMDS (0.19 mL, 1 M, 0.19 mmol, 1.2 Äq.) und 5-Methylfuran-2-carbaldehyd (20.9 mg, 0.19 mmol, 1.2 Äq.) wurde für 1.5 h in 5 mL trockenem THF refluxiert. Das Gemisch wurde abgekühlt und die Lösungsmittel *in vacuo* entfernt. Das Produkt wurde nach präparativer HPLC isoliert.

Ausbeute: 23 mg, 0.08 mmol, 53%.

¹H-NMR (400MHz, CDCl₃): 1.87 (3 H, s), 2.06 (3 H, s), 2.27 (3 H, d, *J* = 0.7 Hz), 2.36-2.35 (3 H, m), 3.97 (3 H, s), 6.09 (1 H, d, *J* = 2.4 Hz), 6.39 (1 H, d, *J* = 3.2 Hz), 6.45 (1 H, s) ppm.

¹³C-NMR (100MHz, CDCl₃): 6.9, 12.0, 13.8, 16.8, 55.3, 99.3, 108.1, 113.6, 117.9, 122.8, 124.4, 150.2, 153.3, 158.1, 161.9, 181.4 ppm.

HRMS (LCMS-ESI): C₁₆H₁₉O₄: berechnet: 275.1278, gefunden: 275.1274.

2-Methoxy-3,5-dimethyl-6-((E)-octadec-2-en-2-yl)-4H-pyran-4-on (25g)

Ein Gemisch von Phosphonat **22a** (60.0 mg, 0.18 mmol, 1.0 Äq.), LHMDS (0.18 mL, 1 M, 0.18 mmol, 1.0 Äq.) und Palmitaldehyd (48 mg, 0.19 mmol, 1.1 Äq.) wurde für 1.5 h in 5 mL trockenem THF refluxiert. Das Gemisch wurde abgekühlt und die Lösungsmittel *in vacuo* entfernt. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch aufgereinigt (Silikagel, Ethylacetat/Cyclohexan = 1/9).

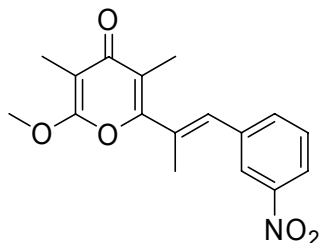
Ausbeute: 8 mg, 0.02 mmol, 11%.

GC-MS (DB_50_S): $R_t = 10.6$ min; $m/z = 404$ $[M]^+$ (21%).

$^1\text{H-NMR}$ (400MHz, CDCl_3): 0.88 (3 H, t, $J = 6.9$ Hz), 1.25 (24 H, s), 1.40-1.49 (2 H, m), 1.86 (3 H, s), 1.90 (3 H, d, $J = 1.4$ Hz) 1.98 (3 H, s), 2.19 (2 H, q, $J = 7.8, 7.5$ Hz), 3.94 (3 H, s), 5.74 (1 H, tq, $J = 7.4, 1.3$ Hz) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (100MHz, CDCl_3): 6.9, 11.8, 14.1, 14.5, 22.7, 28.2, 29.0, 29.3, 29.4, 29.5, 29.60, 29.65, 29.66, 29.69, 31.9, 55.2, 99.2, 117.6, 127.1, 137.5, 158.5, 161.8, 181.6 ppm.

HRMS (GCMS-EI): $\text{C}_{26}\text{H}_{44}\text{O}_3$: berechnet: 404.3290, gefunden: 404.3275.

**2-Methoxy-3,5-dimethyl-6-((E)-1-(3-nitrophenyl)prop-1-en-2-yl)-4H-pyran-4-on
(25h)**

Ein Gemisch von Phosphonat **22a** (60.0 mg, 0.18 mmol, 1.0 Äq.), LHMDS (0.19 mL, 1 M, 0.19 mmol, 1.1 Äq.) und 3-Nitrobenzaldehyd (29 mg, 0.19 mmol, 1.1 Äq.) wurde für 1.5 h in 5 mL trockenem THF refluxiert. Das Gemisch wurde abgekühlt und die Lösungsmittel *in vacuo* entfernt. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch aufgereinigt (Silikagel, Ethylacetat/Cyclohexan = 1/1).

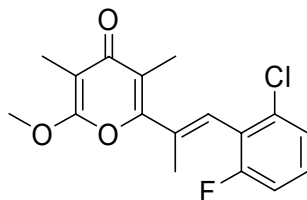
Ausbeute: 15 mg, 0.05 mmol, 30%.

GC-MS (DB_50_S): $R_t = 8.8$ min; $m/z = 315$ [M]⁺ 100%.

¹H-NMR (400MHz, CDCl₃): 1.90 (3 H, s), 2.11 (3 H, s), 2.21 (3 H, d, $J = 1.4$ Hz), 4.01 (3 H, s), 6.78 (1 H, s), 7.60 (1 H, t, $J = 7.9$ Hz), 7.68 (1 H, d, $J = 7.9$ Hz), 8.18 (1 H, ddd, $J = 2.9, 2.4, 1.1$ Hz), 8.24 (1 H, t, $J = 1.8$ Hz) ppm.

¹³C-NMR (100MHz, CDCl₃): 6.9, 11.9, 16.3, 55.4, 88.8, 99.8, 118.7, 122.5, 123.7, 129.5, 132.0, 132.5, 135.0, 137.4, 148.3, 157.1, 161.9, 181.1 ppm.

HRMS (GCMS-EI): C₁₇H₁₇NO₅: berechnet: 315.1107, gefunden: 315.1105.

2-((E)-1-(2-Chloro-6-fluorophenyl)prop-1-en-2-yl)-6-methoxy-3,5-dimethyl-4H-pyran-4-on (25i)

Zu dem Phosphonat **22a** (60.0 mg, 0.18 mmol, 1.0 Äq.) in 5 mL trockenem THF wurden LHMDs (0.19 mL, 1 M, 0.19 mmol, 1.1 Äq.) und 2-Chloro-6-fluorobenzaldehyd (23 mg, 0.19 mmol, 1.1 Äq.) in 2 mL trockenem THF gegeben. Das Gemisch wurde für 1.5 h refluxiert, abgekühlt und die Lösungsmittel *in vacuo* entfernt. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch aufgereinigt (Silikagel, Ethylacetat/Cyclohexan = 3/7).

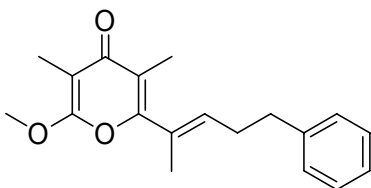
Ausbeute: 12 mg, 0.04 mmol, 24%.

GC-MS (DB_50_S): $R_t = 7.6$ min; $m/z = 322$ $[M]^+$ (100%).

$^1\text{H-NMR}$ (400MHz, CDCl_3): 1.90 (3 H, s), 1.92 (3 H, dd, $J=2.5, 1.4$ Hz), 2.16 (3 H, s), 4.00 (3 H, s), 6.50 (1 H, s), 7.04-7.09 (1 H, m), 7.25-7.29 (2 H, m) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (100MHz, CDCl_3): 6.9, 11.8, 16.82, 16.86, 26.9, 55.3, 99.6, 114.1, 114.4, 119.0, 123.1, 123.3, 125.2, 125.3, 125.7, 129.7, 129.8, 134.22, 134.24, 134.3, 134.89, 134.93, 156.7, 158.5, 161.0, 161.9, 181.2 ppm.

HRMS (GCMS-EI): $\text{C}_{17}\text{H}_{16}\text{ClFO}_3$: berechnet: 322.0772, gefunden: 322.0767.

2-Methoxy-3,5-dimethyl-6-((E)-5-phenylpent-2-en-2-yl)-4H-pyran-4-on (25j)

Ein Gemisch von Phosphonat **22a** (60.0 mg, 0.18 mmol, 1.0 Äq.), LHMDS (0.19 mL, 1 M, 0.19 mmol, 1.1 Äq.) und 3-Phenylpropanal (25 mg, 0.19 mmol, 1.1 Äq.) wurde für 1.5 h in 5 mL trockenem THF refluxiert. Das Gemisch wurde abgekühlt und die Lösungsmittel *in vacuo* entfernt. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch aufgereinigt (Silikagel, Ethylacetat/Cyclohexan = 3/7).

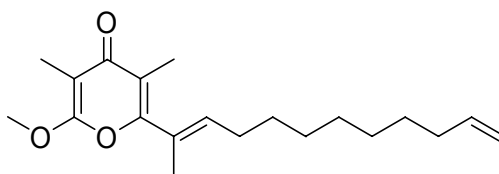
Ausbeute: 24 mg, 0.09 mmol, 50%.

GC-MS (DB_50_S): $R_t = 8.0$ min; $m/z = 298$ $[M]^+$ (95%).

$^1\text{H-NMR}$ (400MHz, CDCl_3): 1.84 (3 H, s), 1.88 (3 H, s), 2.04 (3 H, s), 2.52 (2 H, q, $J = 7.2$ Hz), 2.75 (2 H, t, $J = 7.6$ Hz), 3.81 (3 H, s), 5.69 (1 H, ddd, $J = 8.7, 5.9, 1.5$ Hz), 7.18-7.22 (3H, m), 7.27-7.31 (2H, m) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (100MHz, CDCl_3): 10.2, 11.8, 14.8, 29.9, 35.0, 60.2, 108.8, 110.0, 126.1, 128.38, 128.42, 135.3, 141.2, 158.8, 165.6, 168.5 ppm.

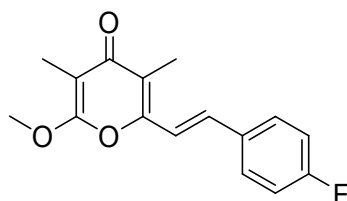
HRMS (GCMS-EI): $\text{C}_{19}\text{H}_{22}\text{O}_3$: berechnet: 298.1569, gefunden: 298.1563.

2-((E)-Dodeca-2,11-dien-2-yl)-6-methoxy-3,5-dimethyl-4H-pyran-4-on (25k)

Ein Gemisch von Phosphonat **22a** (50.0 mg, 0.16 mmol, 1.0 Äq.), LHMDS (0.16 mL, 1 M, 0.16 mmol, 1.0 Äq.) und Dec-9-enal (27 mg, 0.17 mmol, 1.1 Äq.) wurde für 1.5 h in 5 mL trockenem THF refluxiert. Das Gemisch wurde abgekühlt und die Lösungsmittel *in vacuo* entfernt. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch aufgereinigt (Silikagel, Ethylacetat/Cyclohexan = 3/7).

Ausbeute: 6 mg, 0.02 mmol, 14%.

¹H-NMR (400MHz, CDCl₃): 1.22-1.49 (10 H, m), 1.87 (3 H, s), 1.90 (3 H, td, *J* = 1.5, 0.8 Hz), 1.99 (3 H, s), 2.00-2.08 (2 H, m), 2.20 (3 H, q, *J* = 7.2 Hz), 3.95 (3 H, s), 4.93 (1 H, tdd, *J* = 10.2, 2.2, 1.2 Hz), 4.99 (1 H, ddd, *J* = 17.1, 3.6, 1.5 Hz), 5.74 (1 H, tq, *J* = 4.3, 1.6 Hz), 5.81 (1 H, tdd, *J* = 16.9, 10.2, 6.7 Hz).

2-(4-Fluorostyryl)-6-methoxy-3,5-dimethyl-4H-pyran-4-on (25l)

Ein Gemisch von Phosphonat **22b** (60.0 mg, 0.18 mmol, 1.0 Äq.), LHMDs (0.22 mL, 1 M, 0.22 mmol, 1.2 Äq.) und 4-Fluorobenzaldehyd (24 μ L, 0.22 mmol, 1.2 Äq.) wurde für 1.5 h in 5 mL trockenem THF refluxiert. Das Gemisch wurde abgekühlt und die Lösungsmittel *in vacuo* entfernt. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch aufgereinigt (Silikagel, Ethylacetat/Cyclohexan = 1/1).

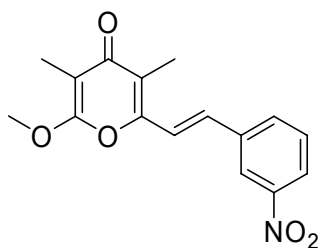
Ausbeute: 45 mg, 0.16 mmol, 91%.

GC-MS (DB_50_S): $R_t = 7.5$ min; $m/z = 274$ [M]⁺ (90%).

¹H-NMR (400MHz, CDCl₃): 1.89 (3 H, s), 2.11 (3 H, s), 4.09 (3 H, s), 6.94 (1 H, d, $J = 16.0$ Hz), 7.09 (1 H, t, $J = 8.6$ Hz), 7.18 (1 H, d, $J = 16.0$ Hz), 7.50 (2 H, dd, $J = 8.8, 5.3$ Hz) ppm.

¹³C-NMR (100MHz, CDCl₃): 7.0, 9.7, 55.5, 99.8, 115.9, 116.1, 117.4, 119.3, 128.8, 128.9, 132.0, 151.8, 161.7, 162.0, 164.4, 180.8 ppm.

HRMS (GCMS-EI). C₁₆H₁₅FO₃: berechnet: 274.1005, gefunden: 274.1000.

2-(3-Nitrostyryl)-6-methoxy-3,5-dimethyl-4H-pyran-4-on (25m)

Ein Gemisch von Phosphonat **22b** (50.0 mg, 0.18 mmol, 1.0 Äq.), LHMDS (0.22 mL, 1 M, 0.22 mmol, 1.2 Äq.) und 3-Nitrobenzaldehyd (34 mg, 0.22 mmol, 1.2 Äq.) wurde für 1.5 h in 5 mL trockenem THF refluxiert. Das Gemisch wurde abgekühlt und das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch aufgereinigt (Silikagel, Ethylacetat/Cyclohexan = 1/1).

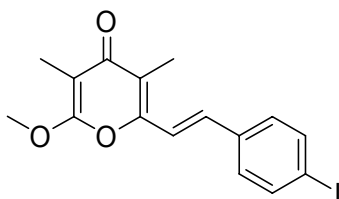
Ausbeute: 34 mg, 0.11 mmol, 62%.

GC-MS (DB_50_S): $R_t = 9.1$ min; $m/z = 301$ $[M]^+$ (100%).

$^1\text{H-NMR}$ (400MHz, CDCl_3): 1.89 (3 H, s), 2.15 (3 H, s), 4.11 (3 H, s), 7.14 (1 H, d, $J = 16.0$ Hz), 7.23 (1 H, d, $J = 15.9$ Hz), 7.57 (1 H, t, $J = 8.0$ Hz), 7.84 (1 H, d, $J = 7.7$ Hz), 8.18 (1 H, d, $J = 8.2$ Hz), 8.34 (1 H, s) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (100MHz, CDCl_3): 7.1, 9.9, 55.6, 100.2, 120.5, 120.9, 121.9, 123.5, 129.9, 130.4, 132.4, 137.3, 148.7, 150.9, 161.8, 180.6 ppm.

HRMS (GCMS-EI): $\text{C}_{16}\text{H}_{15}\text{NO}_5$: berechnet: 301.0950, gefunden: 301.0940.

2-(4-Iodostyryl)-6-methoxy-3,5-dimethyl-4H-pyran-4-on (25n)

Ein Gemisch von Phosphonat **22b** (50.0 mg, 0.18 mmol, 1.0 Äq.), LHMDS (0.22 mL, 1 M, 0.22 mmol, 1.2 Äq.) und 4-Iodobenzaldehyd (53 mg, 0.22 mmol, 1.2 Äq.) wurde für 1.5 h in 5 mL trockenem THF refluxiert. Das Gemisch wurde abgekühlt und das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch aufgereinigt (Silikagel, Ethylacetat/Cyclohexan = 4/6).

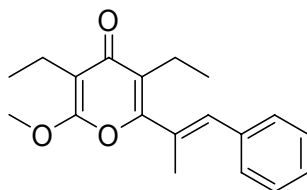
Ausbeute: 37 mg, 0.10 mmol, 53%.

GC-MS (DB_50_S): $R_t = 9.2$ min; $m/z = 382$ [M]⁺ (100%).

¹H-NMR (400MHz, CDCl₃): 1.91 (3 H, s), 2.13 (3 H, s), 4.10 (3 H, s), 7.03 (1 H, d, $J = 15.9$ Hz), 7.14 (1 H, d, $J = 16.1$ Hz), 7.25 (2 H, d, $J = 8.5$ Hz), 7.73 (2 H, d, $J = 8.4$ Hz) ppm.

¹³C-NMR (100MHz, CDCl₃): 7.1, 9.9, 55.6, 95.0, 100.0, 118.3, 119.8, 128.7, 130.3, 132.2, 135.1, 138.1, 151.7, 161.8, 180.7 ppm.

HRMS (GCMS-EI): C₁₆H₁₅I O₃: berechnet: 382.0066, gefunden: 382.0055.

3,5-Diethyl-2-methoxy-6-((E)-1-phenylprop-1-en-2-yl)-4H-pyran-4-on (25o)

Ein Gemisch von Phosphonat **22c** (60.0 mg, 0.17 mmol, 1.0 Äq.), LHMDS (0.21 mL, 1 M, 0.21 mmol, 1.2 Äq.) und Benzaldehyd (21 μ L, 0.21 mmol, 1.2 Äq.) wurde für 1.5 h in 5 mL trockenem THF refluxiert. Das Gemisch wurde abgekühlt und das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch aufgereinigt (Silikagel, Ethylacetat/Cyclohexan = 4/6).

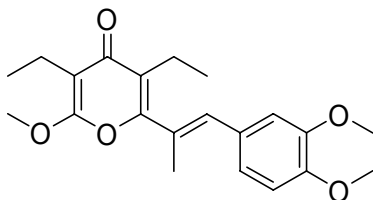
Ausbeute: 15 mg, 0.06 mmol, 37%.

GC-MS (DB_50_S): R_t = 7.4 min; m/z = 298 $[M]^+$ (100%).

$^1\text{H-NMR}$ (400MHz, CDCl_3): 1.07 (3 H, t, J = 7.4 Hz), 1.16 (3 H, t, J = 7.4 Hz), 2.18 (3 H, d, J = 1.5 Hz), 2.43 (2 H, q, J = 7.4 Hz), 2.56 (2 H, q, J = 7.4 Hz), 3.97 (3 H, s), 6.78 (1 H, s), 7.30-7.44 (5 H, m) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (100MHz, CDCl_3): 12.9, 14.0, 15.2, 16.6, 19.4, 55.3, 106.0, 124.3, 127.8, 128.4, 129.0, 131.0, 133.9, 136.0, 158.7, 160.7, 161.9, 180.3 ppm.

HRMS (GCMS-EI): $\text{C}_{19}\text{H}_{22}\text{O}_3$: berechnet: 298.1569, gefunden: 298.1558.

3,5-Diethyl-2-methoxy-6-((E)-1-(3,4-dimethoxyphenyl)prop-1-en-2-yl)-4H-pyran-4-on (25p)

Ein Gemisch von Phosphonat **22c** (60.0 mg, 0.17 mmol, 1.0 Äq.), LHMDS (0.21 mL, 1 M, 0.21 mmol, 1.2 Äq.) und 3,4-Dimethoxybenzaldehyd (35 mg, 0.21 mmol, 1.2 Äq.) wurde für 1.5 h in 5 mL trockenem THF refluxiert. Das Gemisch wurde abgekühlt und das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt. Der Rückstand wurde *via* präparativer HPLC aufgereinigt.

Ausbeute: 39 mg, 0.11 mmol, 64%.

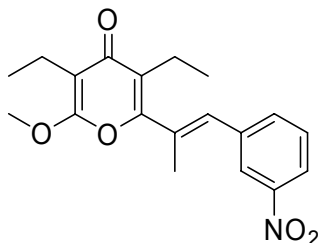
GC-MS (DB_50_S): $R_t = 8.5$ min; $m/z = 358$ $[M]^+$ (8%).

$^1\text{H-NMR}$ (400MHz, CDCl_3): 0.90 (3 H, t, $J = 7.4$ Hz), 1.01 (3 H, t, $J = 7.4$ Hz), 2.05 (3 H, d, $J = 1.5$ Hz), 2.28 (2 H, q, $J = 7.4$ Hz), 2.40 (2 H, q, $J = 7.4$ Hz), 3.77 (3 H, s), 3.77 (3 H, s), 3.82 (3 H, s), 6.56 (1 H, s), 6.75 (1 H, dd, $J = 2.0, 1.9$ Hz), 6.77 (1 H, s), 6.83 (1 H, dd, $J = 8.3, 1.7$ Hz) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (100MHz, CDCl_3): 12.9, 14.0, 15.2, 16.8, 19.4, 55.3, 56.0, 109.8, 111.1, 112.4, 122.2, 124.0, 126.2, 127.5, 128.9, 133.7, 148.8, 161.9, 180.3 ppm.

HRMS (GCMS-EI): $\text{C}_{21}\text{H}_{26}\text{O}_5$: 358.1780, found: 358.1784.

3,5-Diethyl-2-methoxy-6-((E)-1-(3-nitrophenyl)prop-1-en-2-yl)-4H-pyran-4-on
(25q)



Die Substanz wurde analog zu **25o** synthetisiert. Zu einer Lösung des Phosponats **22c** (60.0 mg, 0.17 mmol, 1.0 Äq.) in 5 mL trockenem THF wurden LHMDS (0.21 mL, 1 M, 0.21 mmol, 1.2 Äq.) und 3-Nitrobenzaldehyd (35 mg, 0.21 mmol, 1.2 Äq.) in 2 mL trockenem THF gegeben. Das Gemisch wurde für 1.5 h refluxiert, abgekühlt und die Lösungsmittel *in vacuo* entfernt. Der Rückstand wurde *via* präparativer HPLC aufgereinigt.

Ausbeute: 33 mg, 0.10 mmol, 56%.

GC-MS (DB_50_S): $R_t = 8.9$ min; $m/z = 343$ $[M]^+$ (10%).

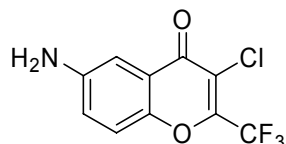
$^1\text{H-NMR}$ (400MHz, CDCl_3): 1.07 (3 H, t, $J = 7.4$ Hz), 1.17 (3 H, t, $J = 7.4$ Hz), 2.20 (3 H, d, $J = 1.5$ Hz), 2.43 (2 H, q, $J = 7.4$ Hz), 2.55 (2 H, q, $J = 7.4$ Hz), 3.98 (3 H, s), 6.81 (1 H, s), 7.60 (1 H, dd, $J = 8.0, 7.9$ Hz), 7.67 (1 H, d, $J = 7.7$ Hz), 8.19 (1 H, ddd, $J = 8.1, 2.2, 1.2$ Hz), 8.24 (1 H, dd, $J = 2.0, 1.7$ Hz) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (100MHz, CDCl_3): 12.8, 14.0, 15.2, 16.7, 19.4, 55.4, 106.3, 122.5, 123.7, 124.7, 129.5, 131.4, 132.1, 135.0, 137.5, 157.6, 161.9, 180.0 ppm.

HRMS (GCMS-EI): $\text{C}_{19}\text{H}_{21}\text{NO}_5$: berechnet: 343.1420, gefunden: 343.1426.

8.4 Versuche zu Kapitel 5.5 – Synthese von Chromenderivaten

6-Amino-3-chloro-2-(trifluoromethyl)-4H-chromen-4-on (70)



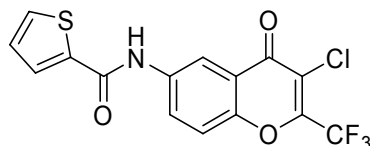
Zu einer Lösung von 3-Chloro-6-nitro-2-(trifluoromethyl)chromen (20.00 mg 0.07 mmol 1.0 Äq.) in Ethanol wurde unter starkem Rühren Eisensulfatheptahydrat (56.82 mg 0.20 mmol 3.0 Äq.) zugegeben. Es wurden 61,2 μL einer 25%-igen NH_4Cl -Lösung hinzugefügt. Zu dem Gemisch wurde Zinkpulver (13.36 mg, 0.20 mmol, 3.0 Äq.) langsam addiert und die Reaktionsmischung bei 50°C nachgerührt. Nach 3 h war das Ausgangsmaterial vollständig verbraucht, die Reaktionsmischung wurde über Celite abfiltriert und mit Ethanol nachgewaschen und die Lösung eingeeengt. Der Rückstand wurde mit Ethylacetat aufgenommen, 1 ml einer 25%-igen NH_4Cl -Lösung zugegeben und die organische Phase mit destilliertem Wasser, gesättigter NaHCO_3 -Lösung und gesättigter NaCl -Lösung gewaschen. Die organische Phase wurde mit MgSO_4 getrocknet und dann eingeeengt.

Ausbeute: 7.30 mg, 0.03 mmol 41%.

GC-MS (DB_100_S): $R_t = 5.8$ min; $m/z = 263$ $[\text{M}]^+$ (100%).

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, $\text{MeOH-}d_4$): 7.27 (1 H, d, $J = 7.2$ Hz), 7.30 (1 H, d, $J = 7.2$ Hz), 7.42 (1 H, d, $J = 7.3$ Hz).

HRMS (LCMS-ESI): $\text{C}_{10}\text{H}_7\text{O}_2\text{NCIF}_3$: berechnet: 264.0034, gefunden: 264.0034.

N-(3-chloro-2-(trifluoromethyl)-4-oxo-4H-chromen-6-yl)-2-(thiophen-2-yl)acetamid (73)

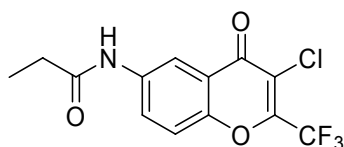
Zu einer Lösung von Argon 6-Amino-3-chloro-2-(trifluoromethyl)-4H-chromen-4-on (**70**) (56.80 mg 0.22 mol 1.0 Äq.) in DMF wurde Pyridin (42.61 mg, 0.54 mmol, 43.35 μ L, 2.5 Äq.) zugegeben und 15 min gerührt. Bei 0 °C wurde Thiophencarbonylchlorid (37.91 mg, 0.26 mmol, 27.63 μ L, 1.2 Äq.) zugetropft. Das Gemisch wurde auf 40 °C erwärmt. Nach 5 h war nach GC Kontrolle (DB_100_S) kein Ausgangsmaterial mehr zu detektieren. Das Gemisch wurde mit Ethylacetat aufgenommen und mit gesättigter NH_4Cl -Lösung und gesättigter NaCl -Lösung gewaschen und über MgSO_4 getrocknet. Eineingien *in vacuo* führte zu einem Feststoff, der in Ethylacetat/Ethanol = 2/1 aufgenommen und erhitzt wurde. Eine Fällung des Produktes wurde durch Zugabe von einigen Tropfen Cyclohexan begünstigt. Der resultierende weiße Niederschlag wurde abgesaugt und getrocknet.

GC-MS (DB_100_S): $R_t = 6.1$ min; $m/z = 373$ $[\text{M}]^+$ (18%).

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): 7.20 (1 H, d, $J = 7.2$ Hz), 7.86 (1 H, dd, $J = 6.0$ Hz, 6.0 Hz), 7.92 (1 H, d, $J = 7.2$ Hz), 8.00 (1 H, s), 8.31 (1 H, d, $J = 6.0$ Hz), 8.51 (1 H, d, $J = 6.0$ Hz), 10.66 (1 H, s) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): 114.4, 118.8, 119.2, 119.3, 119.9, 122.0, 127.6, 128.0, 128.2, 129.6, 132.4, 137.5, 139.1, 147.1, 147.5, 160.1, 171.5, 176.0 ppm.

HRMS (LCMS-ESI): $\text{C}_{15}\text{H}_7\text{O}_3\text{NCIF}_3\text{S}$: berechnet: 372.9782, gefunden: 372.9779.

N-(3-chloro-2-(trifluoromethyl)-4-oxo-4H-chromen-6-yl)propionamid (74)

Zu einer Lösung von 6-Amino-3-chloro-2-(trifluoromethyl)-4H-chromen-4-on (**70**) (60.40 mg, 0.23 mmol, 1.0 Äq.) in DMF wurde Pyridin (22.66 mg, 0.29 mmol, 23.05 μ L, 1.25 Äq.) zugegeben und 15 min gerührt. Bei Raumtemperatur wurde Propionylchlorid (22.26 mg, 0.24 mmol 20.90 μ L, 1.05 Äq.) zugetropft. Nach 30 min war nach GC-Kontrolle (DB_100_S) kein Ausgangsmaterial mehr zu detektieren. Das Gemisch wurde mit Ethylacetat aufgenommen und mit destilliertem Wasser, gesättigter NH_4Cl -Lösung und zweimal mit 1 N HCl-Lösung gewaschen und über MgSO_4 getrocknet. Einingen *in vacuo* führte zu einem Feststoff, der in Ethylacetat aufgenommen und erhitzt wurde. Eine Fällung des Produktes wurde durch Zugabe von einigen Tropfen Cyclohexan begünstigt. Der resultierende weiße Niederschlag wurde abgesaugt und getrocknet.

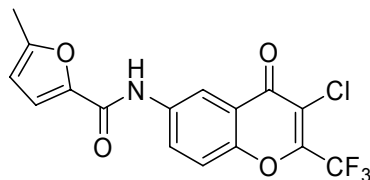
Ausbeute: 21.80 mg, 0.07 mmol 30%.

GC-MS (DB_100_S): $R_t = 6.1$ min; $m/z = 319$ $[\text{M}]^+$ (18%).

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): 1.07 (3 H, s), 7.76 (1 H, d, $J = 7.2$ Hz), 7.98 (1 H, d, $J = 7.2$ Hz), 8.42 (1 H, s), 10.31 (1 H, s) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): 9.4, 29.5, 112.8, 117.3, 117.4, 117.5, 118.6, 119.3, 120.0, 122.1, 126.9, 138.0, 149.8, 171.4, 172.5 ppm.

HRMS (GCMS-EI): $\text{C}_{13}\text{H}_9\text{O}_3\text{NCIF}_3$: berechnet: 319.0218, gefunden: 319.0222.

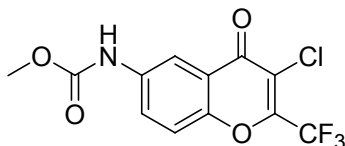
N-(3-Chloro-2-(trifluoromethyl)-4-oxo-4H-chromen-6-yl)-2-(5-methylfuran-2-yl)acetamid (75)

Zu einer Lösung von 6-Amino-3-chloro-2-(trifluoromethyl)-4H-chromen-4-on (**70**) (52.80 mg, 0.20 mmol 1.0 Äq.) in trockenem THF wurde Pyridin (19.81 mg, 0.25 mmol, 20.15 μ L, 1.25 Äq.) zugegeben und 15 min gerührt. Bei Raumtemperatur wurde 5-Methylfuran-2-carbonylchlorid (30.40 mg, 0.21 mmol, 1.05 Äq.) zugetropft. Das Gemisch wurde auf 70 °C erwärmt. Nach 15 min war nach GC-Kontrolle (DB_100_S) kein Ausgangsmaterial mehr zu detektieren. Das Gemisch wurde mit Ethylacetat aufgenommen und mit destilliertem Wasser, gesättigter NH_4Cl -Lösung und zweimal mit 1 N HCl-Lösung gewaschen und über MgSO_4 getrocknet. Einingen *in vacuo* führte zu einem Feststoff, der in Ethylacetat aufgenommen und erhitzt wurde. Eine Fällung des Produktes wurde durch Zugabe von einigen Tropfen Cyclohexan begünstigt. Der resultierende weiße Niederschlag wurde abgesaugt und getrocknet. Ausbeute: 36.80 mg, 0.10 mmol, 49%.

$^1\text{H-NMR}$ (400MHz, $\text{DMSO-}d_6$): 2.43 (3 H,s), 6.20 (1 H, d, $J = 7.1$ Hz), 7.20 (1 H, d, $J = 7.1$ Hz), 7.61 (1 H, d, $J = 12.0$ Hz), 8.11 (1 H, d, $J = 7.1$ Hz), 8.28 (1 H,s), 8.58 (1 H, dd, $J = 7.1$ Hz, 12.0 Hz) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): 14.0, 109.4, 109.4, 114.6, 114.1, 117.4, 117.7, 119.4, 120.1, 122.5, 127.8, 136.8, 145.3, 148.3, 148.7, 150.8, 155.7, 156.2 ppm.

HRMS (GCMS-EI): $\text{C}_{16}\text{H}_9\text{O}_4\text{NClF}_3$: berechnet: 371.0167, gefunden: 371.0167.

Methyl 3-chloro-2-(trifluoromethyl)-4-oxo-4H-chromen-6-ylcarbammat (76)

Zu einer Lösung von 6-Amino-3-chloro-2-(trifluoromethyl)-4H-chromen-4-on (**70**) (47.70 mg, 0.18 mmol, 1.0 Äq.) in DMF wurde Pyridin (35.78 mg, 0.45 mmol 36.40 μ L, 2.5 Äq.) zugegeben und 15 min gerührt. Bei 0 °C wurde Methylchloroformiat (20.52 mg, 0.22 mmol, 16.78 μ L, 1.2 Äq.) zugetropft. Nach 2 h war nach GC-Kontrolle (DB_100_S) kein Ausgangsmaterial mehr zu detektieren. Das Gemisch wurde mit Ethylacetat aufgenommen und mit gesättigter NH_4Cl -Lösung und gesättigter NaCl -Lösung gewaschen und über MgSO_4 getrocknet. Das Entfernen des Lösungsmittels *in vacuo* führte zu einem Feststoff, der in Ethylacetat aufgenommen und erhitzt wurde. Eine Fällung des Produktes wurde durch Zugabe von einigen Tropfen Cyclohexan begünstigt. Der resultierende weiße Niederschlag wurde abgesaugt und getrocknet.

Ausbeute: 35.22 mg, 0.11 mmol, 61%.

GC-MS (DB_100_S): $R_t = 5.8$ min; $m/z = 321$ $[\text{M}]^+$ (100%).

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): 3.10 (3 H, s), 7.77 (1 H, d, $J = 7.2$ Hz), 7.91 (1 H, d, $J = 7.2$ Hz), 8.26 (1 H, s), 10.16 (1 H, s) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): 52.0, 111.6, 117.3, 118.7, 119.5, 120.0, 122.2, 126.1, 138.0, 147.0, 147.4, 149.6, 153.9, 171.4 ppm.

HRMS (GCMS-EI): $\text{C}_{12}\text{H}_7\text{O}_4\text{NCIF}_3$: berechnet: 321.0010, gefunden: 321.0011.

8.5 Versuche zu Kapitel 4.8 – Fluoreszenzbasierte Hemmversuche für MAO A und B

Die zur Durchführung des MAO A und MAO B Assays benötigten Substanzen Kynuramine, Deprenyl und Clorgyline sowie die Enzyme Monoamino Oxidase A und Monoamino Oxidase B wurden von der Firma Sigma-Aldrich Chemie GmbH bezogen. Monoamine Oxidase A und B (human, rekombinant) lagen als Mikrosom von Baculovirus infizierten Zellen vor und wurden bei $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Zum Pipettieren wurden Einzel- und Mehrkanalpipetten der Firma Eppendorf und ein Caliper Zymark Sciclone ALH 500 Pipettierroboter verwendet.

Für die initiale Voruntersuchung der Substanzbibliothek wurde $1\text{ }\mu\text{L}$ einer 10 mM Substanzlösung in DMSO in $49\text{ }\mu\text{L}$ einer Lösung gelöst umfassend aller Komponenten bis auf Kynuramin. Von dieser Mischung wurden viermal $7\text{ }\mu\text{L}$ in kleinlöchrige Meßplatten überführt. Nach 10 min Inkubationszeit bei Raumtemperatur wurden $7\text{ }\mu\text{L}$ einer Kynuramin Lösung zu jedem Reaktionsgefäß addiert. Der Anstieg der Fluoreszenz wurde bei $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ für 30 min im konstanten Kinetik Modus gemessen. Die Reaktionskonzentrationen waren 0.05 mM Kynuramin, $100\text{ }\mu\text{M}$ Inhibitor und $0.1\text{ U/Reaktionsgefäß}$ MAO A oder $0.125\text{ U/Reaktionsgefäß}$ MAO B. Als Puffer wurde ein Kaliumphosphat Puffer (0.1 M) bei einem pH von 7.4 verwendet, der mit KCl isotonisch gemacht wurde.

Alle Substanzen, die bei diesen Voruntersuchungen eine Enzymrestaktivität von weniger als 20% , aufwiesen wurden bei einer Substanzkonzentration von $100\text{ }\mu\text{M}$ erneut getestet. Dies geschah konzentrationsabhängig mit elf Konzentrationen, die ausgehend von der $100\text{ }\mu\text{M}$ Lösung durch $1/2$ Verdünnung hergestellt wurden. Alle Inhibitoren, die einen IC_{50} Wert unter $1.5\text{ }\mu\text{M}$ aufwiesen, wurden erneut konzentrationsabhängig mit elf Konzentrationen in $1/2$ Verdünnungsschritten ausgehend von $10\text{ }\mu\text{M}$ vermessen.

8. Experimenteller Teil

Die Reaktionskonzentrationen waren 0.05 mM Kynumarin und 0.1 U/Reaktionsgefäß MAO A oder 0.125 U/Reaktionsgefäß MAO B. Als Puffer fungierte eine Kaliumphosphat Lösung (0.1 M) bei einem pH von 7.4 der mit KCl isotonisch gemacht wurde.

In der Voruntersuchung wurden bei 100 μ M für MAO A 145 Verbindungen und für MAO B 108 Verbindungen identifiziert, die die Enzymaktivität auf unter 20% reduziert haben. Für diese Verbindungen wurden nach folgendem Verfahren IC_{50} Werte bestimmt. (siehe Anhang Tabelle 2)

Alle Messungen wurden mindestens als Triplikate durchgeführt. Die generierten Daten wurden mit Microsoft Excel und IDBS Xifit ausgewertet. Aus den über 30 min aufgenommenen kinetischen Daten wurde eine lineare Kurvenanpassung über zumindest 10 min vorgenommen, um die Fluoreszenzzunahme proportional zur Reaktionsgeschwindigkeit zu bestimmen. Diese Rate wurde dann in Bezug auf die Positivkontrolle (kein Inhibitor, 100% Aktivität) sowie die Negativkontrolle (kein Enzym, 0% Aktivität) normalisiert. Die Referenzsubstanz diente als zusätzliche Qualitätskontrolle. Für die konzentrationsabhängigen Messungen wurden die entsprechenden Raten mit den dazugehörigen Konzentrationen aufgetragen und eine Vierpunkte logarithmische Kurvenanpassung vorgenommen. Die resultierenden IC_{50} mit den dazugehörigen Standardabweichungen werden hier aufgeführt.

8.6 Versuche zu Kapitel 6.2 – Festphasensynthese von Macrolinen

Die Macrolinsynthese fand auf einem polymeren Träger statt. Für jede Synthese wurden die gleichen Bedingungen gewählt. So wird die Arbeitsvorschrift in diesem Kapitel der Analytik vorangestellt.

Beladung des HMBA-Harzes mit Fmoc-Tryptophan (94)

HMBA-Harz **93** (250 mg, Beladungsladung 1.2 mmol/g, 100-200 Mesh) wurde in DMF (2 mL) für 10 min aufgequollen und (*D*)-Fmoc-Tryptophan (494.2 mg, 1.20 mmol, 4.0 Äq.), Pyridin (285.4 mg, 3.58 mmol, 286 µL, 12.0 Äq.) und 2,6-Dichlorobenzoylchlorid (502.7 mg, 2.40 mmol, 344 µL, 8.0 Äq.) hinzugefügt. Die Suspension wurde über Nacht bei Raumtemperatur geschüttelt. Das Harz wurde dreimal mit DMF, Methanol und Dichlormethan gewaschen und dann im Hochvakuum getrocknet. Die Beladung des HMBA-Harzes mit Fmoc-Tryptophan lag bei 0.75 mmol/g nach Fmoc-Test.

Abspaltung der Fmoc-Gruppe (95)

Die Abspaltung der Fmoc-Gruppe wurde durch zweimaliges Schütteln des Harzes für 10 min mit einer Piperidin/DMF Lösung (10 mL, 20/80 (v/v)) erreicht. Anschließend wurde das Harz dreimal mit einem DMF/DCM-Gemisch gewaschen.

Reduktive Aminierung (91)

Zur reduktiven Aminierung wurde das Harz (210 mg, 0.158 mmol) mit einem Dichlormethan/Trimethylorthoformiat-Gemisch im Verhältnis 1/1 (v/v) gewaschen. Es wurde eine Lösung des jeweiligen Aldehyds (0.79 mmol, 5 Äq. im Verhältnis zum Harz-gebundenen Tryptophan) in Dichlormethan/Trimethylorthoformiat (8 mL, 50/50 (v/v)) zum Harz zugefügt und für 12 h bei Raumtemperatur geschüttelt. Das Reagenzgemisch wurde vom Harz abfiltriert und dieses dreimal mit DMF und THF gewaschen. Dann wurde eine Lösung an NaBH₃CN (9.9 mg, 5 Äq., 0.79 mmol) in

THF/HOAc 80/20 (v/v) zum Harz-gebundenen Imin gegeben und über Nacht bei 0 °C geschüttelt. Das Harz wurde dreimal mit THF gewaschen, um die sekundären Amine **91** zu erhalten.

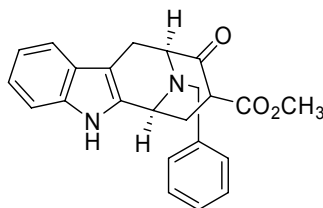
Pictet-Spengler Reaktion (90/96)

Das Harz (210 mg, 0.158 mmol) wurde zweimal mit einer Lösung 15% TFA in DCM (v/v) gewaschen. Das Harz wurde folglich in 15% TFA in DCM (10 mL, (v/v)) suspendiert und 4,4-Dimethoxybutanoat (**92**) (256.2 mg, 10 Äq., 1.58 mmol) hinzugefügt. Die erhaltene Suspension wurde für drei Tage bei Raumtemperatur geschüttelt. Zum Waschen wurde das Harz jeweils dreimal mit Dichlormethan, DMF und 10/90 (v/v) Pyridin in DMF gespült.

NaOMe-induzierte Spaltung und Dieckmann-Zyklisierung (89)

Das Harz (210 mg, 0.158 mmol) wurde bei Raumtemperatur zweimal für 5 min mit TEA in DCM im Verhältnis 15/85 (v/v) geschüttelt. Dann wurde das Harz in einer 1 M Lösung aus NaOMe in 1,4-Dioxan (2 mL) und Methanol (2 mL) über Nacht bei 50 °C gerührt. Nach Filtration und Entfernung der Lösungsmittel *in vacuo* wurde eine Lösung an NaOMe (300 mg, 5.55 mmol, 35 Äq.) in Toluol (9 mL) und Methanol (1 mL) hinzugefügt und das Gemisch über Nacht unter Reflux gehalten. Nach Entfernen des Lösungsmittel unter reduziertem Druck wurden 10 mL Wasser hinzugefügt und die Lösung vorsichtig mit Essigsäure auf einen pH-Wert von 5 eingestellt. Die Lösung wurde mit Essigsäureethylester extrahiert und nachfolgend die organische Phase mit über Na₂SO₄, filtriert. Das Gemisch wurde *in vacuo* getrocknet und der Rückstand *via* HPLC aufgereinigt. (HPLC-Bedingungen für alle Zykloocta[b]indole: 0 bis 18 min, 10 bis 90% wässrige Acetonitril-Lösung, 18 bis 22 min., 90 % wässrige Acetonitril-Lösung, 22.1 bis 23 min, 10% wässrige Acetonitril-Lösung. Alle Lösungsmittel wurden mit 0.1% TFA versetzt. Die Detektion fand bei 254 nm statt, die Flussgeschwindigkeit lag bei 20 mL min⁻¹).

(6S,10S)(-)-Methyl-9-oxo-12-benzyl-6,7,8,9,10,11-hexahydro-6,10-imino-5H-cycloocta[b]indol-8-carboxylat (89a)



Die Verbindung wurde nach der vorangehenden Vorschrift hergestellt.

Ausbeute: 33.1 mg, 0.089 mmol, 56%.

$[\alpha]_D = -177^\circ$ ($c = 1.0$, CHCl_3).

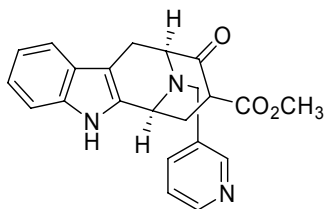
$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, $\text{CH}_3\text{CN-}d_3$): 2.03 (ddd, $J = 2.2, 8.6, 14.5$ Hz, 1H), 2.79 (1H, dt, $J = 2.4, 5.2$ Hz, 1H), 3.13 (dd, $J = 2.8, 7.2$ Hz, 1H), 3.20 (d, $J = 17.2$ Hz, 1H), 3.69 (s, 3H), 4.20 (d, $J = 6.0$ Hz, 1H), 4.21 (d, $J = 13.8$ Hz, 1H), 4.46 (d, $J = 13.8$ Hz, 1H), 4.82 (d, $J = 12.2$ Hz, 1H), 7.31-7.38 (m, 6H), 7.42 (d, 2H, $J = 6.7$ Hz, 1H), 7.45 (d, $J = 7.4$ Hz, 1H), 8.36 (s, 1H) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, $\text{CH}_3\text{CN-}d_3$): 24.2, 28.2, 33.9, 53.1, 54.3, 56.0, 59.0, 111.6, 117.0, 119.9, 125.3, 126.1, 129.6, 130.0, 130.1, 136.3, 206.3 ppm.

HRMS (FAB) $\text{C}_{23}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}_3$ berechnet: 374.1630, gefunden: 374.1604.

Die Werte stimmen mit der Literatur überein.^[137]

(6S,10S)-Methyl-9-oxo-12-((pyridin-3-yl)methyl)-6,7,8,9,10,11-hexahydro-6,10-imino-5H-cycloocta[*b*]indol-8-carboxylat (89b)



Die Verbindung wurde nach der vorangehenden Vorschrift hergestellt.

Ausbeute: 36.2 mg, 0.097 mmol, 61%.

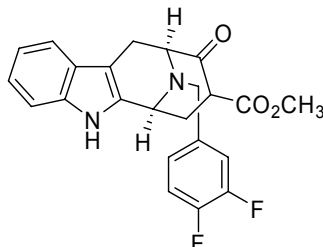
$[\alpha]_D = -93^\circ$ (*c* 0.5, MeOH).

¹H-NMR (400 MHz, MeOH-*d*4): 2.15-2.10 (m, 1H), 2.17-2.24 (m, 1H), 2.35-2.41 (m, 1H), 3.10-3.13 (m, 2H), 3.35 (s, 3H), 3.76 (d, *J* = 14.9 Hz, 1H), 3.88 (dd, *J* = 4.3, 10.0 Hz, 1H), 4.21-4.12 (m, 2H), 7.00 (dt, *J* = 1.0, 7.2 Hz, 1H), 7.10 (dt, *J* = 1.0, 7.2 Hz, 1H), 7.30 (d, *J* = 7.4 Hz, 1H), 7.47 (d, *J* = 7.4 Hz, 1H), 7.98 (dd, *J* = 5.8, 8.0 Hz, 1H), 8.64 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 8.72 (d, *J* = 5.5 Hz, 1H), 8.90 (s, 1H) ppm.

¹³C-NMR (100 MHz, MeOH-*d*4): 17.4, 23.0, 28.0, 29.5, 52.8, 57.4, 57.9, 103.0, 106.1, 111.1, 117.0, 117.3, 117.8, 119.2, 120.1, 122.0, 124.4, 137.4, 154.8, 156.1, 177.3, 201.7 ppm.

HRMS (FAB) C₂₂H₂₁N₃O₃ berechnet: 375.1583, gefunden: 375.1591.

(6*R*,10*R*)-Methyl-9-oxo-12-(2-fluor)benzyl-6,7,8,9,10,11-hexahydro-6,10-imino-5H-cycloocta[*b*]indol-8-carboxylat (89c)



Die Verbindung wurde nach der vorangehenden Vorschrift hergestellt.

Ausbeute: 33.4 mg, 0.085 mmol, 54%.

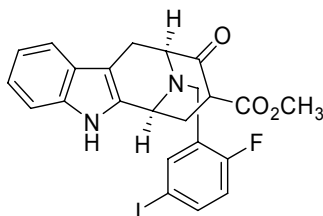
$[\alpha]_D = +132^\circ$ (c 0.5, MeOH).

¹H-NMR (400 MHz, MeOH-*d*4): 2.38-2.41 (m, 1H), 2.47-2.56 (m, 1H), 2.73-2.77 (m, 1H), 3.49-3.56 (m, 4H), 3.59 (dd, *J* = 4.7, 16.8 Hz, 1H), 4.43 (d, *J* = 13.5 Hz, 1H), 4.65-4.69 (m, 2H), 4.93 (dd, *J* = 5.2, 5.3 Hz, 1H), 7.27 (t, *J* = 7.7 Hz, 1H), 7.35-7.40 (m, 2H), 7.46 (t, *J* = 7.7 Hz, 1H), 7.49 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H), 7.65 (dd, *J* = 5.8, 8.5 Hz, 1H), 7.68 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H), 7.81 (t, *J* = 7.5 Hz, 1H) ppm.

¹³C-NMR (100 MHz, MeOH-*d*4): 19.9, 27.5, 30.6, 46.4, 49.3, 57.5, 58.8, 105.4, 110.9, 115.2, 155.4, 117.7, 122.0, 124.5, 131.1, 132.6, 177.3, 202.1 ppm.

HRMS (FAB) C₂₃H₂₁FN₂O₃ berechnet: 392.1536, gefunden: 392.1557.

(6S,10S)-Methyl-9-oxo-12-(2-fluoro-4-iodo)benzyl-6,7,8,9,10,11-hexahydro-6,10-imino-5H-cycloocta[*b*]indol-8-carboxylat (89d)



Die Verbindung wurde nach der vorangehenden Vorschrift hergestellt.

Ausbeute: 44.7 mg, 0.086 mmol, 55%.

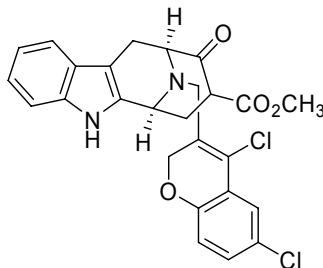
$[\alpha]_D = +114^\circ$ (c 0.5, MeOH)

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, MeOH-*d*4): 2.28-3.43 (m, 2H), 2.51-2.56 (m, 1H), 3.22-3.41 (m, 5H), 4.09 (d, $J = 13.6$ Hz, 1H), 4.30 (d, $J = 13.6$ Hz, 1H), 4.36 (dd, $J = 4.2, 6.0$ Hz, 1H), 4.57 (dd, $J = 6.0, 7.2$ Hz, 1H), 6.95 (t, $J = 9.2$ Hz, 1H), 7.07 (dt, $J = 1.0, 7.0$ Hz, 1H), 7.16 (dt, $J = 1.0, 7.0$ Hz, 1H), 7.35 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 7.52 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 7.71-7.75 (m, 1H), 8.02 (dd, $J = 2.4, 6.8$ Hz, 1H) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, MeOH-*d*4): 27.9, 28.0, 30.6, 43.8, 56.7, 58.7, 105.7, 115.2, 116.8, 117.6, 117.8, 117.9, 199.3, 122.1, 127.7, 130.5, 137.4, 140.0, 142.3, 160.4, 177.2, 202.3 ppm.

HRMS (FAB) $\text{C}_{23}\text{H}_{20}\text{FIN}_2\text{O}_3$ berechnet: 518.0503, gefunden: 518.0488.

(6S,10S)-Methyl-9-oxo-12-((4,6-dichloro-4a,8a-dihydro-2H-chromen-3-yl)methyl)-6,7,8,9,10,11-hexahydro-6,10-imino-5H-cycloocta[b]indol-8-carboxylat (89e)



Die Verbindung wurde nach der vorangehenden Vorschrift hergestellt.

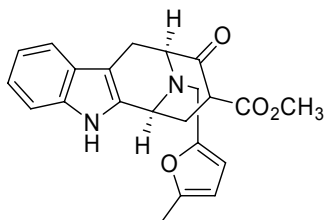
Ausbeute: 23.6 mg, 0.047 mmol, 30%.

$[\alpha]_D = -199^\circ$ (c 0.5, MeOH).

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, MeOH-*d*4): 3.05-3.11 (m, 1H), 3.27-3.32 (m, 1H), 2.46-2.51 (m, 1H), 3.21-3.63 (m, 5H), 3.87-3.95 (m, 1H), 4.13 (d, $J = 10.4$ Hz, 1H), 4.19-4.27 (m, 3H), 4.44-4.55 (m, 0.5 H), 4.56-4.59 (m, 0.5H), 6.61 (t, 0.5 H, $J = 7.2$ Hz, 1H), 6.71 (t, 0.5H, $J = 7.2$ Hz, 1H), 7.04-7.24 (m, 2H), 7.38-7.51 (m, 3H), 7.65 (t, $J = 7.3$ Hz, 1H) ppm.

HRMS (FAB): $\text{C}_{26}\text{H}_{22}\text{Cl}_2\text{N}_2\text{O}_4$ 4 berechnet: 97.0957, gefunden: 497.0969.

(6*R*,10*R*)-Methyl-9-oxo-12-(5-methylfuran-2-yl)methyl)-6,7,8,9,10,11-hexahydro-6,10-imino-5H-cyclocta[*b*]indol-8-carboxylat (89f)



Die Verbindung wurde nach der vorangehenden Vorschrift hergestellt.

Ausbeute: 29.6 mg, 0.078 mmol, 49%.

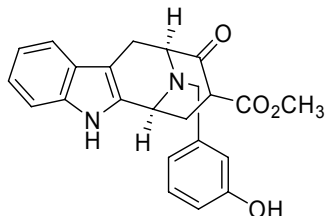
$[\alpha]_D = +71^\circ$ (*c* 0.5, MeOH).

¹H-NMR (400 MHz, MeOH-*d*₄): 2.22-2.28 (m, 1H), 2.31 (s, 3H), 2.43-2.52 (m, 1H), 2.63-2.70 (m, 1H), 3.30-3.34 (m, 1H), 3.41 (s, 3H), 3.47 (dd, *J* = 5.8, 16.3 Hz, 1H), 4.12 (d, *J* = 14.1 Hz, 1H), 4.57 (d, *J* = 14.1 Hz, 1H), 4.64-4.71 (m, 2H), 6.06 (dd, *J* = 1.2, 3.3 Hz, 1H), 6.41 (d, *J* = 3.1 Hz, 1H), 7.06 (dt, *J* = 1.1, 6.8 Hz, 1H), 7.17 (dt, *J* = 1.1, 6.8 Hz, 1H), 7.36 (d, *J* = 7.1 Hz, 1H), 7.54 (d, *J* = 7.1 Hz, 1H) ppm.

¹³C-NMR (100 MHz, MeOH-*d*₄): 12.2, 20.0, 27.7, 27.6, 31.1, 42.3, 57.7, 59.7, 105.8, 106.9, 111.2, 114.1, 118.0, 119.5, 122.4, 124.4, 126.0, 137.5, 154.5, 177.3, 197.4 ppm.

HRMS (FAB) C₂₂H₂₂N₂O₄ berechnet: 378.1580, gefunden: 378.1588.

(6S,10S)-Methyl-9-oxo-12-(3-hydroxy)benzyl-6,7,8,9,10,11-hexahydro-6,10-imino-5H-cycloocta[b]indol-8-carboxylat (89g)



Die Verbindung wurde nach der vorangehenden Vorschrift hergestellt.

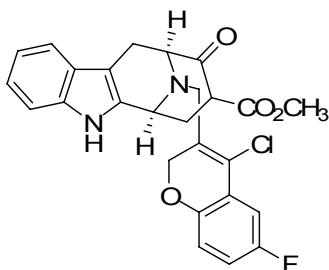
Ausbeute: 26.5 mg, 0.068 mmol, 43%

$[\alpha]_D = +159^\circ$ (c 0.5, MeOH)

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, MeOH-*d*4): 2.22-2.36 (m, 1H), 2.40 (m, 2H), 2.54-2.83 (m, 1H), 3.31 (s, 3H), 3.37 (s, 1H), 3.48 (dd, $J = 1.8, 7.1$ Hz, 1H), 4.27 (d, $J = 16.3$ Hz, 1H), 4.47 (s, 1H), 4.55 (d, $J = 16.3$ Hz, 1H), 6.74-6.76 (m, 1H), 6.84-6.92 (m, 2H), 7.05-7.10 (m, 1H), 7.15-7.20 (m, 1H) ppm.

HRMS (FAB) $\text{C}_{23}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}_4$ berechnet: 390.1580, gefunden: 390.1596.

**(6S,10S)-Methyl-9-oxo-12-((6-chloro-4-fluoro-4a,8a-dihydro-2H-chromen-3-yl)methyl)-6,7,8,9,10,11-hexahydro-6,10-imino-5H-cyclooct[b]indol-8-carboxylat
(89h)**



Die Verbindung wurde nach der vorangehenden Vorschrift hergestellt.

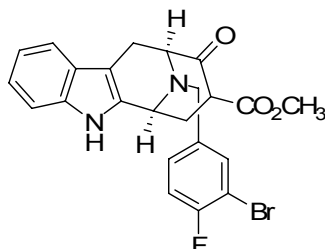
Ausbeute: 16.1 mg, 0.033 mmol, 21%.

$[\alpha]_D = -78^\circ$ (c 0.5, MeOH).

¹H-NMR (400 MHz, MeOH-*d*₄): 3.05-3.11 (m, 1H), 3.27-3.32 (m, 1H), 2.46-2.51 (m, 1H), 3.21-3.63 (m, 5H), 3.87-3.95 (m, 1H), 4.13 (d, 1H, *J* = 12.4 Hz), 4.19-4.28 (m, 3H), 4.56-4.58 (m, 1H), 6.71 (t, 1H, *J* = 7.2 Hz), 7.31-7.45 (m, 3H), 7.52 (d, 1H, *J* = 8.0 Hz), 7.61-7.85 (m, 2H) ppm.

HRMS (FAB): C₂₆H₂₄ClFN₂O₄ berechnet: 482.9312, gefunden: 482.9340.

(6S,10S)-Methyl-9-oxo-12-(3-bromo-4-fluoro)benzyl-6,7,8,9,10,11-hexahydro-6,10-imino-5H-cycloocta[b]indol-8-carboxylat (89k)



Die Verbindung wurde nach der vorangehenden Vorschrift hergestellt.

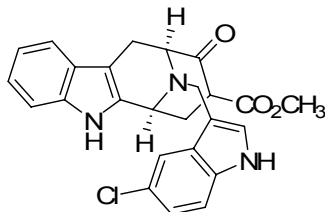
Ausbeute: 34.1 mg, 0.072 mmol, 46%.

$[\alpha]_D = +22^\circ$ (c 0.5, MeOH).

$^1\text{H-NMR}$ (ppm, MeOH- d_4): 2.21-2.35 (m, 1H), 2.39 (m, 2H), 2.54-2.61 (m, 1H), 3.42-3.48 (m, 2H), 3.90 (d, $J = 16.0$ Hz, 1H), 4.16-4.21 (m, 1H), 4.58 (d, $J = 16.1$ Hz, 1H), 4.77 (dd, $J = 4.8, 5.4$ Hz, 1H), 6.59 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 7.08 (dt, $J = 1.0, 7.3$ Hz, 1H), 7.19 (dt, $J = 1.0, 7.3$ Hz, 1H), 7.25 (dd, $J = 1.8, 8.1$ Hz, 1H), 7.38 (td, $J = 1.0, 8.0$ Hz, 1H), 7.47-7.44 (m, 1H), 7.52 (td, $J = 1.0, 8.0$ Hz, 1H) ppm. (Die Protonen des Methylesters wurden bei 3.33 ppm durch Wasser überlagert.).

HRMS (FAB): $\text{C}_{23}\text{H}_{20}\text{BrFN}_2\text{O}_3$ berechnet: 470.0641, gefunden: 470.0655.

(6S,10S)-Methyl-9-oxo-12-((5-chloro-1H-indol-3-yl)methyl)-6,7,8,9,10,11-hexahydro-6,10-imino-5H-cycloocta[*b*]indol-8-carboxylat (89I)



Die Verbindung wurde nach der vorangehenden Vorschrift hergestellt.

Ausbeute: 9.9 mg, 0.022 mmol (13%).

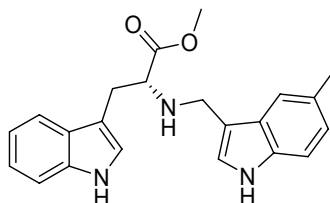
$[\alpha]_D = +176^\circ$ (c 0.5, MeOH).

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, MeOH-*d*4): 2.19-2.30 (m, 2H), 2.53-2.60 (m, 1H), 3.22-3.44 (m, 5H), 3.64 (s, 1H), 3.90-3.92 (m, 2H), 4.38-4.42 (m, 1H), 7.01-7.18 (m, 4H), 7.38 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H), 7.50-7.54 (m, 1H), 7.58 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H), 7.79-7.88 (m, 1H) ppm.

HRMS (FAB) $\text{C}_{25}\text{H}_{22}\text{ClN}_3\text{O}_3$ berechnet: 447.1350, gefunden: 447.1350.

8.7 Versuche zu Kapite 6.2 – Zwischenstufen der Lösungssynthese von Macrolinen

(*R*)-Methyl-2-((5-methyl-1*H*-indol-3-yl)methylamino)-3-(1*H*-indol-3-yl)propanoat (100b)

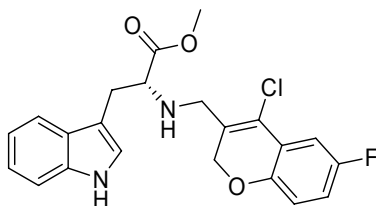


Es wurde *D*-tryptophanmethylesterhydrochlorid 0.331 g (1.30 mmol, 1.0 äq.) mit 25%iger NH_3 -Lösung versetzt und anschließend dreimal mit Chloroform extrahiert. Nach Entfernen des Lösungsmittels wurde der Rückstand in 10 mL Methanol aufgenommen und 0.238 g (1.50 mmol, 1.15 Äq.) 5-Methylindol-3-carbaldehyd versetzt. Nach 3.5 h erfolgte die Zugabe von 0.163 g (2.60 mmol, 2.0 äq.) Natriumcyanoborhydrid bei 0 °C. Die Reaktionsmischung wurde über Nacht bei RT gerührt und anschließend mit gesättigter NaCl-Lösung gequenchet. Nach Extraktion mit Chloroform und Entfernen des Lösungsmittels *in vacuo* wurde das Rohprodukt mittels Säulenchromatographie gereinigt.

Ausbeute: 0.211 g, 0.58 mmol, 45%.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ 2.32 (s, 3H), 3.08 (dd, 1H, $J = 14.5$ Hz, $J = 7.2$ Hz), 3.13 (dd, 1H, $J = 14.4$ Hz, $J = 6.2$ Hz), 3.60 (s, 3H), 3.72 (dd, 1H, $J = 7.2$ Hz, $J = 6.2$ Hz), 3.80 (d, 1H, $J = 13.1$ Hz), 3.96 (d, 1H, $J = 13.1$ Hz), 6.60 (m, 3H, 1H), 7.02 (ddd, 1H, $J = 8.0$ Hz, $J = 7.1$ Hz, $J = 1.1$ Hz), 7.11 (ddd, 1H, $J = 7.9$ Hz, $J = 7.6$ Hz, $J = 1.2$ Hz), 7.14 (d, 1H, $J = 8.3$ Hz), 7.22 (dd, 1H, $J = 1.6$ Hz, $J = 0.8$ Hz), 7.26 (ddd, 1H, $J = 8.1$ Hz, $J = 1.8$ Hz, $J = 0.9$ Hz), 7.51 (ddd, 1H, $J = 7.8$ Hz, $J = 1.9$ Hz, $J = 0.9$ Hz), 7.80 (s, 1H), 7.88 (s, 1H) ppm.

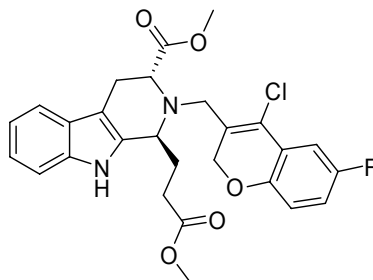
HRMS (LCMS-ESI): $\text{C}_{22}\text{H}_{23}\text{N}_3\text{O}_2$: berechnet: 362.1864, gefunden: 362.1863.

(2R)-2-((4-Chlor-6-fluor-2H-chromen-3-yl)methylamino)-3-(1H-indol-3-yl)propansäuremethylester (100a)

Es wurde *D*-Tryptophanmethylesterhydrochlorid 0.331 g (1.30 mmol, 1.0 äq.) mit 25%iger NH₃-Lösung versetzt und anschließend dreimal mit Chloroform extrahiert. Nach Entfernen des Lösungsmittels wurde der Rückstand in 10 mL Methanol aufgenommen und mit 0.553 g (2.60 mmol, 2.0 äq.) 4-Chlor-6-fluor-2*H*-benzopyran-3-carbaldehyd versetzt. Zusätzlich wurden 0.138 g (1.30 mmol, 1 Äq.) Orthoameisensäuretrimethylester hinzugegeben. Nach 2.0 h erfolgte die Zugabe von 0.163 g (2.60 mmol, 2.0 äq.) Natriumcyanoborhydrid bei 0 °C. Die Reaktionsmischung wurde über Nacht bei RT gerührt und anschließend mit gesättigter NaCl-Lösung gequenchet. Nach Extraktion mit Chloroform und Entfernen des Lösungsmittels *in vacuo* wurde das Rohprodukt mittels Säulenchromatographie gereinigt.

Ausbeute: 0.209 g, 0.50 mmol, 38%.

¹H-NMR: (400 MHz, CDCl₃): 3.00 (d d, 1H, *J* = 14.5 Hz, *J* = 7.2 Hz), 3.13 (dd, *J* = 14.5 Hz, *J* = 5.6 Hz, 1H), 3.40 (d, 1H, *J* = 13.9 Hz), 3.48 (d, 1H, *J* = 13.9 Hz), 3.52 (dd, 1H, *J* = 5.6 Hz, *J* = 7.2 Hz), 3.60 (s, 3H), 4.53 (d, 1H, *J* = 14.3 Hz), 4.68 (d, 1H, *J* = 14.2 Hz), 6.66 (dd, 1H, *J* = 8.8 Hz, *J*_{HF} = 4.4 Hz), 6.77 (ddd, 1H, *J*_{HF} = 8.7 Hz, *J* = 8.4 Hz, *J* = 3.0 Hz), 6.96 (d, 1H, *J* = 2.2 Hz), 7.00 (ddd, 1H, *J* = 7.9 Hz, *J* = 7.5 Hz, *J* = 1.0 Hz), 7.04 (dd, 1H, *J*_{HF} = 9.2 Hz, *J* = 3.0 Hz), 7.08 (ddd, 1H, *J* = 8.2 Hz, *J* = 7.2 Hz, *J* = 1.1 Hz), 7.26 (d, 1H, *J* = 8.1 Hz), 7.50 (d, 1H, *J* = 7.9 Hz), 8.00 (bs, 1H) ppm.

(1S, 3R)-Methyl-1-(2-(methoxycarbonyl)ethyl)-2-((6-chlor-4-fluor-2H-chromen-3-yl)methyl)-2,3,4,9-tetrahydro-1H-pyrido[3,4-b]indol-3-carboxylat (90a)

Es wurde eine Lösung des Tryptophanmethylesterderivates **100a** (0.123 g, 0.30 mmol, 1.0 Äq.) in 10 mL einer 15%-igen Lösung von TFA in DCM gerührt. Bei RT wurde Methyl-4,4-dimethoxybutyrat (0.097 g, 0.60 mmol, 2.0 Äq.) hinzugegeben. Die Reaktion wurde über Nacht gerührt. Mittels einer NaHCO₃-Lösung wurde der pH-Wert der Lösung auf 8 - 9 eingestellt. Nach Extraktion mit DCM und Entfernen des Lösungsmittels unter reduziertem Druck erfolgt die Reinigung des Rohproduktes durch Säulenchromatographie.

Ausbeute: 0.147 g (0.29 mmol), 97%.

¹H-NMR: (400 MHz, CDCl₃): 1.97 (m, 1H), 2.10 (m, 1H), 2.42 (m, 1H), 2.58 (m, 1H), 3.06 (m, 2H), 3.30 (d, 1H, *J* = 13.6 Hz), 3.45 (s, 3H), 3.64 (d, 1H, *J* = 13.6 Hz), 3.78 (s, 3H), 3.97 (m, 2H, 10-H), 4.80 (d, 1H, *J* = 14.6 Hz), 5.09 (d, 1H, *J* = 14.6 Hz), 6.78 (dd, 1H, *J* = 8.6 Hz, *J*_{HF} = 4.5 Hz), 6.90 (ddd, 1H, *J*_{HF} = 8.7 Hz, *J* = 8.5 Hz, *J* = 3.0 Hz), 7.16 (m, 3H, 4-H, 5-H), 7.34 (d, 1H, *J* = 8.2 Hz), 7.58 (d, 1H, *J* = 7.9 Hz) ppm.

8.8 Versuche zu Kapitel 6.4 – Kinetische Analyse des Bindungsmodus

Zur Optimierung der Enzymkonzentration wurde eine Enzymverdünnungsreihe in frisch hergestelltem Puffer mit 2 mM DTT und 0.025% NP-40 hergestellt. Diese Lösung wird im Folgenden Lösung A genannt. Die Enzymverdünnungen waren im Bereich von 1/60 bis 1/1920. Die Startkonzentration betrug 1.2 mg/mL.

Zu IC_{50} Bestimmung wurde eine Inhibitorverdünnung in Lösung A mit Inhibitorkonzentrationen zwischen 100 mM und 1.5625 mM angefertigt. Die Enzymkonzentration lag bei 1/150. Die Lösung wurde 30 min inkubiert. Nach Zugabe von Substrat (Endkonzentration 1 mM) und einer weiteren Inkubationszeit von 2 min konnte die Hydrolyse des Substrats *via* UV für 50 min bei 37 °C untersucht werden. Alle 2 min wurde die resultierende Absorption bei 405 nm gemessen. Um eine homogene Reaktionsmischung zu gewährleisten, wurde die Messplatte jeweils 20 s für 10 s bei 600 RpM geschüttelt. Die IC_{50} -Werte wurden als Wendepunkte der Anfangsgeschwindigkeit/Konzentrations-Auftragung bestimmt.

Zur K_M Bestimmung wurden Substratverdünnungen von 200 mM bis 0.2 μ M hergestellt. Nach Zugabe von Enzym (Endverhältnis 1/150) und einer Inkubationszeit von 2 min wurde die UV-Adsorption für 50 min gemessen. Alle 2 min wurde ein Messpunkt bei 37 °C und 405 nm aufgenommen. Um eine homogene Reaktionsmischung zu gewährleisten, wurde auch diesmal die Messplatte jeweils 20 s für 10 s bei 600 RpM geschüttelt. Der K_M wurde wie im Hauptteil beschrieben aus der Lineweaver-Burk Analyse ermittelt. Zur Bestimmung des Bindungsmodus wurde eine K_I -Kalibrationskurve erstellt, die die Bestimmung der Konzentration des Hydrolyseproduktes aus verschiedenen Adsorptionswerten ermöglicht. Dann wurden Substratverdünnungen im Konzentrationsbereich von 200 mM bis 0.2 μ M hergestellt. Es wurden Enzymlösungen in Lösung A mit einem Enzymanteil von 1/150 und Inhibitorlösungen mit Endkonzentrationen von 64.8 μ M; 32.4 μ M und 16.2 μ M

8. Experimenteller Teil

gemischt. Nach 15 min Inkubationszeit bei Raumtemperatur wurde die Substratlösung zum Enzym-Inhibitorgemisch hinzugefügt. Nach einer Inkubationszeit von 2 min wurde die UV-Adsorption bei 405 nm über eine Messzeit von 50 min bei 37 °C gemessen. Datenpunkte wurden alle 2 min aufgenommen. Während der gesamten Messzeit wurde die Platte alle 20 s für 10 s bei 600 RpM geschüttelt. Der resultierende K_i wurde, wie im Hauptteil beschrieben, berechnet.

9. Literaturverzeichnis

- [1] M. A. Koch, L.-O. Wittenberg, S. Basu, D. A. Jeyaraj, E. Gourzoulidou, K. Reinecke, A. Odermatt, H. Waldmann, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, *101*, 16721-16726.
- [2] R. Balamurugan, F. J. Dekker, H. Waldmann, *Mol. Biosyst.* **2005**, *1*, 36-45.
- [3] B. M. McArdle, R. J. Quinn, *ChemBioChem* **2007**, *8*, 788-798.
- [4] T. Leßmann, H. Waldmann, *Chem. Commun.* **2006**, 3380-3389.
- [5] J. P. Nandy, M. Prakesch, S. Khadem, P. T. Reddy, U. Sharma, P. Arya, *Chem. Rev.* **2009**, *109*, 1999-2060.
- [6] P. Arya, R. Joseph, Z. Gan, B. Rakic, *Chem. Biol.* **2005**, *12*, 163-180.
- [7] M. Yoshida, C. Hedberg, M. Kaiser, H. Waldmann, *Chem. Commun.* **2009**, 2926-2928.
- [8] S. Wetzel, W. Wilk, S. Chammaa, B. Sperl, A. Roth, A. Yektaoglu, S. Renner, T. Berg, C. Arenz, A. Giannis, T. I. Oprea, D. Rauh, M. Kaiser, H. Waldmann, *Angew. Chem Int. Ed.* **2009**, abgeschickt.
- [9] W. Wilk, H. Waldmann, M. Kaiser, *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, *17*, 2304-2309.
- [10] D.R. Spring, *Chem. Soc. Rev.* **2005**, *34*, 472-482.
- [11] C. M. Dobson, *Nature* **2004**, *432*, 824-828.
- [12] R. S. Bohacek, C. McMartin, W. C. Guida, *Med. Res. Rev.* **1996**, *16*, 3-50.
- [13] C. A. Lipinski, C., A. Hopkins, *Nature* **2004**, *432*, 855-861.
- [14] M.D. Burke, S. L. Schreiber, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 46-58.
- [15] A. Nören-Müller, I. Reis-Correa Jr., H. Prinz, C. Rosenbaum, K. Saxena, H. J. Schwalbe, D. Vestweber, G. Cagna, S. Schunk, O. Schwarz, H. Schiewe, H. Waldmann, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2006**, *103*, 10606-10611.
- [16] S. Wetzel, K. Klein, S. Renner, D. Rauh, T. I. Oprea, P. Mutzel, H. Waldmann, *Nat. Chem. Biol.* **2009**, *5*, 581-583.
- [17] S. Renner, W. A. van Otterlo, M. Dominguez Seoane, S. Mocklinghoff, B. Hofmann, S. Wetzel, A. Schuffenhauer, P. Ertl, T. I. Oprea, D. Steinhilber, L. Brunsveld, D. Rauh, H. Waldmann, *Nat. Chem. Biol.* **2009**, *5*, 585-92.
- [18] G. M. Cragg, D. J. Newman, *Pure Appl. Chem.* **2005**, *77*, 7-24.
- [19] D. J. Newman, G. M. Cragg, *J. Nat. Prod.* **2007**, *70*, 461-477.
- [20] B. M. Gallagher Jr., *Curr. Med. Chem.* **2007**, *14*, 2959-2967.
- [21] J. M. Smith, *Nature* **1970**, *225*, 563-564.
- [22] H. M. Wilks, A. Cortes, D. C. Emery, D. J. Halsall, A. R. Clarke, J. J. Holbrook, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1992**, *672*, 80-93.
- [23] R. B. Russell, P. D. M. Sasiemi, J. E. Sternberg, *J. Mol. Biol.* **1998**, *282*, 903-918.
- [24] M. Kaiser, S. Wetzel, K. Kumar, H. Waldmann, *Cell. Mol. Life Sci.* **2008**, *65*, 1186-1201.
- [25] M. A. Koch, A. Schuffenhauer, M. Scheck, S. Wetzel, M. Casaulta, A. Odermatt, P. Ertl, H. Waldmann, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, *102*, 17272-17277.
- [26] F. J. Dekker, M. A. Koch, H. Waldmann, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2005**, *9*, 232-239.

- [27] O. Barun, K. Kumar, S. Sommer, A. Langerak, T. U. Mayer, O. Muller, O. H. Waldmann, *Eur. J. Org. Chem.* **2005**, 4773-4788.
- [28] T. Leßmann, M. G. Leuenberger, S. Menninger, M. Lopez-Canet, O. Müller, S. Hümmer, J. Bormann, K. Korn, E. Fava, M. Zerial, T. U. Mayer, H. Waldmann, *Chem. Biol.* **2007**, *14*, 443-451.
- [29] L. Bialy, H. Waldmann. *Chem. Eur. J.* **2004**, *10*, 2759-2780.
- [30] J. D. Umarye, T. Lessmann, A. B. Garcia, V. Mamane, S. Sommer, H. Waldmann, *Chem. Eur. J.* **2007**, *13*, 3305-3319.
- [31] B. Meseguer, D. Alonso-Diaz, N. Griebenow, T. Herget, H. Waldmann, *Angew. Chem. Int. Ed* **1999**, *38*, 2902-2906.
- [32] B. Meseguer, D. Alonso-Diaz, N. Griebenow, T. Herget, H. Waldmann, *Chem. Eur. J.* **2000**, *6*, 3943-3957.
- [33] C. Rosenbaum, P. Baumhof, R. Mazitschek, O. Muller, A. Giannis, H. Waldmann, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**; *43*, 224-228.
- [34] I. Reis-Corrêa Jr., A. Nören-Müller, H.-D. Ambrosi, S. Jakupovic, K. Saxena, H. Schwalbe, M. Kaiser, H. Waldmann, *Chem. Asian J.* **2007**, *2*, 1109-1126.
- [35] A. Nören-Müller, W. Wilk, K. Saxena, H. Schwalbe, M. Kaiser, H. Waldmann, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 5973-5977.
- [36] W. Wilk, A. Nören-Müller, M. Kaiser, H. Waldmann, *Chem. Eur. J.* **2009**, *15*, 11976-11984.
- [37] D. Brohm, S. Metzger, A. Bhargava, O. Muller, F. Lieb, H. Waldmann, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 307-311.
- [38] L. Holm, C. Sander, *Nucleic Acids Res* **1994**, *22*, 3600-3609.
- [39] I. N. Shindyalov, P. E. Bourne, *Protein Eng* **1998**, *11*, 739-47
- [40] unveröffentlichte Arbeiten von Dr. S. Wetzel.
- [41] M. Scheck, M. A. Koch, H. Waldmann, *Tetrahedron* **2008**, *64*, 4792-4802.
- [42] M. Eguchi, *Med. Res. Rev.* **2003**, *24*, 182-212.
- [43] A. Schuffenhauer, P. Ertl, S. Roggo, S. Wetzel, M. A. Koch, H. Waldmann, *J. Chem. Inf. Model* **2007**, *47*, 47-58.
- [44] D. J. Newman, G. M. Cragg, *Journal of Natural Products* **2007**, *70*, 461-477.
- [45] O. Schwarz, S. Jakupovic, H.-D. Ambrosi, L. O. Haustedt, C. Mang, L. Mueller-Kuhrt, *Journal of Combinatorial Chemistry* **2007**, *9*, 1104-1113.
- [46] D. S. Tan, *Chemical Biology* **2007**, *2*, 483-518.
- [47] J. Larsson, J. Gottfries, L. Bohlin, A. Backlund, *J. Nat. Prod.* **2005**, *68*, 985-991.
- [48] J. Rosen, L. Rickardson, A. Backlund, J. Gullbo, L. Bohlin, R. Larsson, J. Gottfries, *QSAR Comb. Sci.* **2009**, *28*, 436-446
- [49] S. Wetzel, *Dissertation*, TU Dortmund **2009**.
- [50] *Dictionary of Natural Products, v17.2* **2008**, Chapman & Hall / CRC Informa, <http://www.crcpress.com/>.
- [51] M. Olah, M. Mracec, L. Ostopovici, R. Rad, A. Bora, N. Hadaruga, I. Olah, M. Banda, Z. Simon, M. Mracec, T. I. Oprea, *WOMBAT: world of molecular bioactivity*, Vol. 23, Wiley-VCH, **2005**.

- [52] M. Olah, R. Rad, L. Ostopovici, A. Bora, N. Hadaruga, D. Hadaruga, R. Moldovan, A. Fulas, M. Mracec, T. I. Oprea, *Chemical Biology* **2007**, *2*, 760-786.
- [53] A. K. Ghose, V. N. Viswanadhan, J. J. Wendoloski, *J. Phys. Chem. A* **1998**, *102*, 3762-3772.
- [54] C. A. Lipinski, F. Lombardo, B. W. Dominy, P. J. Feeney, *Adv. Drug Delivery Rev.* **2001**, *46*, 3-26.
- [55] S. Muresan, J. Sadowski, *Methods and Principles in Medicinal Chemistry* **2008**, *37*, 441-461.
- [56] G. M. Rishton, *Drug Discovery Today* **2002**, *8*, 86-96.
- [57] T. I. Oprea, A. M. Davis, S. J. Teague, P. D. Leeson, *J. Chem. Inf. Model.* **2001**, *41*, 1308-1315.
- [58] F. W. Sertürner, *Ann. Phys.* **1817**, *55*, 56-90.
- [59] F. W. Sertürner, *Ann. Chim.* **1817**, *5*, 21-42.
- [60] F. W. Sertürner, *J. Pharmacie* **1805**, *13*, 234-236.
- [61] F. W. Sertürner, *J. Pharmacie* **1806**, *14*, 47-93.
- [62] R. R. Vardaro, V. Di Marzo, A. Crispino and G. Cimino, *Tetrahedron* **1991**, *47*, 5569-5576.
- [63] V. Di Marzo, R. R. Vardaro, L. De Petrocellis, G. Villani, R. Minei, G. Cimino, *Experientia*, **1991**, *47*, 1221-1227.
- [64] J. E. Moses, J. E. Baldwin and R. M. Adlington, *Tetrahedron Lett.*, **2004**, *45*, 6447-6448.
- [65] G. X. Liang, A. K. Miller and D. Trauner, *Org. Lett.* **2005**, *7*, 819-821.
- [66] B. E. Marynoff, A. B. Reitz *Chem. Rev.* **1989**, *89*, 863-927.
- [67] L. M. Gayo, M. J. Suto *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 513-516,
- [68] V. vanRheenen, R. C. Kelly, D. Y. Cha *Tetrahedron Lett.* **1976**, *17*, 1973-1976
- [69] N. K. Jana, J. G. Verkade, *Org. Lett.*, **2003**, *5*, 3787-3790.
- [70] M. Bortolato, K. Chen, J. C. Shih, *Adv. Drug Delivery Rev.* **2008**, *60*, 1527-1533.
- [71] R. J. Ward, F. Lallemand, P. de Witte, D. T. Dexter, *Prog. Neurobiol.* **2008**, *85*, 135-147.
- [72] M. B. H. Youdim, D. Edmondson, K. F. Tipton, *Nat. Rev. Neurosci.* **2006**, *7*, 295-309.
- [73] Bolasco, A.; Fioravanti, R.; Carradori, S., *Expert Opin. Therapeutic Patents* **2005**, *15*, 1763-1782.
- [74] C. P. Lim, X. Cao, *Mol. BioSys.* **2006**, *2*, 536-550.
- [75] T. Berg, *Chem. Bio. Chem.* **2008**, *9*, 2039-44.
- [76] S. Fletcher, J. Turkson, P. T. Gunning, *Chem. Med. Chem.* **2008**, *3*, 1159-1168.
- [77] R. Buettner, M. Kortylewski, D. Pardoll, H. Yu, R. Jove, *STAT proteins as molecular targets for cancer therapy. In: Signal Transducers and Activators of Transcription (STATs) Activation and Biology*, P. B. Sehgal, D. E. Levy, T., Eds., Kluwer Academic Publishers: Norwell, USA, **2003**, 645-661.
- [78] L. Costantino, D. Barlocco, *Curr. Med. Chem.* **2008**, *15*, 834-843.
- [79] Z. Chen, Z. C. Han, *Medicinal Research Reviews* **2008**, *28*, 185-200.
- [80] N. Marchesini, Y. A. Hannun, *Biochem. Cell Biol.* **2004**, *82*, 27-44.
- [81] K. Trajkovic, C. Hsu, S. Chiantia, L. Rajendran, D. Wenzel, F. Wieland, P. Schwillle, B. Brugger, M. Simons, *Science* **2008**, *319*, 1244-1247.

- [82] J. Buigues, J. Vallejo *The Journal of Clinical Psychiatry* **1987**, *48*, 55-59.
- [83] T. L. Lemke, D. A. Williams, *Foye's principles of medicinal chemistry*. (6th Ed.) V. Roche, S. W. Zito, Eds., Lippincott Williams & Wilkins: Philadelphia, USA, **2008**, 1377 ff.
- [84] K. R. Bonson, M. Baggott., *Handbook of neurotoxicology*. E. J. Massaro Ed., Humana Press: Totowa, USA, **2002**, 237.
- [85] P. Riederer, L. Lachenmayer, G. Laux, *Curr. Med. Chem.* **2004**, *11*, 2033–2043.
- [86] C. Binda, F. Hubálek, M. Li, Y. Herzig, J. Sterling, D. E. Edmondson, A. Mattevi, *Journal of medicinal chemistry* **2005**, *48*, 8148-8154.
- [87] S. Henriot, C. Kuhn, R. Kettler, M. Da Prada *J Neural Transm Suppl.* **1994**, *41*, 321-325.
- [88] L. Novaroli, M. Reist, E. Favre, A. Carotti, M. Catto, P.-A. Carrupt, *Bioorg. Med. Chem.* **2005**, *13*, 6212-6217.
- [89] M. Verleyea, R. Steinschneider, F. X. Bernard, J.-M. Gillardina, *Brain Research* **2007**, *1138*, 30-38.
- [90] A. M. Cesura, M. D. Galva, R. Imhof, E. Kyburz, G. B. Picotti, M. Da Prada, *Eur. J. Pharmacol.* **1989**, *162*, 457-465.
- [91] G. P. McGlacken, I. J. S. Fairlamb, *Nat.Prod.Rep.* **2005**, *22*, 369–385.
- [92] A. Carcereri de Prati, A. R. Ciampa, E. Cavalieri, R. Zaffini, E. Darra, M. Menegazzi, H. Suzuki, S. Mariotto, *Current Medicinal Chemistry* **2005**, *12*, 1819-1828.
- [93] D. C.Fry, L. T.Vassilev, *J Mol Med* **2005**, *83*, 955-63.
- [94] L. L.Conte, C. Chothia, J. Janin, *J. Mol. Biol.* **1999**, *285*, 2177-2198.
- [95] J. Mueller, B. Sperl; W. Reindl, A. Kiessling, T. Berg, *ChemBioChem* **2008**, *9*, 723-727.
- [96] J. Schust, B. Sperl, A. Hollis, T. U. Mayer, T. Berg, *Chem. Biol.* **2006**, *13*, 1235-1242.
- [97] J. Schust, *Dissertation*, Julian-Maximilians-Universität Würzburg **2006**.
- [98] E. Fasler-Kann, A. Pansky, M. Wiederkehr, M. Battegay, M. H. Heim, *Eur. J. Biochem.* **1998**, *254*, 514-519.
- [99] E. H. Schuchman, R. J. Desnick, *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*, C. R. Scriver, W. S. Sly, B. Childs, A. L. Beaudet, D. Valle, K. W. Kinzler, B. Vogelstein, Eds., McGraw Hill: New York, **2001**, 3589-3610.
- [100] R. Goggel, S. Winoto-Morbach, G. Vielhaber, Y. Imai, K. Lindner, L. Brade, H. Brade, S. Ehlers, A. S. Slutsky, S. Schutze, E. Gulbins, S. Uhlig, *S. Nat. Med.* **2004**, *10*, 155-160.
- [101] I. Petrache, V. Natarajan, L. Zhen, T. R. Medler, A. T. Richter, C. Cho, W. C. Hubbard, E. V. Berdyshev, R. M. Tudor, *Nat. Med.* **2005**, *11*, 491-498.
- [102] M. Kolzer, C. Arenz, K. Ferlinz, N. Werth, H. Schulze, R. Klingenstein, K. Sandhoff, *Biol. Chem.* **2003**, *384*, 1293-1298.
- [103] A. G. Roth, D. Drescher, Y. Yang, S. Redmer, S. Uhlig, C. Arenz, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2009**, *48*, 7560-7563.
- [104] M. Hamada,; K. Iikubo, Y. Ishikawa, A. Ikeda, K. Umezawa, S. Nishiyama, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2003**, *13*, 3151-3153.
- [105] C. Okudaira, Y. Ikeda, S. Kondo, S. Furuya, Y. Hirabayashi, T. Koyano, Y. Saito, K. Umezawa, *Journal of Enzyme Inhibition* **2000**, *15*, 129-138.

- [106] M. Marsh, G. van Meer, *Science* **2008**, 319, 1191-1192.
- [107] C. Arenz, A. Giannis, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2000**, 39, 1440-1442.
- [108] F. Nara, M. Tanaka, T. Hosoya, K. Suzuki-Konagai, T. Ogita, *J. Antibiot* **1999**, 52, 525-530.
- [109] R. Uchida, H. Tomoda, Y. Dong, S. Omura, *J. Antibiot.* **1999**, 52, 572-574.
- [110] V. Wascholowski, A. Giannis, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2006**, 45, 827-30.
- [111] M. Tanaka, F. Nara, K. Suzuki-Konagai, T. Hosoya, T. Ogita, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, 119, 7871-7872.
- [112] F. Nara, M. Tanaka, T. Hosoya, K. Suzuki-Konagai, T. Ogita, *J. Antibiot.* **1999**, 52, 525-530.
- [113] Y. Shi, F. Lan, C. Matson, P. Mulligan, J. R. Whetstone, P. A. Cole, R. A. Casero, Y. Shi, *Cell* **2004**, 119, 941-953.
- [114] L. Holm, C. Sander, *Nucleic Acids Res.* **1994**, 17, 3600-3609. Der Dali Webserver kann über die folgende Internetadresse erreicht werden: http://ekhidna.biocenter.helsinki.fi/dali_server.
- [115] Y. Huang, E. Greene, T. M. Stewart, A. C. Goodwin, P. M. Baylin, R. A. Casero Jr, *Proc. Natl. Acad. Sci USA* **2007**, 104, 8023-8028.
- [116] M. G. Lee, C. Wynder, D. M. Schmidt, D. G. McCafferty, R. Shiekhatter *Chem Biol* **2006**, 13, 563-567
- [117] D. M. Schmidt, D. G. McCafferty, *Biochemistry* **2007**, 46, 4408-4416.
- [118] M. Yang, J. C. Culhane, L. M. Szewczuk, P. Jalili, H. L. Ball, M. Machius, P. A. Cole, H. Yu *Biochemistry* **2007**, 46, 8058-8065.
- [119] R. Ueda, T. Suzuki, K. Mino, H. Tsumoto, H. Nakagawa, M. Hasegawa, R. Sasaki, T. Mizukami, N. Miyata, *J. Am. Chem. Soc.* 2009, 131, 17536-17537.
- [120] I. V. Tetko, V. Y. Tanchuk, T. N. Kasheva, A. E. Villa, *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* **2001**, 41, 1488-93.
- [121] P. Ertl, B. Rohde, P. Selzer, *J. Med. Chem.* **2000**, 43, 3714-3717.
- [122] Y. Liu, Y. Lu, M. Prashad, O. Repic, T. J. Blacklock, *Adv. Synth. Catal.* **2005**, 347, 217-219.
- [123] R. Pflantz, J. Christoffers, *Chem. Eur. J.* **2009**, 15, 2200-2209.
- [124] J. DeRuiter, B. E. Swearingen, V. Wandrekar, C. A. Mayfield, *J. Med. Chem.* **1989**, 32, 1033-1038.
- [125] E. A. Wydysh, S. M. Medghalchi, A. Vadlamudi, C. A. Townsend, *J. Med. Chem.* **2009**, 52, 3317-3327.
- [126] S. Sato, T. Sakamoto, E. Miyazawa, Y. Kikugawa, *Tetrahedron* **2004**, 7899-7906.
- [127] I. Reis-Corrêa Jr., A. Nören-Müller, H.-D. Ambrosi, S. Jakupovic, K. Saxena, H. Schwalbe, M. Kaiser, H. Waldmann, *Chem. Asian J.* **2007**, 2, 1109-1126.
- [128] D. Butler, *Nature* **2000**, 406, 670-672.
- [129] R. Singh, V. Rao, H. Shakila, R. Gupta, A. Khera, N. Dhar, A. Singh, A. Koul, Y. Singh, M. Naseema, R. P. Narayanan, C. N. Paramasivan, V. D. Ramanathan, A. K. Tyagi, *Mol. Microbiol.* **2003**, 50, 751-762.

- [130] L. Bialy, H. Waldmann, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 3814-3839.
- [131] M. B. Soellner, K. A. Rawls, C. Grundner, T. Alber, J. A. Ellman, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 9613-9615.
- [132] C. Grundner, D. Perrin, R. H van Huijsduijnen, D. Swinnen, J. Gonzales, C. L. Gee, T. N. Wells, T. Alber, *Structure* **2007**, *15*, 499-509.
- [133] A. Koul, T. Herget, B. Klebl, A. Ullrich, *Nat. Rev. Microbiol.* **2004**, *2*, 189-202.
- [134] T. Weide, L. Arve, H. Prinz, H. Waldmann, H. Kessler, *Bio. Med. Chem. Lett.* **2006**, *16*, 59-63
- [135] N. J. Beresford, D. Mulhearn, B. Szczepankiewicz, G. Liu, M. E. Johnson, A. Fordham-Skelton, C. Abad-Zapatero, J. S. Cavet, L. Taberner, *J. Antimicrob. Chemother.* **2009**, *63*, 928-936.
- [136] S. Zhao, X. Liao, T. Wang, J. Flippen-Anderson, J. M. Cook, *J. Org. Chem.* **2003**, *68*, 6279-6295.
- [137] P. Yu, T. Wang, J. M. Cook, *J. Org. Chem.* **2000**, *65*, 3173-3191.
- [138] J. Li, T. Wang, P. Yu, A. Peterson, R. Weber, D. Soerens, D. Grubisha, D. Bennett, J. M. Cook, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 6998-7010.
- [139] E. D. Cox, L. D. Hamaker, J. L. Peng Yu, K. M. Czerwinski, L. Deng, D. W. Berrett, J. M. Cook, *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 44-61.
- [140] E. D. Cox, J. M. Cook, *Chem. Rev.* **1995**, *95*, 1797-1842.
- [141] T. E. Nielson, F. Diness, M. Meldal, *Curr. Opin. Drug Discov. Dev.* **2003**, *6*, 801-814.
- [142] S. Hotha, J. C. Yarrow, J. G. Yang, S. Garrett, K. V. Rendchintala, T. U. Mayer, T. M. Kapoor, *Angew. Chem.* **2003**, *115*, 2481-2484, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 2379-2382.
- [143] Z.-Y. Zhang, S. Y. Lee, *Expert Opin. Investigat. Drugs* **2003**, *12*, 223-233.
- [144] S. Zhang, Z.-Y. Zhang, *Drug Discov. Today* **2007**, *12*, 373-381.
- [145] A. Nören-Müller, *Dissertation*, Technische Universität Dortmund **2008**.
- [146] M. Dixon, E. C. Webb, *Enzymes* **1979**, 3rd Edition, Longman, London, 340ff.
- [147] S. Carney, *Drug Discov. Today* **2005**, *10*, 1011-1013.

10. Abkürzungsverzeichnis

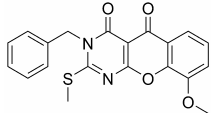
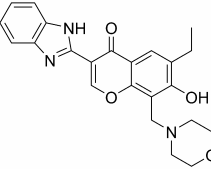
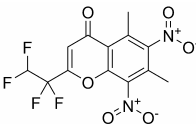
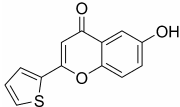
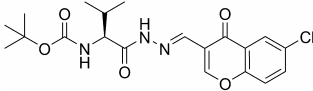
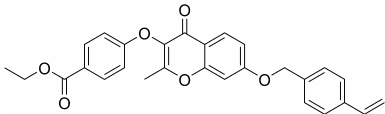
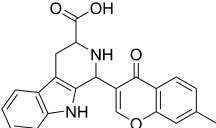
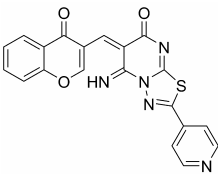
| | |
|------------------|--|
| abs. | absolut (wasser- und sauerstofffrei) |
| AChE | Acetylcholinesterase |
| Äq. | Äquivalent |
| 11 β HSD | Corticosteroid 11-beta-dehydrogenase isozyme 1 |
| BIOS | Biology-oriented synthesis |
| Bn | Benzyl |
| DBU | 1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en |
| DMF | Dimethylformamid |
| DMEM | Dulbecco's Modified Eagle Medium |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| DPN | Dictionary of Natural Products |
| ee | Enantiomeric Excess, Enantiomerenüberschuss |
| ESI | Electron Spray Ionization |
| FAB | Fast Atom Bombardment |
| FAD | Flavin Adenin Dinucleotid |
| Fmoc | 9-Fluorenylmethyloxycarbonyl |
| GC | Gaschromatographie |
| GC-MS | Gaschromatographie mit gekoppelter Massendetektion |
| h | Stunde |
| HPLC | High Performance Liquid Chromatography |
| HR-MS | High Resolution Mass Spectrometry |
| HRP | Horseradish Peroxidase |
| IC ₅₀ | mittlere inhibitorische Konzentration |
| LC | Liquid phase chromatography |
| LSD1 | Lysin Specific Demethylase 1 |
| MAO | Monoaminoxidase |

10. Abkürzungsverzeichnis

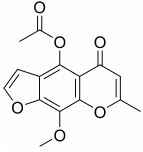
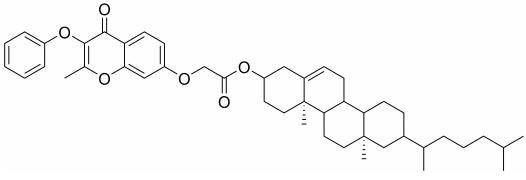
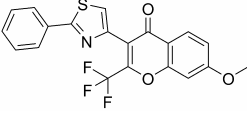
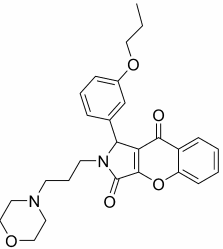
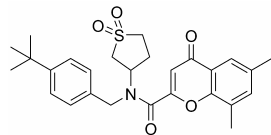
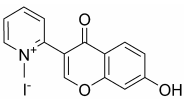
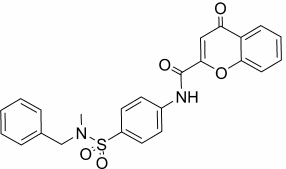
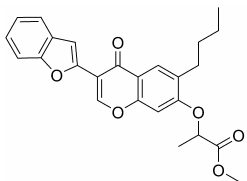
| | |
|----------------|--|
| mCPBA | <i>meta</i> -Chlorperbenzoesäure |
| Me | Methyl |
| MeOH | Methanol |
| min | Minute |
| NHMDS | Natrium-bis(trimethylsilyl)amid |
| NMO | <i>N</i> -Methylmorpholin- <i>N</i> -oxid |
| NSAR | nichtsteroidale Antirheumatika |
| <i>n</i> -BuLi | <i>n</i> -Butyllithium |
| PSSC | Protein Structure Similarity Clustering |
| PTP1B | Tyrosine-Protein Phosphatase non-Receptor Type 1 |
| RabGGTase | Geranylgeranyl Transferase Type-2 Subunit alpha |
| R _t | Retentionszeit |
| SCONP | Structural Classification of Natural Products |
| STAT | Signal Transducers and Activators of Transcription |
| STG | Scaffold Tree Generator |
| STN | Scaffold Tree Navigator |
| TBAF | Tetrabutylammoniumfluorid |
| TFA | Trifluoressigsäure |
| THF | Tetrahydrofuran |
| WOMBAT | World of Molecular Bioactivity |

11. Anhang

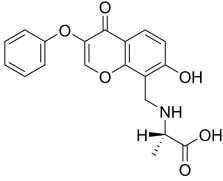
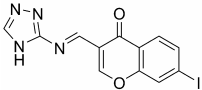
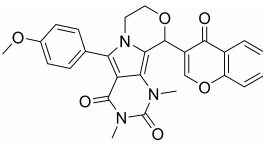
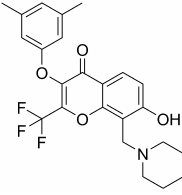
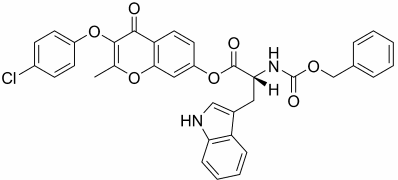
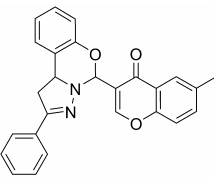
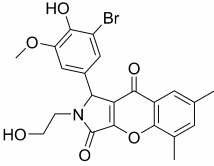
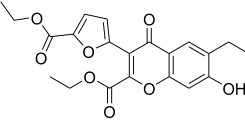
Anhang Tabelle 1: Vollständige Übersicht über die Zusammenstellung der γ -Pyron Substanzbibliothek. Die Substanzen wurden von Dr. S. Wetzel nach Strukturgerüsten und abnehmender Ähnlichkeit sortiert. Die Sortierung mittels des Programms Pipeline Pilot durchgeführt.^[8]

| Eintrag | Struktur | Substanz ID | Quelle |
|---------|---|-------------------|----------------|
| 1 |  | IBS_STOCK6S-12494 | InterBioScreen |
| 2 |  | IBS_STOCK1S-01509 | InterBioScreen |
| 3 |  | IBS_STOCK2S-49092 | InterBioScreen |
| 4 |  | IBS_STOCK3S-37796 | InterBioScreen |
| 5 |  | IBS_STOCK4S-88371 | InterBioScreen |
| 6 |  | IBS_STOCK1N-42389 | InterBioScreen |
| 7 |  | IBS_STOCK1N-24178 | InterBioScreen |
| 8 |  | IBS_STOCK5S-59840 | InterBioScreen |

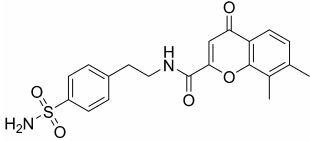
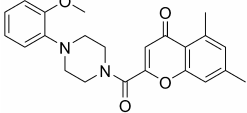
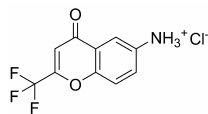
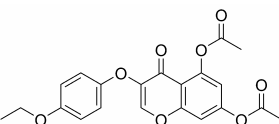
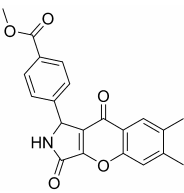
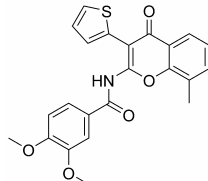
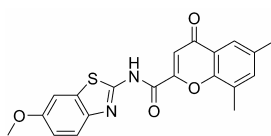
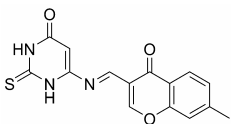
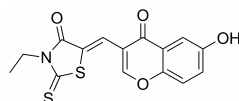
11. Anhang

| Eintrag | Struktur | Substanz ID | Quelle |
|---------|---|-------------------|----------------|
| 9 |  | IBS_STOCK1N-32199 | InterBioScreen |
| 10 |  | IBS_STOCK1N-65605 | InterBioScreen |
| 11 |  | IBS_STOCK1S-21508 | InterBioScreen |
| 12 |  | IBS_STOCK4S-44861 | InterBioScreen |
| 13 |  | IBS_STOCK5S-26389 | InterBioScreen |
| 14 |  | IBS_STOCK1N-41521 | InterBioScreen |
| 15 |  | IBS_STOCK5S-88963 | InterBioScreen |
| 16 |  | IBS_STOCK5S-29501 | InterBioScreen |

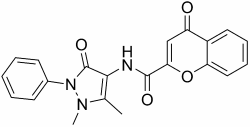
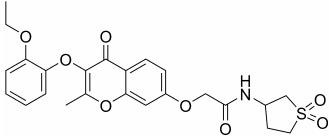
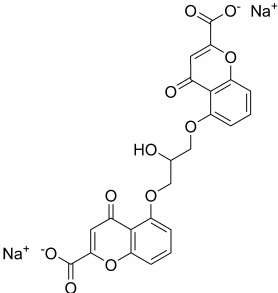
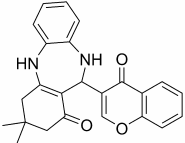
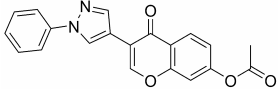
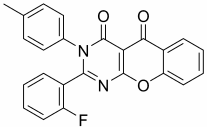
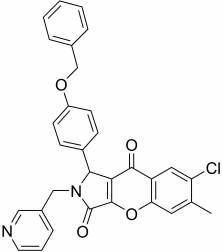
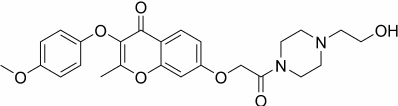
11. Anhang

| Eintrag | Struktur | Substanz ID | Quelle |
|---------|---|-------------------|----------------|
| 17 |  | IBS_STOCK1N-01522 | InterBioScreen |
| 18 |  | IBS_STOCK3S-15541 | InterBioScreen |
| 19 |  | IBS_STOCK5S-89309 | InterBioScreen |
| 20 |  | IBS_STOCK3S-25673 | InterBioScreen |
| 21 |  | IBS_STOCK1N-11532 | InterBioScreen |
| 22 |  | IBS_STOCK2S-27421 | InterBioScreen |
| 23 |  | IBS_STOCK5S-55717 | InterBioScreen |
| 24 |  | IBS_STOCK5S-37947 | InterBioScreen |

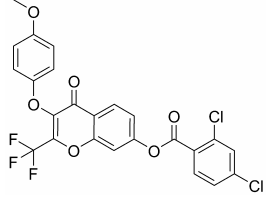
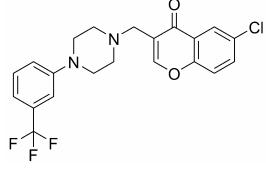
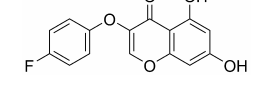
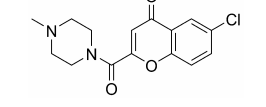
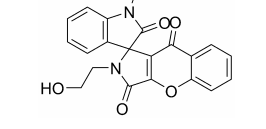
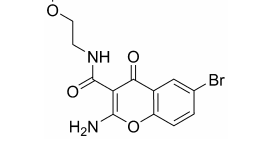
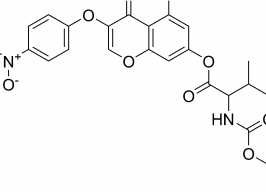
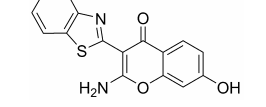
11. Anhang

| Eintrag | Struktur | Substanz ID | Quelle |
|---------|---|-----------------------|----------------|
| 25 |  | IBS_STOCK5S- 95070 | InterBioScreen |
| 26 |  | IBS_STOCK5S- 92087 | InterBioScreen |
| 27 |  | IBS_STOCK2S- 37497 | InterBioScreen |
| 28 |  | IBS_STOCK1N- 00030 | InterBioScreen |
| 29 |  | IBS_STOCK5S- 46014 | InterBioScreen |
| 30 |  | IBS_STOCK6S- 03980 | InterBioScreen |
| 31 |  | IBS_STOCK5S- 51464 | InterBioScreen |
| 32 |  | IBS_STOCK3S- 72615 | InterBioScreen |
| 33 |  | IBS_STOCK5S- 28698 | InterBioScreen |

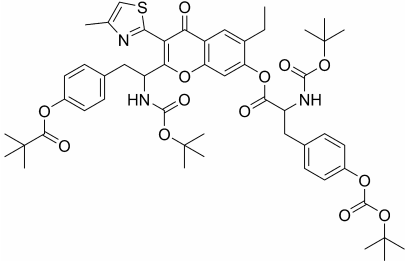
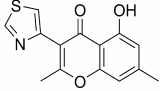
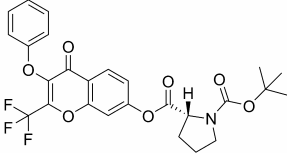
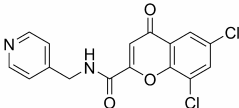
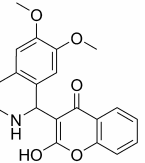
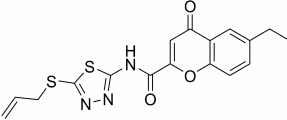
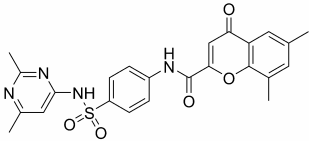

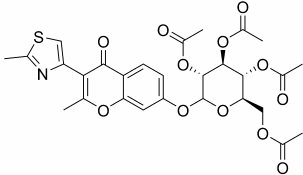
11. Anhang

| Eintrag | Struktur | Substanz ID | Quelle |
|---------|---|-------------------|----------------|
| 34 |  | IBS_STOCK5S-93953 | InterBioScreen |
| 35 |  | IBS_STOCK6S-40170 | InterBioScreen |
| 36 |  | IBS_STOCK1N-03646 | InterBioScreen |
| 37 |  | IBS_STOCK3S-93786 | InterBioScreen |
| 38 |  | IBS_STOCK3S-00760 | InterBioScreen |
| 39 |  | IBS_STOCK5S-27663 | InterBioScreen |
| 40 |  | IBS_STOCK5S-33485 | InterBioScreen |
| 41 |  | IBS_STOCK6S-38778 | InterBioScreen |

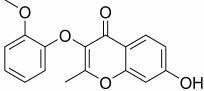
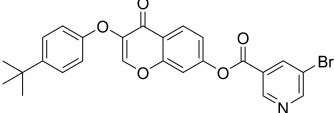
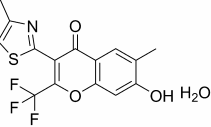
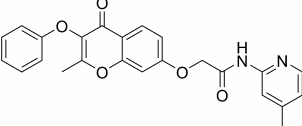
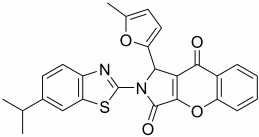
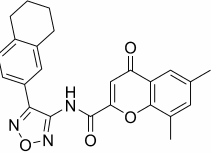
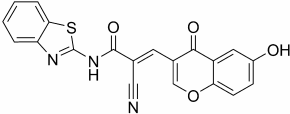
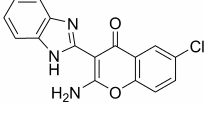
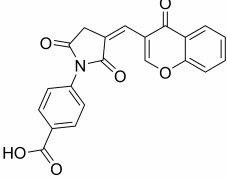
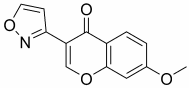
11. Anhang

| Eintrag | Struktur | Substanz ID | Quelle |
|---------|---|-------------------|----------------|
| 42 |  | IBS_STOCK2S-61495 | InterBioScreen |
| 43 |  | IBS_STOCK1S-94094 | InterBioScreen |
| 44 |  | IBS_STOCK1N-00199 | InterBioScreen |
| 45 |  | IBS_STOCK5S-84745 | InterBioScreen |
| 46 |  | IBS_STOCK5S-35834 | InterBioScreen |
| 47 |  | IBS_STOCK6S-19158 | InterBioScreen |
| 48 |  | IBS_STOCK1S-58565 | InterBioScreen |
| 49 |  | IBS_STOCK1N-28762 | InterBioScreen |

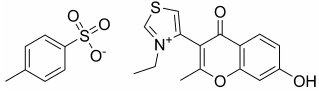
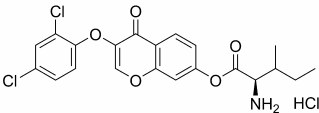
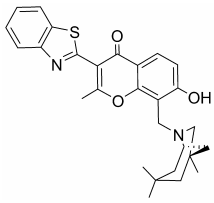
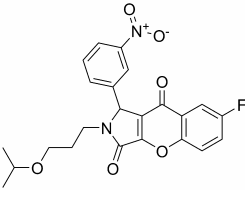
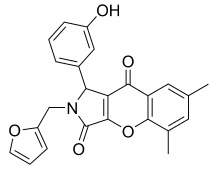
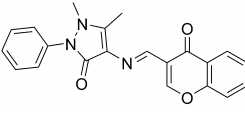
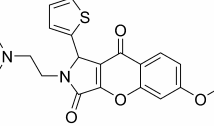
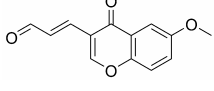
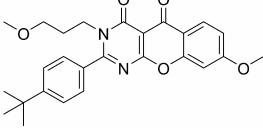
11. Anhang

| Eintrag | Struktur | Substanz ID | Quelle |
|---------|---|-------------------|----------------|
| 50 |  | IBS_STOCK1N-01015 | InterBioScreen |
| 51 |  | IBS_STOCK1N-06534 | InterBioScreen |
| 52 |  | IBS_STOCK1S-62595 | InterBioScreen |
| 53 |  | IBS_STOCK5S-85773 | InterBioScreen |
| 54 |  | IBS_STOCK1N-68133 | InterBioScreen |
| 55 |  | IBS_STOCK5S-92006 | InterBioScreen |
| 56 |  | IBS_STOCK5S-51355 | InterBioScreen |
| 57 |  | IBS_STOCK1N-25536 | InterBioScreen |
| 58 |  | IBS_STOCK1N-09832 | InterBioScreen |

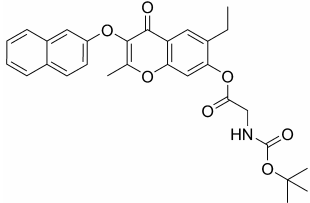
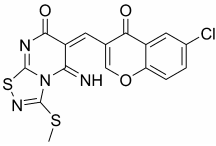
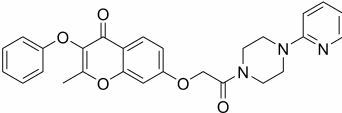
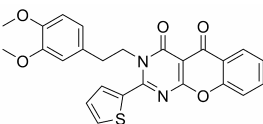
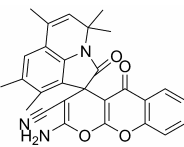
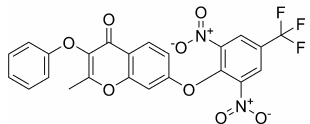
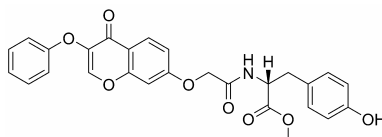
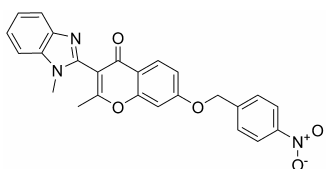
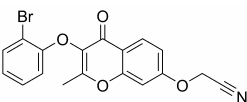
11. Anhang

| Eintrag | Struktur | Substanz ID | Quelle |
|---------|---|-------------------|----------------|
| 59 |  | IBS_STOCK1N-38257 | InterBioScreen |
| 60 |  | IBS_STOCK2S-71086 | InterBioScreen |
| 61 |  | IBS_STOCK1S-64619 | InterBioScreen |
| 62 |  | IBS_STOCK6S-42238 | InterBioScreen |
| 63 |  | IBS_STOCK5S-83275 | InterBioScreen |
| 64 |  | IBS_STOCK6S-30606 | InterBioScreen |
| 65 |  | IBS_STOCK5S-34578 | InterBioScreen |
| 66 |  | IBS_STOCK6S-17433 | InterBioScreen |
| 67 |  | IBS_STOCK6S-40009 | InterBioScreen |
| 68 |  | IBS_STOCK1N-05357 | InterBioScreen |

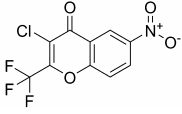
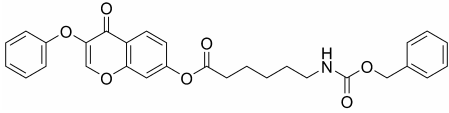
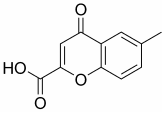
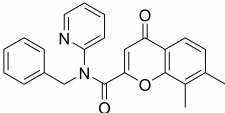
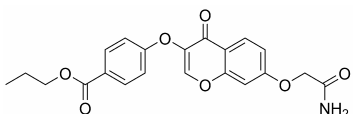
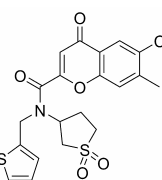
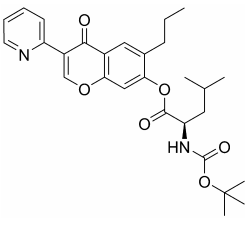
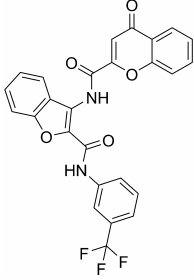
11. Anhang

| Eintrag | Struktur | Substanz ID | Quelle |
|---------|---|-------------------|----------------|
| 69 |  | IBS_STOCK5S-54717 | InterBioScreen |
| 70 |  | IBS_STOCK1N-44845 | InterBioScreen |
| 71 |  | IBS_STOCK1N-29177 | InterBioScreen |
| 72 |  | IBS_STOCK4S-40014 | InterBioScreen |
| 73 |  | IBS_STOCK5S-35432 | InterBioScreen |
| 74 |  | IBS_STOCK2S-85037 | InterBioScreen |
| 75 |  | IBS_STOCK5S-90083 | InterBioScreen |
| 76 |  | IBS_STOCK5S-39406 | InterBioScreen |
| 77 |  | IBS_STOCK5S-28297 | InterBioScreen |

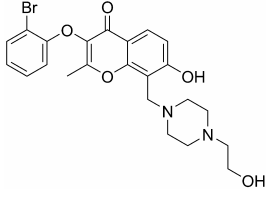
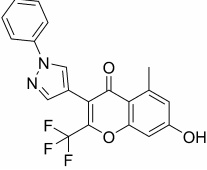
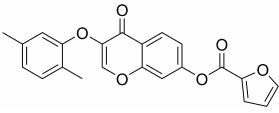
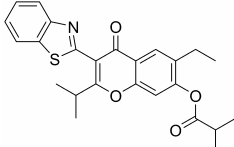
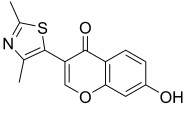
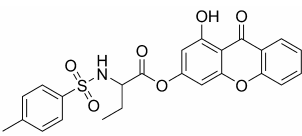
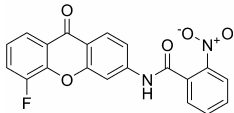
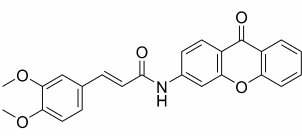
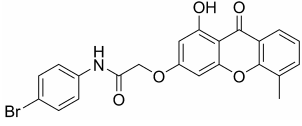
11. Anhang

| Eintrag | Struktur | Substanz ID | Quelle |
|---------|---|-------------------|----------------|
| 78 |  | IBS_STOCK1S-08223 | InterBioScreen |
| 79 |  | IBS_STOCK5S-47146 | InterBioScreen |
| 80 |  | IBS_STOCK6S-35285 | InterBioScreen |
| 81 |  | IBS_STOCK5S-41380 | InterBioScreen |
| 82 |  | IBS_STOCK5S-40481 | InterBioScreen |
| 83 |  | IBS_STOCK1S-58617 | InterBioScreen |
| 84 |  | IBS_STOCK1N-08947 | InterBioScreen |
| 85 |  | IBS_STOCK1S-67562 | InterBioScreen |
| 86 |  | IBS_STOCK4S-64888 | InterBioScreen |

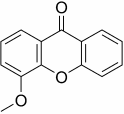
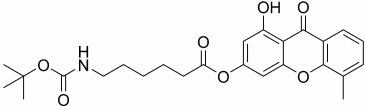
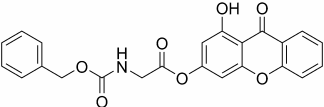
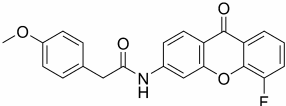
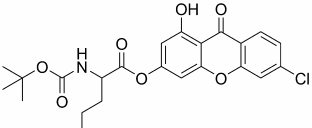
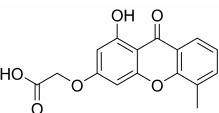
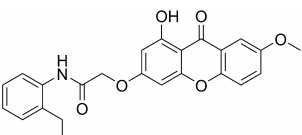
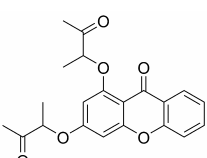
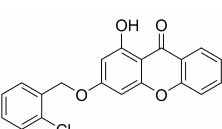
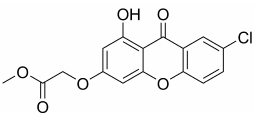
11. Anhang

| Eintrag | Struktur | Substanz ID | Quelle |
|---------|---|-----------------------|----------------|
| 87 |  | IBS_STOCK2S- 44578 | InterBioScreen |
| 88 |  | IBS_STOCK5S- 45046 | InterBioScreen |
| 89 |  | IBS_STOCK1N- 15258 | InterBioScreen |
| 90 |  | IBS_STOCK5S- 89437 | InterBioScreen |
| 91 |  | IBS_STOCK4S- 71041 | InterBioScreen |
| 92 |  | IBS_STOCK5S- 47982 | InterBioScreen |
| 93 |  | IBS_STOCK1N- 42885 | InterBioScreen |
| 94 |  | IBS_STOCK5S- 89402 | InterBioScreen |

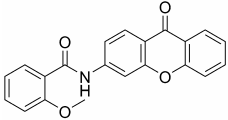
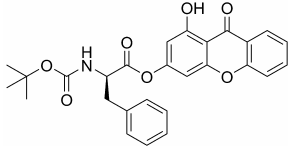
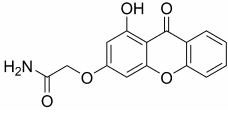
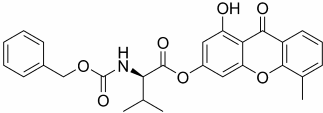
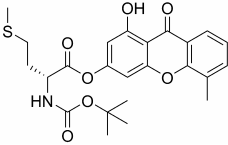
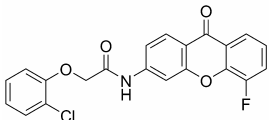
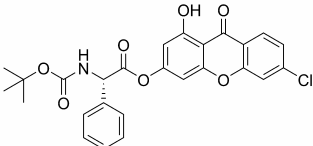
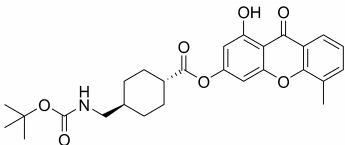
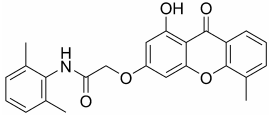
11. Anhang

| Eintrag | Struktur | Substanz ID | Quelle |
|---------|---|-------------------|----------------|
| 95 |  | IBS_STOCK4S-79796 | InterBioScreen |
| 96 |  | IBS_STOCK1S-17395 | InterBioScreen |
| 97 |  | IBS_STOCK1N-30832 | InterBioScreen |
| 98 |  | IBS_STOCK1N-29077 | InterBioScreen |
| 99 |  | IBS_STOCK1N-01163 | InterBioScreen |
| 100 |  | IBS_STOCK6S-00457 | InterBioScreen |
| 101 |  | IBS_STOCK5S-92398 | InterBioScreen |
| 102 |  | IBS_STOCK5S-92164 | InterBioScreen |
| 103 |  | IBS_STOCK6S-00695 | InterBioScreen |

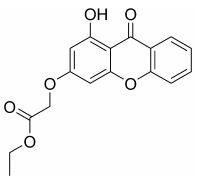
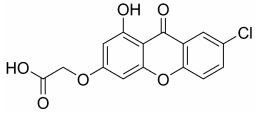
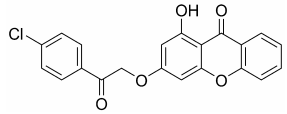
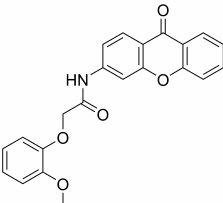
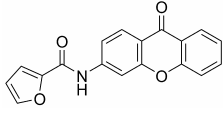
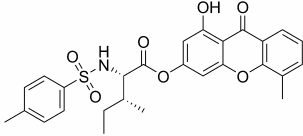
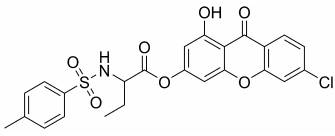
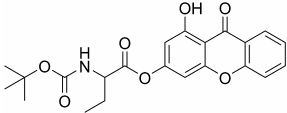
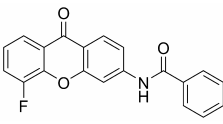
11. Anhang

| Eintrag | Struktur | Substanz ID | Quelle |
|---------|---|-------------------|----------------|
| 104 |  | IBS_STOCK1N-29323 | InterBioScreen |
| 105 |  | IBS_STOCK6S-01602 | InterBioScreen |
| 106 |  | IBS_STOCK6S-00865 | InterBioScreen |
| 107 |  | IBS_STOCK5S-96215 | InterBioScreen |
| 108 |  | IBS_STOCK5S-99946 | InterBioScreen |
| 109 |  | IBS_STOCK1N-64226 | InterBioScreen |
| 110 |  | IBS_STOCK6S-36046 | InterBioScreen |
| 111 |  | IBS_STOCK1N-58373 | InterBioScreen |
| 112 |  | IBS_STOCK5S-56038 | InterBioScreen |
| 113 |  | IBS_STOCK5S-90008 | InterBioScreen |

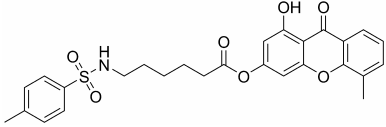
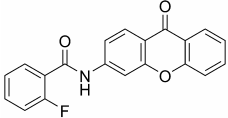
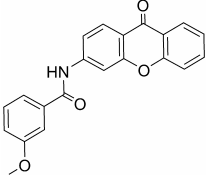
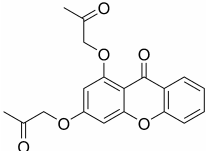
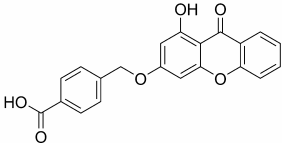
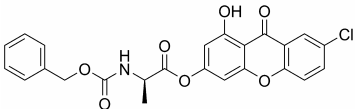
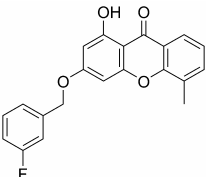
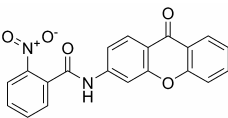
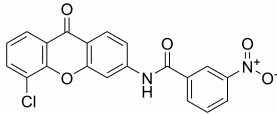
11. Anhang

| Eintrag | Struktur | Substanz ID | Quelle |
|---------|---|-------------------|----------------|
| 114 |  | IBS_STOCK5S-84939 | InterBioScreen |
| 115 |  | IBS_STOCK6S-01706 | InterBioScreen |
| 116 |  | IBS_STOCK1N-65252 | InterBioScreen |
| 117 |  | IBS_STOCK6S-01271 | InterBioScreen |
| 118 |  | IBS_STOCK5S-98367 | InterBioScreen |
| 119 |  | IBS_STOCK5S-96225 | InterBioScreen |
| 120 |  | IBS_STOCK5S-96600 | InterBioScreen |
| 121 |  | IBS_STOCK5S-99381 | InterBioScreen |
| 122 |  | IBS_STOCK5S-98469 | InterBioScreen |

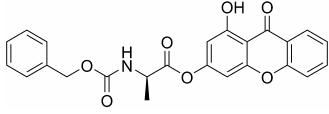
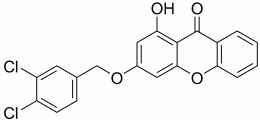
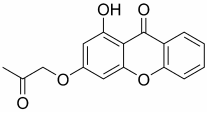
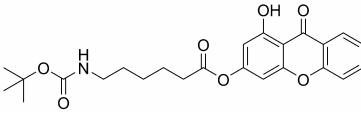
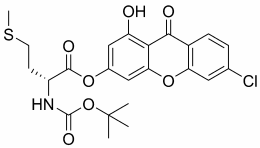
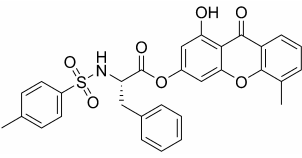
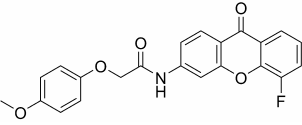
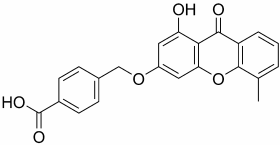
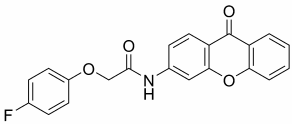
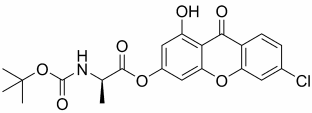
11. Anhang

| Eintrag | Struktur | Substanz ID | Quelle |
|---------|---|-----------------------|----------------|
| 123 |  | IBS_STOCK1N- 54982 | InterBioScreen |
| 124 |  | IBS_STOCK5S- 84903 | InterBioScreen |
| 125 |  | IBS_STOCK1N- 58144 | InterBioScreen |
| 126 |  | IBS_STOCK5S- 83626 | InterBioScreen |
| 127 |  | IBS_STOCK5S- 83537 | InterBioScreen |
| 128 |  | IBS_STOCK6S- 01209 | InterBioScreen |
| 129 |  | IBS_STOCK5S- 99796 | InterBioScreen |
| 130 |  | IBS_STOCK6S- 01205 | InterBioScreen |
| 131 |  | IBS_STOCK5S- 85251 | InterBioScreen |

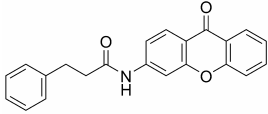
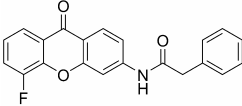
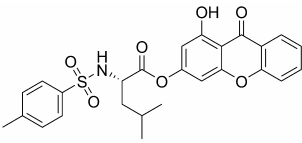
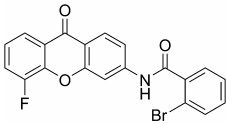
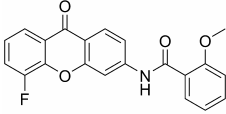
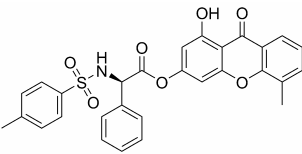
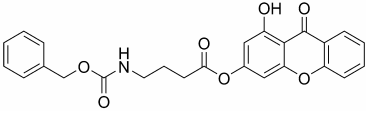
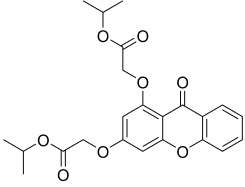
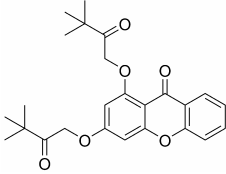
11. Anhang

| Eintrag | Struktur | Substanz ID | Quelle |
|---------|---|-------------------|----------------|
| 132 |  | IBS_STOCK5S-96967 | InterBioScreen |
| 133 |  | IBS_STOCK5S-87546 | InterBioScreen |
| 134 |  | IBS_STOCK5S-92982 | InterBioScreen |
| 135 |  | IBS_STOCK1N-56315 | InterBioScreen |
| 136 |  | IBS_STOCK1N-57878 | InterBioScreen |
| 137 |  | IBS_STOCK5S-98312 | InterBioScreen |
| 138 |  | IBS_STOCK5S-73490 | InterBioScreen |
| 139 |  | IBS_STOCK5S-84641 | InterBioScreen |
| 140 |  | IBS_STOCK5S-86097 | InterBioScreen |

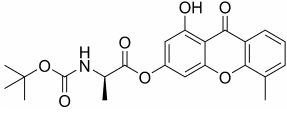
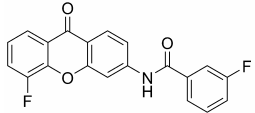
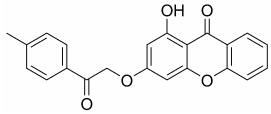
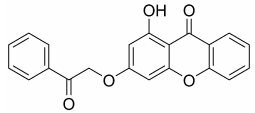
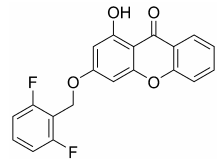
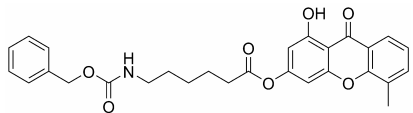
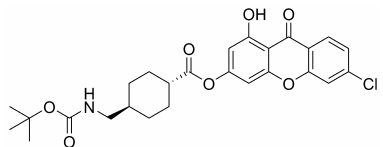
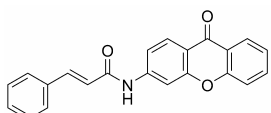
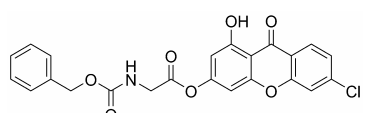
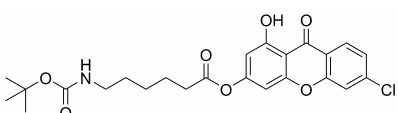
11. Anhang

| Eintrag | Struktur | Substanz ID | Quelle |
|---------|---|-------------------|----------------|
| 141 |  | IBS_STOCK5S-99107 | InterBioScreen |
| 142 |  | IBS_STOCK5S-26258 | InterBioScreen |
| 143 |  | IBS_STOCK1N-64473 | InterBioScreen |
| 144 |  | IBS_STOCK5S-98801 | InterBioScreen |
| 145 |  | IBS_STOCK6S-01054 | InterBioScreen |
| 146 |  | IBS_STOCK6S-01043 | InterBioScreen |
| 147 |  | IBS_STOCK5S-95288 | InterBioScreen |
| 148 |  | IBS_STOCK1N-59040 | InterBioScreen |
| 149 |  | IBS_STOCK5S-90338 | InterBioScreen |
| 150 |  | IBS_STOCK5S-98502 | InterBioScreen |

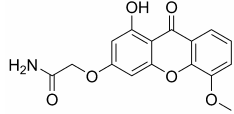
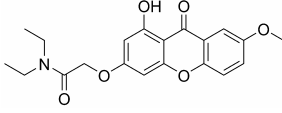
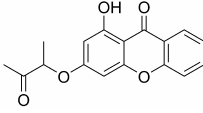
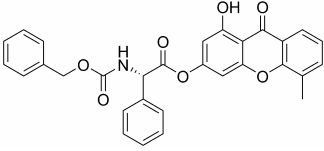
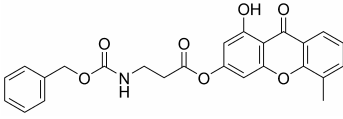
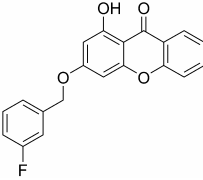
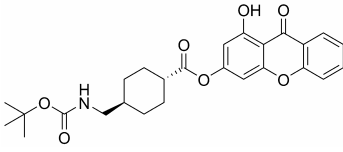
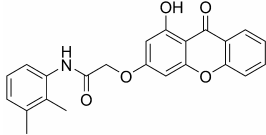
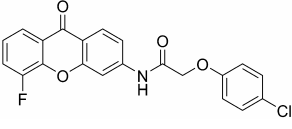
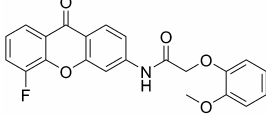
11. Anhang

| Eintrag | Struktur | Substanz ID | Quelle |
|---------|---|-----------------------|----------------|
| 151 |  | IBS_STOCK5S- 95617 | InterBioScreen |
| 152 |  | IBS_STOCK5S- 85596 | InterBioScreen |
| 153 |  | IBS_STOCK6S- 00191 | InterBioScreen |
| 154 |  | IBS_STOCK5S- 95478 | InterBioScreen |
| 155 |  | IBS_STOCK5S- 91397 | InterBioScreen |
| 156 |  | IBS_STOCK5S- 98508 | InterBioScreen |
| 157 |  | IBS_STOCK5S- 99090 | InterBioScreen |
| 158 |  | IBS_STOCK1N- 57111 | InterBioScreen |
| 159 |  | IBS_STOCK5S- 32922 | InterBioScreen |

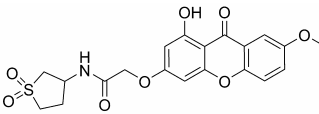
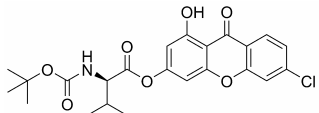
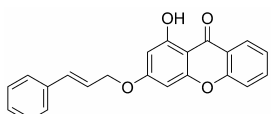
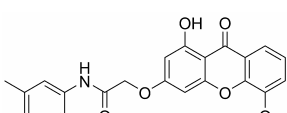
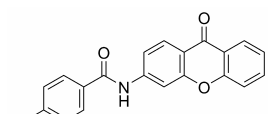
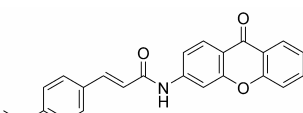
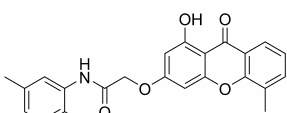
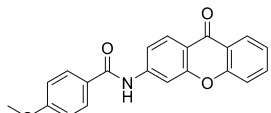
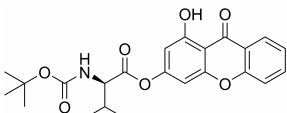
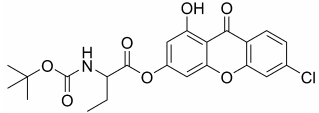
11. Anhang

| Eintrag | Struktur | Substanz ID | Quelle |
|---------|---|-------------------|----------------|
| 160 |  | IBS_STOCK5S-99027 | InterBioScreen |
| 161 |  | IBS_STOCK5S-87045 | InterBioScreen |
| 162 |  | IBS_STOCK1N-56619 | InterBioScreen |
| 163 |  | IBS_STOCK1N-56203 | InterBioScreen |
| 164 |  | IBS_STOCK5S-29102 | InterBioScreen |
| 165 |  | IBS_STOCK5S-96848 | InterBioScreen |
| 166 |  | IBS_STOCK5S-97461 | InterBioScreen |
| 167 |  | IBS_STOCK5S-90886 | InterBioScreen |
| 168 |  | IBS_STOCK6S-00399 | InterBioScreen |
| 169 |  | IBS_STOCK5S-96688 | InterBioScreen |

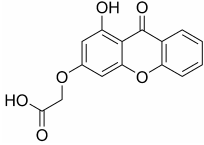
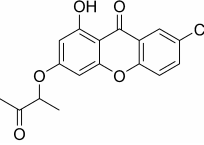
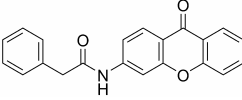
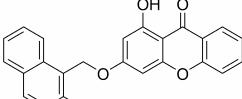
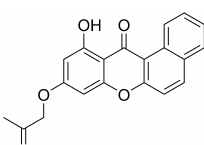
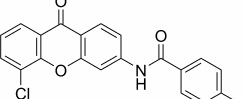
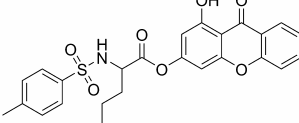
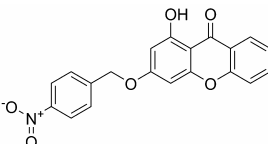
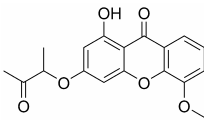
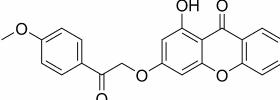
11. Anhang

| Eintrag | Struktur | Substanz ID | Quelle |
|---------|---|-------------------|----------------|
| 170 |  | IBS_STOCK1N-64644 | InterBioScreen |
| 171 |  | IBS_STOCK1N-69290 | InterBioScreen |
| 172 |  | IBS_STOCK1N-64332 | InterBioScreen |
| 173 |  | IBS_STOCK6S-00937 | InterBioScreen |
| 174 |  | IBS_STOCK1N-60281 | InterBioScreen |
| 175 |  | IBS_STOCK5S-38709 | InterBioScreen |
| 176 |  | IBS_STOCK5S-99506 | InterBioScreen |
| 177 |  | IBS_STOCK6S-32273 | InterBioScreen |
| 178 |  | IBS_STOCK5S-90043 | InterBioScreen |
| 179 |  | IBS_STOCK5S-84976 | InterBioScreen |

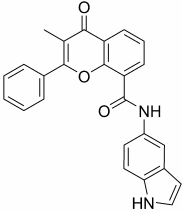
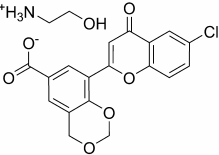
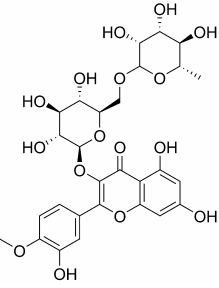
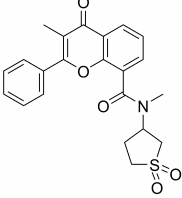
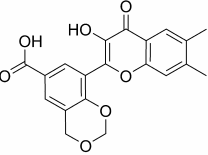
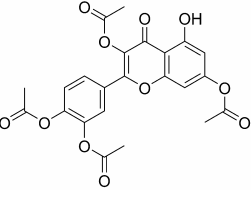
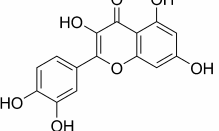
11. Anhang

| Eintrag | Struktur | Substanz ID | Quelle |
|---------|---|-----------------------|----------------|
| 180 |  | IBS_STOCK6S- 38432 | InterBioScreen |
| 181 |  | IBS_STOCK5S- 98286 | InterBioScreen |
| 182 |  | IBS_STOCK1N- 58590 | InterBioScreen |
| 183 |  | IBS_STOCK6S- 33822 | InterBioScreen |
| 184 |  | IBS_STOCK5S- 92000 | InterBioScreen |
| 185 |  | IBS_STOCK5S- 85945 | InterBioScreen |
| 186 |  | IBS_STOCK5S- 96652 | InterBioScreen |
| 187 |  | IBS_STOCK5S- 89989 | InterBioScreen |
| 188 |  | IBS_STOCK6S- 00046 | InterBioScreen |
| 189 |  | IBS_STOCK5S- 99038 | InterBioScreen |

11. Anhang

| Eintrag | Struktur | Substanz ID | Quelle |
|---------|---|-------------------|----------------|
| 190 |  | IBS_STOCK1N-57056 | InterBioScreen |
| 191 |  | IBS_STOCK5S-87118 | InterBioScreen |
| 192 |  | IBS_STOCK5S-84472 | InterBioScreen |
| 193 |  | IBS_STOCK5S-46772 | InterBioScreen |
| 194 |  | IBS_STOCK5S-93582 | InterBioScreen |
| 195 |  | IBS_STOCK5S-89992 | InterBioScreen |
| 196 |  | IBS_STOCK6S-01557 | InterBioScreen |
| 197 |  | IBS_STOCK5S-56240 | InterBioScreen |
| 198 |  | IBS_STOCK1N-64331 | InterBioScreen |
| 199 |  | IBS_STOCK1N-57983 | InterBioScreen |

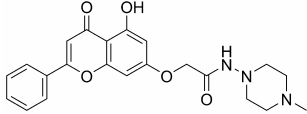
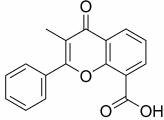
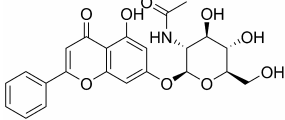
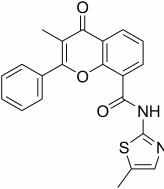
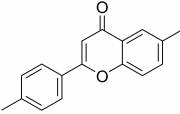
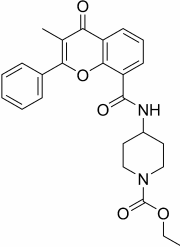
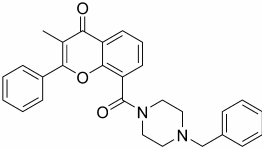
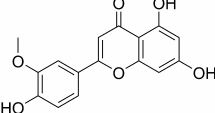
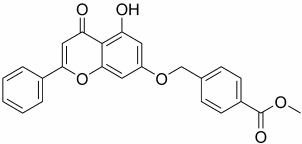
11. Anhang

| Eintrag | Struktur | Substanz ID | Quelle |
|---------|---|-------------------|----------------|
| 200 |  | IBS_STOCK1N-69379 | InterBioScreen |
| 201 |  | IBS_STOCK1N-23953 | InterBioScreen |
| 202 |  | IBS_STOCK1N-54280 | InterBioScreen |
| 203 |  | IBS_STOCK6S-22547 | InterBioScreen |
| 204 |  | IBS_STOCK1N-02575 | InterBioScreen |
| 205 |  | IBS_STOCK1N-00292 | InterBioScreen |
| 206 |  | IBS_STOCK1N-04222 | InterBioScreen |

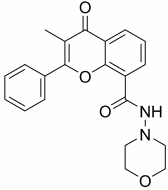
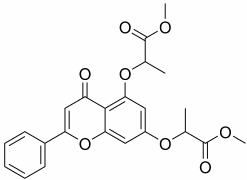
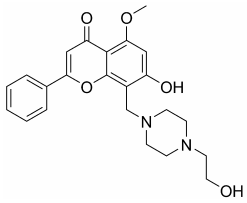
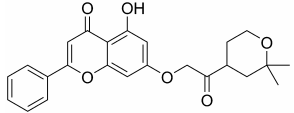
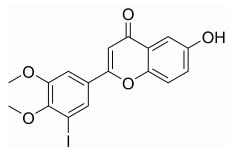
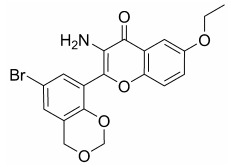
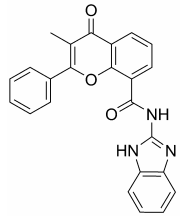
11. Anhang

| Eintrag | Struktur | Substanz ID | Quelle |
|---------|----------|-------------------|----------------|
| 207 | | IBS_STOCK1N-69016 | InterBioScreen |
| 208 | | IBS_STOCK6S-19875 | InterBioScreen |
| 209 | | IBS_STOCK1N-24546 | InterBioScreen |
| 210 | | IBS_STOCK6S-27528 | InterBioScreen |
| 211 | | IBS_STOCK1N-11907 | InterBioScreen |
| 212 | | IBS_STOCK1N-68204 | InterBioScreen |
| 213 | | IBS_STOCK1S-49140 | InterBioScreen |
| 214 | | IBS_STOCK5S-58225 | InterBioScreen |

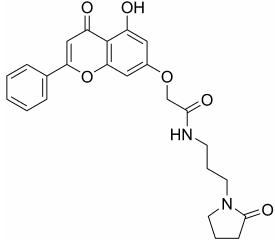
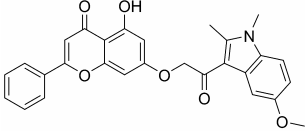
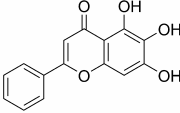
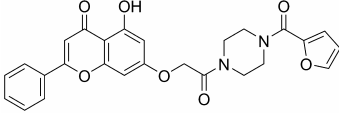
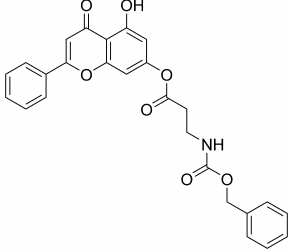
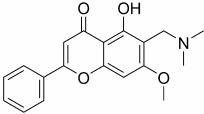
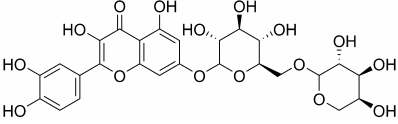
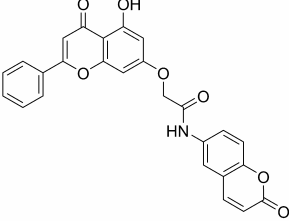
11. Anhang

| Eintrag | Struktur | Substanz ID | Quelle |
|---------|---|-------------------|----------------|
| 215 |  | IBS_STOCK6S-42828 | InterBioScreen |
| 216 |  | IBS_STOCK1N-69951 | InterBioScreen |
| 217 |  | IBS_STOCK1N-59846 | InterBioScreen |
| 218 |  | IBS_STOCK6S-26993 | InterBioScreen |
| 219 |  | IBS_STOCK1N-45047 | InterBioScreen |
| 220 |  | IBS_STOCK6S-22000 | InterBioScreen |
| 221 |  | IBS_STOCK6S-25437 | InterBioScreen |
| 222 |  | IBS_STOCK1N-14981 | InterBioScreen |
| 223 |  | IBS_STOCK1N-22252 | InterBioScreen |

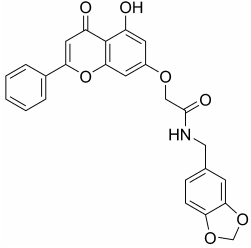
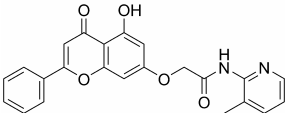
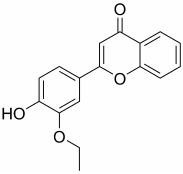
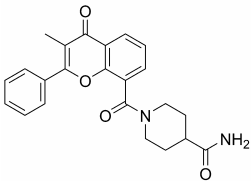
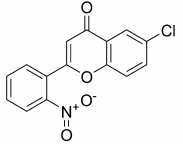
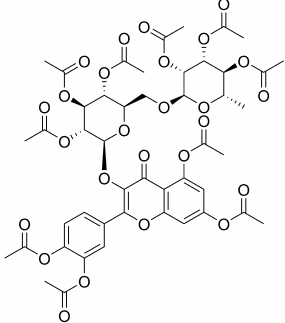
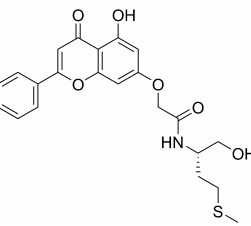
11. Anhang

| Eintrag | Struktur | Substanz ID | Quelle |
|---------|---|-----------------------|----------------|
| 224 |  | IBS_STOCK6S- 23803 | InterBioScreen |
| 225 |  | IBS_STOCK1N- 12184 | InterBioScreen |
| 226 |  | IBS_STOCK6S- 27548 | InterBioScreen |
| 227 |  | IBS_STOCK1N- 01253 | InterBioScreen |
| 228 |  | IBS_STOCK1N- 41708 | InterBioScreen |
| 229 |  | IBS_STOCK1N- 08722 | InterBioScreen |
| 230 |  | IBS_STOCK6S- 21081 | InterBioScreen |

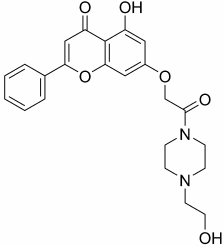
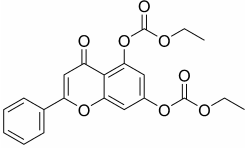
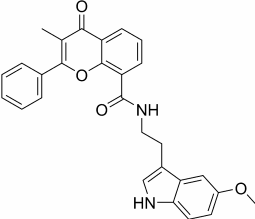
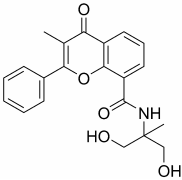
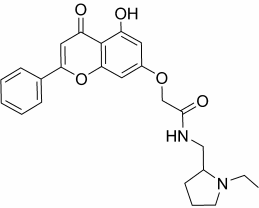
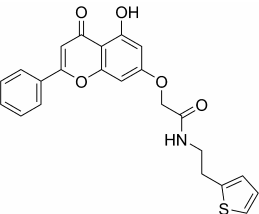
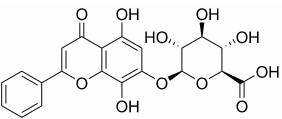
11. Anhang

| Eintrag | Struktur | Substanz ID | Quelle |
|---------|---|-------------------|----------------|
| 231 |  | IBS_STOCK1N-69353 | InterBioScreen |
| 232 |  | IBS_STOCK1N-50710 | InterBioScreen |
| 233 |  | IBS_STOCK1N-28559 | InterBioScreen |
| 234 |  | IBS_STOCK6S-40325 | InterBioScreen |
| 235 |  | IBS_STOCK1N-45295 | InterBioScreen |
| 236 |  | IBS_STOCK1N-69484 | InterBioScreen |
| 237 |  | IBS_STOCK1N-50334 | InterBioScreen |
| 238 |  | IBS_STOCK1N-69858 | InterBioScreen |

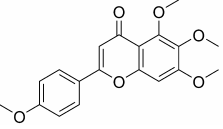
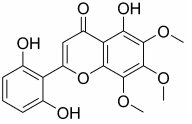
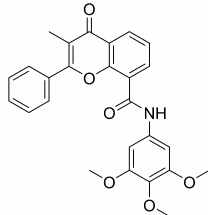
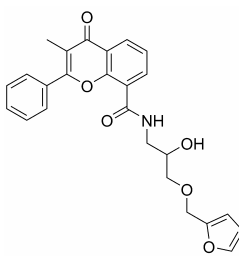
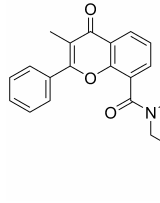
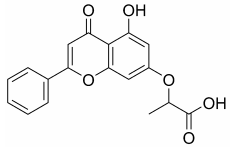
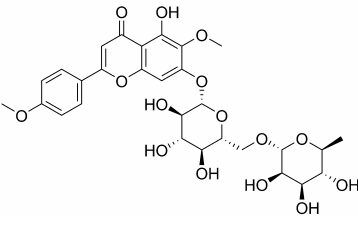
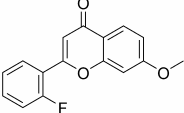
11. Anhang

| Eintrag | Struktur | Substanz ID | Quelle |
|---------|---|-----------------------|----------------|
| 239 |  | IBS_STOCK6S- 43461 | InterBioScreen |
| 240 |  | IBS_STOCK6S- 40252 | InterBioScreen |
| 241 |  | IBS_STOCK1N- 33002 | InterBioScreen |
| 242 |  | IBS_STOCK6S- 25683 | InterBioScreen |
| 243 |  | IBS_STOCK1S- 80476 | InterBioScreen |
| 244 |  | IBS_STOCK1N- 17598 | InterBioScreen |
| 245 |  | IBS_STOCK1N- 70623 | InterBioScreen |

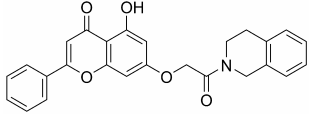
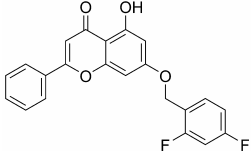
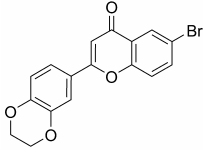
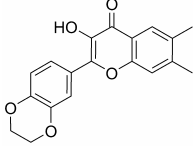
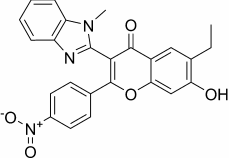
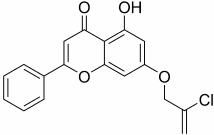
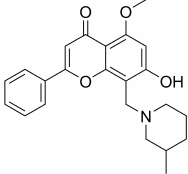
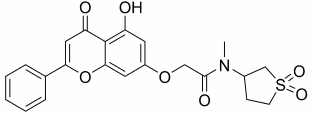
11. Anhang

| Eintrag | Struktur | Substanz ID | Quelle |
|---------|---|-------------------|----------------|
| 246 |  | IBS_STOCK1N-69552 | InterBioScreen |
| 247 |  | IBS_STOCK1N-45425 | InterBioScreen |
| 248 |  | IBS_STOCK1N-69231 | InterBioScreen |
| 249 |  | IBS_STOCK1N-70113 | InterBioScreen |
| 250 |  | IBS_STOCK1N-68637 | InterBioScreen |
| 251 |  | IBS_STOCK6S-37597 | InterBioScreen |
| 252 |  | IBS_STOCK1N-52965 | InterBioScreen |

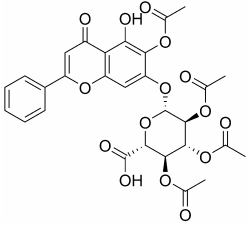
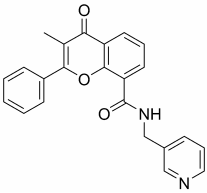
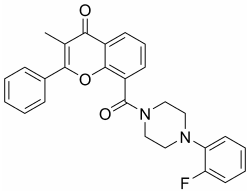
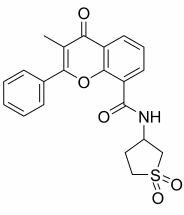
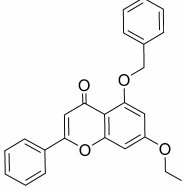
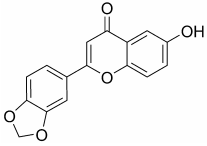
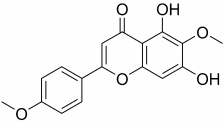
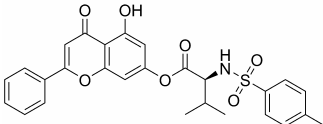
11. Anhang

| Eintrag | Struktur | Substanz ID | Quelle |
|---------|---|-------------------|----------------|
| 253 |  | IBS_STOCK1N-09778 | InterBioScreen |
| 254 |  | IBS_STOCK1N-17641 | InterBioScreen |
| 255 |  | IBS_STOCK6S-21753 | InterBioScreen |
| 256 |  | IBS_STOCK1N-70036 | InterBioScreen |
| 257 |  | IBS_STOCK6S-21383 | InterBioScreen |
| 258 |  | IBS_STOCK1N-09647 | InterBioScreen |
| 259 |  | IBS_STOCK1N-08706 | InterBioScreen |
| 260 |  | IBS_STOCK3S-76041 | InterBioScreen |

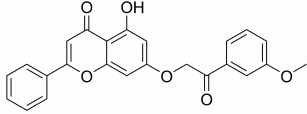
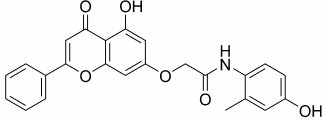
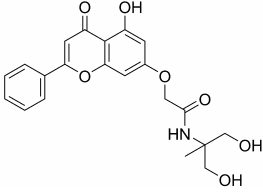
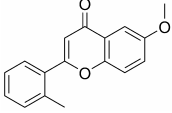
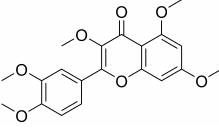
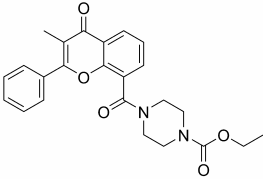
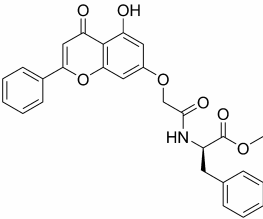
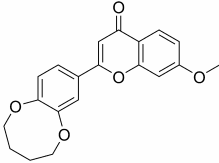
11. Anhang

| Eintrag | Struktur | Substanz ID | Quelle |
|---------|---|-----------------------|----------------|
| 261 |  | IBS_STOCK6S- 36093 | InterBioScreen |
| 262 |  | IBS_STOCK4S- 89839 | InterBioScreen |
| 263 |  | IBS_STOCK1N- 11094 | InterBioScreen |
| 264 |  | IBS_STOCK1N- 08520 | InterBioScreen |
| 265 |  | IBS_STOCK1S- 75174 | InterBioScreen |
| 266 |  | IBS_STOCK1N- 47594 | InterBioScreen |
| 267 |  | IBS_STOCK6S- 20742 | InterBioScreen |
| 268 |  | IBS_STOCK6S- 16843 | InterBioScreen |

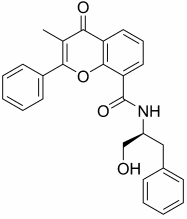
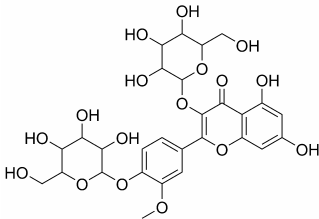
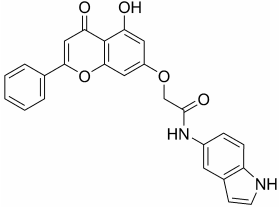
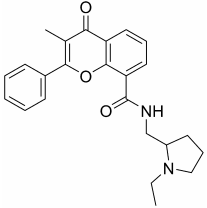
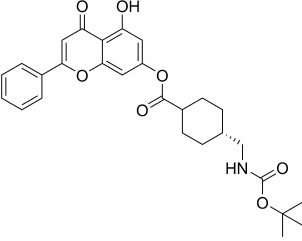
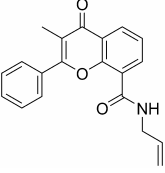
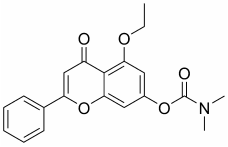
11. Anhang

| Eintrag | Struktur | Substanz ID | Quelle |
|---------|---|-------------------|----------------|
| 269 |  | IBS_STOCK1N-03986 | InterBioScreen |
| 270 |  | IBS_STOCK6S-24693 | InterBioScreen |
| 271 |  | IBS_STOCK6S-22721 | InterBioScreen |
| 272 |  | IBS_STOCK6S-19565 | InterBioScreen |
| 273 |  | IBS_STOCK5S-50237 | InterBioScreen |
| 274 |  | IBS_STOCK1N-33354 | InterBioScreen |
| 275 |  | IBS_STOCK1N-09903 | InterBioScreen |
| 276 |  | IBS_STOCK1N-10107 | InterBioScreen |

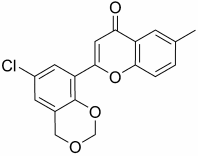
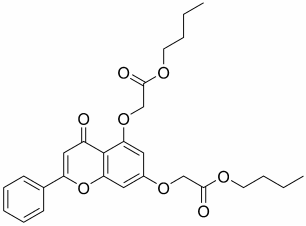
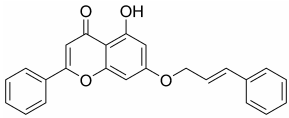
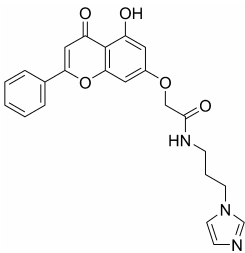
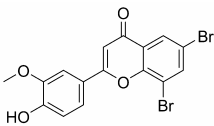
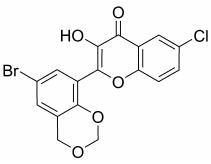
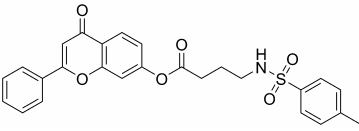
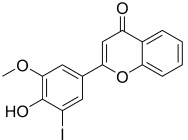
11. Anhang

| Eintrag | Struktur | Substanz ID | Quelle |
|---------|---|-------------------|----------------|
| 277 |  | IBS_STOCK1N-54004 | InterBioScreen |
| 278 |  | IBS_STOCK1N-68651 | InterBioScreen |
| 279 |  | IBS_STOCK6S-40664 | InterBioScreen |
| 280 |  | IBS_STOCK5S-29346 | InterBioScreen |
| 281 |  | IBS_STOCK1N-00418 | InterBioScreen |
| 282 |  | IBS_STOCK6S-32276 | InterBioScreen |
| 283 |  | IBS_STOCK1N-69570 | InterBioScreen |
| 284 |  | IBS_STOCK1N-00166 | InterBioScreen |

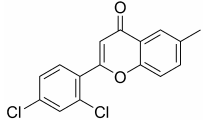
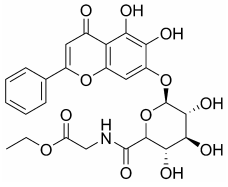
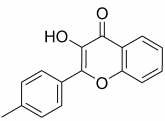
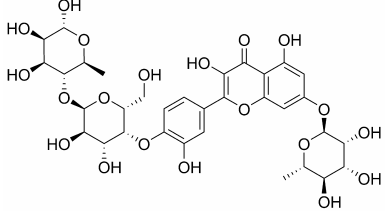
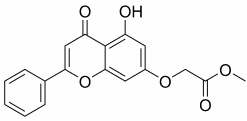
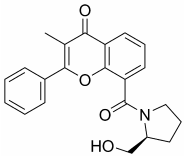
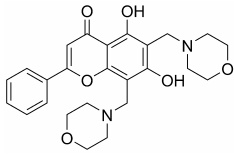
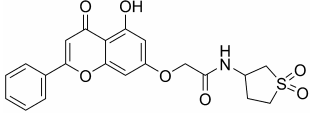
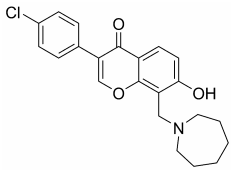
11. Anhang

| Eintrag | Struktur | Substanz ID | Quelle |
|---------|---|-------------------|----------------|
| 285 |  | IBS_STOCK1N-69893 | InterBioScreen |
| 286 |  | IBS_STOCK1N-08230 | InterBioScreen |
| 287 |  | IBS_STOCK1N-70703 | InterBioScreen |
| 288 |  | IBS_STOCK6S-25601 | InterBioScreen |
| 289 |  | IBS_STOCK1N-54487 | InterBioScreen |
| 290 |  | IBS_STOCK6S-28611 | InterBioScreen |
| 291 |  | IBS_STOCK6S-29564 | InterBioScreen |

11. Anhang

| Eintrag | Struktur | Substanz ID | Quelle |
|---------|---|-------------------|----------------|
| 292 |  | IBS_STOCK1N-00284 | InterBioScreen |
| 293 |  | IBS_STOCK1N-07623 | InterBioScreen |
| 294 |  | IBS_STOCK1N-22287 | InterBioScreen |
| 295 |  | IBS_STOCK1N-69175 | InterBioScreen |
| 296 |  | IBS_STOCK4S-95609 | InterBioScreen |
| 297 |  | IBS_STOCK1N-07662 | InterBioScreen |
| 298 |  | IBS_STOCK1N-00870 | InterBioScreen |
| 299 |  | IBS_STOCK1N-45942 | InterBioScreen |

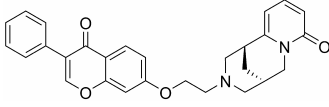
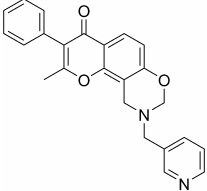
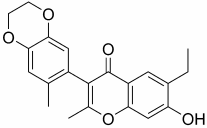
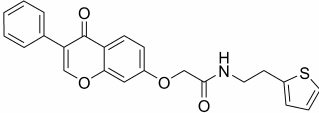
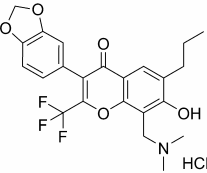
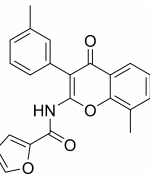
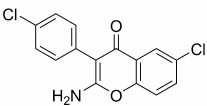
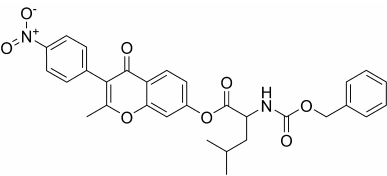
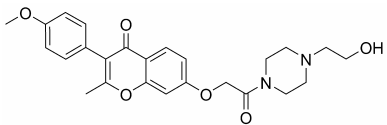
11. Anhang

| Eintrag | Struktur | Substanz ID | Quelle |
|---------|---|-------------------|----------------|
| 300 |  | IBS_STOCK3S-83333 | InterBioScreen |
| 301 |  | IBS_STOCK1N-06039 | InterBioScreen |
| 302 |  | IBS_STOCK2S-88260 | InterBioScreen |
| 303 |  | IBS_STOCK1N-68438 | InterBioScreen |
| 304 |  | IBS_STOCK1N-13166 | InterBioScreen |
| 305 |  | IBS_STOCK1N-69857 | InterBioScreen |
| 306 |  | IBS_STOCK1N-29495 | InterBioScreen |
| 307 |  | IBS_STOCK6S-14615 | InterBioScreen |
| 308 |  | IBS_STOCK1N-26657 | InterBioScreen |

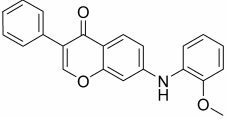
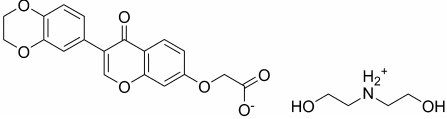
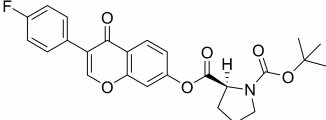
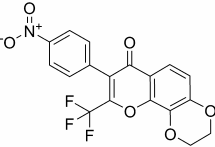
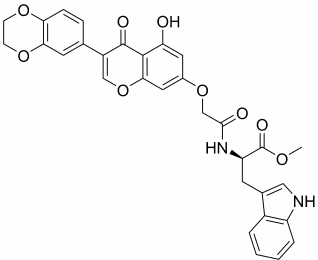
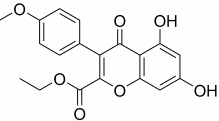
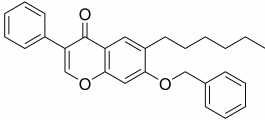
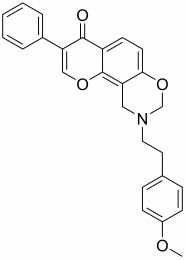
11. Anhang

| Eintrag | Struktur | Substanz ID | Quelle |
|---------|----------|-------------------|----------------|
| 309 | | IBS_STOCK5S-66402 | InterBioScreen |
| 310 | | IBS_STOCK1N-25358 | InterBioScreen |
| 311 | | IBS_STOCK1S-17634 | InterBioScreen |
| 312 | | IBS_STOCK6S-09506 | InterBioScreen |
| 313 | | IBS_STOCK3S-87867 | InterBioScreen |
| 314 | | IBS_STOCK1N-02643 | InterBioScreen |
| 315 | | IBS_STOCK6S-38726 | InterBioScreen |
| 316 | | IBS_STOCK1N-34239 | InterBioScreen |

11. Anhang

| Eintrag | Struktur | Substanz ID | Quelle |
|---------|---|-------------------|----------------|
| 317 |  | IBS_STOCK1N-68030 | InterBioScreen |
| 318 |  | IBS_STOCK6S-36153 | InterBioScreen |
| 319 |  | IBS_STOCK1N-02545 | InterBioScreen |
| 320 |  | IBS_STOCK6S-40346 | InterBioScreen |
| 321 |  | IBS_STOCK1S-16765 | InterBioScreen |
| 322 |  | IBS_STOCK6S-02305 | InterBioScreen |
| 323 |  | IBS_STOCK6S-18162 | InterBioScreen |
| 324 |  | IBS_STOCK1S-36351 | InterBioScreen |
| 325 |  | IBS_STOCK6S-42692 | InterBioScreen |

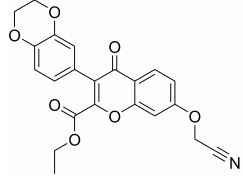
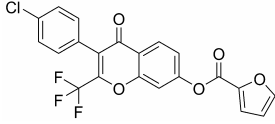
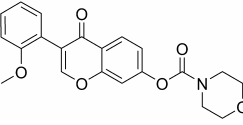
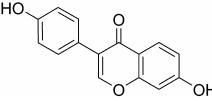
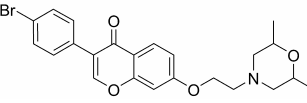
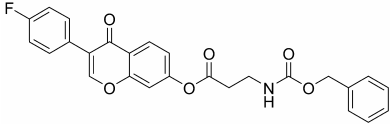
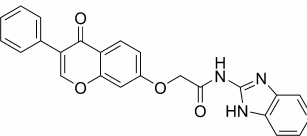
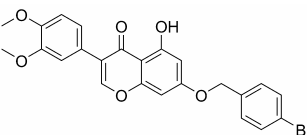
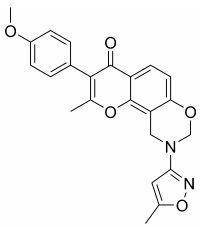
11. Anhang

| Eintrag | Struktur | Substanz ID | Quelle |
|---------|---|-----------------------|----------------|
| 326 |  | IBS_STOCK6S- 12271 | InterBioScreen |
| 327 |  | IBS_STOCK1N- 04112 | InterBioScreen |
| 328 |  | IBS_STOCK5S- 39341 | InterBioScreen |
| 329 |  | IBS_STOCK1S- 18155 | InterBioScreen |
| 330 |  | IBS_STOCK1N- 01391 | InterBioScreen |
| 331 |  | IBS_STOCK1N- 19481 | InterBioScreen |
| 332 |  | IBS_STOCK5S- 43236 | InterBioScreen |
| 333 |  | IBS_STOCK6S- 34989 | InterBioScreen |

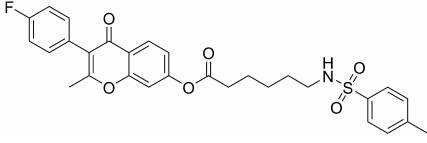
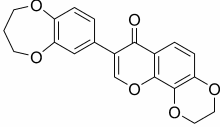
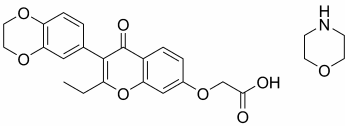
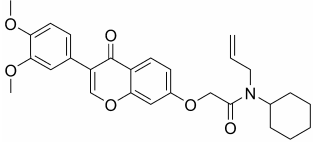
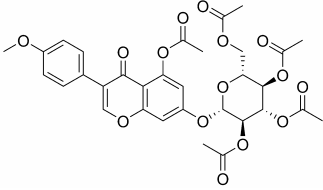
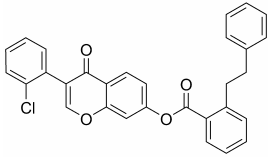
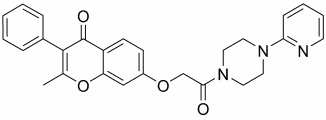
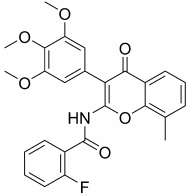
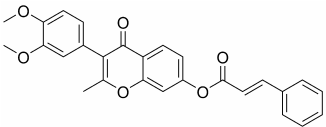
11. Anhang

| Eintrag | Struktur | Substanz ID | Quelle |
|---------|----------|-------------------|----------------|
| 334 | | IBS_STOCK2S-61709 | InterBioScreen |
| 335 | | IBS_STOCK6S-37503 | InterBioScreen |
| 336 | | IBS_STOCK5S-35984 | InterBioScreen |
| 337 | | IBS_STOCK6S-26367 | InterBioScreen |
| 338 | | IBS_STOCK1N-29629 | InterBioScreen |
| 339 | | IBS_STOCK1N-40851 | InterBioScreen |
| 340 | | IBS_STOCK4S-56841 | InterBioScreen |

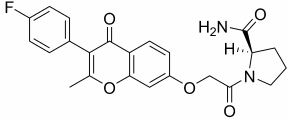
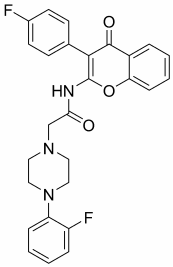
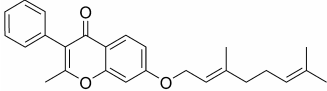
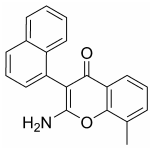
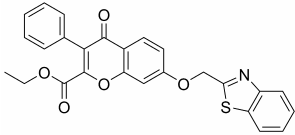
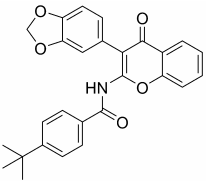
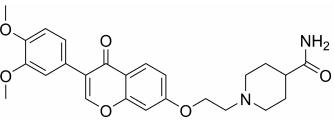
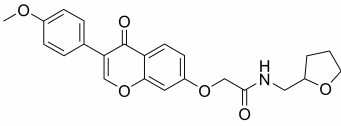
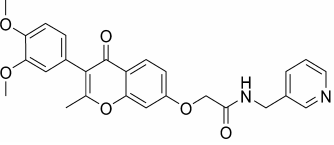
11. Anhang

| Eintrag | Struktur | Substanz ID | Quelle |
|---------|---|-------------------|----------------|
| 341 |  | IBS_STOCK5S-49473 | InterBioScreen |
| 342 |  | IBS_STOCK3S-05115 | InterBioScreen |
| 343 |  | IBS_STOCK4S-54554 | InterBioScreen |
| 344 |  | IBS_STOCK1N-31750 | InterBioScreen |
| 345 |  | IBS_STOCK6S-17700 | InterBioScreen |
| 346 |  | IBS_STOCK1S-36886 | InterBioScreen |
| 347 |  | IBS_STOCK6S-40992 | InterBioScreen |
| 348 |  | IBS_STOCK5S-46787 | InterBioScreen |
| 349 |  | IBS_STOCK1N-70767 | InterBioScreen |

11. Anhang

| Eintrag | Struktur | Substanz ID | Quelle |
|---------|---|-------------------|----------------|
| 350 |  | IBS_STOCK1S-32990 | InterBioScreen |
| 351 |  | IBS_STOCK1N-03530 | InterBioScreen |
| 352 |  | IBS_STOCK1N-05501 | InterBioScreen |
| 353 |  | IBS_STOCK6S-43092 | InterBioScreen |
| 354 |  | IBS_STOCK1N-23870 | InterBioScreen |
| 355 |  | IBS_STOCK5S-47662 | InterBioScreen |
| 356 |  | IBS_STOCK6S-36354 | InterBioScreen |
| 357 |  | IBS_STOCK6S-13147 | InterBioScreen |
| 358 |  | IBS_STOCK1N-39233 | InterBioScreen |

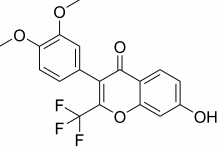
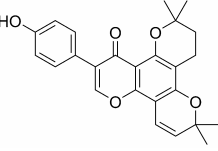
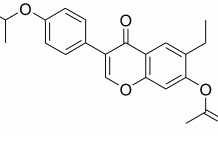
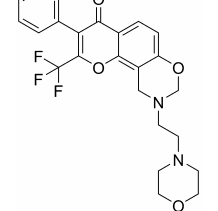
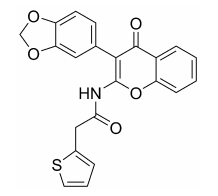
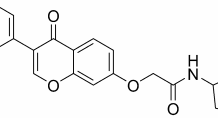
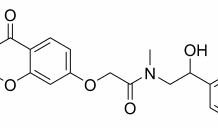
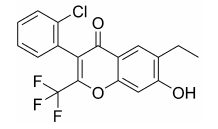
11. Anhang

| Eintrag | Struktur | Substanz ID | Quelle |
|---------|---|-------------------|----------------|
| 359 |  | IBS_STOCK1N-04695 | InterBioScreen |
| 360 |  | IBS_STOCK6S-06534 | InterBioScreen |
| 361 |  | IBS_STOCK1N-40022 | InterBioScreen |
| 362 |  | IBS_STOCK6S-17510 | InterBioScreen |
| 363 |  | IBS_STOCK1S-24991 | InterBioScreen |
| 364 |  | IBS_STOCK5S-78412 | InterBioScreen |
| 365 |  | IBS_STOCK6S-29496 | InterBioScreen |
| 366 |  | IBS_STOCK6S-33875 | InterBioScreen |
| 367 |  | IBS_STOCK1N-70653 | InterBioScreen |

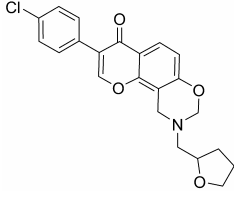
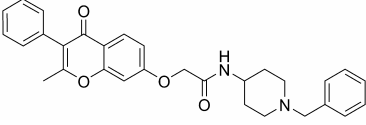
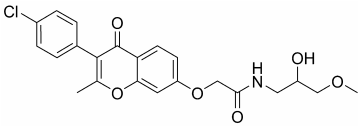
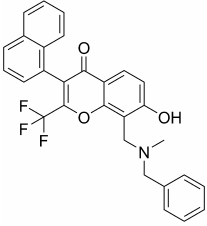
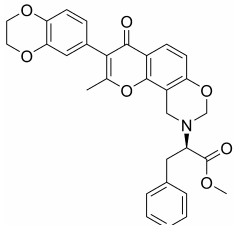
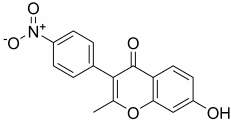
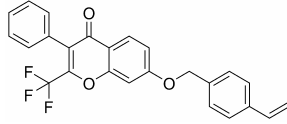
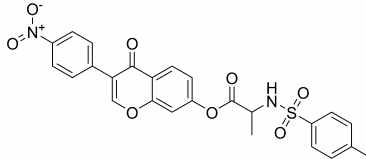
11. Anhang

| Eintrag | Struktur | Substanz ID | Quelle |
|---------|----------|-----------------------|----------------|
| 368 | | IBS_STOCK6S- 17959 | InterBioScreen |
| 369 | | IBS_STOCK3S- 50447 | InterBioScreen |
| 370 | | IBS_STOCK1N- 07711 | InterBioScreen |
| 371 | | IBS_STOCK1N- 06531 | InterBioScreen |
| 372 | | IBS_STOCK6S- 43189 | InterBioScreen |
| 373 | | IBS_STOCK1N- 02139 | InterBioScreen |
| 374 | | IBS_STOCK5S- 51624 | InterBioScreen |
| 375 | | IBS_STOCK6S- 37476 | InterBioScreen |
| 376 | | IBS_STOCK1N- 00730 | InterBioScreen |

11. Anhang

| Eintrag | Struktur | Substanz ID | Quelle |
|---------|---|-----------------------|----------------|
| 377 |  | IBS_STOCK2S- 56950 | InterBioScreen |
| 378 |  | IBS_STOCK1N- 12744 | InterBioScreen |
| 379 |  | IBS_STOCK1N- 01369 | InterBioScreen |
| 380 |  | IBS_STOCK6S- 42766 | InterBioScreen |
| 381 |  | IBS_STOCK5S- 88988 | InterBioScreen |
| 382 |  | IBS_STOCK6S- 37001 | InterBioScreen |
| 383 |  | IBS_STOCK1N- 70825 | InterBioScreen |
| 384 |  | IBS_STOCK2S- 94055 | InterBioScreen |

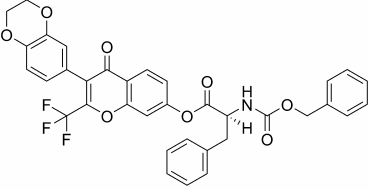
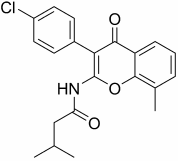
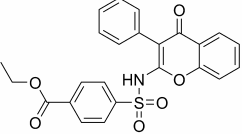
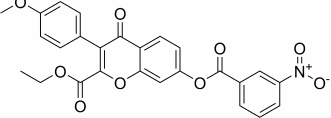
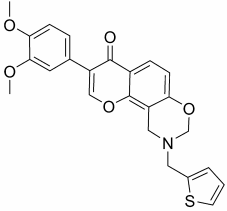
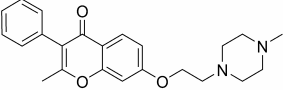
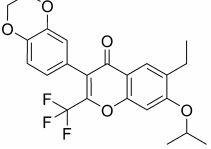
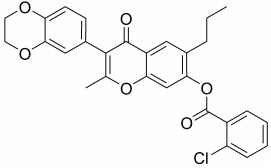
11. Anhang

| Eintrag | Struktur | Substanz ID | Quelle |
|---------|---|-------------------|----------------|
| 385 |  | IBS_STOCK6S-41359 | InterBioScreen |
| 386 |  | IBS_STOCK6S-41082 | InterBioScreen |
| 387 |  | IBS_STOCK6S-36117 | InterBioScreen |
| 388 |  | IBS_STOCK2S-80688 | InterBioScreen |
| 389 |  | IBS_STOCK1N-05489 | InterBioScreen |
| 390 |  | IBS_STOCK1S-15658 | InterBioScreen |
| 391 |  | IBS_STOCK5S-99899 | InterBioScreen |
| 392 |  | IBS_STOCK1S-31955 | InterBioScreen |

11. Anhang

| Eintrag | Struktur | Substanz ID | Quelle |
|---------|----------|-------------------|----------------|
| 393 | | IBS_STOCK1N-37510 | InterBioScreen |
| 394 | | IBS_STOCK5S-44893 | InterBioScreen |
| 395 | | IBS_STOCK5S-56432 | InterBioScreen |
| 396 | | IBS_STOCK3S-48305 | InterBioScreen |
| 397 | | IBS_STOCK1N-04755 | InterBioScreen |
| 398 | | IBS_STOCK3S-49527 | InterBioScreen |
| 399 | | IBS_STOCK5S-38856 | InterBioScreen |
| 400 | | IBS_STOCK2S-90157 | InterBioScreen |

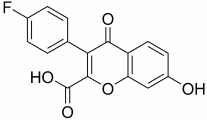
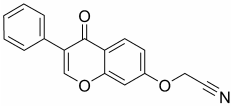
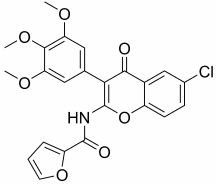
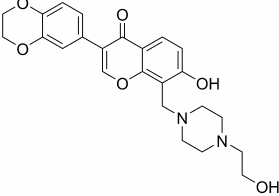
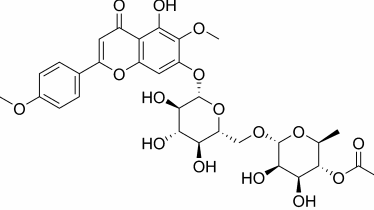
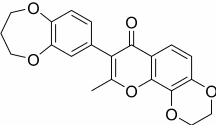
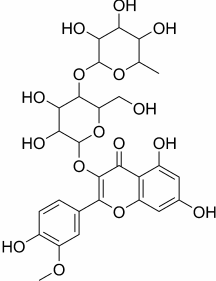
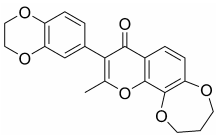
11. Anhang

| Eintrag | Struktur | Substanz ID | Quelle |
|---------|---|-------------------|----------------|
| 401 |  | IBS_STOCK1N-06618 | InterBioScreen |
| 402 |  | IBS_STOCK6S-04532 | InterBioScreen |
| 403 |  | IBS_STOCK6S-36611 | InterBioScreen |
| 404 |  | IBS_STOCK1N-33895 | InterBioScreen |
| 405 |  | IBS_STOCK1N-70689 | InterBioScreen |
| 406 |  | IBS_STOCK6S-18159 | InterBioScreen |
| 407 |  | IBS_STOCK1S-19323 | InterBioScreen |
| 408 |  | IBS_STOCK3S-47235 | InterBioScreen |

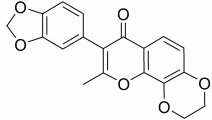
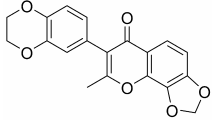
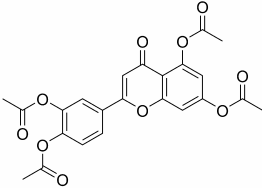
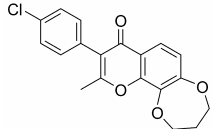
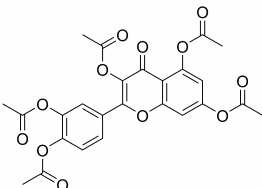
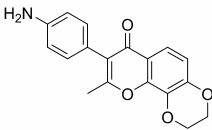
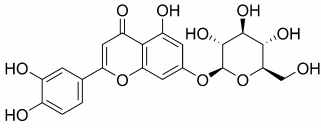
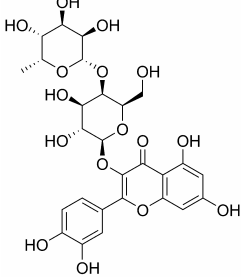
11. Anhang

| Eintrag | Struktur | Substanz ID | Quelle |
|---------|----------|-------------------|----------------|
| 409 | | IBS_STOCK6S-00512 | InterBioScreen |
| 410 | | IBS_STOCK1N-33844 | InterBioScreen |
| 411 | | IBS_STOCK1N-70168 | InterBioScreen |
| 412 | | IBS_STOCK2S-63621 | InterBioScreen |
| 413 | | IBS_STOCK6S-43658 | InterBioScreen |
| 414 | | IBS_STOCK5S-52209 | InterBioScreen |
| 415 | | IBS_STOCK6S-37080 | InterBioScreen |
| 416 | | IBS_STOCK1N-40826 | InterBioScreen |
| 417 | | IBS_STOCK1N-09127 | InterBioScreen |

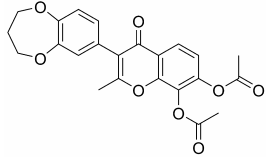
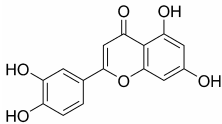
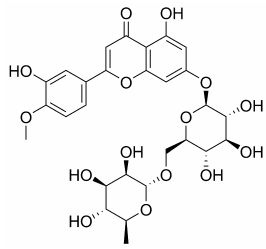
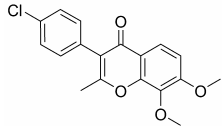
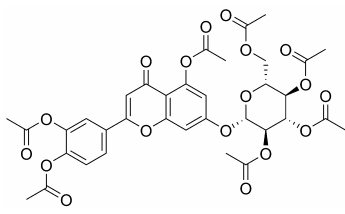
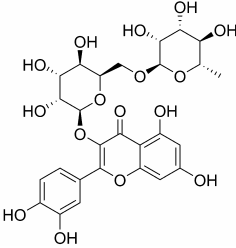
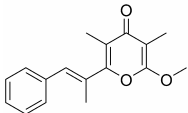
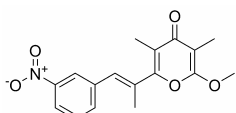
11. Anhang

| Eintrag | Struktur | Substanz ID | Quelle |
|---------|---|-------------------|----------------|
| 418 |  | IBS_STOCK1N-04685 | InterBioScreen |
| 419 |  | IBS_STOCK4S-39768 | InterBioScreen |
| 420 |  | IBS_STOCK5S-67510 | InterBioScreen |
| 421 |  | IBS_STOCK4S-68880 | InterBioScreen |
| 422 |  | IBS_STOCK1N-01756 | InterBioScreen |
| 423 |  | IBS_STOCK1N-03004 | InterBioScreen |
| 424 |  | IBS_STOCK1N-04457 | InterBioScreen |
| 425 |  | IBS_STOCK1N-05003 | InterBioScreen |

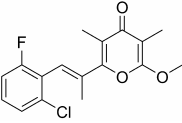
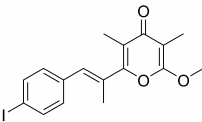
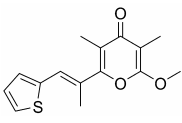
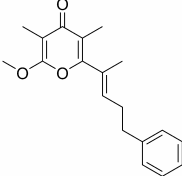
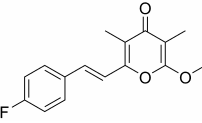
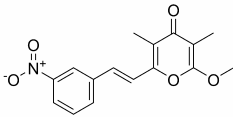
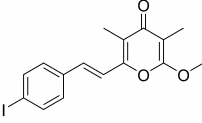
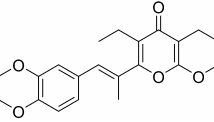
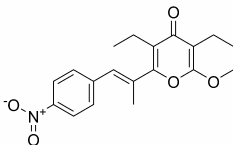
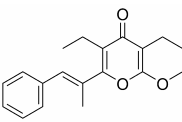
11. Anhang

| Eintrag | Struktur | Substanz ID | Quelle |
|---------|---|-------------------|----------------|
| 426 |  | IBS_STOCK1N-05175 | InterBioScreen |
| 427 |  | IBS_STOCK1N-05794 | InterBioScreen |
| 428 |  | IBS_STOCK1N-05936 | InterBioScreen |
| 429 |  | IBS_STOCK1N-06645 | InterBioScreen |
| 430 |  | IBS_STOCK1N-08201 | InterBioScreen |
| 431 |  | IBS_STOCK1N-08413 | InterBioScreen |
| 432 |  | IBS_STOCK1N-08497 | InterBioScreen |
| 433 |  | IBS_STOCK1N-09823 | InterBioScreen |

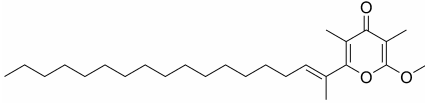
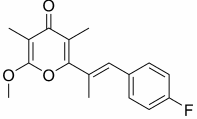
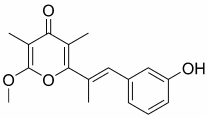
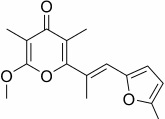
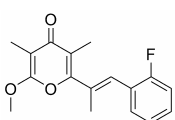
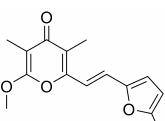
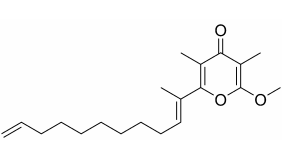
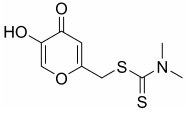
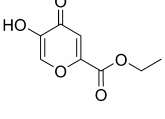
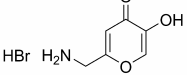
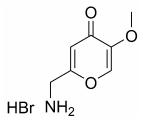
11. Anhang

| Eintrag | Struktur | Substanz ID | Quelle |
|---------|---|-------------------|----------------|
| 434 |  | IBS_STOCK1N-11277 | InterBioScreen |
| 435 |  | IBS_STOCK1N-14308 | InterBioScreen |
| 436 |  | IBS_STOCK1N-14729 | InterBioScreen |
| 437 |  | IBS_STOCK1N-15679 | InterBioScreen |
| 438 |  | IBS_STOCK1N-17593 | InterBioScreen |
| 439 |  | IBS_STOCK1N-23471 | InterBioScreen |
| 440 |  | | synthetisiert |
| 441 |  | | synthetisiert |

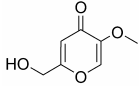
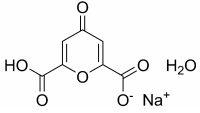
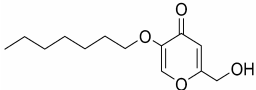
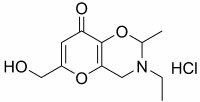
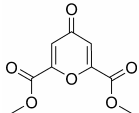
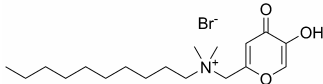
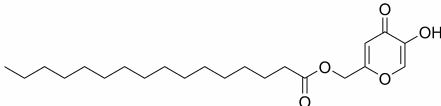


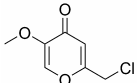
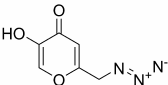
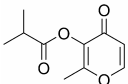
11. Anhang

| Eintrag | Struktur | Substanz ID | Quelle |
|---------|---|-------------|---------------|
| 442 |  | | synthetisiert |
| 443 |  | | synthetisiert |
| 444 |  | | synthetisiert |
| 445 |  | | synthetisiert |
| 446 |  | | synthetisiert |
| 447 |  | | synthetisiert |
| 448 |  | | synthetisiert |
| 449 |  | | synthetisiert |
| 450 |  | | synthetisiert |
| 451 |  | | synthetisiert |

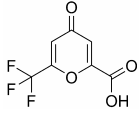
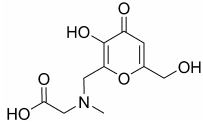
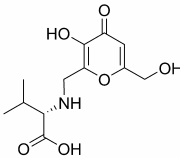
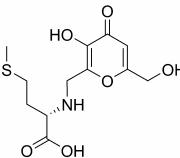
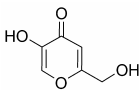
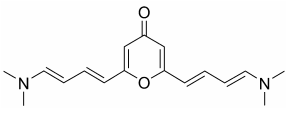


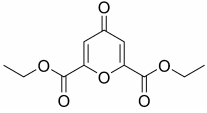
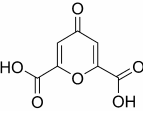
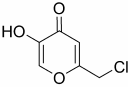
11. Anhang

| Eintrag | Struktur | Substanz ID | Quelle |
|---------|---|-------------|---------------|
| 452 |  | | synthetisiert |
| 453 |  | | synthetisiert |
| 454 |  | | synthetisiert |
| 455 |  | | synthetisiert |
| 456 |  | | synthetisiert |
| 457 |  | | synthetisiert |
| 458 |  | | synthetisiert |
| 459 |  | kasf-025126 | Aurora |
| 460 |  | ka-10041 | Aurora |
| 461 |  | kasf-058775 | Aurora |
| 462 |  | kasf-059164 | Aurora |

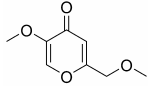
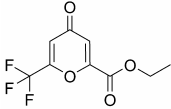
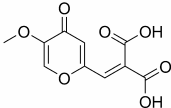
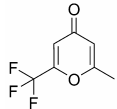
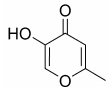
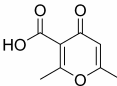
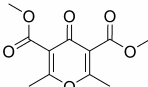
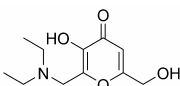
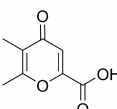
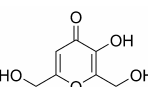

11. Anhang

| Eintrag | Struktur | Substanz ID | Quelle |
|---------|---|-------------|--------|
| 463 |  | kasf-059200 | Aurora |
| 464 |  | kasf-059771 | Aurora |
| 465 |  | kasf-060757 | Aurora |
| 466 |  | kasf-060846 | Aurora |
| 467 |  | kasf-061062 | Aurora |
| 468 |  | kasf-061630 | Aurora |
| 469 |  | kasf-062367 | Aurora |
| 470 |  | kasf-101601 | Aurora |
| 471 |  | kasf-104766 | Aurora |
| 472 |  | kasf-106293 | Aurora |
| 473 |  | kasf-106981 | Aurora |
| 474 |  | kasf-107849 | Aurora |

11. Anhang

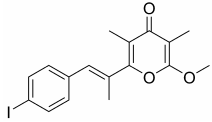
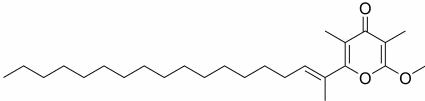
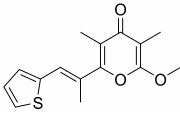
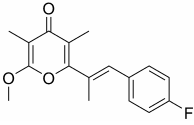
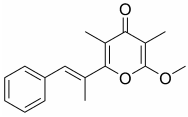
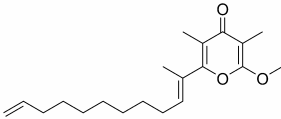
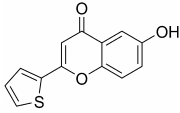
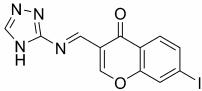
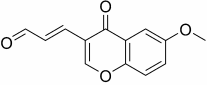
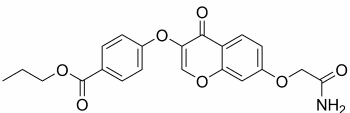
| Eintrag | Struktur | Substanz ID | Quelle |
|---------|---|-----------------|--------|
| 475 |  | kasi-398833 | Aurora |
| 476 |  | kbs-000104 | Aurora |
| 477 |  | kbs-000132 | Aurora |
| 478 |  | kbs-000170 | Aurora |
| 479 |  | kbsa-0000028 | Aurora |
| 480 |  | kbsa-0000631 | Aurora |
| 481 |  | kbsa-0000697 | Aurora |
| 482 |  | kbsa-0143980 | Aurora |
| 483 |  | kbsb-0091512 | Aurora |
| 484 |  | kbsenon-0000130 | Aurora |
| 485 |  | kbsenon-0009034 | Aurora |

11. Anhang

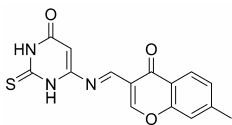
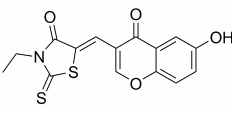
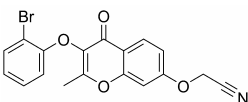
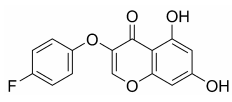
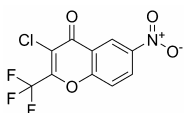
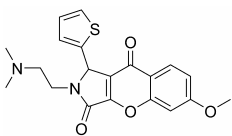
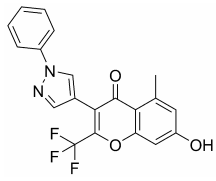
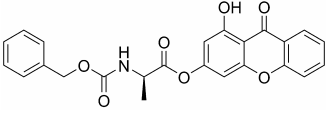
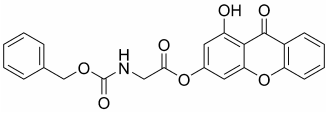
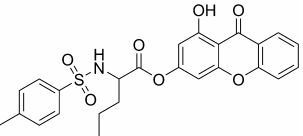
| Eintrag | Struktur | Substanz ID | Quelle |
|---------|---|--------------|--------|
| 486 |  | kasf-106283 | Aurora |
| 487 |  | kcheb-133442 | Aurora |
| 488 |  | kasf-109822 | Aurora |
| 489 |  | kenb-0015722 | Aurora |
| 490 |  | ki-034198 | Aurora |
| 491 |  | ki-035349 | Aurora |
| 492 |  | kina-0033191 | Aurora |
| 493 |  | kina-0140602 | Aurora |
| 494 |  | kmy-043452 | Aurora |
| 495 |  | kmy-065990 | Aurora |
| 496 |  | kph-118129 | Aurora |

11. Anhang

Anhang Tabelle 2: Inhibitoren der MAO A und MAO B Isoformen aus der vermessenen γ -Pyron-Substanzbibliothek. Die IC_{50} -Werte beider Enzyme wurden bestimmt. Wird kein Wert angegeben ist der IC_{50} größer als 100 μ M. Die angegebenen Eintrags-Nummern stimmen mit jenen aus Anhang Tabelle 1 überein.

| Eintrag | Struktur | IC_{50} [μ M] | |
|---------|---|----------------------|-----------------|
| | | MAO A | MAO B |
| 448 |  | 3.19 ± 0.23 | 4.02 ± 0.23 |
| 452 |  | 12.5 ± 1.0 | |
| 444 |  | 16.3 ± 0.5 | |
| 453 |  | 18.1 ± 1.5 | |
| 451 |  | 18.2 ± 1.1 | |
| 458 |  | | 4.88 ± 0.18 |
| 4 |  | 0.94 ± 0.03 | |
| 18 |  | 1.31 ± 0.04 | |
| 76 |  | 3.96 ± 0.19 | |
| 91 |  | 6.14 ± 0.40 | |

11. Anhang

| Eintrag | Struktur | IC ₅₀ [μM] | |
|---------|---|-----------------------|---------------|
| | | MAO A | MAO B |
| 32 |  | 7.25 ± 1.01 | 1.14 ± 0.09 |
| 33 |  | 18.5 ± 1.1 | |
| 86 |  | 20.1 ± 2.8 | 0.715 ± 0.058 |
| 44 |  | 34.1 ± 4.2 | 1.41 ± 0.10 |
| 87 |  | 40.1 ± 2.9 | |
| 75 |  | | 0.342 ± 0.170 |
| 96 |  | | 1.43 ± 0.16 |
| 141 |  | 0.231 ± 0.014 | 1.92 ± 0.10 |
| 106 |  | 0.438 ± 0.028 | 1.54 ± 0.24 |
| 196 |  | 0.532 ± 0.045 | 4.04 ± 0.41 |

11. Anhang

| Eintrag | Struktur | IC ₅₀ [μM] | |
|---------|----------|-----------------------|-------------|
| | | MAO A | MAO B |
| 100 | | 0.565 ± 0.032 | 3.94 ± 0.16 |
| 144 | | 0.624 ± 0.081 | |
| 188 | | 0.624 ± 0.034 | |
| 130 | | 0.713 ± 0.038 | |
| 145 | | 0.826 ± 0.040 | 1.50 ± 0.08 |
| 153 | | 0.850 ± 0.018 | 4.95 ± 0.14 |
| 150 | | 0.959 ± 0.103 | 1.42 ± 0.15 |
| 120 | | 0.972 ± 0.056 | 1.34 ± 0.07 |
| 157 | | 1.05 ± 0.07 | |
| 189 | | 1.06 ± 0.09 | |

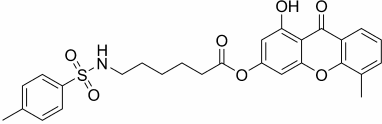
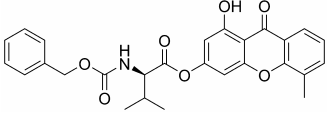
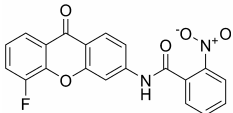
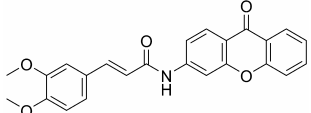
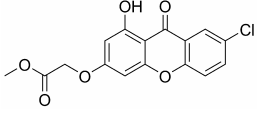
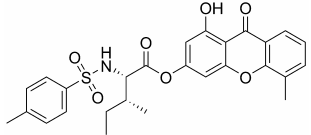
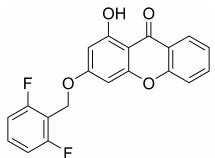
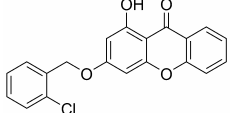
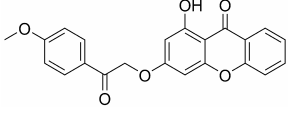
11. Anhang

| Eintrag | Struktur | IC ₅₀ [μM] | |
|---------|----------|-----------------------|---------------|
| | | MAO A | MAO B |
| 123 | | 1.07 ± 0.08 | 3.81 ± 1.19 |
| 166 | | 1.31 ± 0.24 | |
| 169 | | 1.41 ± 0.14 | |
| 176 | | 1.41 ± 0.06 | 1.75 ± 0.33 |
| 168 | | 2.09 ± 0.17 | 0.562 ± 0.088 |
| 191 | | 2.12 ± 0.18 | |
| 137 | | 2.42 ± 0.24 | 1.34 ± 0.08 |
| 160 | | 2.63 ± 0.35 | 15.6 ± 2.1 |
| 165 | | 2.73 ± 0.67 | |

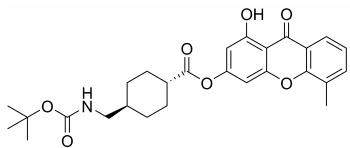
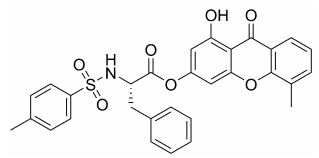
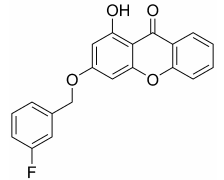
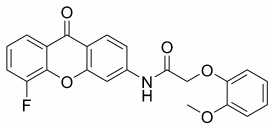
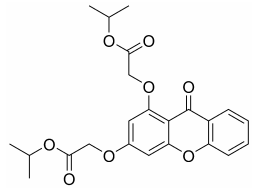
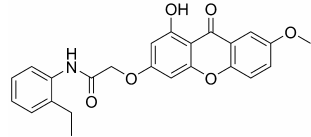
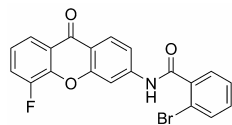
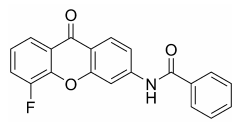
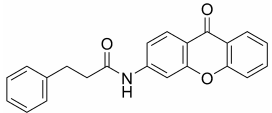
11. Anhang

| Eintrag | Struktur | IC ₅₀ [μM] | |
|---------|----------|-----------------------|---------------|
| | | MAO A | MAO B |
| 194 | | 2.85 ± 0.26 | 2.80 ± 0.18 |
| 108 | | 3.42 ± 0.26 | |
| 118 | | 3.49 ± 0.13 | |
| 181 | | 4.33 ± 0.32 | 4.87 ± 0.44 |
| 174 | | 5.04 ± 0.75 | 0.218 ± 0.035 |
| 197 | | 5.08 ± 0.48 | |
| 182 | | 5.16 ± 0.51 | |
| 171 | | 5.86 ± 0.35 | |
| 185 | | 7.44 ± 0.49 | |

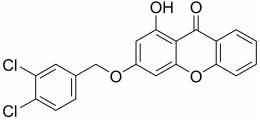
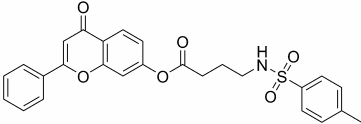
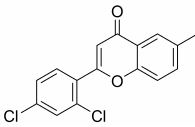
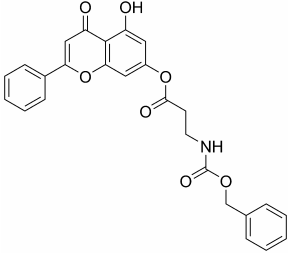
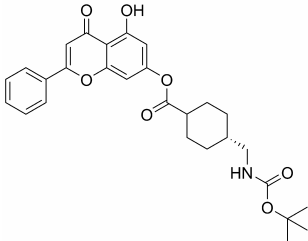
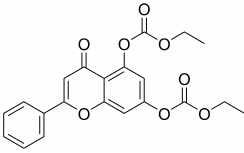
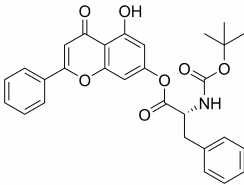
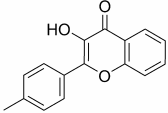
11. Anhang

| Eintrag | Struktur | IC ₅₀ [μM] | |
|---------|---|-----------------------|---------------|
| | | MAO A | MAO B |
| 132 |  | 6.99 ± 0.36 | |
| 117 |  | 9.81 ± 0.60 | |
| 101 |  | 10.4 ± 0.5 | |
| 102 |  | 12.5 ± 0.8 | |
| 113 |  | 14.5 ± 1.0 | 14.0 ± 1.6 |
| 128 |  | 15.3 ± 1.6 | 9.47 ± 1.89 |
| 164 |  | 18.1 ± 1.2 | |
| 112 |  | 19.9 ± 0.9 | 0.143 ± 0.008 |
| 458 |  | 21.3 ± 1.3 | |

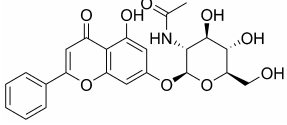
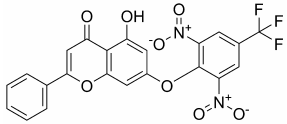
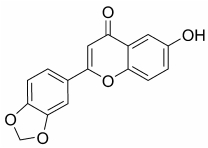
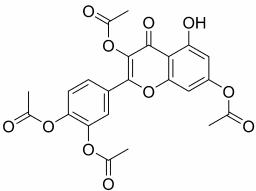
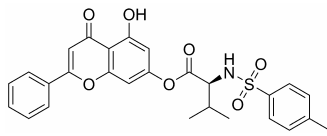
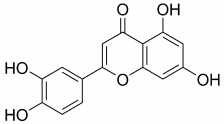
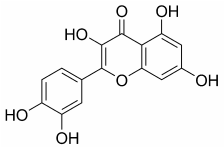
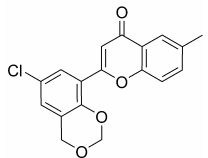
11. Anhang

| Eintrag | Struktur | IC ₅₀ [μM] | |
|---------|---|-----------------------|---------------|
| | | MAO A | MAO B |
| 121 |  | 22.4 ± 1.5 | |
| 146 |  | 22.6 ± 1.3 | |
| 175 |  | 24.6 ± 1.3 | 1.92 ± 0.16 |
| 179 |  | 32.8 ± 3.3 | |
| 159 |  | 83.6 ± 8.9 | |
| 110 |  | | 0.051 ± 0.002 |
| 154 |  | | 0.740 ± 0.054 |
| 131 |  | | 5.42 ± 0.87 |
| 151 |  | | 12.0 ± 1.3 |

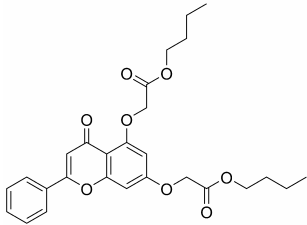
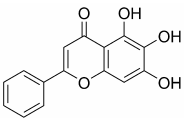
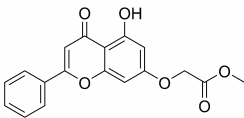
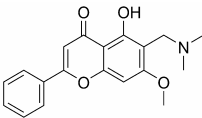
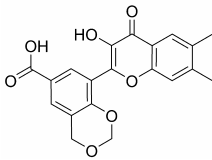
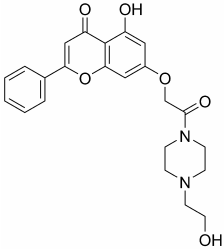
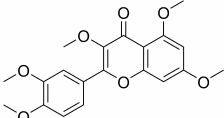
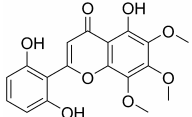
11. Anhang

| Eintrag | Struktur | IC ₅₀ [μM] | |
|---------|---|-----------------------|------------|
| | | MAO A | MAO B |
| 142 |  | | 17.4 ± 1.7 |
| 298 |  | 0.886 ± 0.053 | |
| 300 |  | 0.945 ± 0.068 | |
| 235 |  | 0.953 ± 0.047 | |
| 289 |  | 1.31 ± 0.07 | |
| 247 |  | 1.99 ± 0.10 | |
| 211 |  | 2.45 ± 0.06 | |
| 302 |  | 3.37 ± 0.45 | |

11. Anhang

| Eintrag | Struktur | IC ₅₀ [μM] | |
|---------|---|-----------------------|---------------|
| | | MAO A | MAO B |
| 217 |  | 3.91 ± 0.30 | 2.48 ± 0.36 |
| 213 |  | 4.17 ± 0.13 | |
| 274 |  | 4.29 ± 0.48 | 0.572 ± 0.059 |
| 205 |  | 4.89 ± 0.36 | |
| 276 |  | 7.57 ± 0.73 | |
| 435 |  | 7.72 ± 0.51 | 20.6 ± 2.3 |
| 206 |  | 8.01 ± 0.41 | |
| 292 |  | 10.3 ± 1.3 | |

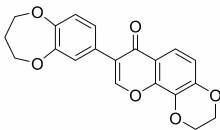
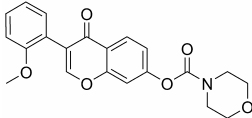
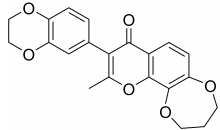
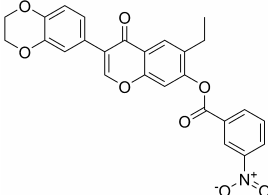
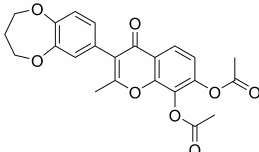
11. Anhang

| Eintrag | Struktur | IC ₅₀ [μM] | |
|---------|---|-----------------------|------------|
| | | MAO A | MAO B |
| 293 |  | 10.8 ± 1.1 | |
| 233 |  | 10.4 ± 0.3 | 22.1 ± 2.0 |
| 304 |  | 11.1 ± 0.9 | |
| 236 |  | 11.9 ± 0.7 | |
| 204 |  | 28.5 ± 2.6 | |
| 246 |  | 29.4 ± 2.3 | |
| 281 |  | 35.1 ± 1.8 | |
| 254 |  | 37.2 ± 5.5 | 26.7 ± 3.6 |

11. Anhang

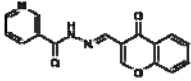
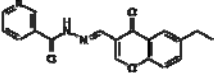
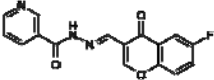
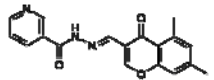
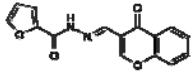
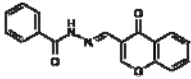
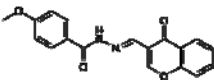
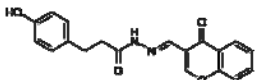
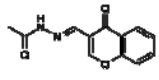
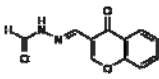
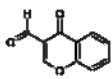
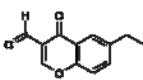
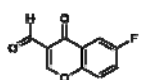
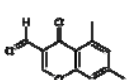
| Eintrag | Struktur | IC ₅₀ [μM] | |
|---------|----------|-----------------------|---------------|
| | | MAO A | MAO B |
| 222 | | | 15.1 ± 1.7 |
| 392 | | 1.79 ± 0.03 | |
| 419 | | 2.33 ± 0.24 | |
| 349 | | 2.86 ± 0.12 | |
| 429 | | 6.39 ± 0.60 | 7.51 ± 1.26 |
| 344 | | 9.88 ± 0.79 | |
| 368 | | 10.2 ± 1.03 | 0.865 ± 0.051 |
| 386 | | 39.2 ± 3.3 | |
| 397 | | | 0.304 ± 0.031 |

11. Anhang

| Eintrag | Struktur | IC ₅₀ [μM] | |
|---------|---|-----------------------|---------------|
| | | MAO A | MAO B |
| 351 |  | | 0.544 ± 0.057 |
| 343 |  | | 1.470 ± 0.177 |
| 425 |  | | 5.01 ± 0.85 |
| 339 |  | | 14.5 ± 0.9 |
| 434 |  | | 34.8 ± 2.2 |

11. Anhang

Anhang Tabelle 3: Von T. Berg *et al.* identifizierte Chromen-basierte STAT Inhibitoren.^[95]

| Eintrag | Struktur | App. IC ₅₀ [μM] | | |
|---------|---|----------------------------|----------|----------|
| | | STAT5b | STAT3 | STAT1 |
| 1 |  | 47 ± 17 | > 500 | > 500 |
| 2 |  | 53 ± 32 | 54 ± 8 | 52 ± 1 |
| 3 |  | 79 ± 20 | 159 ± 19 | 396 ± 84 |
| 4 |  | 217 ± 45 | 107 ± 9 | 162 ± 36 |
| 5 |  | 56 ± 10 | > 500 | > 500 |
| 6 |  | 53 ± 24 | 241 ± 55 | >500 |
| 7 |  | 64 ± 26 | 176 ± 22 | 351 ± 23 |
| 8 |  | 90 ± 30 | > 500 | > 500 |
| 9 |  | 86 ± 27 | 242 ± 43 | > 500 |
| 10 |  | 92 ± 13 | 343 ± 14 | > 500 |
| 11 |  | 15 ± 1 | 54 ± 7 | 69 ± 5 |
| 12 |  | 11 ± 2 | 20 ± 2 | 34 ± 5 |
| 13 |  | 22 ± 4 | 41 ± 11 | 64 ± 8 |
| 14 |  | 51 ± 10 | n.d. | n.d. |

Danksagung

Herrn Prof. Dr. Herbert Waldmann danke ich herzlich für die interessante Themenstellung, anregende Diskussionen und die Freiheit bei der Durchführung dieser Arbeit, sowie für die Bereitstellung hervorragender Arbeitsbedingungen.

Für viele hilfreiche und interessante Diskussionen danke ich Dr. Markus Kaiser. Außerdem danke ich allen, die zum Erfolg dieser Arbeit beigetragen haben. An dieser Stelle sollen insbesondere Dr. Samy Chammaa und Dr. Andrea Nören-Müller, Dr. Frank Dekker und Dr. Stefan Wetzel gedankt werden.

Ein herzlicher Dank gilt allen Mitarbeitern am Max-Planck-Institut für Molekulare Physiologie und an der Universität Dortmund, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Hervorzuheben sind hier Dr. Petra Janning und Andreas Brockmeyer für Hilfe in allen analytischen Fragestellungen, sowie Julia Schneider für ihre Hilfe im Labor.

Allen Mitarbeitern in der Abteilung Chemische Biologie am Max-Planck-Institut Dortmund möchte ich für die freundschaftlich-kollegiale Arbeitsatmosphäre danken. Dies gilt insbesondere für Dr. Robin Bon, Dr. Marion Müller, Tobias Zimmermann, Dr. Sebastian Koch, Dr. Tanja Knoth, Dr. Luc Eberhardt und Bernhard Ellinger, denen ich auch für viele Unternehmungen neben der Arbeit danke.

Ich danke ganz besonders meinen Eltern für die fortwährende Unterstützung während all der Jahre der Promotion und des Studiums.

Schließlich danke ich von ganzem Herzen Anke für ihre unendliche Geduld und liebevolle Unterstützung während der Anfertigung dieser Arbeit.

Lebenslauf

Persönliche Daten

| | |
|-----------------------|---------------------------|
| Name | Wolfram Wilk |
| Geburtsdatum und -ort | 25. März 1982, Düsseldorf |
| Familienstand | ledig |

Schulbildung

| | |
|-------------------|------------------------------|
| 08/1992 – 06/2001 | Nelly-Sachs-Gymnasium, Neuss |
| 06/2001 | Abitur |

Universitätsausbildung

| | |
|-------------------|---|
| 10/2001 – 09/2006 | Studiengang Chemie/Diplom, RWTH Aachen |
| 09/2003 | Vordiplom |
| 04/2002 – 09/2006 | Diplomarbeit, RWTH Aachen, Arbeitskreis Prof. Dr. D. Enders: „Organokatalysierte Dominoreaktionen“ |
| 09/2006 | Diplom |
| 12/2006 – 03/2010 | Doktorarbeit, Max-Planck-Institut für Molekulare Physiologie und Universität Dortmund, Arbeitskreis Prof. Dr. H. Waldmann: „Biologie-orientierte Synthese (BIOS) von naturstoffabgeleiteten Substanzbibliotheken und deren biologische Evaluierung“ |

Dortmund, März 2010.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und nur mit den angegebenen Hilfsmitteln angefertigt habe.

Dortmund, 02.03.2010

Wolfram Wilk

Hochsetzen in Literaturkapitel

- [1] M. A. Koch, L.-O. Wittenberg, S. Basu, D. A. Jeyaraj, E. Gourzoulidou, K. Reinecke, A. Odermatt, H. Waldmann, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, *101*, 16721-16726.
- [2] R. Balamurugan, F. J. Dekker, H. Waldmann, *Mol. Biosyst.* **2005**, *1*, 36-45.
- [3] B. M. McArdle, R. J. Quinn, *ChemBioChem* **2007**, *8*, 788-798.
- [4] T. Leßmann, H. Waldmann, *Chem. Commun.* **2006**, 3380-3389.
- [5] J. P. Nandy, M. Prakesch, S. Khadem, P. T. Reddy, U. Sharma, P. Arya, *Chem. Rev.* **2009**, *109*, 1999-2060.
- [6] P. Arya, R. Joseph, Z. Gan, B. Rakic, *Chem. Biol.* **2005**, *12*, 163-180.
- [7] M. Yoshida, C. Hedberg, M. Kaiser, H. Waldmann, *Chem. Commun.* **2009**, 2926-2928.
- [8] S. Wetzel, W. Wilk, S. Chammaa, B. Sperl, A. Roth, A. Yektaoglu, S. Renner, T. Berg, C. Arenz, A. Giannis, T. I. Oprea, D. Rauh, M. Kaiser, H. Waldmann, *Angew. Chem Int. Ed.* **2009**, abgeschickt.
- [9] W. Wilk, H. Waldmann, M. Kaiser, *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, *17*, 2304-2309.
- [10] D.R. Spring, *Chem. Soc. Rev.* **2005**, *34*, 472-482.
- [11] C. M. Dobson, *Nature* **2004**, *432*, 824-828.
- [12] R. S. Bohacek, C. McMartin, W. C. Guida, *Med. Res. Rev.* **1996**, *16*, 3-50.
- [13] C. A. Lipinski, C., A. Hopkins, *Nature* **2004**, *432*, 855-861.
- [14] M.D. Burke, S. L. Schreiber, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 46-58.
- [15] A. Nören-Müller, I. Reis-Correa Jr., H. Prinz, C. Rosenbaum, K. Saxena, H. J. Schwalbe, D. Vestweber, G. Cagna, S. Schunk, O. Schwarz, H. Schiewe, H. Waldmann, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2006**, *103*, 10606-10611.
- [16] S. Wetzel, K. Klein, S. Renner, D. Rauh, T. I. Oprea, P. Mutzel, H. Waldmann, *Nat. Chem. Biol.* **2009**, *5*, 581-583.
- [17] S. Renner, W. A. van Otterlo, M. Dominguez Seoane, S. Mocklinghoff, B. Hofmann, S. Wetzel, A. Schuffenhauer, P. Ertl, T. I. Oprea, D. Steinhilber, L. Brunsveld, D. Rauh, H. Waldmann, *Nat. Chem. Biol.* **2009**, *5*, 585-92.
- [18] G. M. Cragg, D. J. Newman, *Pure Appl. Chem.* **2005**, *77*, 7-24.
- [19] D. J. Newman, G. M. Cragg, *J. Nat. Prod.* **2007**, *70*, 461-477.
- [20] B. M. Gallagher Jr., *Curr. Med. Chem.* **2007**, *14*, 2959-2967.
- [21] J. M. Smith, *Nature* **1970**, *225*, 563-564.
- [22] H. M. Wilks, A. Cortes, D. C. Emery, D. J. Halsall, A. R. Clarke, J. J. Holbrook, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1992**, *672*, 80-93.
- [23] R. B. Russell, P. D. M. Sasieni, J. E. Sternberg, *J. Mol. Biol.* **1998**, *282*, 903-918.
- [24] M. Kaiser, S. Wetzel, K. Kumar, H. Waldmann, *Cell. Mol. Life Sci.* **2008**, *65*, 1186-1201.
- [25] M. A. Koch, A. Schuffenhauer, M. Scheck, S. Wetzel, M. Casaulta, A. Odermatt, P. Ertl, H. Waldmann, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, *102*, 17272-17277.
- [26] F. J. Dekker, M. A. Koch, H. Waldmann, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2005**, *9*, 232-239.
- [27] O. Barun, K. Kumar, S. Sommer, A. Langerak, T. U. Mayer, O. Muller, O. H. Waldmann, *Eur. J. Org. Chem.* **2005**, 4773-4788.

- [28] T. Leßmann, M. G. Leuenberger, S. Menninger, M. Lopez-Canet, O. Müller, S. Hümmer, J. Bormann, K. Korn, E. Fava, M. Zerial, T. U. Mayer, H. Waldmann, *Chem. Biol.* **2007**, *14*, 443-451.
- [29] L. Bialy, H. Waldmann. *Chem. Eur. J.* **2004**, *10*, 2759-2780.
- [30] J. D. Umarye, T. Lessmann, A. B. Garcia, V. Mamane, S. Sommer, H. Waldmann, *Chem. Eur. J.* **2007**, *13*, 3305-3319.
- [31] B. Meseguer, D. Alonso-Diaz, N. Griebenow, T. Herget, H. Waldmann, *Angew. Chem. Int. Ed* **1999**, *38*, 2902-2906.
- [32] B. Meseguer, D. Alonso-Diaz, N. Griebenow, T. Herget, H. Waldmann, *Chem. Eur. J.* **2000**, *6*, 3943-3957.
- [33] C. Rosenbaum, P. Baumhof, R. Mazitschek, O. Muller, A. Giannis, H. Waldmann, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**; *43*, 224-228.
- [34] I. Reis-Corrêa Jr., A. Nören-Müller, H.-D. Ambrosi, S. Jakupovic, K. Saxena, H. Schwalbe, M. Kaiser, H. Waldmann, *Chem. Asian J.* **2007**, *2*, 1109-1126.
- [35] A. Nören-Müller, W. Wilk, K. Saxena, H. Schwalbe, M. Kaiser, H. Waldmann, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 5973-5977.
- [36] W. Wilk, A. Nören-Müller, M. Kaiser, H. Waldmann, *Chem. Eur. J.* **2009**, *15*, 11976-11984.
- [37] D. Brohm, S. Metzger, A. Bhargava, O. Muller, F. Lieb, H. Waldmann, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 307-311.
- [38] L. Holm, C. Sander, *Nucleic Acids Res* **1994**, *22*, 3600-3609.
- [39] I. N. Shindyalov, P. E. Bourne, *Protein Eng* **1998**, *11*, 739-47
- [40] unveröffentlichte Arbeiten von Dr. S. Wetzel.
- [41] M. Scheck, M. A. Koch, H. Waldmann, *Tetrahedron* **2008**, *64*, 4792-4802.
- [42] M. Eguchi, *Med. Res. Rev.* **2003**, *24*, 182-212.
- [43] A. Schuffenhauer, P. Ertl, S. Roggo, S. Wetzel, M. A. Koch, H. Waldmann, *J. Chem. Inf. Model* **2007**, *47*, 47-58.
- [44] D. J. Newman, G. M. Cragg, *Journal of Natural Products* **2007**, *70*, 461-477.
- [45] O. Schwarz, S. Jakupovic, H.-D. Ambrosi, L. O. Haustedt, C. Mang, L. Mueller-Kuhrt, *Journal of Combinatorial Chemistry* **2007**, *9*, 1104-1113.
- [46] D. S. Tan, *Chemical Biology* **2007**, *2*, 483-518.
- [47] J. Larsson, J. Gottfries, L. Bohlin, A. Backlund, *J. Nat. Prod.* **2005**, *68*, 985-991.
- [48] J. Rosen, L. Rickardson, A. Backlund, J. Gullbo, L. Bohlin, R. Larsson, J. Gottfries, *QSAR Comb. Sci.* **2009**, *28*, 436-446
- [49] S. Wetzel, *Dissertation*, TU Dortmund **2009**.
- [50] *Dictionary of Natural Products, v17.2* **2008**, Chapman & Hall / CRC Informa, <http://www.crcpress.com/>.
- [51] M. Olah, M. Mracec, L. Ostopovici, R. Rad, A. Bora, N. Hadaruga, I. Olah, M. Banda, Z. Simon, M. Mracec, T. I. Oprea, *WOMBAT: world of molecular bioactivity*, Vol. 23, Wiley-VCH, **2005**.

- [52] M. Olah, R. Rad, L. Ostopovici, A. Bora, N. Hadaruga, D. Hadaruga, R. Moldovan, A. Fulias, M. Mracec, T. I. Oprea, *Chemical Biology* **2007**, *2*, 760-786.
- [53] A. K. Ghose, V. N. Viswanadhan, J. J. Wendoloski, *J. Phys. Chem. A* **1998**, *102*, 3762-3772.
- [54] C. A. Lipinski, F. Lombardo, B. W. Dominy, P. J. Feeney, *Adv. Drug Delivery Rev.* **2001**, *46*, 3-26.
- [55] S. Muresan, J. Sadowski, *Methods and Principles in Medicinal Chemistry* **2008**, *37*, 441-461.
- [56] G. M. Rishton, *Drug Discovery Today* **2002**, *8*, 86-96.
- [57] T. I. Oprea, A. M. Davis, S. J. Teague, P. D. Leeson, *J. Chem. Inf. Model.* **2001**, *41*, 1308-1315.
- [58] F. W. Sertürner, *Ann. Phys.* **1817**, *55*, 56-90.
- [59] F. W. Sertürner, *Ann. Chim.* **1817**, *5*, 21-42.
- [60] F. W. Sertürner, *J. Pharmacie* **1805**, *13*, 234-236.
- [61] F. W. Sertürner, *J. Pharmacie* **1806**, *14*, 47-93.
- [62] R. R. Vardaro, V. Di Marzo, A. Crispino and G. Cimino, *Tetrahedron* **1991**, *47*, 5569-5576.
- [63] V. Di Marzo, R. R. Vardaro, L. De Petrocellis, G. Villani, R. Minei, G. Cimino, *Experientia*, **1991**, *47*, 1221-1227.
- [64] J. E. Moses, J. E. Baldwin and R. M. Adlington, *Tetrahedron Lett.*, **2004**, *45*, 6447-6448.
- [65] G. X. Liang, A. K. Miller and D. Trauner, *Org. Lett.* **2005**, *7*, 819-821.
- [66] B. E. Marynoff, A. B. Reitz *Chem. Rev.* **1989**, *89*, 863-927.
- [67] L. M. Gayo, M. J. Suto *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 513-516,
- [68] V. vanRheenen, R. C. Kelly, D. Y. Cha *Tetrahedron Lett.* **1976**, *17*, 1973-1976
- [69] N. K. Jana, J. G. Verkade, *Org. Lett.*, **2003**, *5*, 3787-3790.
- [70] M. Bortolato, K. Chen, J. C. Shih, *Adv. Drug Delivery Rev.* **2008**, *60*, 1527-1533.
- [71] R. J. Ward, F. Lallemant, P. de Witte, D. T. Dexter, *Prog. Neurobiol.* **2008**, *85*, 135-147.
- [72] M. B. H. Youdim, D. Edmondson, K. F. Tipton, *Nat. Rev. Neurosci.* **2006**, *7*, 295-309.
- [73] Bolasco, A.; Fioravanti, R.; Carradori, S., *Expert Opin. Therapeutic Patents* **2005**, *15*, 1763-1782.
- [74] C. P. Lim, X. Cao, *Mol. BioSys.* **2006**, *2*, 536-550.
- [75] T. Berg, *Chem. Bio. Chem.* **2008**, *9*, 2039-44.
- [76] S. Fletcher, J. Turkson, P. T. Gunning, *Chem. Med. Chem.* **2008**, *3*, 1159-1168.
- [77] R. Buettner, M. Kortylewski, D. Pardoll, H. Yu, R. Jove, *STAT proteins as molecular targets for cancer therapy. In: Signal Transducers and Activators of Transcription (STATs) Activation and Biology*, P. B. Sehgal, D. E. Levy, T., Eds., Kluwer Academic Publishers: Norwell, USA, **2003**, 645-661.
- [78] L. Costantino, D. Barlocco, *Curr. Med. Chem.* **2008**, *15*, 834-843.
- [79] Z. Chen, Z. C. Han, *Medicinal Research Reviews* **2008**, *28*, 185-200.
- [80] N. Marchesini, Y. A. Hannun, *Biochem. Cell Biol.* **2004**, *82*, 27-44.

- [81] K. Trajkovic, C. Hsu, S. Chiantia, L. Rajendran, D. Wenzel, F. Wieland, P. Schwille, B. Brugger, M. Simons, *Science* **2008**, *319*, 1244-1247.
- [82] J. Buigues, J. Vallejo *The Journal of clinical psychiatry* **1987**, *48*, 55-59.
- [83] T. L. Lemke, D. A. Williams, *Foye's principles of medicinal chemistry*. (6th Ed.) V. Roche, S. W. Zito, Eds., Lippincott Williams & Wilkins: Philadelphia, USA, **2008**, 1377 ff.
- [84] K. R. Bonson, M. Baggott., *Handbook of neurotoxicology*. E. J. Massaro Ed., Humana Press: Totowa, USA, **2002**, 237.
- [85] P. Riederer, L. Lachenmayer, G. Laux, *Curr. Med. Chem.* **2004**, *11*, 2033–2043.
- [86] C. Binda, F. Hubálek, M. Li, Y. Herzig, J. Sterling, D. E. Edmondson, A. Mattevi, *Journal of medicinal chemistry* **2005**, *48*, 8148-8154.
- [87] S. Henriot, C. Kuhn, R. Kettler, M. Da Prada *J Neural Transm Suppl.* **1994**, *41*, 321-325.
- [88] L. Novaroli, M. Reist, E. Favre, A. Carotti, M. Catto, P.-A. Carrupt, *Bioorg. Med. Chem.* **2005**, *13*, 6212-6217.
- [89] M. Verleyea, R. Steinschneider, F. X. Bernard, J.-M. Gillardina, *Brain Research* **2007**, *1138*, 30-38.
- [90] A. M. Cesura, M. D. Galva, R. Imhof, E. Kyburz, G. B. Picotti, M. Da Prada, *Eur. J. Pharmacol.* **1989**, *162*, 457-465.
- [91] G. P. McGlacken, I. J. S. Fairlamb, *Nat.Prod.Rep.* **2005**, *22*, 369–385.
- [92] A. Carcereri de Prati, A. R. Ciampa, E. Cavaliere, R. Zaffini, E. Darra, M. Menegazzi, H. Suzuki, S. Mariotto, *Current Medicinal Chemistry* **2005**, *12*, 1819-1828.
- [93] D. C.Fry, L. T.Vassilev, *J Mol Med* **2005**, *83*, 955-63.
- [94] L. L.Conte, C. Chothia, J. Janin, *J. Mol. Biol.* **1999**, *285*, 2177-2198.
- [95] J. Mueller, B. Sperl; W. Reindl, A. Kiessling, T. Berg, *ChemBioChem* **2008**, *9*, 723-727.
- [96] J. Schust, B. Sperl, A. Hollis, T. U. Mayer, T. Berg, *Chem. Biol.* **2006**, *13*, 1235-1242.
- [97] J. Schust, *Dissertation*, Julian-Maximilians-Universität Würzburg **2006**.
- [98] E. Fasler-Kann, A. Pansky, M. Wiederkehr, M. Battegay, M. H. Heim, *Eur. J. Biochem.* **1998**, *254*, 514-519.
- [99] E. H. Schuchman, R. J. Desnick, *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*, C. R. Scriver, W. S. Sly, B. Childs, A. L. Beaudet, D. Valle, K. W. Kinzler, B. Vogelstein, Eds., McGraw Hill: New York, **2001**, 3589-3610.
- [100] R. Goggel, S. Winoto-Morbach, G. Vielhaber, Y. Imai, K. Lindner, L. Brade, H. Brade, S. Ehlers, A. S. Slutsky, S. Schutze, E. Gulbins, S. Uhlig, S. *Nat. Med.* **2004**, *10*, 155-160.
- [101] I. Petrache, V. Natarajan, L. Zhen, T. R. Medler, A. T. Richter, C. Cho, W. C. Hubbard, E. V. Berdyshev, R. M. Tuder, *Nat. Med.* **2005**, *11*, 491-498.
- [102] M. Kolzer, C. Arenz, K. Ferlinz, N. Werth, H. Schulze, R. Klingenstein, K. Sandhoff, *Biol. Chem.* **2003**, *384*, 1293-1298.
- [103] A. G. Roth, D. Drescher, Y. Yang, S. Redmer, S. Uhlig, C. Arenz, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2009**, *48*, 7560-7563.

- [104] M. Hamada, K. Iikubo, Y. Ishikawa, A. Ikeda, K. Umezawa, S. Nishiyama, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2003**, *13*, 3151-3153.
- [105] C. Okudaira, Y. Ikeda, S. Kondo, S. Furuya, Y. Hirabayashi, T. Koyano, Y. Saito, K. Umezawa, *Journal of Enzyme Inhibition* **2000**, *15*, 129-138.
- [106] M. Marsh, G. van Meer, *Science* **2008**, *319*, 1191-1192.
- [107] C. Arenz, A. Giannis, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2000**, *39*, 1440-1442.
- [108] F. Nara, M. Tanaka, T. Hosoya, K. Suzuki-Konagai, T. Ogita, *J. Antibiot.* **1999**, *52*, 525-530.
- [109] R. Uchida, H. Tomoda, Y. Dong, S. Omura, *J. Antibiot.* **1999**, *52*, 572-574.
- [110] V. Wascholowski, A. Giannis, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2006**, *45*, 827-30.
- [111] M. Tanaka, F. Nara, K. Suzuki-Konagai, T. Hosoya, T. Ogita, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 7871-7872.
- [112] F. Nara, M. Tanaka, T. Hosoya, K. Suzuki-Konagai, T. Ogita, *J. Antibiot.* **1999**, *52*, 525-530.
- [113] Y. Shi, F. Lan, C. Matson, P. Mulligan, J. R. Whetstone, P. A. Cole, R. A. Casero, Y. Shi, *Cell* **2004**, *119*, 941-953.
- [114] L. Holm, C. Sander, *Nucleic Acids Res.* **1994**, *17*, 3600-3609. Der Dali Webserver kann über die folgende Internetadresse erreicht werden: http://ekhidna.biocenter.helsinki.fi/dali_server.
- [115] Y. Huang, E. Greene, T. M. Stewart, A. C. Goodwin, P. M. Baylin, R. A. Casero Jr, *Proc. Natl. Acad. Sci USA* **2007**, *104*, 8023-8028.
- [116] M. G. Lee, C. Wynder, D. M. Schmidt, D. G. McCafferty, R. Shiekhattar *Chem Biol* **2006**, *13*, 563-567
- [117] D. M. Schmidt, D. G. McCafferty, *Biochemistry* **2007**, *46*, 4408-4416.
- [118] M. Yang, J. C. Culhane, L. M. Szewczuk, P. Jalili, H. L. Ball, M. Machius, P. A. Cole, H. Yu *Biochemistry* **2007**, *46*, 8058-8065.
- [119] R. Ueda, T. Suzuki, K. Mino, H. Tsumoto, H. Nakagawa, M. Hasegawa, R. Sasaki, T. Mizukami, N. Miyata, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 17536-17537.
- [120] I. V. Tetko, V. Y. Tanchuk, T. N. Kasheva, A. E. Villa, *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* **2001**, *41*, 1488-93.
- [121] P. Ertl, B. Rohde, P. Selzer, *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 3714-3717.
- [122] Y. Liu, Y. Lu, M. Prashad, O. Repic, T. J. Blacklock, *Adv. Synth. Catal.* **2005**, *347*, 217-219.
- [123] R. Pflantz, J. Christoffers, *Chem. Eur. J.* **2009**, *15*, 2200-2209.
- [124] J. DeRuiter, B. E. Swearingen, V. Wandrekar, C. A. Mayfield, *J. Med. Chem.* **1989**, *32*, 1033-1038.
- [125] E. A. Wydysh, S. M. Medghalchi, A. Vadlamudi, C. A. Townsend, *J. Med. Chem.* **2009**, *52*, 3317-3327.
- [126] S. Sato, T. Sakamoto, E. Miyazawa, Y. Kikugawa, *Tetrahedron* **2004**, 7899-7906.

- [127] I. Reis-Corrêa Jr., A. Nören-Müller, H.-D. Ambrosi, S. Jakupovic, K. Saxena, H. Schwalbe, M. Kaiser, H. Waldmann, *Chem. Asian J.* **2007**, *2*, 1109-1126.
- [128] D. Butler, *Nature* **2000**, *406*, 670-672.
- [129] R. Singh, V. Rao, H. Shakila, R. Gupta, A. Khera, N. Dhar, A. Singh, A. Koul, Y. Singh, M. Naseema, R. P. Narayanan, C. N. Paramasivan, V. D. Ramanathan, A. K. Tyagi, *Mol. Microbiol.* **2003**, *50*, 751-762.
- [130] L. Bialy, H. Waldmann, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 3814-3839.
- [131] M. B. Soellner, K. A. Rawls, C. Grundner, T. Alber, J. A. Ellman, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 9613-9615.
- [132] C. Grundner, D. Perrin, R. H van Huijsduijnen, D. Swinnen, J. Gonzales, C. L. Gee, T. N. Wells, T. Alber, *Structure* **2007**, *15*, 499-509.
- [133] A. Koul, T. Herget, B. Klebl, A. Ullrich, *Nat. Rev. Microbiol.* **2004**, *2*, 189-202.
- [134] T. Weide, L. Arve, H. Prinz, H. Waldmann, H. Kessler, *Bio. Med. Chem. Lett.* **2006**, *16*, 59-63
- [135] N. J. Beresford, D. Mulhearn, B. Szczepankiewicz, G. Liu, M. E. Johnson, A. Fordham-Skelton, C. Abad-Zapatero, J. S. Cavet, L. Taberero, *J. Antimicrob. Chemother.* **2009**, *63*, 928-936.
- [136] S. Zhao, X. Liao, T. Wang, J. Flippen-Anderson, J. M. Cook, *J. Org. Chem.* **2003**, *68*, 6279-6295.
- [137] P. Yu, T. Wang, J. M. Cook, *J. Org. Chem.* **2000**, *65*, 3173-3191.
- [138] J. Li, T. Wang, P. Yu, A. Peterson, R. Weber, D. Soerens, D. Grubisha, D. Bennett, J. M. Cook, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 6998-7010.
- [139] E. D. Cox, L. D. Hamaker, J. L. Peng Yu, K. M. Czerwinski, L. Deng, D. W. Berrett, J. M. Cook, *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 44-61.
- [140] E. D. Cox, J. M. Cook, *Chem. Rev.* **1995**, *95*, 1797-1842.
- [141] T. E. Nielson, F. Diness, M. Meldal, *Curr. Opin. Drug Discov. Dev.* **2003**, *6*, 801-814.
- [142] S. Hotha, J. C. Yarrow, J. G. Yang, S. Garrett, K. V. Rendchintala, T. U. Mayer, T. M. Kapoor, *Angew. Chem.* **2003**, *115*, 2481-2484, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 2379-2382.
- [143] Z.-Y. Zhang, S. Y. Lee, *Expert Opin. Investigat. Drugs* **2003**, *12*, 223-233.
- [144] S. Zhang, Z.-Y. Zhang, *Drug Discov. Today* **2007**, *12*, 373-381.
- [145] A. Nören-Müller, *Dissertation*, Technische Universität Dortmund **2008**.
- [146] M. Dixon, E. C. Webb, *Enzymes* **1979**, 3rd Edition, Longman, London, 340ff.
- [147] S. Carney, *Drug Discov. Today* **2005**, *10*, 1011-1013.